

Université Constantine1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Ecologie Végétale

N° d'ordre : 67/DS/2014/

N° de série : 05/B.Eco/2014/

Thèse

Présentée à l'Université Constantine1 pour l'obtention du Diplôme de

Doctorat en Sciences

Spécialité : Biotechnologies Végétales.

Soutenue publiquement par

BOUAZZA LYAS

**Etude de la valeur nutritive de légumineuses
arbustives du genre *Acacia*. Effets spécifiques de
leurs hautes teneurs en tannins condensés sur la
méthanogénèse ruminale d'ovins.**

Soutenue le 17 Juin 2014

Devant le Jury :

Présidente : Mme.MERAIHI ZAHIA.

Professeur à l'université Constantine1

Rapporteur : M.BOUSSEBOUA HACENE

Professeur à l'université Constantine1

Examineurs : M.NIAR ABDELLATIF

Professeur à l'université de Tiaret

Mme.AOUN LEILA

Professeur à l'université d'El Tarf

M.NANCIB NABIL

Professeur à l'université Ferhat Abbès/Sétif

M.HAMIDECHI M^{ed} ABDELHAFID

Professeur à l'université Constantine1

Résumé

Cette thèse est focalisée sur l'étude de l'effet de fourrages riches en tanin condensés, des Acacias collectés de plusieurs régions d'Algérie, sur le microbiote ruminal des ovins.

La composition chimique des feuilles de neuf plantes, dont cinq Acacias (*A.nilotica*, *A.horrída*, *A.albida*, *A.julibrissin*, *A.cyanophylla*, *A.halimus*, *Vicia faba*, *A. herba alba* et *P.granatum*), sont effectuées selon les procédés standards. Les résultats de ces analyses montrent des différences significatives ($p<0,05$) entre ces espèces. Les légumineuses arbustives présentent l'avantage d'être riches en Protéines Brutes avec des valeurs variant de 156,6 à 252,0 (g/kg MS), et l'inconvénient, pour certaines, d'être riches en ADL (facteur antinutritionnel) avec des valeurs enregistrées chez *A.nilotica*, *A.albida* et *A.cyanophylla* de 126 ; 139,7 et 147,5 (g/kg MS), respectivement.

Les Acacias présentent les taux les plus élevés en Polyphénols, essentiellement en tanins condensés. Nos résultats sont comparables à ceux publiés par plusieurs auteurs. L'étude de l'activité biologique de ces tannins, en utilisant le PolyÉthylèneGlycol couplé à la technique de production de gaz, montre que seuls les tannins condensés de *A.cyanophylla* et *A.nilotica* sont significativement actifs ($p<0,05$). Ceci conforte les résultats d'autres études montrant les effets antagonistes des Tanins Condensés.

La digestibilité, selon deux approches, *in vivo* (*in sacco*) et *in vitro* (selon Tilley et Terry), est testée en donnant des taux relativement acceptables pour ces ligneux. *A. Albida*, malgré sa faible teneur en TC, et en ADL montre des taux de digestibilité relativement faibles.

L'effet de ces substrats sur le microbiote ruminale de deux races différentes, Shurra et Merinos, donne des résultats significativement différents ($p<0,05$) pour *A.cyanophylla* et *A.nilotica*, seulement.

L'impact des composés secondaires des Acacias étudiés sur la réduction de la production de méthane est tangible. L'analyse de la quantité de méthane produite, en présence et en absence de PEG, montre des différences significatives ($p<0,05$) pour toutes les Acacias utilisés. Les Tanins Condensés de ces fabacées ont un effet négatif sur la méthanogenèse ruminale. Ce qui recommanderait l'utilisation des Acacias pour réduire les pertes en azote et par ricochet juguler les effets néfastes des éructations de CH₄ sur l'environnement.

Mots clés : Acacia, Ovin, Production de gaz, Tannin Condensé, PEG, Méthane.

Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés en leur totalité au niveau du laboratoire de nutrition animale, Département de Production animale, Institut Vétérinaire de l'université de Léon en Espagne.

La réalisation de cette thèse n'aurait pas été possible sans la collaboration du Ministère de la de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique. Je tiens à remercier particulièrement l'Etat algérien pour son soutien financier et son aide à la réalisation de ce travail.

Je remercie Monsieur Secundino Lopez, Professeur et Directeur du Laboratoire de production animale de l'université à Léon, de m'avoir accueilli et permis la réalisation de ce travail dans son laboratoire. Merci pour ses contributions et ses efforts, consentis lors de la rédaction des articles et communications.

Je suis très honoré et je tiens à remercier Madame Meraihi Z., Professeur à l'université Constantine 1, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Je tiens également à remercier les membres du jury, Madame Aoun L., Professeur à l'université d'El Tarf. Messieurs les Professeurs Niar A., Professeur à l'université de Tiaret; Hamidechi M.A., Professeur à l'université Constantine1 et Nancib N., Professeur à l'université Ferhat Abbès de Sétif d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie aussi chaleureusement l'ensemble du personnel du Laboratoire de nutrition animale de l'université de Léon en Espagne pour leur aide et leur disponibilité. Merci à Maria, Eva , Edenne et particulièrement à Raul Bodas .

Je remercie également le personnel administratif toujours prêt à rendre service et particulièrement Maria la secrétaire du laboratoire, sans oublier le « hola chicos » de la gentille, Dr.Ranilla, qui atténuait, un tant soit peu, mon dépaysement durant les moments de solitudes. Je tiens à leur présenter à toutes et à tous mes sincères remerciements.

Je remercie chaleureusement M.Ghodbane Mouloud et M.Medjkel Samir de m'avoir accompagné lors de la collecte des échantillons dans la steppe, dans les wilayas de Djelfa et M'sila, leur compagnie m'a été très bénéfique. Sans oublier de remercier M.Baaziz Karim qui m'a conduit avec lui dans la wilaya d'El Oued, ce qui m'a permis de procéder à quelques collectes de plantes sahariennes.

En dernier je dois aussi remercier la Segnora Marisa Gonzales, notre locatrice, d'avoir accepté de partager avec nous son duplex royal ainsi que pour son humanisme et sa grande patience lors de la préparation des repas copieux (Mziyet, couscous, poulet roti, pizza, pain maison...) préparés par le «chef» en cuisine, mon ami Mr.Boufennara souhil. Je tiens à remercier Souhil pour son aide et sa précieuse contribution lors des calculs et ses précieuses connaissances en chimie.

Je dédie cette thèse de Doctorat à ma mère. Pour ses sacrifices et sa grande patience ce qui m'a permis de gravir les estrades de la réussite.

A la mémoire de mon père Ahmed, parti à la fleur de l'âge.

Liste des figures

Numéro	Intitulé	Page
Figure 1	Diagramme du rumen des ovins	4
Figure 2	Vue de différentes bactéries pénétrant dans une particule végétale en cours de digestion dans le rumen.	8
Figure 3	Hydrolyse et fermentation microbienne des aliments dans le rumen	10
Figure 4	Schéma de la dégradation et de l'utilisation des matières azotées dans le rumen chez le ruminant	13
Figure 5	Les différents glucides végétaux	19
Figure 6	Voies du métabolisme des glucides dans le rumen	21
Figure 7	Incubation de papier dans une suspension de bactéries et de protozoaires ruminales	23
Figure 8	Structure des Tannins hydrolysables	29
Figure 9	Structure chimique de base des flavonoïdes	30
Figure 10	Structure chimique du flavan-3-ols	30
Figure 11	Structure des tannins condensés	32
Figure 12	Structure chimique du dimère A2 (procyanidol)	32
Figure 13	Etapas de la biosynthèse des tannins condensés	33
Figure 14	Micrographie montrant les TCs fixés à l'osmium (taches noires) d'une foliole de Sainfoin (<i>Onobrychis vicifolia</i> Scop.)	39
Figure 15	Sacs en nylon pour l'étude de la digestibilité <i>in sacco</i>	67
Figure 16	Teneur en PB (g/kg MS) des espèces étudiées	71
Figure 17	Teneur en composants pariétaux en fonction de l'espèce végétale	74
Figure 18	Teneur en hémicellulose et cellulose en fonction de l'espèce végétale	75
Figure 19	Concentration en Polyphénols des espèces fourragères étudiées	77
Figure 20	Ratio (+PEG/-PEG) mesurant l'activité biologique des tanins	81
Figure 21	Digestibilités des fourrages (g/g MS) selon la méthode de Tilley et Terry	85
Figure 22	Evolution de la disparition, <i>in sacco</i> , de la matière sèche des substrats récoltés	87
Figure 23	Comparaison entre la digestibilité <i>In sacco</i> et la digestibilité de Tilley et Terry (p<0.05)	90
Figure 24	Relation entre la composition en ADL et la digestibilité de la matière sèche	91
Figure 25	Relation entre les composants pariétaux et la digestibilité de la NDF	94
Figure 26	Schéma représentant la complexation/dissociation des tannins condensés (TCs) avec les protéines alimentaires	98
Figure 27	Cinétique de production de gaz (ml / g MS) des fourrages collectés	100
Figure 28	Effet du Polyéthylène Glycol sur la production de gaz chez <i>A.nilotica</i> et <i>A.cyanophylla</i>	109
Figure 29	Production de gaz à 24h d'incubation par le microbiote des races Assaf et Mérinos	115
Figure 30	Gaz total produit (mmol/g MS) en absence et en présence de PEG	124
Figure 31	Production de CO ₂ et de CH ₄ (mmol/g MS) en Présence et en absence de PEG	125
Figure 32	Relation entre la production de CO ₂ et les Tanins Condensés	126
Figure 33	Relation entre la production de Méthane et les Tanins Condensés	126

Liste des tableaux

Numéro	Intitulé	Page
Tableau 1:	Les différentes classes de polymères dérivant des flavan-3-ols	31
Tableau 2 :	Effets des TCs sur la nutrition des petits ruminants.	42
Tableau 3 :	Composition du milieu de culture	56
Tableau 4 :	Composition de la solution étalon pour le dosage des PolyPhénols	57
Tableau 5 :	Préparation de la salive artificielle	61
Tableau 6 :	Composition de la salive artificielle	61
Tableau 7 :	Composition chimiques (g/kg MS) des plantes fourragères collectées	70
Tableau 8 :	Composition en Polyphénols (g/kg MS) et activité biologique des tanins	76
Tableau 9 :	Digestibilité <i>in vitro</i> de la matière sèche (g /g MS) selon Tilley et Terry	84
Tableau 10:	Cinétique de dégradation <i>in sacco</i> de la matière sèche (g/ g MS) des fourrages	86
Tableau 11:	Corrélation entre les digestibilités <i>in vitro</i> et <i>in sacco</i> de la matière sèche	89
Tableau 12 :	Corrélation entre la digestibilité <i>in vitro</i> , <i>in sacco</i> et la composition chimique	92
Tableau 13 :	Dégradation <i>in sacco</i> de la fraction NDF (g/ g MS) des fourrages collectés.	93
Tableau 14 :	Cinétique de la dégradation <i>in sacco</i> de la matière azotée	97
Tableau 15:	Production de gaz cumulative en (ml/g MS) des fourrages étudiés	99
Tableau 16:	Paramètres cinétiques de la fermentation des fourrages étudiés	102
Tableau 17:	Coefficients de corrélation entre la production de gaz et la composition chimique des fourrages collectés.	106
Tableau 18 :	Coefficient de corrélation entre la composition chimique et les paramètres cinétique de la production de gaz	107
Tableau 19:	Effet du PEG sur la digestibilité (apparente et réelle) et la production de gaz après 48 h d'incubation des fourrages collectés	112
Tableau 20 :	Effet du PEG sur les paramètres cinétiques de production de gaz des fourrages étudiés	113
Tableau 21 :	Différences observées dans la production de gaz entre deux races ovines	114
Tableau 22 :	Effet du PEG sur la DMO24 et l'Energie Métabolisable des fourrages collectés	117
Tableau 23 :	Données de la littérature sur la DMO24 et la ME des Acacias	118
Tableau 24 :	Production des AGV, facteur de partition et biomasse bactérienne	120
Tableau 25 :	Stœchiométrie de la production des gaz <i>in vitro</i> (mmol/g MS) en présence et en absence du PEG	123
Tableau 26 :	Produits terminaux de digestion microbienne des glucides chez le ruminant	127

Liste des abréviations

A : Asymptotique de Production de gaz	ml/g MS
AA : Acide Aminé	
AM : Augmentation de méthane	%
ADF : Acid Detergent Fibre	% MS
ADL : Acid Detergent Lignin	% MS
ADS : Acid Detergent Solution	g / ml
AIVD : Apparent <i>in vitro</i> Digestibility	g/g MS
AGV : Acide Gras Volatils	mmol/ g MS
c : vitesse de la dégradation	h ⁻¹
PB : Proteines Brutes	% MS
DM : Dry Matter	%
D144 : Disparition de la matière sèche après 144 heures	g/g MS
ED : Dégradabilité Effective	g/g MS
G24 : Production de gaz cumulative à 24 heures	ml/g MS
GT : Gaz total	MI
IVD-TT : <i>in vitro</i> Digestibility of Tilley and Terry	g/g MS
IVOMD : Digestibilité <i>in vitro</i> de la matière organique	g/gMS
L : lag time	h ⁻¹
MAT : Matière azotée totale	% MS
MS : Matière sèche	%
MM : Matière Minérale	% MS
NDF : Neutral Detergent Fibre	% MS
OM : Matière organique	% MS
PBM : Production de la Biomasse Microbienne	Mg
PF : Facteur de cloisonnement (Partition Factor)	mg/ml
PNP : Phénols Non Précipitables	g/kg MS
PEG : Polyéthylène glycol	
PVPP : Poly Vinyl Pyrrolidone	
TEP : Total Extractable phénols	g/kg MS
TIVD : True <i>in vitro</i> Digestibility	g/g MS
TCL : Tanins Condensés liés	g/kg MS
TCL : Tanins condensés libres	g/kg MS
TCT : Tanins condensés totaux	g/kg MS
TCs : Tanins Condensés	
THs : Tanins Hydrolysables	
TT : Tanins totaux	g/kg MS

Publications et Communications

Publications

L. Bouazza, R. Bodas, S. Boufennara, H. Bousseboua and S. López. 2012. Nutritive evaluation of foliage from fodder trees and shrubs characteristic of Algerian arid and semi-arid areas. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 21 , 521–536.

Boufennara S., Lopez S., Bousseboua H., Bodas R., **Bouazza L.** 2012. Chemical composition and digestibility of some browse species collected from Algerian arid rangelands. *Spanish journal of Agriculture Research*. 10 (1), 88-98.

Chentli Amira, Gillmann Louisa , **Bouazza Lyas**, Medjkal Samir, Limami Anis Mohamed , Le Paven Marie-Christine Morère , Bousseboua Hacène.2014. Effects of secondary compounds from cactus and acacias trees on rumen microbial profile changes performed by Real- Time PCR. *International Journal of Advanced Research*, Volume 2, Issue 2, 660-671.

Communications

L. Bouazza, S. Boufennara, R. Bodas, H. Bousseboua and S. López.2012.Nutritive evaluation of foliage from some Acacia trees characteristic of Algerian arid and semi-arid areas. FAO-CIHEAM Network on Sheep and Goats Sub-Network on Nutrition. 14th International Seminar. 2nd Symposium of LowInputBreeds. Feeding and management strategies to improve livestock productivity, welfare and product quality under climate change Hammamet, Tunisia, 15 – 18 May 2012.

L. Bouazza, S.Boufennara, A.Chentli, R. Bodas, H. Bousseboua and S. López.2013. The feeding value of deseeded pods from *Acacia nilotica* and *Albizia julibrissin* as evaluated by chemical analyses and *in vitro* gas production. FAO-CIHEAM Network on Sheep and Goats Sub-Network on Production Systems 8th International Seminar *Technology creation and transfer in small ruminants: roles of research, development services and farmer associations* Tangier, Morocco, 11 to 13 June 2013.

Boufennara S., Bouazza L., Lopez S., Bousseboua H., Bodas R. 2011. Effect of polyethylene glycol addition on gas production parameters and *in vitro* digestibility of some browse plant species collected from Algerian arid rangelands. Les journées internationales de Biotechnologie, Sousse, Tunisie, 19-22 décembre 2011.

Boufennara S., Bouazza L., BoussebouaH., Lopez S., Bodas R. 2011. Effect of polyethylene glycol addition on methane production from some Algerian browse plant species in an *in vitro* gas system. FAO-CIHEAM Network on Sheep and Goats Sub-Network on Nutrition. 14th International Seminar. 2nd Symposium of LowInputBreeds. Feeding and management strategies to improve livestock productivity, welfare and product quality under climate change Hammamet, Tunisia, 15 – 18 May 2012.

S. Boufennara, L. Bouazza, S. Lopez, H. Bousseboua and R. Bodas.2013.Nutritive evaluation of some browse plant species collected from Algerian arid rangelands by chemical analyses and *in vitro* gas production. FAO-CIHEAM Network on Sheep and Goats Sub-Network on Production Systems 8th International Seminar *Technology creation and transfer in small ruminants: roles of research, development services and farmer associations* Tangier, Morocco, 11 to 13 June 2013.

Chentli A, Bouazza L, Medjekal S, Gillmann L et Bousseboua H.2013. Evaluation de la valeur nutritionnelle des raquettes d'*Opuntia* d'une région aride de l'Algérie par la technique de production de gaz. FAO-CIHEAM Network on Sheep and Goats Sub-Network on Production Systems 8th International Seminar *Technology creation and transfer in small ruminants: roles of research, development services and farmer associations* Tangier, Morocco, 11 to 13 June 2013.

Table des Matières

Résumé	i
Remerciements	ii
Liste des figures	iv
Liste des tableaux	v
Liste des abbreviations	vi
Pulications et communications	vii
Table des Matières	viii
Introduction générale	1
Première Partie : Etude Bibliographique	
Chapitre I : Composition du microbiote ruminal	
1-	Introduction..... 4
2-	Anatomie et physiologie du rumen..... 4
2.1.	Anatomie du rumen 4
2.2.	Conditions de milieux..... 5
2.2.1.	L'anaérobiose..... 5
2.2.2.	Le pH 5
2.2.3.	La température 6
2.2.4.	L'humidité 6
2.2.5.	La pression osmotique 6
3-	La population microbienne du rumen..... 7
3.1.	Les bactéries de la flore ruminale..... 7
3.1.1.	Les bactéries fibrolytiques..... 8
3.1.1.1.	Les bactéries cellulolytiques..... 8
3.1.1.2.	Les bactéries hémicellulolytiques..... 9
3.1.1.3.	Les bactéries pectinolytiques 10
3.1.2.	Les bactéries amylolytiques..... 11
3.1.2.1.	Caractéristiques bactériologiques..... 11
3.1.2.2.	Mécanismes de dégradation de l'amidon..... 11
3.1.3.	Les bactéries utilisatrices de glucides simples..... 12
3.1.4.	Les bactéries protéolytiques..... 12
3.1.5.	Les bactéries uréolytiques..... 14
3.1.6.	Les bactéries utilisatrices d'acide..... 14
3.2.	Les archaebactéries 15
3.3.	Les champignons 16
3.4.	Les protozoaires 17
3.5.	Interaction entre microorganismes du rumen..... 18
3.5.1.	Relations entre bactéries du rumen..... 18
3.5.2.	Relations entre bactéries et protozoaires..... 18
3.5.3.	Interactions entre bactéries - protozoaires et champignons..... 18
4-	Les différents glucides dans l'alimentation des ruminants..... 18
4.1.	Les glucides pariétaux 18
4.1.1.	La cellulose..... 19
4.1.2.	Les pectines..... 19
4.1.3.	Les hémicelluloses..... 19
4.1.4.	La lignine..... 19
4.2.	Les glucides cytoplasmiques..... 19

4.2.1.	Les sucres solubles.....	20
4.2.2.	L'amidon.....	20
5-	Digestion ruminale des glucides.....	20
5.1.	Hydrolyse.....	20
5.2.	La digestion de la cellulose par les bactéries cellulolytiques.....	22
5.3.	Mécanisme de digestion de la cellulose.....	23
5.4.	Fermentations.....	23
6-	Le métabolisme énergétique ruminal.....	24
6.1.	Le transfert d'énergie dans le rumen.....	24
6.1.1.	La fermentation lactique.....	25
6.1.2.	Les fermentations propioniques.....	25
6.1.3.	La méthanogénèse.....	26
6.2.	Le microbiote ruminal détenteur d'un pouvoir réducteur.....	26
Chapitre II : Généralités sur les tannins		
1-	Introduction.....	28
1.1.	Classification biochimique des tannins.....	28
1.1.1.	Les tannins hydrolysables.....	28
1.1.2.	Les tannins condensés.....	29
1.1.2.1.	Nomenclature.....	29
1.1.2.2.	Structure biochimique des flavan-3-ols.....	30
1.1.2.3.	Structure biochimique des polymères.....	31
1.1.2.4.	Biosynthèse des tannins condensés.....	33
2-	Propriétés des tannins.....	34
2.1.	Les propriétés physico-chimiques des tannins.....	34
2.1.1.	Solubilité des tannins.....	34
2.1.2.	Liaisons aux protéines.....	34
1.1.3.	Liaison aux acides nucléiques.....	35
1.1.4.	Chélation d'ions métalliques.....	35
2.2.	Les propriétés biologiques des tannins.....	35
2.2.1.	Inhibition des enzymes.....	35
2.2.2.	Activité anti-oxydante.....	35
2.2.3.	Effet antiseptique.....	36
3-	Analyses biochimiques des tannins.....	36
3.1.	Dosages des tannins totaux.....	36
3.1.1.	Méthode chimique de Folin-Ciocalteu.....	36
3.1.2.	Méthodes biologiques.....	36
3.2.	Analyse des tannins hydrolysables.....	37
3.3.	Dosages spécifiques et analyses des tannins condensés.....	37
4-	Plantes à tannins.....	38
4.1.	Les plantes à tannins hydrolysables.....	38
4.2.	Les plantes à tannins condensés.....	38
4.3.	Rôle des tannins dans les plantes.....	39
4.4.	Localisation des tannins dans la plante.....	39
4.5.	Facteurs de variation de la teneur en tannins.....	40
4.5.1.	L'espèce végétale et la variété.....	40
4.5.2.	La partie végétale.....	40
4.5.3.	Le stade végétal.....	40
4.5.4.	Les conditions environnementales.....	41
5-	Les effets des tannins chez les ruminants.....	41

5.1.	Effets des tannins hydrolysables.....	42
5.2.	Effets des tannins condensés.....	42
5.2.1	Effets bénéfiques des tannins condensés.....	43
5.2.1.1.	Amélioration des paramètres zootechniques.....	43
5.2.1.2.	Absence d'effet sur l'ingestion volontaire d'aliments.....	44
5.2.1.3.	Effets sur la digestion des aliments.....	44
5.2.1.4.	Effets sur la santé des animaux.....	45
5.2.2.	Effets néfastes des tannins condensés.....	46
5.2.3.	Palier aux effets néfastes des tannins condensés.....	47
5.3.	Inactivation des tannins condensés.....	48
5.3.1.	Distribution de PEG aux animaux consommant des tannins condensés.....	48
Deuxième Partie : Matériel et Méthodes		
1-	Description des sites d'étude	49
2-	Matériels biologiques	49
2.2.	Echantillons testés.....	49
2.3.	Echantillonnage.....	50
2.4.	Animaux utilisés.....	50
2.4.1.	Etude <i>in situ</i>	50
2.4.2.	Etudes <i>in vitro</i>	50
3-	Méthodes.....	51
3.1.	Analyse chimique fourragère.....	51
3.1.1.	Détermination de la matière sèche.....	51
3.1.2.	Détermination des sels minéraux.....	51
3.1.3.	Détermination de la matière azotée totale.....	51
3.1.4.	Détermination des composés de la paroi végétale.....	52
3.1.4.1.	Estimation de la fraction NDF (Neural Detergent Fibre).....	52
3.1.4.2.	Estimation de la fraction ADF (Acid Detergent Fibre).....	53
3.1.4.3.	Estimation de la fraction ADL (Acid Detergent Lignin).....	53
2.2	Analyse des Polyphénols.....	53
3.2.1.	Test biologique des tanins (Tanins Bioassay).....	54
3.2.2.	Procédures.....	54
3.2.3.	Dosage chimique des Polyphénols.....	56
3.2.3.1.	Préparation de l'extrait	56
3.2.3.2.	Dosage des polyphénols (Méthode de Folin Ciocalteu).....	57
3.2.3.3.	Analyse des Phénols totaux.....	58
3.2.3.4.	Dosage des tanins totaux à partir de l'extrait.....	58
3.2.3.5.	Extraction des tanins condensés libres.....	58
3.2.4.	Analyse des tanins condensés Proanthocyanidines.....	59
3.2.4.1.	Analyse des tanins condensés libre.....	59
3.2.4.2.	Analyse des tanins condensés attachés.....	60
3.3.	Etude de la Digestibilité <i>in vitro</i>.....	60
3.3.1.	Digestibilité selon Tilley and Terry.....	60
3.3.2.	Production de gaz et digestibilité à 144 h.....	62
3.3.2.1.	Inoculum.....	62
3.3.2.2.	Description du système de fermentation de Theodureau.....	63
3.3.2.3.	Potentiel de Disparition de la Matière sèche (D144h).....	64
3.4.	Analyse des gaz en présence du PolyEthylèneGlycol.....	65

3.4.1.	Préparation des échantillons.....	65
3.4.2.	Analyses chromatographiques.....	66
3.5.	Etude de la dégradabilité <i>in situ</i>	67
3.5.1.	Animaux utilisés.....	67
3.5.2.	Procédure.....	67
3.5.3.	Calculs	68
3.5.3.1.	Digestibilité de la matière sèche.....	68
3.5.3.2.	Digestibilité de la matière azotée totale.....	68
3.5.3.3.	Digestibilité de la fraction NDF.....	69
3.6.	Analyses statistiques	69
 Troisième Partie : Résultats et Discussion 		
1-	Composition chimique des fourrages	70
1.1.	Teneurs en matières minérales (MM).....	70
1.2.	Teneurs en Protéines Brutes (PB).....	71
1.3.	Teneurs en composants pariétaux.....	73
1.4.	Teneurs en Polyphénols.....	76
1.4.1.	Dosage chimique.....	76
1.4.2.	Activité biologique des tanins.....	80
2-	Etude de la digestibilité des fourrages	83
2.1.	Digestibilité de la matière sèche.....	83
2.1.1.	Digestibilité <i>in vitro</i> selon la méthode de Tilley et Terry.....	83
2.1.2.	Dégradabilité <i>in situ</i> (<i>in sacco</i>).....	86
2.1.2.1.	Cinétique de dégradation de la Matière Sèche <i>in sacco</i>	87
2.1.2.2.	La digestibilité <i>in vitro</i> et la dégradabilité <i>in sacco</i> de la matière sèche.....	88
2.2.	Cinétique de dégradation <i>in sacco</i> de la fraction NDF.....	92
2.3.	Cinétique de dégradation <i>in sacco</i> de la matière azotée.....	96
3-	Fermentations et production de gaz <i>in vitro</i>	99
3.1.	Production de Gaz à 144 heures.....	99
3.2.	Cinétique de production de gaz et digestibilité à 144 heures.....	102
3.3.	Effet de la composition chimique sur la production de gaz.....	103
4-	Etude de l'effet des Tanins sur la digestibilité	108
4.1.	Effet du PEG sur la digestibilité réelle de la matière sèche.....	108
4.2.	Effet du PEG sur la cinétique de production de gaz.....	108
4.3.	Effet du facteur race sur la production de gaz.....	114
5-	Effets des Tanins sur la production de Méthane	117
5.1.	Energie métabolisable et digestibilité de la matière organique.....	117
5.2.	Matière organique réellement dégradée et production des AGV	119
5.3.	Effet du PEG sur la partition du carbone et de l'hydrogène.....	122
5.3.1.	Production de gaz total en présence de PEG.....	122
5.3.2.	Effet des tanins condensés sur la production de CO ₂ et CH ₄	124
5.3.3.	Production de méthane et perte d'énergie.....	129
5.4.	Utilisation des Acacias pour la réduction du méthane.....	129
	Conclusion	131
	Références bibliographiques	133
	ANNEXE	
	ADDENDA	

Introduction Générale

En Algérie, le cheptel ovin et caprin compte un effectif de près 24 millions de têtes (FAO, 2009). Cet important patrimoine zootechnique, en constant développement, risque à terme d'être menacé à cause de la dégradation des écosystèmes. La steppe, avec la transhumance en zones céréalières, a constitué dans le passé la principale source de son alimentation. Cependant, ce système a subi d'importantes modifications. Actuellement, seuls 15% de l'effectif seraient concernés par la transhumance (Bourbouze, 2006). La sédentarisation accrue a conduit à une surexploitation des parcours steppiques qui n'arrivent plus à couvrir les besoins alimentaires du cheptel.

La mise en culture de milliers d'hectares de parcours a mené à la dégradation presque irréversible de la steppe, conjuguée avec le phénomène de désertification et de l'avancée du sable. Ce phénomène de désertification, qui n'est pas propre à notre pays, il touche de vastes zones du globe et se révèle comme un phénomène en constante augmentation. Cette situation impose une stratégie de lutte active, pour sauvegarder non seulement la fertilité naturelle des milieux à risque mais aussi leur réhabilitation là où cela restent techniquement possible.

Pour les ruminants, l'introduction massive de concentrés très onéreux dans cette zone n'est qu'un remède provisoire et aléatoire. Cette situation pourrait conduire à terme à un élevage en bergerie intégrale qui nécessite une alimentation systématisée à l'auge, ce qui suppose une production fourragère suffisante et une bonne connaissance des besoins nutritionnels des ovins de races locales.

Les hautes plaines steppiques, majoritairement occupées par l'alfa (*Stipa tenacissima* L.), se voient progressivement colonisées par l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba* Asso) (Le Houérou, 1981). L'alfa, espèce steppique vivace reconnue pour sa grande résistance à la sécheresse, régresse sans cesse dans son milieu naturel. Sa rusticité semble ne plus lui apporter d'avantage écologique face à une sécheresse persistante, au surpâturage et à un rouissage naturel très long en absence d'exploitation rythmée (Hellal *et al.*, 2007).

Les plantations d'arbustes fourragers constituent indéniablement un élément de stabilité dans l'alimentation des petits ruminants. Ces plantations consolident la protection de

l'environnement contre l'érosion, permettant la fixation du sol et sa protection contre l'érosion hydrique. Les arbustes fourragers peuvent aussi valoriser des terres marginales inutilisables en agriculture traditionnelle (terres salées,...).

La valeur nutritive de tout fourrage en général et des arbustes en particulier dépend essentiellement de leur teneur en matières azotées totales et en cellulose brute. Par leur bonne valeur nutritive (MAT > 15% et CB > 25 %) et leur bonne appétibilité, surtout après fanage, les Acacias sont sans doute des espèces prometteuses pour les zones semi-arides est arides.

L'*Acacia cyanophylla* Lindl. (syn. *Acacia saligna*), est une espèce arbustive communément répandue dans les milieux à climat aride des pays du Maghreb (Mulas M., et Mulas G., 2004). Des études réalisées en Tunisie sur des moutons de la race Barbarine ont montré que l'ingestion de feuilles de *A.cyanophylla* était basse (250 g MS/jour), probablement en raison du taux élevé de tanins de l'Acacia (4-7% MS) (Ben Salem *et al.*, 1998). La consommation de plantes riches en tanins induit des effets contradictoires chez les ruminants. Il est important de distinguer les effets produits par les Tanins Hydrolysables (THs) de ceux des Tanins Condensés (TCs) (Makkar, 2003c).

Les THs peuvent être responsables d'intoxications sévères, voire mortelles. A l'inverse, les TCs sont considérés comme étant de moindre toxicité, en particulier chez les ruminants. Même si l'ingestion de grandes quantités de TCs peut avoir des effets néfastes sur les paramètres zootechniques et la physiologie digestive des animaux. Par ailleurs, les TCs ont été associés à des effets bénéfiques sur la santé et la production animale lorsqu'ils sont ingérés de façon modérée. L'effet bénéfique des TCs dans le rumen est lié à la protection des protéines vis-à-vis des dégradations ruminales. La complexation des TCs avec les protéines alimentaires ou leur fixation aux enzymes bactériennes réduisent globalement la protéolyse ruminale, ce qui permet son assimilation au niveau des intestins par l'animal et non plus sa perte sous forme de méthane (Zimmer and Cordesse, 1996; Jean-Blain, 1998; Aerts *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2003 ;Mc Nabb *et al.*, 1993; Barry et Mc Nabb, 1999; Makkar, 2003c; Waghorn, 2008).

Bien que le méthane (CH₄) soit un produit naturel des fermentations ruminales, sa production représente une perte énergétique de l'ordre de 2 à 12% de l'énergie de ses ingestas (Johnson et Johnson, 1995). Il est rejeté dans l'atmosphère essentiellement par voie orale (95%) au cours d'éruclations régulières ou par les poumons, après passage dans le sang. A l'échelle de la ferme, la contribution du CH₄ aux émissions de gaz à effet de serre est comprise entre 40 et 60% ;

le CH₄ d'origine entérique en représente 80% et les 20% restants proviennent des effluents d'élevage (Gill *et al.*, 2010). Les vaches (laitières et allaitantes) et les mâles reproducteurs représentent à eux seuls 58% des émissions totales annuelles, elles sont suivies par les bovins à l'engraissement (33%), alors que la part des ovins, caprins et équins reste relativement mineure (Vermorel *et al.*, 2008). La réduction des émissions de CH₄ par les ruminants présente ainsi un double intérêt : nutritionnel, productif pour l'animal et environnemental pour la planète.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés, principalement, à évaluer la valeur nutritive des feuilles de légumineuses riches en tannins, en majorité des arbres, collectées des régions arides et semi-arides d'Algérie : *Acacia cyanophylla* (*syn. Acacia saligna*), *Acacia nilotica*, *Acacia horrida*, *Acacia albida*, *Albizia julibrissin*, *Pinuca granatum*, *Vicia faba*, *Atriplex halimus* et *Artemisia herba alba*. Leurs compositions chimiques et le comportement du microbiote ruminal d'ovins à leur égard, *in vitro* et *in situ*, sont analysés.

Dans un second volet nous étudions la capacité des tanins à réduire les pertes d'azote sous forme de méthane, avec l'utilisation du PolyéthylèneGlycol (PEG) comme inhibiteur des tanins afin de déterminer l'effet spécifique des TCs sur la protéolyse et la production de méthane dans le rumen.

La présentation de ce travail est organisée en trois parties :

La première partie, scindée en deux chapitres, présente dans un premier temps la composition du microbiote ruminale avec une présentation sommaire des différentes réactions d'hydrolyses et fermentations produites. Le second chapitre est consacré aux tanins. Leurs structures chimiques et leurs propriétés sont exhaustivement énumérées avec, au passage, la présentation des méthodes d'analyses les plus usitées.

La seconde partie se consacre à présenter le matériel biologique utilisé, végétal et animal, les méthodes d'études, *in sacco* et *in vitro*, le plan d'échantillonnage adopté ainsi que les méthodes d'analyses statistiques employées.

En troisième partie, les résultats sont discutés en les comparant à ceux publiés dans la littérature scientifique internationale et en mettant en exergue le classement des fourrages étudiés d'après leurs valeurs nutritives et la capacité de leurs tanins condensés à réduire la production de méthane.

Première Partie

Etude

Bibliographique

Chapitre I : Composition du microbiote ruminal

1-Introduction

Le microbiote ruminal constitue la particularité la plus remarquable de la digestion des ruminants. Sa composition varie, en particulier, en fonction du changement des conditions d'environnement mais aussi en fonction de l'espèce de ruminants, de l'âge ou encore de la composition de la ration alimentaire. La compréhension des mécanismes de variations de la population bactérienne permet d'optimiser les performances du ruminant. Une véritable symbiose existe entre le ruminant et son microbiote ruminal. L'animal, étant incapable de métaboliser la cellulose, bénéficie de l'absorption avale des produits métaboliques terminaux des fermentations microbiennes mais aussi de l'apport conséquent de protéines et vitamines d'origine microbienne.

2-Anatomie et physiologie du rumen

2.1. Anatomie du rumen

Du point de vue de l'anatomie digestive, les Ruminants sont caractérisés par un estomac pluriloculé composé du rumen, du réseau, du feuillet et de la caillette. L'ensemble rumen-réseau-feuillet ou préestomac est le siège d'une digestion mécanique. Dans la caillette s'effectue la digestion enzymatique des ingestas. L'estomac des ruminants occupe les 4/5 de la cavité abdominale, en dehors de la gestation. Il présente un proventricule énorme, divisé en trois compartiments : le rumen, le réticulum et l'omasum, et une portion réellement peptique, équivalente à l'estomac des monogastriques : l'abomasum (Barone R., 1997).

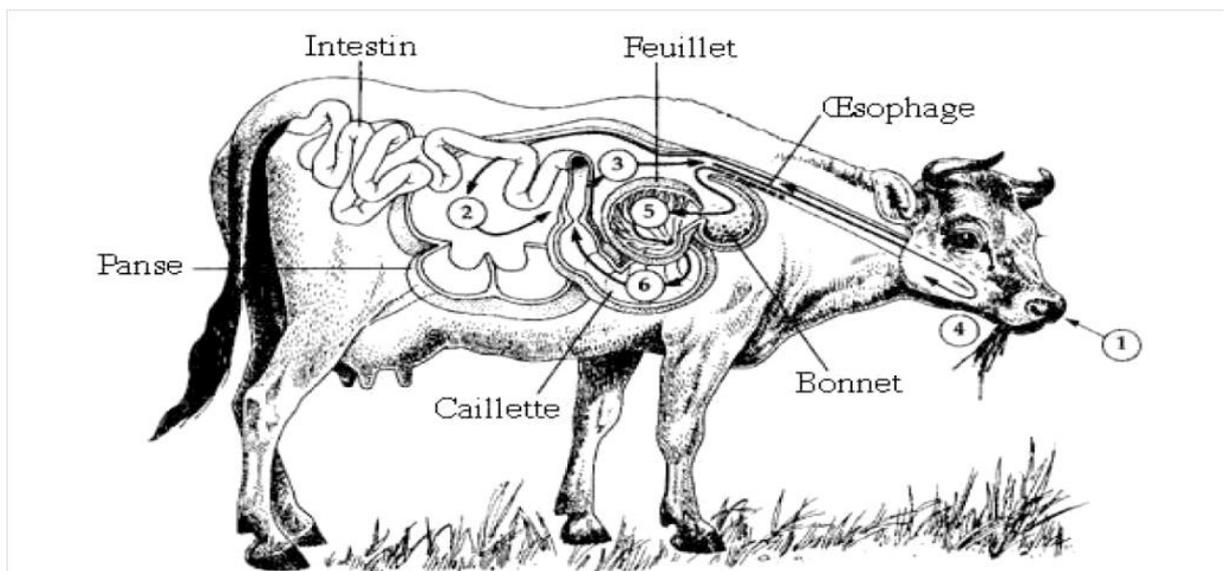


Figure 1 : Tube digestif des ruminants

Le rumen, encore appelé panse ou réticule-rumen, est de loin le plus volumineux des réservoirs gastriques des ruminants. Le réticule-rumen est similaire à une grande cuve de fermentation d'une capacité d'environ 200L chez les bovins et 20L chez et les ovins de race tempérée. Il contient les aliments ingérés, de l'eau, une population microbienne variée et très active et de l'urée salivaire recyclée. L'ensemble est soumis aux mouvements péristaltiques et tamponé par la salive qui maintient un pH voisin de 6,5 à une température de 39° C.

2.2. Conditions de milieu

Le développement des microorganismes du rumen est directement dépendant des conditions physicochimiques du milieu.

2.2.1. L'anaérobiose

Le milieu ruminal est caractérisé par des conditions d'anaérobiose vraie. Les apports d'oxygène sont faibles (déglutition, diffusion à partir des vaisseaux des parois) mais des souches de bactéries aérobies facultatives le font vite disparaître. Par exemple, bien qu'étant généralement strictement anaérobie, certaines souches de *Selenomonas ruminantium* sont connues pour tolérer une exposition à de faibles quantités d'oxygène (Brugère H., 1983). Stewart et Bryant rapportent que Samah et Wimpenny ont démontré la présence d'une NADH-oxydase soluble, supposée réduire l'oxygène en eau ou en H₂O₂. Le superoxyde produit dans cette réaction serait par la suite métabolisé par une superoxyde dismutase, de sorte que l'O₂ ne représente pas 1% des gaz du sac dorsal. La teneur en CO₂ est toujours élevée (60% de la poche des gaz), celles en CH₄ de 27%, 7% en N₂, et 0,2% en H₂ (Tiret L., 2001). La majeure partie de ces gaz est éliminée par éructation et le reste est partiellement incorporée dans divers métabolismes bactériens.

Le milieu ruminal est de ce fait très réducteur, et le métabolisme des microorganismes qu'il héberge est de type fermentaire. Ce qui permet la libération de composés organiques (acides fixes et volatiles : lactate, acétate, butyrate, propionate), et non pas de gaz carbonique et d'eau comme dans le cas de la respiration (Brugère H., 1983)

2.2.2. Le pH

Le pH a un rôle prédominant dans la sélection des microorganismes du rumen et dans l'orientation des fermentations. La valeur du pH du rumen est normalement comprise entre 5,5 et 7,3 (Satge B., 1993 ; Brugère H., 1983). Cette marge est cependant un peu large. Le pH normal ne correspond pas à la neutralité au sens physico-chimique (7,0). Dans le rumen en fonctionnement, il

Il y a production d'acides gras volatils (AGV) et il est normal que la réaction soit légèrement acide (par exemple de 6 à 6,8). Autour de ces valeurs, le pH peut varier sans qu'il y ait parallèlement de troubles mais cela n'est pas pour autant la normalité. Les causes de variations les plus fréquentes du pH sont en fait les fluctuations alimentaires. Le pH baisse dans la période postprandiale et s'élève pendant le jeûne.

Les éléments responsables du pH du rumen sont, pour les acides : les AGV et l'acide lactique produits par les fermentations, et pour les bases, les bicarbonates et les phosphates de la salive, ainsi que, le cas échéant, l'ammoniac venant de la protéolyse ou de l'uréolyse. Compte tenu des quantités de ces éléments et de la valeur du pH, le pouvoir tampon est assuré essentiellement par les bicarbonates. Ceux-ci sont apportés par la salive (un bovin adulte sécrète chaque jour environ 100 litres de salive riche en bicarbonates, à pH = 8).

2.2.3. La température

La température ruminale est supérieure d'au moins un degré par rapport à la température centrale, c'est-à-dire comprise entre 39,5°C et 40°C. Elle peut atteindre 41°C lorsque les fermentations sont très intenses mais aussi chuter de plusieurs degrés après ingestion de grandes quantités d'eau froide : de 5 à 10°C pour une à deux heures.

2.2.4. L'humidité

L'humidité est en moyenne élevée (de l'ordre de 85%), néanmoins cette valeur n'est pas homogène dans l'ensemble du rumen. La partie supérieure contient les éléments les plus grossiers, la partie inférieure les particules de petite taille baignant dans un milieu très liquide. L'eau du rumen représente une masse liquidienne plus importante en quantité que l'eau plasmatique et elle peut être utilisée, le cas échéant, comme réserve pour l'organisme.

L'imbibition et la désagrégation progressive des particules alimentaires s'effectuent à la faveur des contractions régulières de la paroi ruminale et des cycles méryciques. Les apports hydriques sont assurés par l'eau ingérée et par une intense salivation (Brugère H., 1983).

2.2.5. La pression osmotique

Elle est de l'ordre de grandeur de celle du sang, la pression osmotique varie dans une plus grande gamme de 200 à 400 mosm/l.

3-La population microbienne du rumen

La présence d'une population microbienne dans le réticule-rumen est la particularité majeure qui caractérise les ruminants. Il s'agit principalement de bactéries, d'archéobactéries, de protozoaires et de champignons, et secondairement de bactériophages et virus. Ces microorganismes ont la propriété essentielle de dégrader la cellulose et les protéines alimentaires en vue de synthétiser leurs propres produits et de transformer les hydrates de carbone en Acide Gras Volatils (AGV). L'animal hôte absorbe ainsi la biomasse microbienne et les AGV qui représentent respectivement ses sources majeures en protéines et en énergies.

3.1. Les bactéries de la flore ruminale

Les bactéries du rumen représentent la moitié de la biomasse microbienne. Elles constituent l'ensemble le plus diversifié : une soixantaine d'espèces recensées par les méthodes culturelles classiques mais plusieurs centaines pressenties par les techniques génomiques actuelles. Leurs concentrations varient de 10^{10} à 10^{11} cellules/ml (Fonty *et al.*, 1995, Hungate, 1966a).

La colonisation du tractus digestif des ruminants par les bactéries est rapide. Ainsi à l'âge d'un jour, les premières bactéries apparaissent (*Escherichia coli*, Streptocoques). Les bactéries cellulolytiques apparaissent dès l'âge de 4 jours chez 75 % des jeunes ruminants (Fonty *et al.*, 1987). Les trois principales espèces bactériennes cellulolytiques sont : *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens*. Elles sont présentes à des concentrations variant de 10^8 à 10^9 cellules/ml (Coleman, 1975). Les différentes bactéries ne sont pas distribuées de façon homogène dans le contenu ruminal, comme le suggère la stratification des digesta du rumen (Hungate, 1966b). Ainsi, les bactéries associées à la phase solide du rumen, bactéries solidement adhérentes aux particules alimentaires, sont plus abondantes (50 – 75% des bactéries) que les bactéries faiblement associées ou libres de la phase liquide (Cheng and Costerton, 1980 ; Forsberg and Lam, 1977). Les bactéries ruminales ont été classifiées en quatre groupes, en fonction de leur environnement :

- (1) les bactéries vivant libres, associées à la phase liquide ruminale ;
- (2) les bactéries associées avec les particules alimentaires ;
- (3) les bactéries associées à l'épithélium ruminal ;
- (4) les bactéries attachées à la surface des protozoaires (Czerkawski F.M and Cheng K.J., 1988).

3.1.1. Les bactéries fibrolytiques

3.1.1.1. Les bactéries cellulolytiques

Deux types de bactéries cellulolytiques sont trouvées dans le rumen : des bacilles (parmi lesquelles sont majoritairement isolés *Fibrobacter succinogenes* et *Butyrivibrio fibrisolvens*) (Hungate R.E., 1966 ; Stewart C.S and Bryant M.P., 1988) et des coques (représentés par *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus*).

Fibrobacter succinogenes, *R. albus* et *R. flavefaciens* sont connues pour être les principales espèces cellulolytiques du rumen (Forsberg C.W *et al.*, 1997). La population cellulolytique représente selon les études entre 4 et 9% de la population bactérienne du rumen (Michalet-Doreau B *et al.*, 2001) et elle peut même représenter jusqu'à 17% de cette population (Martin C *et al.*, 2001). L'utilisation d'outils de biologie moléculaire donne des indications permettant de déterminer la composition quantitative de la flore cellulolytique. Ainsi, selon Martin *et al.*, (2001), ainsi que selon Weimer *et al.*, (1999), la population des *Ruminococci* (incluant *R. albus* et *R. flavefaciens*) issue de rumen de vaches laitières est plus importante que celle de *F. succinogenes* (avec, dans l'étude de Martin *et al.*, 2001, une prédominance de *R. albus*), alors que chez le mouton *F. succinogenes* est l'espèce cellulolytique majoritaire ou au moins présente en quantité équivalente aux *Ruminococci* (Michalet-Doreau *et al.*, 2001).

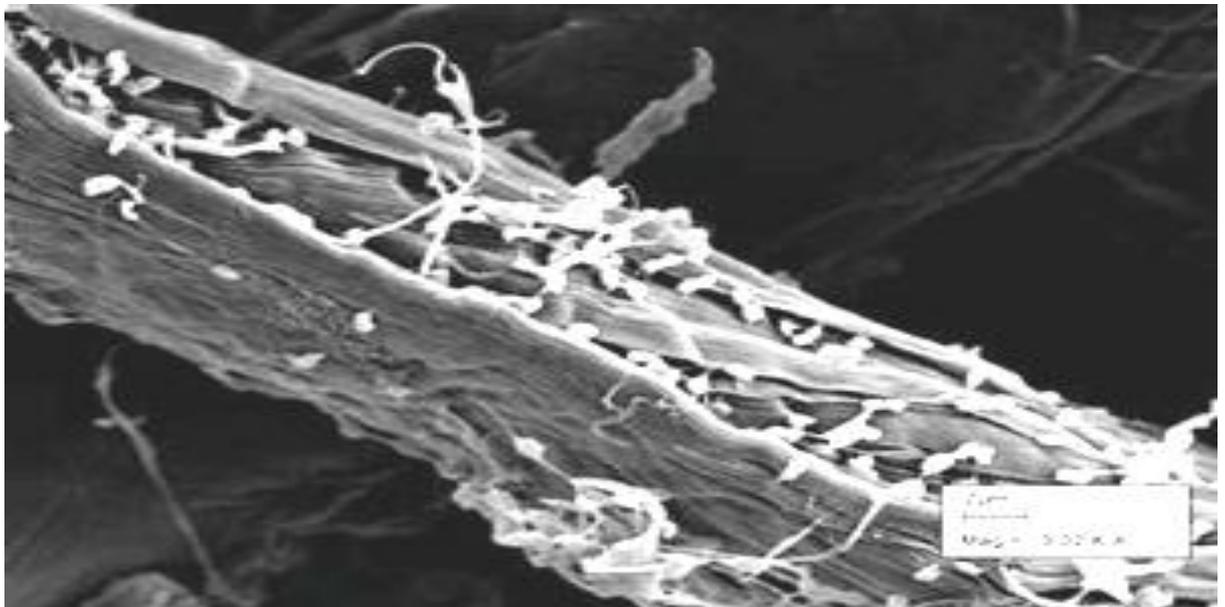


Figure 2: Vue de différentes bactéries pénétrant dans une fibre végétale en cours de digestion dans le rumen (Photo ; Lydia Joubert. USDA publication).

a. Les bacilles cellulolytiques

Deux types de bactéries cellulolytiques en bâtonnet peuvent être trouvés en quantité importante dans le rumen : *Fibrobacter succinogenes* (anciennement *Bacteroides succinogenes*) et *Butyrivibrio*

fibrisolvens (Hungate R.E., 1966). *Fibrobacter succinogenes*, décrit pour la première fois par Hungate en 1950 (sous le nom de *Bacteroides succinogenes*) (Stewart C.S and Bryant M.P., 1988) est aujourd'hui considéré comme l'une des principales bactéries cellulolytiques (Forsberg C.W *et al.*, 1997). L'autre bacille cellulolytique le plus fréquent dans le rumen est *Butyrivibrio fibrisolvens*. Cette bactérie est l'une des espèces bactériennes prédominantes dans le rumen, et a été isolée à partir de contenus ruminiaux dilués au $1/10^8$ ème. *B. fibrisolvens* fermente un grand nombre de sucres, avec des variations importantes en fonction des souches considérées. Ainsi, dix neuf souches cellulolytiques ont été isolées de rumen de moutons, recevant des fourrages de mauvaise qualité (Stewart C.S and Bryant M.P., 1988). Ses principaux produits de fermentation sont le formate, le butyrate et l'acétate.

b. Les coques cellulolytiques

Ces bactéries constituent un groupe distinct à l'intérieur des bactéries ruminales dégradant la cellulose. Elles sont caractérisées par une morphologie coccoïde et un diamètre de 0,8 à 1 µm. Elles ont été cultivées en culture pure par de nombreux chercheurs et peuvent représenter jusqu'à 84% des bactéries cellulolytiques se développant sur gélose à la cellulose.

La majorité des souches de *R. flavefaciens* sont cellulolytiques, bien que d'autres activités fermentaires (fermentation du xylane, de la cellobiose, activité variable selon les souches avec le sucrose, le D-xylose, le L-arabinose, le glucose, le mannose et le lactose) soient présentes chez certaines souches.

Quand à *Ruminococcus albus*, reconnu comme étant l'autre principal coque impliqué dans la digestion des parois végétales dans le rumen, il s'agit d'un coque, Gram négatif à Gram variable, cellulolytique, non motile, d'un diamètre de 0,8 à 2 µm, classiquement retrouvé sous la forme de diplocoque. Cette bactérie présente une activité cellulolytique rapide. *R. albus* fermente typiquement la cellulose, la cellobiose et le glucose et peut fermenter un certain nombre d'autres glucides (sucrose, D-xylose, L-arabinose, fructose, mannose, lactose). Sa croissance requiert de l'ammoniac et un ou plusieurs des acides gras volatils suivant : isobutyrate, isovalérate, 2-methylbutyrate et n-valérate (Hungate R.E., 1966).

3.1.1.2. Les bactéries hémicellulolytiques

L'hémicellulose, qui représente près de 37-48% des parois de la plante, présente une structure très complexe, avec le xylane présent comme l'un des principaux polymères. Les principales bactéries hémicellulolytiques sont *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, ainsi que les *Ruminococci* (Tiret L., 2001) (figure 3).

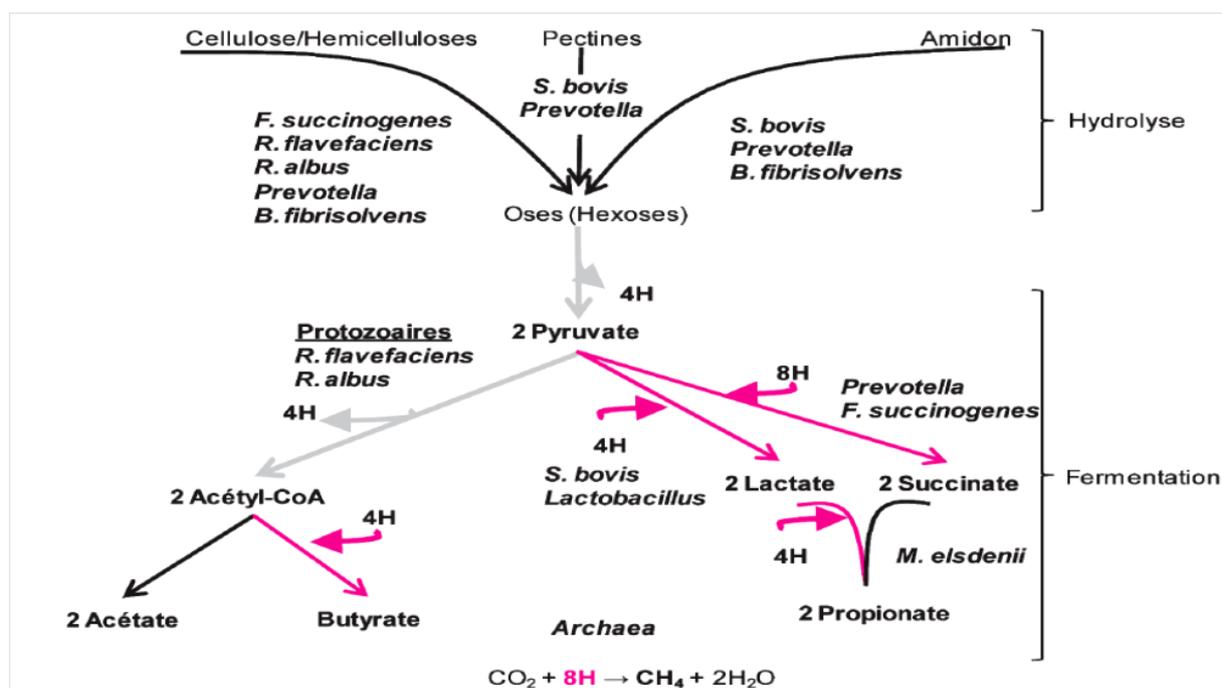


Figure 3:Hydrolyse et fermentation microbiennes des aliments dans le rumen (Popova *et al.*, 2011).

*Les réactions qui produisent de l'hydrogène sont en gris ; les réactions hydrogénotropes sont en rouge. Les fonctions connues des principales espèces bactériennes sont indiquées

Les xylanases présentent une répartition plus large que les cellulases parmi les bactéries ruminales. Les microorganismes produisent généralement plus d'une xylanase. Ainsi, quatre gènes codant pour des endoglucanases ont été clonés et caractérisés chez *F. succinogenes* (Krause D.O *et al.*, 2003). Une activité xylanasique est également attribuée à *R. albus*, à *R. flavofaciens* (chez qui 4 gènes codant pour des xylanases ont été mis en évidence), *Butyrivibrio fibrisolvens* (qui est considéré comme présentant une très importante activité de dégradation du xylane) et *Prevotella* (Krause D.O *et al.*, 2003).

3.1.1.3. Les bactéries pectinolytiques

La digestion de la pectine est assurée par un certain nombre de bactéries, parmi lesquelles *Lachnospira multiparus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola* (Stewart et Bryant, 1988). L'activité fermentaire vis-à-vis du xylane et de la pectine est plus fréquente et plus importante chez les souches de *P. ruminicola* subsp. *ruminicola* que chez subsp. *brevis*, *Succinivibrio dextrinosolvans*, *Treponema bryantii* et *Streptococcus bovis* (Tiret L., 2001). Les enzymes pectinolytiques sont divisées en 2 principaux groupes : les pectines estérases, qui catalysent la dégradation du méthanol, et les enzymes de dépolymérisation qui sont soit des hydrolases, soit des lyases. Les souches de *Lachnospira multiparus* pectinolytiques se présentent sous la forme de

bacilles incurvés Gram positif. *L. multiparus* a été détecté en grande quantité dans le rumen de bétail nourri à l'aide de fourrages de légumineuses (Bryant *et al.*, (1958).

3.1.2. Les bactéries amylolytiques

3.1.2.1. Caractéristiques bactériologiques

Un certain nombre des bactéries cellulolytiques ruminales sont également amylolytiques, comme certaines souches de *F. succinogenes*, et la plupart des souches de *B. fibrisolvans*. Les espèces non cellulolytiques (*Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Succinimonas amylolytica* et *Selenomonas ruminantium*) comprennent de nombreuses souches dégradant l'amidon. Les souches de *Streptococcus bovis* rassemblent des coques ou des coccobacilles à Gram positif, immobiles, non sporulés, groupés par deux ou en courtes chaînes, aéro-anaérobies, homo fermentaire, catalase négative.

Les principaux substrats fermentés par *S. bovis* sont l'amidon, certains glucides simples (maltose, cellobiose, sucrose, glucose, fructose, galactose, mannose, lactose) mais pas la cellulose. Dans des tubes de gélose à l'amidon, inoculés avec des dilutions suffisantes de contenu ruminal et incubés à 39°C, les colonies de *S. bovis* apparaissent invariablement les premières, elles sont suivies de près par celles de *Butyrivibrio* (Hungate R.E., 1966). Le principal produit de ce type de fermentation est le lactate. Néanmoins, d'après Stewart et Bryant, Russel a démontré que *S. bovis* est capable de croître en utilisant des cellodextrines dérivées de la cellulose. Ainsi, cette bactérie est capable de survivre dans le rumen d'animaux uniquement nourris de fourrage. Lorsque le régime est à base de foin, *S. bovis* croît lentement et produit essentiellement de l'acétate, du formate et de l'éthanol (Roque J.L., 1991).

3.1.2.2. Mécanismes de dégradation de l'amidon

Au contraire des protozoaires, les bactéries amylolytiques sont trop petites pour ingérer les grains d'amidon, ou même l'amidon de haut poids moléculaire. Les bactéries doivent sécréter des amylases, produire des amylases associées à la surface, ou utiliser d'autres mécanismes à la surface de la cellule, afin d'hydrolyser l'amidon en malto-oligomères qui eux peuvent être transporté à l'intérieur de la cellule. La présence d'amylase a été montrée dans les fluides extracellulaires de certaines souches de *S. bovis*. L'analyse des types d'amylases trouvées dans ces milieux extracellulaires a montré qu'une α -amylase était rapidement détectée mais qu'aucune pullulanase ni

β -amylase ne l'étaient (Kotarski S.F *et al.*, 1992). La présence extracellulaire de cette enzyme n'était probablement pas due au relargage suite à la lyse de la bactérie.

3.1.3. Les bactéries utilisatrices de glucides simples

Au sein de la microflore ruminale, un nombre important d'espèces bactériennes sont capables de dégrader les glucides simples, on citera par exemple : *S. ruminantium*, *S. bovis*, *B. fibrisolvens*, certaines souches de *Succinivibrio dextrinosolvens* et de Ruminocoques. Chez des animaux recevant de grandes quantités de glucides rapidement fermentescibles, les lactobacilles prolifèrent souvent en compagnie de *S. bovis*, créant ainsi des conditions de milieu très acide (Goad D.W *et al.*, 1998). Selon Stewart et Bryant (1988), les deux principaux lactobacilles sont *Lactobacillus ruminis*, et *Lactobacillus vitulinus*. *L. ruminis* est un bacille : motile grâce à un flagelle péritriche, Gram positif, produisant de l'acide lactique (principalement l'isomère L). Les principaux substrats métabolisés sont le maltose, la cellobiose, le sucrose, le glucose, le fructose, le galactose, le mannose et le lactose. *L. vitulinus* présente un profil fermentaire proche de celui de *L. ruminis*, à l'exception près que *L. vitulinus* produit l'isomère D de l'acide lactique (Stewart C.S and Bryant M.P., 1988).

3.1.4. Les bactéries protéolytiques

Les premières études sur la flore protéolytique du rumen, dont l'isolement des principaux genres bactériens s'est avéré difficile, a permis de voir émerger deux principales notions sur cette flore : tout d'abord, ces bactéries sont, à part quelques exceptions, faiblement protéolytiques. Elles n'utilisent pas les protéines comme principale source d'énergie, ou même dans certains cas, comme source principale d'azote. De plus, une grande proportion de bactéries ruminales possède une activité protéolytique et près de la moitié (entre 30 et 50 %) du total des bactéries viables isolées du rumen peuvent être protéolytiques (Wallace R.J., 1986). Les bactéries protéolytiques appartiennent à la plupart des principaux genres, bien que les principales bactéries cellulolytiques ne semblent pas être protéolytiques. L'activité protéolytique de la flore du rumen, qui est au final très faible en dépit de son importance dans la nutrition, est donc due à l'activité d'un grand nombre d'espèces présentant une activité faible (Wallace R.J., 1986).

Les souches protéolytiques du genre *Bacteroides* sont les bactéries protéolytiques prépondérantes sous certaines conditions d'alimentation. *Ruminobacter amylophilus*, qui possède une importante activité amylolytique, est l'une des espèces protéolytiques isolées les plus actives. Il est présent en grande quantité lorsque l'animal reçoit une alimentation riche en amidon (Wallace

R.J and Cotta M.A. 1988). Des souches protéolytiques de *Prevotella ruminicola* ont été obtenues à partir de ruminants nourris au fourrage, ainsi qu'avec des régimes contenant des concentrés. Selon Wallace, *P. ruminicola* serait probablement la bactérie protéolytique la plus nombreuse, mais elle n'est pas systématiquement isolée de tous les animaux. De même, des souches de *Butyrivibrio fibrisolvens* peuvent être trouvées sous certaines conditions et peuvent même être l'organisme protéolytique prédominant isolé chez certains animaux (Wallace R.J., 1986).

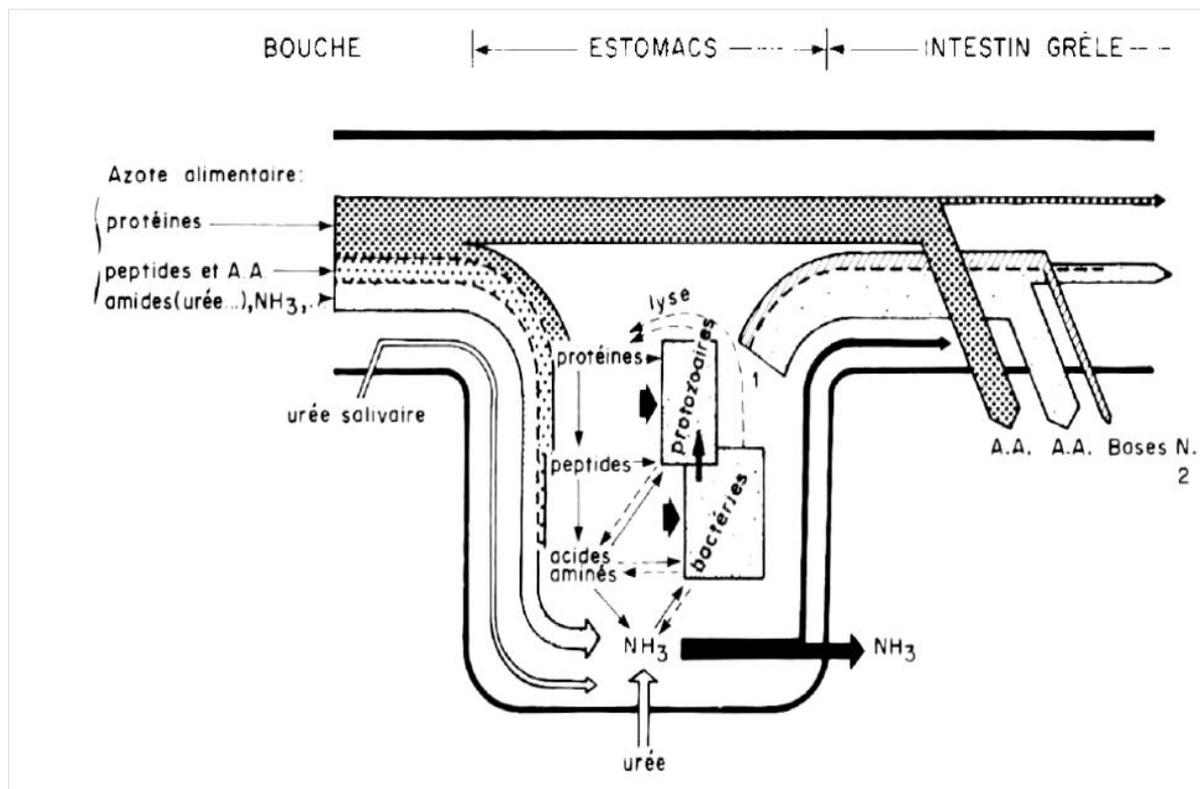


Figure 4 : Schéma de la dégradation et de l'utilisation des matières azotées dans le rumen chez le ruminant (d'après Jarrige, 1981). Bases N = Bases azotées

Les enzymes protéolytiques trouvées dans le contenu ruminal semblent être nombreuses et variées. L'utilisation d'inhibiteurs de protéases ont permis de démontrer que le type de protéase prédominant dans le rumen est du type cystéine-protéase (Wallace R.J., 1986). D'autres types enzymatiques sont présents mais de manière plus variable. On retrouve ainsi des sérine-protéases (représentant entre 0 et 41 % de l'activité totale), des métalloprotéases (9-30 %) et des aspartiquesprotéases (2-15 %) (Wallace R.J and Cotta M.A., 1988).

L'ammoniac est la plus importante source d'azote pour la croissance des bactéries ruminales. En fonction de l'alimentation, 60 à 90% de l'azote consommé journalièrement par le ruminant est converti en ammoniac, et de 50 à 70 % de l'azote bactérien est issu de l'ammoniac.

Selon Bryant et Robinson (1963), 92 % des bactéries ruminales isolées peuvent utiliser l'ammoniac comme principale source d'azote. La répartition des enzymes d'assimilation (principalement la glutamate déshydrogénase (GDH) et les enzymes des systèmes de la glutamine synthétase –GS- et du glutamate synthétase -GOGAT-) de l'ammoniac sont largement réparties au sein de l'écosystème ruminal.

3.1.5. Les bactéries uréolytiques

La production d'ammoniac via l'hydrolyse de l'urée par les bactéries ruminales joue un rôle important dans le métabolisme de l'azote chez les ruminants. Une activité uréasique a été détectée chez certaines espèces bactériennes isolées du rumen, telles que *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Selenomonas sp.*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus bromii*, *Butyrivibrio sp.* et *Treponema sp.* (Tiret L., 2001) ; Wozny M.A *et al.*, 1977). Selon Wallace et Cotta (1980), deux groupes bactériens dont l'importance relative est controversée se partageraient l'activité uréolytique. Tout d'abord, une population nombreuse de bactéries anaérobies strictes avec une activité uréasique faible, dont font partie les genres suivants: *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*, *Treponema*, *Selenomonas*, *Bifidobacterium*, *Succinivibrio*. D'autre part, on trouverait également une population bactérienne nettement plus faible, anaérobie facultative et beaucoup plus spécifiquement uréolytique.

Le mécanisme enzymatique de dégradation de l'urée est une hydrolyse par l'uréase (Wallace R.J and Cotta M.A. 1988). Le pH optimum de l'uréase est de 7 à 8,5, et sa température optimale est de 40°C. Les pH élevés du rumen favoriseraient donc la dégradation de l'urée et l'alcalose ruminale rencontrée lors d'intoxication ammoniacale favorise donc l'entretien du processus pathologique en stimulant la dégradation de l'urée.

3.1.6. Les bactéries utilisatrices d'acide

Au sein des bactéries ruminales utilisatrices d'acides, un certain nombre est capable d'utiliser le lactate. Il s'agit principalement de *Selenomonas ruminantium*, *Megasphera elsdenii* et *Veillonella parvula*. Des souches de *Selenomonas ruminantium* fermentent le lactate et sont placées dans une autre sous-espèce (*S. ruminantium* subsp. *lactilytica*) que celles qui ne le font pas (*S. ruminantium* subsp. *ruminantium*) (Stewart C.S and Bryant M.P., 1988). Les produits de fermentation du lactate sont le propionate, l'acétate et le dioxyde de carbone. *S. ruminantium* subsp. *lactilytica* requiert du n-valérate pour croître sur du glucose mais n'en a pas besoin pour se développer sur du lactate. En cas de croissance sur du lactate, l'acide para-aminobenzoïque (PABA) et l'aspartate semblent être nécessaires.

3.2. Les archaeobactéries

Les archaeobactéries sont des méthanogènes, membres du domaine des Archaea et appartiennent au règne des Euryarchaeota. Ce sont des microorganismes anaérobies strictes, représentant environ 4% des microorganismes ruminiaux (Yanagita, *et al.*, 2000), et peuvent être aisément distingués des autres organismes car ils produisent tous du méthane comme principal produit de fermentation. En raison du rôle du méthane dans le réchauffement de la planète et de la perte d'énergie par les ruminants par le méthane (estimée à 6% de l'énergie ingérée), un intérêt important est porté à ces méthanogènes. Des études, basées sur la culture ou sur l'analyse moléculaire, ont montrées que les méthanogènes ruminiaux les plus communément isolés appartiennent à la famille des *Methanobacteriaceae*. Il s'agit fréquemment d'espèces appartenant au genre *Methanobrevibacter* (Stewart et Bryant, 1988). D'autres méthanogènes appartenant à la famille des *Methanomicrobiaceae* ont été découvert chez des bovins et des ovins; tandis que des méthanogènes de la famille des *Methanosarcinaceae* ont été trouvés chez les caprins et les bovins (Skillman, *et al.*, 2006). Néanmoins, il faut noter que le statut taxonomique des méthanogènes isolés du rumen n'est pas encore parfaitement résolu, et nécessite des analyses au niveau moléculaire afin de le clarifier (Whitford, *et al.*, 2001).

Enfin, les bactéries méthanogéniques présentent une grande sensibilité à des pH inférieurs à 6 (Tiret L, 2001) et disparaissent donc à des pH inférieurs à cette valeur. *Methanobrevibacter* (*Mbb.*) spp. est considéré comme la principale espèce de méthanogènes ruminiaux, que ce soit par des méthodes de culture (Stewart et Bryant, 1988), ou par des analyses génomiques (Sharp *et al.*, 1998). La souche type est *Mbb. ruminantium* M1 (Euzéby, 2006). Décrite pour la première fois par Smith et Hungate comme *Methanobacterium*, *M. ruminantium* est un coccobacille Gram positif, non motile, d'environ 0,7 µm de large, sur 1,8µm de long. Ses principaux substrats sont le dihydrogène et le dioxyde de carbone, mais le formate peut également être utilisé lorsqu'il est présent en grandes concentration dans le rumen. *M. ruminantium* est caractérisé par une exigence en coenzyme M, spécifique aux méthanogènes, qui joue un rôle de porteur de groupements méthyles. D'autres souches de *Methanobrevibacter* spp. sont isolées du rumen : ainsi, on retrouve également des souches de *Mbb. smithii* et de *Mbb. thaueri* (Skillman, *et al.*, 2006). Selon Skillman *et al.*, 2006, *Mbb. thaueri* serait même la bactérie méthanogène prédominante chez le veau laitier au pré, bien que d'autres études insistent sur l'importance de *Mbb. ruminantium*, et de *Mbb. smithii*, associée aux ciliés du rumen (Tokura, 1999).

Parmi les espèces méthanogènes, on note également la place importante de *Methanomicrobium mobile*. Ainsi, selon Yanagita *et al.*, près de 54% des méthanogènes ruminiaux chez les ovins seraient des souches de *M. mobile* (Yanagita *et al.*, 2000). *M. mobile* appartient à la famille des *Methanomicrobiales*. Il s'agit d'une bacille Gram négatif, faiblement motile, ne sporulant pas, d'une taille de 0,7 µm sur 1,5 à 2 µm (Paynter and Hungate 1968). Une troisième espèce de bactéries méthanogènes est fréquemment impliquée dans le rumen : il s'agit de *Methanosarcina sp.* (Yanagita *et al.*, 2000), qui appartient à la famille des *Methanosarcinaceae*. Il s'agit de bactéries Gram positives, non motiles, d'un diamètre de 1,5 - 2µm, qui se présentent en paquet, ou en large groupes. Les substrats utilisés pour la production de méthane incluent le dihydrogène et le dioxyde de carbone, le méthanol, les méthylamines (formés dans le rumen lors de la dégradation de la choline) et l'acétate (Stewart et Bryant, 1988).

3.3. Les champignons

Les champignons trouvés dans le rumen sont anaérobies stricts, ce qui est tout à fait exceptionnel dans le groupe des champignons, ils ne possèdent pas de mitochondries, pas de cytochromes et assurent uniquement la fermentation de tissus cellulosiques. On décrit trois espèces qui sont *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* et *Sphaeromonas communis*. Il y a 10^3 à 10^5 zoospores par ml de milieu ruminal. Les zoospores s'attachent sur les particules de plantes déjà abîmées, le rhizoïde pénètrent dans les tissus par protéolyse. Ils colonisent les tissus lignifiés qui restent dans le rumen, diminuent la taille des particules, cassent les structures, et dégradent des tissus mêmes très lignifiés (Tiret L., 2001). Les enzymes nécessaires sont extra-cellulaires. L'activité protéolytique est assurée par des métalloprotéases, ils hydrolysent l'extensine des parois.

Les champignons apparaissent 8 à 10 jours après la naissance chez l'agneau, donc avant l'ingestion de nourriture solide. Ils disparaissent chez 80% des agneaux nourris par des concentrés, mais se stabilisent si la nourriture est peu hydratée. Chez l'animal adulte, leur nombre augmente si l'alimentation est riche en fibres. Les champignons produisent une importante quantité de H₂ et sont donc associés, dans les réactions métaboliques, aux bactéries méthanogènes, bactéries consommatrices de dihydrogène (Stewart C.S and Bryant M.P., 1988). Les bactéries cellulolytiques diminuent l'activité des champignons. L'élimination des champignons diminue la digestibilité et augmente la proportion de propionate (Tiret L., 2001).

Les champignons ne sont pas indispensables, parfois absents, et prennent toute leur importance avec les fourrages de mauvaise qualité.

3.4. Les protozoaires

La majorité des protozoaires retrouvés dans le rumen appartiennent à l'embranchement des ciliés, et sont représentés par deux groupes, tous les deux de la sous-classe des *Trichostomatia*. Les « holotriches » appartiennent à l'ordre des *Vestibuliferida*, et les « entodiniomorphes » à l'ordre des *Entodiniomorphidés*, sous ordre des *Entodiniomorphinés*, et famille des *Ophryoscolecidés*. Au sein des Entodiniomorphidés, on retrouve un nombre important de genres : les genres *Entodinium* (un genre difficile à classer sur la base de l'aspect morphologique (Williams A.G and Coleman G.S., 1992), *Eodinium* (dont l'espèce type est *Eodinium lobatum*), *Diplodinium*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Polyplastron*, *Diploplastron*, *Metadinium*, *Epidinium*, *Enoploplastron*, *Ophryoscolex*, *Epiplastron*, *Elytroplastron*.

Le développement des protozoaires dépend du contact avec d'autres ruminants par la salive, l'air et la nourriture.

Les plus gros protozoaires peuvent dégrader également l'hémicellulose. D'autre part, les protozoaires jouent un rôle important dans l'hydrolyse de l'amidon, en ingérant les granules d'amidon et les sucres solubles et en diminuant de ce fait l'accessibilité de ses substrats aux bactéries amylolytiques.

Les interactions avec d'autres microorganismes sont nombreuses : les protozoaires ingèrent les bactéries endogènes ou exogènes comme source de protéines pour leur synthèse cellulaire. La prédation augmente la concentration en ammoniac et de phosphate et augmente la croissance bactérienne et son efficacité car il y a plus de nutriments utilisables. La défaunation induit une augmentation du nombre de bactéries anaérobies utilisant les glucides. Les protozoaires ingèrent aussi des champignons et d'autres protozoaires pour se fournir en azote et en stérols.

La quantité de protozoaires varie rapidement avec le repas. Ils sont très sensibles à l'absence de nutrition et peuvent disparaître en 2 à 3 jours de diète. La nourriture influence la quantité et la composition en protozoaires et des ingestions fréquentes favorisent le développement des protozoaires. Si l'alimentation est riche en glucides, les protozoaires croissent rapidement, puis stockent l'amylopectine assurant une fermentation graduelle qui évite la formation d'acide lactique. Le changement alimentaire doit être progressif au risque d'entraîner la mort des ciliés, sensibles au pH acide.

La nécessité des protozoaires est controversée : ils améliorent la digestibilité, uniformisent la fermentation entre les repas, et seront surtout importants pour les faibles rations.

3.5. Interaction entre microorganismes du rumen

3.5.1. Relations entre bactéries du rumen

Les bactéries ont des relations symbiotiques. Il y a des espèces qui transforment des produits déjà pré-digérés par d'autres. Ces interactions profitent beaucoup plus à l'hôte.

3.5.2. Relations entre bactéries et protozoaires

Dans le réticulo-rumen les protozoaires et bactéries sont en compétition pour l'utilisation de l'ammoniac et de l'énergie sous forme d'ATP indispensable à leur croissance. Les protozoaires ingèrent un grand nombre de bactéries (Jarrige., 1978 ; Demeyer et Van Nevel, 1979 ; Preston et Leng, 1984). Ce double rôle de compétition et de prédation que jouent les protozoaires au détriment des bactéries explique leur contribution négative à la digestion ruminale. Des expériences de défaunation par élimination des protozoaires tentées par Van Nevel et Demeyer (1981) ont abouti à l'amélioration du bilan azoté des rations et à l'augmentation de la production de viande et de laine.

3.5.3. Interactions entre bactéries - protozoaires et champignons

Tout en étant en compétition avec les bactéries, pour la colonisation des particules alimentaires, les champignons attaquent les substrats qui sont ensuite colonisés par les bactéries (Bauchop, 1979 ; Orpin, 1975). Orpin met en évidence le rôle prédateur que les protozoaires jouent sur les champignons en ingérant leurs zoospores.

4- Les différents glucides dans l'alimentation des ruminants

Les constituants glucidiques des différentes cellules végétales peuvent être classés en deux catégories ; les glucides pariétaux et les glucides cytoplasmiques.

4.1. Les glucides pariétaux

La paroi des cellules végétales est composée de polymères souvent complexes, d'autant plus nombreux en proportion que la cellule est âgée. Ils sont responsables de la rigidité des végétaux ils ne sont pas hydrolysables par les enzymes digestives des êtres vivants supérieurs mais sont dégradés par la flore cellulolytique (Enjalbert, F., 1996 ; Nocek, J., 1991). Ils se trouvent en grande proportion dans les tiges des fourrages et des enveloppes des graines.

4.1.1. La cellulose

C'est un polymère (homopolysaccharide) de glucose en liaison β 1-4, dont l'hydrolyse extracellulaire conduit à des dimères de cellobiose. Elle constitue le principal glucide structural des parois des cellules végétales.

4.1.2. Les pectines

Constituée principalement de chaînes d'acides galacturoniques, elles sont facilement dégradables par la microflore ruminale, comme les glucides cytoplasmiques. Leur importance quantitative reste minime dans la plupart des rations.

4.1.3. Les hémicelluloses

Ce sont des polymères complexes (hétéropolysaccharides ou hétéropolyholosides) de xylose, glucose, galactose, arabinose et acide glucuronique, elles sont facilement dégradées par les enzymes microbiennes, sauf si elles sont trop liées à la lignine.

4.1.4. La lignine

Sa structure est non glucidique mais elle est classiquement rangée parmi les glucides pariétaux car liée aux hémicelluloses et à la cellulose. C'est un polymère complexe de composés aromatiques phénoliques, très difficile à dégrader. Sa proportion augmente fortement avec l'âge de la plante.

4.2. Les glucides cytoplasmiques

Ce sont les oses et les autres glucides hydrolysables par les enzymes digestives des êtres vivants supérieurs. Ils se trouvent en grande quantité dans la plupart des aliments dits « concentrés »

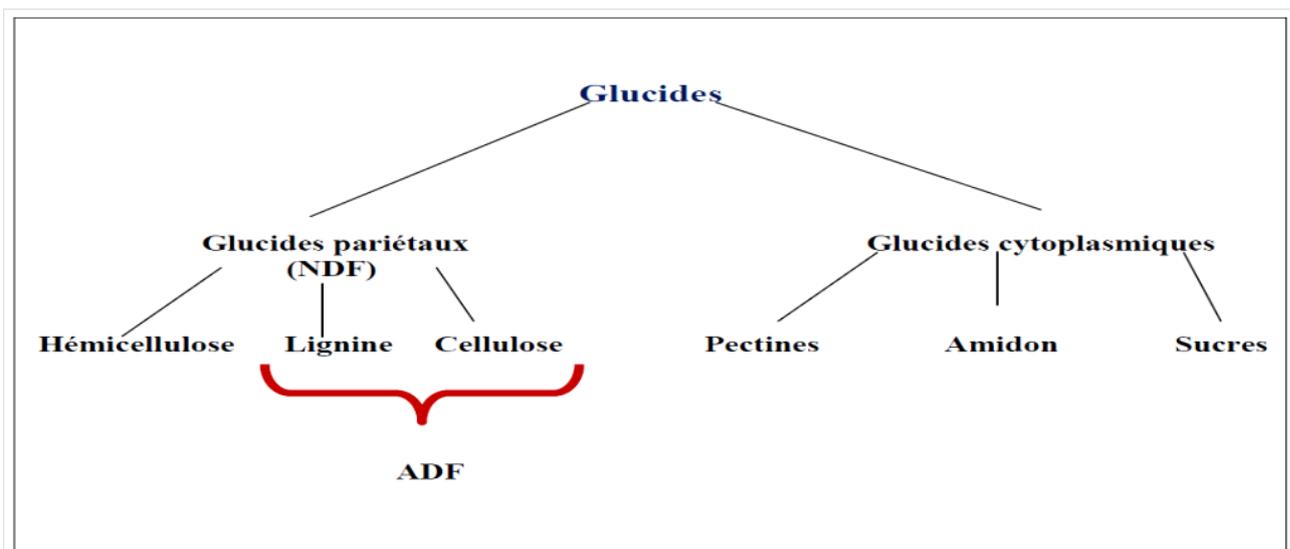


Figure 5: Les différents glucides végétaux (Nocek J., 1991)

énergétiques » et un peu dans les fourrages jeunes (Figure 3). On peut distinguer deux groupes, les sucres solubles et l'amidon.

4.2.1. Les sucres solubles

Ce sont les oses et les diholosides ou disaccharides. Ils sont très rapidement fermentés. Ils représentent généralement moins de 10% des rations et sont présents dans les feuilles et les tiges jeunes.

4.2.2. L'amidon

Constitué essentiellement d'une fraction glucidique (99%), c'est un polyholoside composé de deux types de macromolécules reliées entre elles par des liaisons hydrogènes.

a. L'amylose

Polymère principalement linéaire de D-glucose en liaison α 1-4, avec quelques liaisons α 1-6. En moyenne, l'amylose représente de 20 à 30 % du poids total.

b. L'amylopectine

Ramifiée, composée de D-glucose en liaison α 1-6 et α 1-4 au niveau des ramifications. Elle est plus grosse que l'amylose et représente en moyenne 70 à 80 % du poids de l'amidon.

L'amidon se présente sous forme de granule avec un hile autour duquel on observe des zones concentriques alternativement claires et sombres. En général les granules sont volumineux et lenticulaires :

- Type A, petits ou sphériques, présent surtout dans les amidons des céréales
- Type B, caractéristiques des amidons de tubercules, mais présents aussi dans les céréales.
- Type C, structure intermédiaire, présent chez les légumineuse.

5- Digestion ruminale des glucides

5.1. Hydrolyse

Les microorganismes du rumen hydrolysent dans un premier temps les glucides végétaux (cellulose, hémicelluloses, pectines, amidon, sucres) en sécrétant des polysaccharidases (cellulases, hémicellulases, pectinases, amylase) et oligosaccharidases (α -D ou β -D-glucosidase, β -D-xylosidase, β -D-galactosidase, β -D-cellobiosidases). Les bactéries du rumen doivent se fixer aux fragments végétaux pour les dégrader. La plupart des bactéries cellulolytiques ont aussi des activités hémicellulolytiques. En revanche, les populations fibrolytiques et amylolytiques sont distinctes, avec une sensibilité particulière au pH des populations fibrolytiques.

Bien que certains protozoaires puissent se fixer sur les particules solides, ils ingèrent généralement de petites particules qu'ils digèrent ensuite via leurs enzymes produites dans le sac

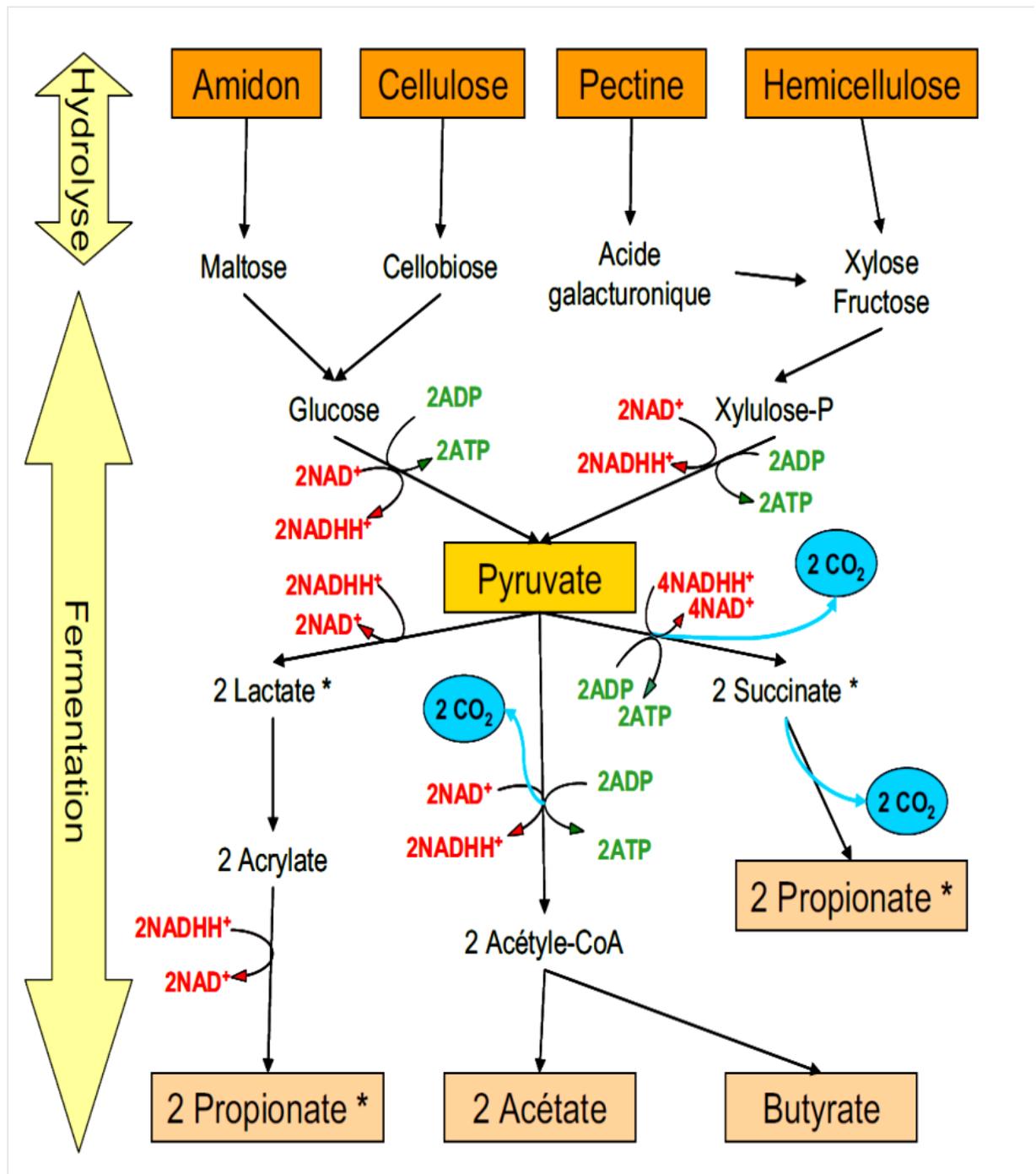


Figure 6 : Voies du métabolisme des glucides dans le rumen

(Jouany *et al.*, 1995 et Moss *et al.*, 2000)

digestif. Ils possèdent une activité fibrolytique et amylolytique. Les protozoaires peuvent également stocker de l'amidon, ce qui permet notamment d'éviter les baisses importantes de pH en soustrayant l'amidon de l'action des bactéries amylolytiques. La séquestration naturelle des protozoaires à l'intérieur du rumen explique pourquoi le temps de contact entre les particules végétales est suffisamment long pour permettre une digestion importante des substrats ingérés par les ciliés. Les

champignons doivent se fixer aux fragments végétaux pour les dégrader. Ils produisent des enzymes actives contre la cellulose et les hémicelluloses, leur présence dans le rumen améliore de 30 à 50% la digestion des glucides pariétaux des fourrages peu digestibles comme la paille de blé (Hillaire *et al.*, 1990).

Des enzymes pectinolytiques, des estérases et des lyases sont produites par les protozoaires et les bactéries. En revanche, il ne semble pas que les champignons soient capables de digérer efficacement les substances pectiques (Hillaire *et al.*, 1990).

5.2. La digestion de la cellulose par les bactéries cellulolytiques

Les bactéries, tout comme les champignons et les protozoaires du rumen, colonisent presque toutes les parties des plantes qui pénètrent dans le rumen, à l'exception des surfaces des plantes intactes, qui ne sont colonisées par aucun microorganisme. La principale voie d'entrée de l'invasion semble se faire via les lésions de l'épiderme de la plante (Chesson A and Forsberg C.W., 1988). Les bactéries associées aux particules alimentaires sont considérées comme le groupe le plus important dans la dégradation des fibres, du fait de leur prédominance en terme de masse bactérienne, et d'activité endoglucanasique (Minato H, *et al.*, 1966). L'adhésion de la bactérie aux parois cellulaires semble être la première étape du processus de dégradation. Les principales espèces bactériennes s'attachant de la sorte sont les bactéries cellulolytiques *R. albus*, *R. flavefaciens* et *F. succinogenes*. Les espèces de *Ruminococcus* semblent s'attacher de manière lâche, alors que *F. succinogenes* présente une adhésion serrée (Chesson A and Forsberg C.W., 1988).

L'adhésion de la bactérie à la cellulose au sein de l'écosystème ruminal peut être divisée en quatre phases pour les trois espèces précédemment citées :

- (1) transport de la bactérie non motile jusqu'au substrat.
- (2) adhésion non spécifique à la bactérie sur les sites disponibles de la paroi cellulaire.
- (3) adhésion spécifique grâce à la formation de ligands avec le substrat, formation qui pourrait être facilitée par des structures comme les cellulosomes ou le glycocalyx.

(4) prolifération des bactéries attachées sur des tissus potentiellement digestibles (Krause D.O, *et al.*, 2003). L'adhésion bactérienne peut néanmoins être affectée par un certain nombre de facteurs, comme la nature du substrat, les facteurs environnementaux ou encore la compétition entre microorganismes.

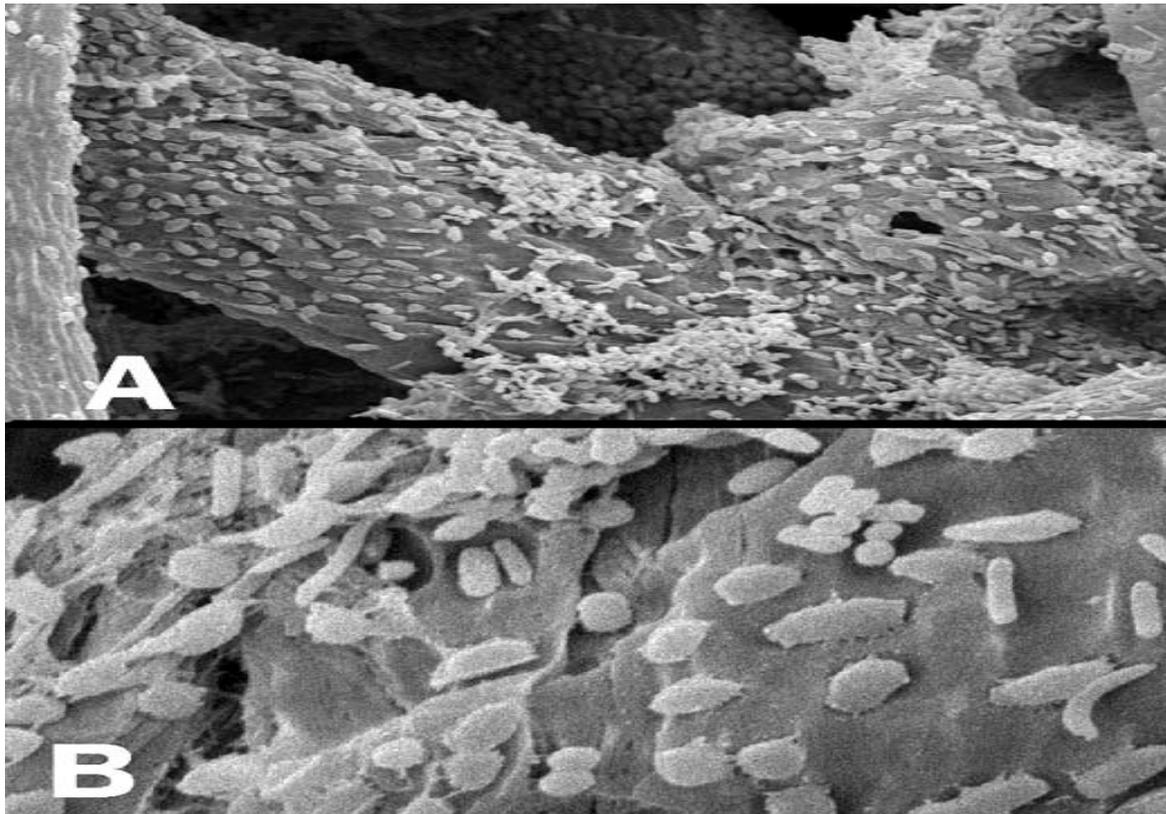


Figure 7: Incubation de papier dans une suspension de bactéries et de protozoaires ruminants

5.3. Mécanisme de digestion de la cellulose

Le complexe des enzymes cellulolytiques comprend 3 principaux types d'enzymes qui fonctionnent en synergie pour hydrolyser la cellulose cristalline. Il s'agit des endo- β -glucanases, des exo- β -glucanases (uniquement retrouvées chez des champignons anaérobiques dans le rumen) et des β -glucosidases. Le mode d'action de chaque enzyme est le suivant : les endoglucanases, 1,4- β -D-glucan glucanohydrolases et carboxyméthylcellulase scindent de manière « aléatoire » les chaînes de cellulose en glucose et en cello-oligosaccharides. Puis les exoglucanases et 1,4- β -D glucan cellobiohydrolases réalisent une dissociation d'unités de cellobiose à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne. Enfin, les β -glucosidases et cellobiases réalisent l'hydrolyse de la cellulose en glucose (Krause D.O *et al.*, 2003). L'inhibition par les produits terminaux, liée à une accumulation de cellobiose, est prévenue par l'action de la β -glucosidase.

5.4. Fermentations

Les produits issus de la phase d'hydrolyse sont principalement le glucose, le cellobiose, le xylose et l'acide galacturonique (Russel and Gahr., 2000). Les monomères issus des processus d'hydrolyse sont alors fermentés dans le cytoplasme des cellules microbiennes en AGV et gaz via le pyruvate. Le C₂ et le C₄ sont formés à partir de l'acétyl Co-A alors que le C₃ est principalement

formé à partir du succinate ou, dans une moindre mesure, à partir de l'acrylate (via le lactate). Le C₅ et le C₆ sont formés à partir de la condensation de l'acetyl-CoA et du propionyl-coA.

Les processus de fermentation anaérobie impliquent des transferts d'hydrogène et génèrent de l'énergie métabolique conservée sous la forme d'adénosine triphosphate (ATP), qui est ensuite utilisée par les micro-organismes afin d'assurer leur fonction d'entretien et de croissance. La partition entre les différentes voies fermentaires est régulée par des lois thermodynamiques à travers les ratios des cofacteurs ATP/ADP et NADH₂/NAD, reflétant le statut énergétique et le potentiel redox, respectivement. Lorsque l'énergie est en excès, les voies fermentaires générant moins d'ATP sont favorisées (Sauvant and Van Milgen., 1995).

6- Le métabolisme énergétique ruminal

6.1. Le transfert d'énergie dans le rumen

Toutes les cellules vivantes ont besoin des oxydations pour se procurer leur énergie, dont l'ATP est le représentant. Le processus d'oxydation consiste à transférer des électrons d'un donneur à un accepteur : plus grande est la différence de potentiel entre les couples concernées, plus grande est l'énergie produite. Cependant, lorsqu'un organisme ne dispose que d'un seul substrat carboné, il est donc placé théoriquement dans une situation sans issue s'il ne dispose pas d'un accepteur pour faire marcher ses oxydations. Une des situations les plus fréquentes est en milieu anaérobie où la cellule est privée d'un excellent accepteur d'électron, l'Oxygène. En l'absence de ce dernier, ou lorsque la cellule ne sait pas l'utiliser, la parade consiste à se porter sur un accepteur provisoire comme le NAD⁺, même s'il est disponible en quantité limitée ou à fabriquer un accepteur définitif, fatalement dérivé du substrat de départ puisqu'il n'y a rien d'autre de disponible (Pelmont G., 1993).

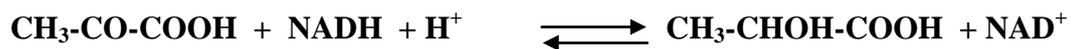
Le rumen est le siège de nombreuses réactions chimiques faisant intervenir divers couples d'oxydoréduction. La fermentation ruminale est un processus exergonique au cours de laquelle les constituants du régime alimentaire sont convertis en produits rapidement utilisables par l'animal. Ces transformations génèrent de l'énergie libre utilisée pour la croissance des microorganismes et notamment les bactéries anaérobies majoritairement présentes dans le rumen. L'absence d'O₂ et la production d'agents réducteurs caractérisent le rumen comme un environnement hautement réducteur avec des valeurs de Eh situées entre - 150 et -250 mV (Broberg G., 1952 ; Marouken M., 1982). Puisque l'O₂ n'est pas disponible en tant qu'accepteur final d'électron, d'autres moyens d'oxydation doivent être employés et ces réactions d'oxydation doivent être couplées aux réactions de réduction (Russell J.B and Strobel H.J., 1993). Les oxydations anaérobies sont incomplètes, mais

les bactéries ruminales possèdent des mécanismes de conservation d'énergie très efficaces. Ces bactéries sont souvent capables de se reproduire autant de fois en présence de glucose que *Escherichia coli* en aérobie, bien que l'énergie disponible soit au moins 7 fois inférieure en anaérobie (Russell J.B and Wallace R.J., 1989).

Les hydrates de carbone sont la source d'énergie première pour la croissance des microorganismes du rumen et la majorité des bactéries fermentent ces sucres. Plusieurs modes de fermentation existent, notamment la fermentation lactique, propionique et la méthanogénèse entre autres.

6.1.1. La fermentation lactique

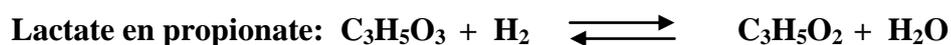
Après la glycolyse, appelée aussi voie de Emben-Meyerhof-Parnas, une molécule de glucose subit une transformation en acide pyruvique (gain net : 2 ATP). Deux molécules en sont formées par molécule de glucose et sont réduites en acide lactique par l'enzyme lactate déshydrogénase selon la réaction :



En somme une bactérie ruminale métabolisant le glucose sur ce principe crée son propre accepteur d'électrons à partir du glucose. Le produit est l'acide lactique qui est rejeté dans le milieu. De plus, la réaction est fortement faisable d'un point de vue thermodynamique, avec une différence de potentiel standard de + 0,447 V. Le glucose est utilisé comme source d'énergie mais le rendement de l'opération est médiocre, car le glucose est transformé en grande quantité pour produire seulement 2 ATP par molécule.

6.1.2. Les fermentations propioniques

Le propionate est le produit de fermentation de nombreuses bactéries anaérobies. En effet la fermentation propionique à partir du glucose ou du lactate correspond aux bilans :



Le lactate est l'un des substrats préférés des bactéries propioniques. Il y a deux voies principales pour passer du lactate au propionate. La première est la voie du succinate : elle met en

jeu la réduction du fumarate en succinate qui s'accompagne de la synthèse d'ATP. Cette réaction est possible thermodynamiquement parce que le potentiel standard du couple fumarate/succinate est de +0,03 V, assez éloigné du couple NAD⁺/NADH (-0,32 V), donnant une énergie suffisante pour la synthèse d'un ATP. Le propionate est aussi formé à partir du lactate par la voie de l'acrylate (Baldwin R.L. *et al.*, 1962) via le lactyl CoA, l'acrylyl CoA et le propionyl CoA. On la trouve chez quelques espèces comme *Clostridium propionicum* (Johns A.T., 1952).

6.1.3. La méthanogénèse

Les microorganismes producteurs de CH₄ (méthanogènes) sont strictement anaérobies et appartiennent au domaine des archaebactéries. Des traces d'oxygène suffisent à les tuer, en partie par l'auto-oxydation de certains cofacteurs nécessaires à leur métabolisme. Elles se développent dans des milieux réducteurs (Eh = - 180 mV). La phase liquide du rumen, caractérisée par un potentiel redox situé entre 150 et - 250 mV, se trouve être l'endroit de prédilection pour la production de CH₄. Ce dernier est produit essentiellement par une réduction du CO₂ selon la réaction:



La réaction est exergonique et les archéobactéries l'utilisent pour leur production. D'autre part, l'hydrogène est un substrat. Il est engendré par des fermentations dans le milieu ruminal. Les méthanogènes vivent en association avec d'autres organismes anaérobies qui leur fournissent en continu l'H₂ et le CO₂ indispensables pour leur croissance. Une formation de CH₄ s'accompagne d'une consommation d'H₂. En d'autres termes, la méthanogénèse épure l'H₂ et favorise les fermentations des autres couples présents dans le milieu.

6.2. Le microbiote ruminal détenteur d'un pouvoir réducteur

La fermentation ruminale est un processus exergonique qui convertit les aliments en AGV, en acide lactique, en ammoniac et en méthane et d'autres gaz. L'énergie ainsi libérée est utilisée par les microorganismes autochtones du rumen pour accroître ou maintenir leur activité et leur croissance. L'efficacité de l'activité microbienne se répercute directement sur les performances zootechniques du ruminant. La population microbienne ruminale majoritairement constituée de bactéries anaérobies qui ne cherche qu'à accroître sa biomasse, est parfois limitée par des perturbations telles que l'ingestion de certains aliments, l'eau de boisson et l'accumulation des produits terminaux de la digestion (Remond B., 1995). Des espèces impliquées dans les fermentations métaboliques ont été isolées et leurs activités caractérisées (Hungate R.E., 1966).

Puisque l'O₂ n'est pas disponible en tant qu'accepteur final d'électrons, d'autres moyens de récupération de l'énergie, comme la respiration anaérobie, sont mis en œuvre pour la production d'ATP qui est l'élément énergétique final, indispensable à la croissance de tout le microbiote.

Le groupe des *Archaea* auquel appartiennent les méthanogènes, sont présentes et familières des environnements extrêmes situés aux limites en termes de température, de pH, de salinité et/ou d'anaérobiose (Schäfer G., *et al.* 1999). L'absence d'oxygène et le niveau du Eh désignent, de ce point de vue, le rumen comme un environnement extrême : anaérobie, hautement réducteur et particulièrement favorable à la croissance des méthanogènes (Sauer F.D and Teather R.M., 1987).

Les Archéobactéries méthanogènes sont très sensibles à la présence d'O₂ et ne peuvent se développer tant que toute trace d'O₂ n'a pas été préalablement soustraite du milieu de culture (Smith P.H and Hungate R.E., 1958). Elles captent leur énergie en réduisant le CO₂ comme accepteur final d'électrons, en CH₄. La production de CH₄ semble être plus conséquente chez des animaux à la pâture (Johnson K.A and Johnson D.E., 1995) que chez des animaux recevant des rations riches en concentrés : la quantité de méthane est réduite de moitié à savoir de 28 à 15g de CH₄/L de lait produit (Sauvant D., 1993). Il s'agit là principalement d'un effet ration qui permet à l'animal de mieux valoriser l'énergie alimentaire en limitant les pertes sous forme de méthane, estimées à environ 8% de l'énergie brute ingérée et 12% de l'énergie digestible (Rochette Y. *et al.*, 2005).

Chapitre II : Généralités sur les tannins

1- Introduction

Les tannins (ou tanins) sont des substances d'origine végétale qui ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible, le cuir (Bruneton., 1999). Cette propriété de tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène de la peau.

D'un point de vue biochimique, une première définition a été proposée par Bate-Smith (1973) : « les tannins sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3 000 Da et qui ont, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines ». Même si cette définition reste valable, elle a été complétée grâce aux méthodes récentes d'analyse qui ont permis d'éclaircir la structure de ces polyphénols.

Ainsi, les tannins sont désormais définis comme des polyphénols de masse moléculaire allant jusqu'à 20 000 Da (Haslam, 1989; Hagerman, 2002). Selon leur structure biochimique, il est usuel de distinguer deux classes de tannins : les tannins hydrolysables (THs) et les tannins condensés (TCs).

1.1. Classification biochimique des tannins

Les tannins sont des polymères de molécules phénoliques de PM compris entre 500 et 20 000 Da (Hagerman, 2002). La structure de ces composés phénoliques comprend au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupements phénoliques. La grande famille des polyphénols s'étend des molécules simples, comme les acides phénoliques, aux molécules hautement polymérisées, comme les tannins.

Chez les végétaux supérieurs, il est usuel de distinguer deux groupes de tannins selon leur structure biochimique: les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992; Bruneton, 1999; Hagerman, 2002).

1.1.1. Les tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables (THs) sont des oligo- ou poly-esters d'un sucre, en général le glucose, et de molécules d'acide-phénol (Jean-Blain, 1998; Bruneton, 1999; Mueller-Harvey,

2001). Ils sont classés selon la nature de l'acide-phénol : les tannins galliques possèdent un acide gallique (Figure 8), alors que les tannins éllagiques ont un acide hexahydroxyphénique (Hagerman, 2002). Les tannins éllagiques sont obtenus suite à un couplage oxydatif entre les molécules d'acide gallique (Mueller-Harvey, 2001).

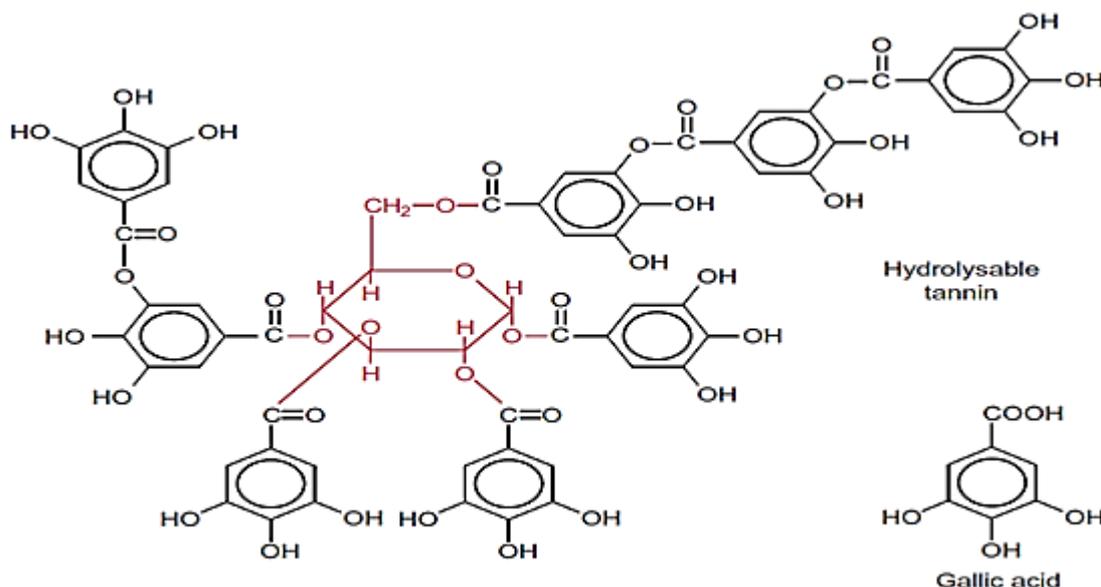


Figure 8 : Structure des Tannins hydrolysables

(Hans-Walter Heldt and Birgit Piechulla, Plant Biochemistry, 2011)

En général, les THs ont un faible PM. Cependant, des couplages oxydatifs entre THs peuvent produire des polymères de PM importants (Mueller-Harvey, 2001). Seules les molécules de triesters ou de PM supérieurs présentent les propriétés classiques des tannins (Bruneton, 1999). Le terme « tannin hydrolysable » indique leur sensibilité à l'hydrolyse acide. Ils sont notamment hydrolysés dans le tractus digestif des ruminants et leurs produits de dégradation sont absorbés. Ils peuvent être responsables d'intoxications, lors d'ingestion trop massive, et provoquent des lésions hépatiques et rénales, décrites chez les ovins (Zhu *et al.*, 1992) ou les bovins (Plumlee *et al.*, 1998).

1.1.2. Les tannins condensés

1.1.2.1. Nomenclature

Les tannins condensés (TCs), ou proanthocyanidols, sont des polyphénols appartenant à la famille des flavonoïdes (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992; Bruneton, 1999). La structure chimique des flavonoïdes est basée sur un système d'hétérocycles (Figure 6). En général, les TCs ont des PMs plus élevés que ceux des THs (Hagerman, 1992).

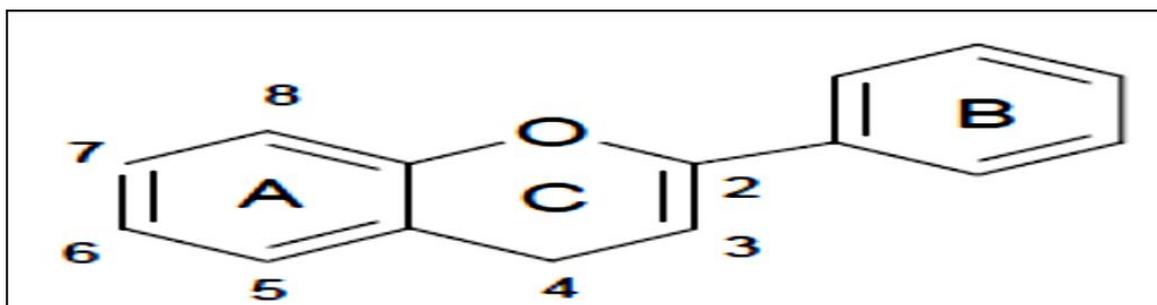


Figure 9 : Structure chimique de base des flavonoïdes

L'unité de base (ou monomère) des TCs est un flavan-3-ol (Figure 9). Les TCs sont des polymères de flavan-3-ols liés par des liaisons de type C-C (Type B) ou C-OC (type A) (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Jean-Blain, 1998; Bruneton, 1999; Feucht et Treutter, 1999; Schofield *et al.*, 2001).

Selon la nomenclature française, les noms des TCs se terminent en «-ols» car ce sont des flavonoïdes (nomenclature anglaise : terminaison en «-in»). Ils sont définis par la nature (et le nom) des monomères qui le constituent et par la position et la stoechiométrie (α ou β) de la (ou des) liaison(s) interflavanique(s).

Par définition, les homo-polymères sont des TCs présentant uniquement une classe de flavan-3-ols dans leur structure (Figure 9) (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Hagerman, 2002). A l'inverse, les hétéro-polymères peuvent contenir des monomères de classes différentes (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Hedqvist *et al.*, 2000).

En fonction de leur degré de polymérisation (nombre de flavan-3-ols composant le TC), généralement les oligomères, comprenant de 2 à 10 monomères, sont distingués des polymères contenant plus de 10 monomères.

1.1.2.2. Structure biochimique des flavan-3-ols

La présence d'un hydrogène (H) ou d'un groupement hydroxyl (OH) aux positions R1, R2 et R3 permet d'identifier les flavan-3-ols (Figure 10).

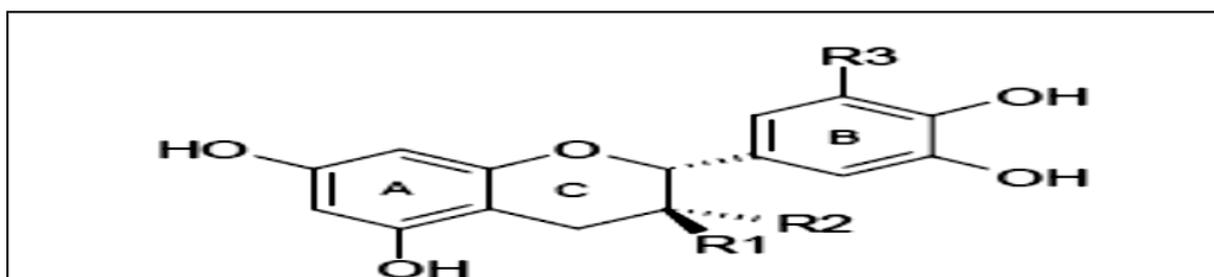


Figure 10 : Structure chimique du flavan-3-ols

Tableau 1: Les différentes classes de polymères dérivant des flavan-3-ols

Flavan-3-ols	Classes Des homo-polymères	R1	R2	R3	Nombre de fonctions OH
Catéchol (C)	Procyanidols	OH	H	H	5
Épicatéchol (EC)	Procyanidols	H	OH	H	5
Gallocatéchol (GC)	Prodelphinidols	OH	H	OH	6
Épigallocatéchol (EGC)	Prodelphinidols	H	OH	OH	6
Fisétinidinol	Profisétidinols	H	H	H	4
Robinétidiol	Prorobinétidinols	H	H	OH	5

En fait, les monomères des prodelphinidols (ou prodelphinidins) (PDs) sont différenciés de ceux des procyanidols (ou procyanidins) (PCs) par la présence d'un groupement OH en position R3, ce qui leur confère une capacité accrue à se fixer aux protéines (Aerts et al., 1999; Schofield et al., 2001). Parfois, le flavan-3-ol est estérifié à un acide gallique en position R2 (Figure 7) (Mueller-Harvey and Mc Allan., 1992). La présence d'un ou plusieurs acides galliques modifie les propriétés biologiques des TCs (Schofield *et al.*, 2001; Hagerman, 2002).

1.1.2.3. Structure biochimique des polymères

Les végétaux supérieurs contiennent majoritairement deux classes d'homopolymères : les PCs composés uniquement de catéchol (C) ou d'épicathécol (EC) et les PDs constitués seulement de gallocathécol (GC) ou d'épigallocathécol (EGC) (Figure 11) (Mueller-Harvey and Mc Allan., 1992; Bruneton., 1999).

Deux autres classes d'homo-TCs sont plus rarement rencontrées : les profisétidinols (profisetinidins) et les prorobinétidinols (prorobinetinidins) (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Collingborn *et al.*, 2000). Néanmoins, des hétéro-oligomères, composés à la fois de C ou EC et de GC ou EGC, ont également été identifiés chez certaines plantes (Mueller-Harvey and McAllan., 1992), comme le sainfoin (Marais *et al.*, 2000). Les liaisons interflavoniques sont majoritairement de type Carbone-Carbone (Type B) et surtout établies entre le C₈ du monomère terminal et le C₆ du monomère additionné. Cependant des liaisons entre le C₆ du monomère terminal et le C₄ du monomère additionné sont parfois décrites (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Bruneton, 1999; Feucht et Treutter, 1999; Hagerman, 2002). Par conséquent, les TCs peuvent présenter soit une structure linéaire (uniquement des liaisons C₄-C₈) (exemple des TCs des grains de sorgho), soit une

structure branchée (liaisons C₄-C₈ et C₄-C₆) (exemple les TCs du quebracho) (Hagerman, 2002) (Figure11).

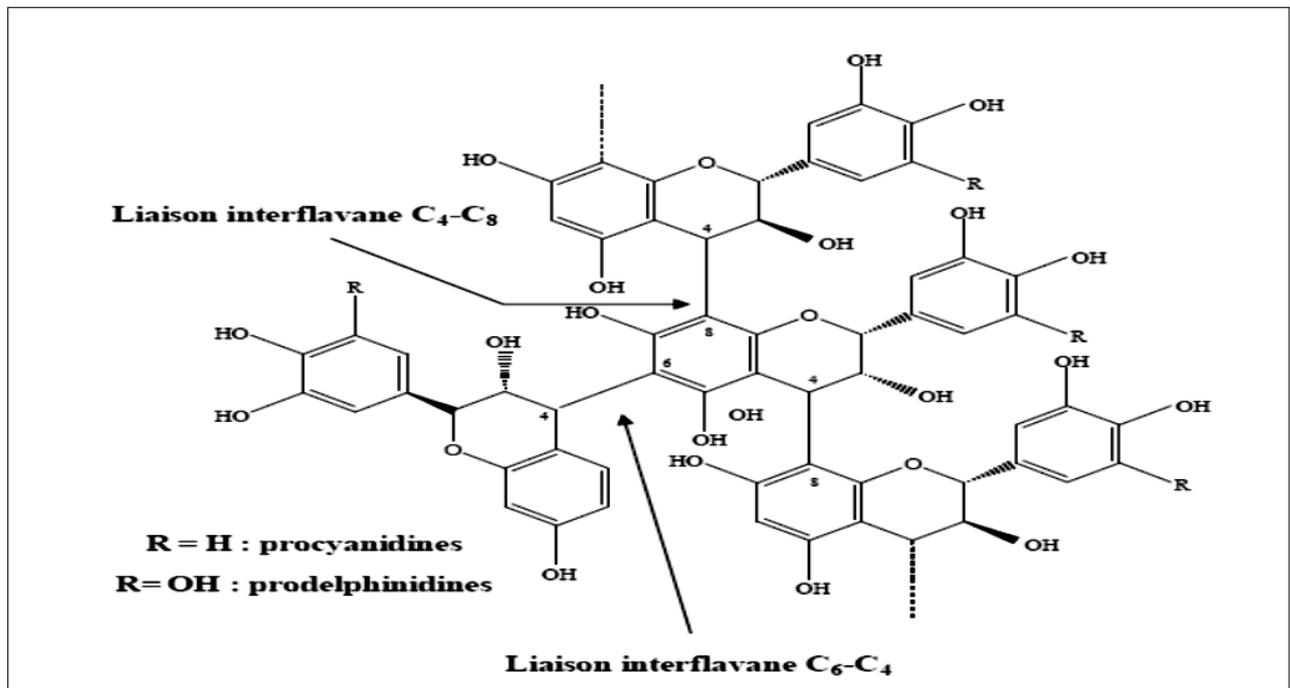


Figure 11 : Structure des tanins condensés (Bruneton, 1999; Hagerman, 2002).

Un second type de liaison (Type A) a été décrit chez les TCs, qui fait intervenir à la fois une liaison C₄-C₈ et une liaison C₂-O-C₇ entre deux monomères (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Mueller-Harvey, 2006) (Figure 12).

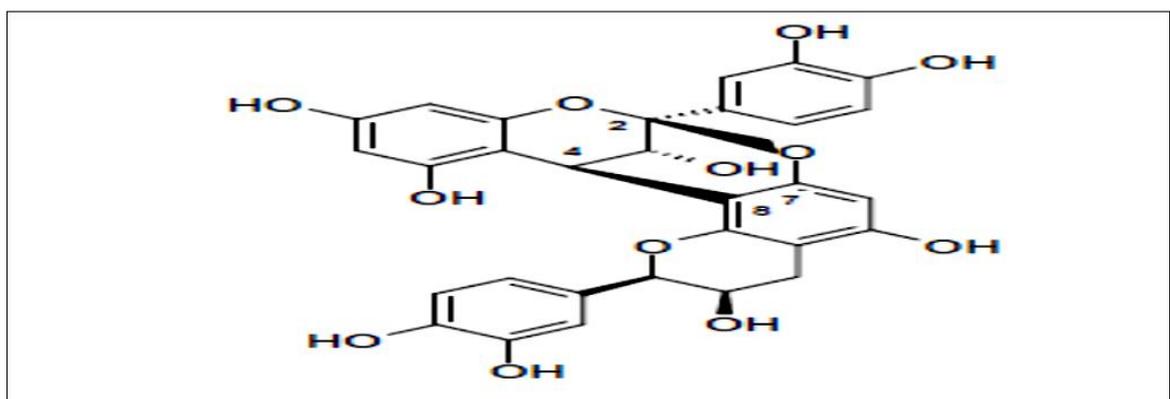


Figure 12. Structure chimique du dimère A2 (procyanidol)

Il est intéressant de noter que le degré de polymérisation des TCs est très variable selon la plante. Par exemple, il a été montré que les grains de raisin contiennent des TCs composés de 2 à 17 monomères (Prieur *et al.*, 1994) alors que ceux du sainfoin sont généralement composés de 5 à 8

monomères (Koupai- Abyazani *et al.*, 1993). Des TCs de plus haut degré de polymérisation existeraient mais leur insolubilité rend leur analyse difficile (Mueller-Harvey, 2006).

1.1.2.4. Biosynthèse des tannins condensés

Chimiquement, la formation des TCs implique des flavan-3,4-diols qui sont des Molécules très réactives. Ces flavan-3,4-diols donnent des carbocations qui réagissent sur les carbones nucléophiles en position 8 ou 6 d'un flavan-3-ol (Bruneton, 1999; Schofield *et al.*, 2001).

Les flavan-3-ols et les TCs sont issus de la voie métabolique du phénylpropanoïde (Weisshaar and Jenkins., 1998), qui conduit également à la synthèse des flavonoïdes (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Bruneton, 1999). Néanmoins, bien que la voie de biosynthèse des flavonoïdes soit bien connue, les étapes de condensation et de polymérisation des TCs restent mal définies (Mueller- Harvey and Mc Allan., 1992; Hagerman, 2002). Les précurseurs de la synthèse des flavonoïdes sont la phénylalanine et l'acétate (Mueller-Harvey and Mc Allan., 1992). Les premières étapes de la synthèse des flavan-3-ols seraient communes à celles des anthocyanes et auraient lieu dans le cytoplasme alors que la maturation et la polymérisation des TCs aurait lieu dans la vacuole des cellules végétales (Aerts *et al.*, 1999; Waghorn., 2008) (Figure 13).

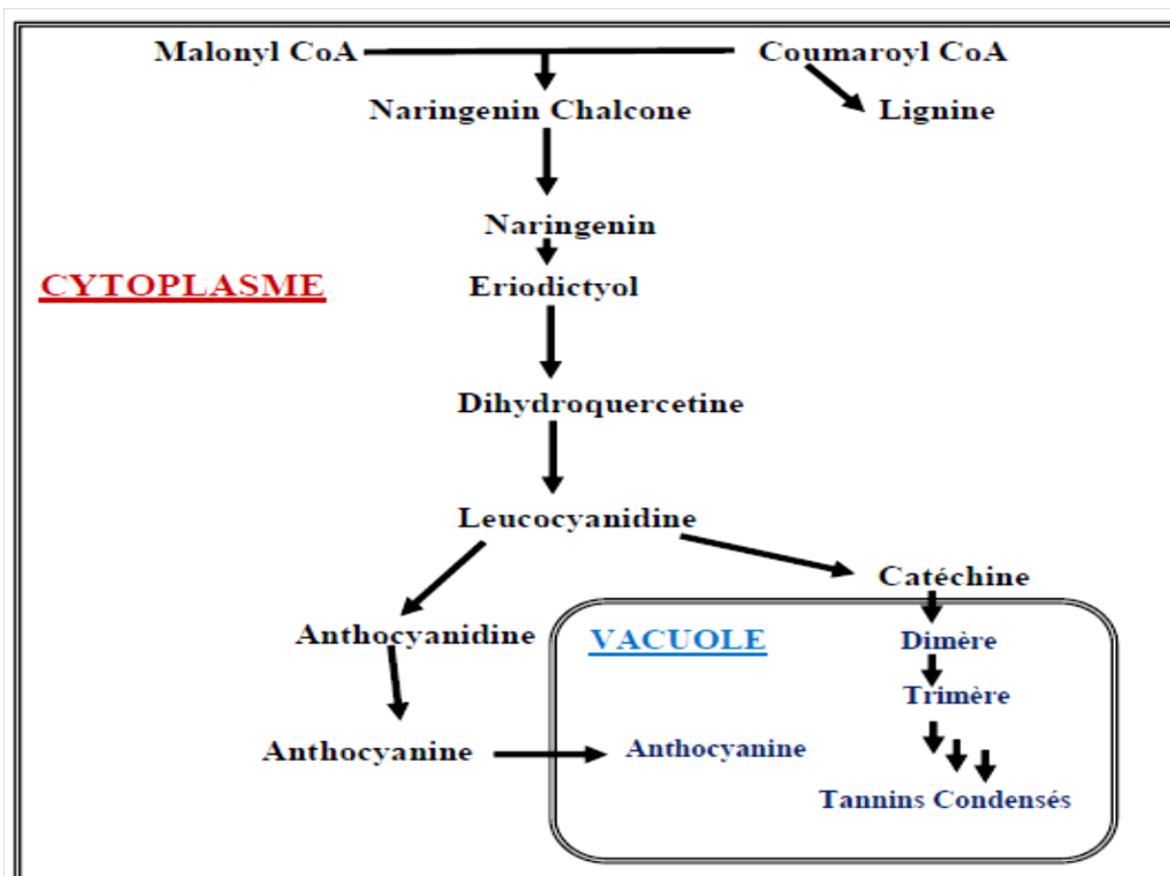


Figure 13 : Etapes de la biosynthèse des tannins condensés (Aerts *et al.*, 1999).

2- Propriétés des tanins

La structure chimique des tanins présente de nombreux groupements hydroxyles et phénoliques qui leur confèrent la propriété de former des complexes avec de nombreuses macromolécules, telles que des protéines et des hydrates de carbones, ou encore avec des ions métalliques (Mueller-Harvey and Mc Allan., 1992; Bravo., 1998).

2.1. Les propriétés physico-chimiques des tanins

2.1.1. Solubilité des tanins

La solubilité des tanins dans l'eau dépend de leur poids moléculaire et de leur degré de polymérisation (Jean-Blain, 1998; Bruneton, 1999). Les tanins sont également solubles dans l'acétone et les alcools. C'est pour cette raison que l'extraction des tanins est généralement réalisée par une solution acétone-eau ou méthanol-eau (Makkar H.P.S., 2000).

2.1.2. Liaisons aux protéines

Les tanins se fixent à la quasi-totalité des protéines, formant ainsi des complexes insolubles à pH physiologique (pH 7.4) (Zimmer et Cordesse, 1996). En plus de former des liaisons directes avec des protéines, les tanins établissent des « ponts » entre les protéines, ce qui entraîne leur précipitation (Zimmer et Cordesse, 1996; Bruneton, 1999). Néanmoins, le degré de complexation des tanins avec les protéines dépend de la structure et de la configuration tridimensionnelle des molécules impliquées (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Waterman, 1999; Poncet-Legrand *et al.*, 2006).

Les tanins à PM trop important avec un encombrement stérique associé, ne peuvent se fixer aux protéines (Hagerman, 1992; Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Jean-Blain, 1998). La liaison aux protéines dépend également de la nature chimique (composition) des tanins (Bravo, 1998; Feucht et Treutter, 1999; Waterman, 1999; Bennick, 2002), très affins pour les protéines de conformation ouverte, de PM supérieur à 20 kDas et riches en acides aminés hydrophobes (proline et hydroxy-proline) (Hagerman, 1992; Zimmer et Cordesse, 1996; Jean-Blain, 1998). De plus, la précipitation des protéines est favorisée au pH isoélectrique des protéines mises en jeu (Hagerman, 1992; Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Zimmer et Cordesse, 1996).

Enfin, la complexation des molécules de tannin et des protéines est étroitement dépendante des conditions du milieu, tels le pH, la température, la force ionique ou de la présence de molécules compétitrices. En fonction de ces conditions, deux types de complexation sont distingués :

- **Une complexation réversible**

En conditions non oxydantes et dans la gamme de pH autour de 7, les interactions entre tanins et protéines s'établissent par des liaisons réversibles (liaisons hydrogènes ou d'interactions hydrophobes) (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992; Zimmer and Cordesse, 1996; Jean-Blain, 1998; Bruneton, 1999; Bennick, 2002; Hagerman, 2002; Poncet-Legrand *et al.*, 2006). Ce mécanisme de complexation de surface semble être non spécifique.

- **Une complexation irréversible**

En conditions de stress oxydatif, les fonctions phénols des tanins ont tendance à s'auto-oxyder en O-quinones. Ces dernières interagissent avec les protéines par des liaisons covalentes irréversibles (Bruneton, 1999; Feucht and Treutter, 1999). Enfin, la stabilité des complexes 'tannin/protéine' dépend également des conditions du milieu. Elle serait maximale dans une gamme de pH compris entre pH3.5 et pH7.0 (Jones and Mangan, 1977).

1.1.3. Liaison aux acides nucléiques

Les tanins peuvent également former des complexes avec les acides nucléiques (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992). Des dérivés de l'acide tannique interagissaient avec l'ADN induisant des modifications conformationnelles (Labieniec et Gabryelak (2006).

1.1.4. Chélation d'ions métalliques

Les tanins ont la propriété de chélater les ions ferriques et cuivriques. Ainsi, l'acide tannique chélate les ions ferriques par ces groupements gallates, ce qui limite l'absorption intestinale du fer non-hémique (Hagerman, 2002).

2.2. Les propriétés biologiques des tanins

Les propriétés biologiques des tanins découlent de leurs propriétés physicochimiques.

2.2.1. Inhibition des enzymes

L'une des conséquences directes de la capacité des tanins à complexer les protéines est l'inactivation des enzymes, soit directement par fixation aux sites actifs, soit indirectement par l'encombrement stérique créé par la fixation des molécules de tanins sur l'enzyme (Zimmer and Cordesse, 1996).

2.2.2. Activité anti-oxydante

De nombreux tanins présentent des propriétés anti-oxydantes par le piégeage des radicaux libres ou encore par l'inactivation des ions pro-oxydants (Bruneton, 1999; Feucht and Treutter, 1999; Hässig *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2007). Grâce à leurs fonctions phénoliques, qui ont un fort caractère nucléophile, les tanins sont d'excellents piègeurs de radicaux libres. Les radicaux libres, tels le fer et le cuivre sous forme libre, sont des espèces chimiques instables et très réactives. Ils

s'attaquent à l'ADN et perturbent le processus de réplication, induisant des mutations cancérogènes. Ainsi, des activités antimutagènes et anticancéreuses ont été attribuées à certains tannins en raison de leur propriété anti-oxydante (Chung *et al.*, 1998; Jung and Ellis, 2001; Richelle *et al.*, 2001).

2.2.3. Effet antiseptique

Les tannins ont une activité antiseptique (Chung *et al.*, 1998; Bruneton, 1999). Certaines drogues à tannins présenteraient des effets antimicrobiens (Chung *et al.*, 1998; Hatano *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2006), antifongiques (Baba-Moussa *et al.*, 1999; Bruneton, 1999) ou antiviraux (Chung *et al.*, 1998; Yamaguchi *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2005).

3- Analyses biochimiques des tannins

En raison de leurs structures complexes et variées, l'analyse des tannins est délicate et leur dosage souvent difficile. Cependant, des méthodes de dosage des tannins totaux (TTs) ont été développées, basées sur leurs propriétés physicochimiques ou biologiques. Parallèlement, des méthodes ont été proposées pour doser spécifiquement les THs ou les TCs.

3.1. Dosages des tannins totaux

3.1.1. Méthode chimique de Folin-Ciocalteu

La méthode de Folin-Ciocalteu (réactif spécifique des phénols) se décompose en deux dosages colorimétriques successifs : le dosage des phénols totaux puis le dosage des phénols non-tanniques d'un extrait acétonique (Bruneton, 1999; Makkar, 2000). Ce second dosage est réalisé après la déplétion des tannins de l'extrait par le polyvinyl pyrrolidone (PVPP) (Makkar, 2000; Schofield *et al.*, 2001). Le PVPP est une molécule capable de se lier aux tannins présents dans l'extrait en complexes « tannin/PVPP », retirés de l'extrait par centrifugation (Makkar *et al.*, 1995). Indirectement, la teneur en tannins totaux (TTs) d'un échantillon est alors déterminée par la différence entre les teneurs en phénols totaux et en phénols non-tanniques.

3.1.2. Méthodes biologiques

Il existe diverses méthodes de dosage des TTs fondées sur leur propriété à se fixer aux protéines :

- La méthode traditionnelle, utilisant de la poudre de peau, est appliquée dans le cas des drogues officinales (Bruneton, 1999; Pharmacopée-Européenne, 2001).
- la méthode de la diffusion radiale (avec de l'albumine bovine ou du rubesco inclus dans un gel d'agarose) est une méthode simple qui permet le dosage simultané de nombreux échantillons (Makkar, 2000; Hagerman, 2002; Mueller-Harvey, 2006) ;

- les techniques basées sur l'inhibition d'enzyme (β -glucosidase ; trypsine ; alcaline phosphatase) sont des méthodes très sensibles (Schofield *et al.*, 2001);
- une méthode basée sur la propriété des tannins à réduire la production de gaz lors de fermentations anaérobies a également été développée (Makkar *et al.*, 1995; Makkar H.P.S., 2000; Mueller-Harvey., 2006).

3.2. Analyse des tannins hydrolysables

Pour le dosage des THs, il est possible d'évaluer la concentration en tannins galliques et éllagiques distinctement. Après une hydrolyse sulfurique, l'acide gallique libéré est dosé par la méthode à la rhodanine alors que l'acide éllagique est dosé à l'aide de la méthode à l'acide nitreux (Jean-Blain, 1998; Bruneton, 1999; Makkar H.P.S., 2000; Mueller-Harvey., 2001). Ces deux méthodes colorimétriques peuvent être complétées par une analyse qualitative et quantitative en RMN ou en spectrométrie de masse (Mueller-Harvey, 2001).

3.3. Dosages spécifiques et analyses des tannins condensés

Dans la plante, les TCs sont présents sous différentes formes : libres ou liés, c'est à dire ceux fixés aux protéines ou aux fibres de la plante (Schofield *et al.*, 2001). L'existence de ces deux formes (libres ou liés) rend le dosage des TCs plus délicat.

En général, les TCs sont majoritairement présents sous forme libre (Terrill *et al.*, 1992b). Cependant les conditions de stockage, de séchage et d'extraction des échantillons peuvent influencer la proportion de TCs liés/libres (Schofield *et al.*, 2001).

Afin de doser les TCs liés, un traitement par des agents chimiques, tel que le sodium dodécyl sulfate, est réalisé ultérieurement à l'étape d'extraction, afin de rompre les liaisons protéines-TCs et fibres-TCs et de libérer ainsi les TCs liés (Makkar H.P.S., 2000).

Le dosage des TCs peut ensuite être réalisé par diverses méthodes colorimétriques :

- la méthode à la vanilline est très utilisée dans les études en nutrition. Cette méthode dépend de la réaction de la vanilline avec le groupement flavonoïde terminal des TCs et la formation de complexes colorés (Makkar H.P.S., 2000; Schofield *et al.*, 2001). Cependant cette réaction n'est pas spécifique aux TCs mais de manière générale aux flavanols (Hagerman, 2002).
- la méthode du Butanol-HCl, développée par Porter *et al.*(1986) est basée sur la réaction de dépolymérisation des TCs en milieu acide. Cette réaction conduit à la libération des anthocyanidines (molécules colorées) correspondant aux monomères clivés (Jean-Blain, 1998; (Makkar H.P.S., 2000; Schofield *et al.*, 2001). Elle permet un dosage semi-quantitatif des TCs car

les monomères terminaux libérés ne donnent pas les anthocyanidines correspondants et, par conséquent, ils ne sont pas dosés (Schofield *et al.*, 2001). Cependant, la méthode au Butanol-HCl reste la méthode la plus utilisée (Makkar H.P.S. 2000; Schofield *et al.*, 2001; Hagerman., 2002; Lazarus *et al.*, 2003).

- la méthode au DMACA (p-Diméthylaminocinnamaldehyde) permet le dosage des flavan-3 ols, les monomères des TCs (Treutter, 1989; Li *et al.*, 1996; Feucht and Treutter, 1999). Cette méthode colorimétrique très sensible aux monomères l'est moins aux polymères (Gutmann et Feucht, 1994). L'analyse qualitative et quantitative des TCs d'un échantillon peut être réalisée par thiololyse, une méthode basée sur le clivage des liaisons interflavanique en présence d'un nucléophile (par exemple : le toluène- α -thiol) (Guyot *et al.*, 2001; Mueller-Harvey, 2006).

Lors d'études nutrition animale, l'analyse des échantillons est généralement réalisée par le dosage des TTs et des TCs, en associant des méthodes chimiques (Butanol-HCl et Folin-Ciocalteu par exemple) et des méthodes biologiques (Utilisation du PEG).

4- Plantes à tannins

4.1. Les plantes à tannins hydrolysables

Les THs sont présents chez certaines familles d'Angiospermes dicotylédones et quelques familles de *Fagaceae*, d'*Anacardiaceae*, d'*Anacardium* et de *Geraniaceae* (Bruneton, 1999). Par contre, ils sont absents des Gymnospermes et des Monocotylédones (Jean-Blain, 1998).

4.2. Les plantes à tannins condensés

Les TCs sont en général plus répandus dans le règne végétal et plus abondants dans les plantes que les THs (Jean-Blain., 1998). Les TCs se rencontrent chez de nombreuses plantes vasculaires chez les Angiospermes et les Gymnospermes (Bruneton., 1999). Certaines espèces de *Pinaceae* (pin), de *Fagaceae* (chêne et chataîgnier), de *Rosidae* (acacia) et de *Rosaceae* (pommier, fraisier) contiennent de fortes quantités de TCs (> 5% de la MS). Parmi les *Fabaceae* (légumineuses), certaines espèces de légumineuses fourragères, telles que le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), le sulla (*Hedysarium coronarium*) et les lotiers pédonculé et corniculé (*Lotus pedunculatus* et *L. corniculatus*), contiennent des TCs en quantité non négligeable (2 à 5% de la MS). Par contre, les plantes herbacées de la famille des *Poaceae*, tel que le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.), ou d'autres représentants de la famille des légumineuses, comme la luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.) et le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.), présentent des quantités très faibles ou non détectables de TCs.

4.3. Rôle des tanins dans les plantes

Les tanins sont des métabolites secondaires des végétaux (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Bruneton, 1999), c'est à dire des substances non-essentiels pour la croissance de la plante. Par contre, les tanins jouent un rôle dans la défense des plantes face aux agressions. La synthèse des tanins est l'un des mécanismes de défense des plantes contre les attaques des phytopathogènes. Par exemple, une accumulation de tanins a été observée dans les zones d'invasion de la plante par des bactéries, des champignons ou par des nématodes, ce qui inhiberait leur développement (Feucht et Treutter, 1999; Collingborn et al., 2000). Les tanins sont aussi un moyen de défense contre les agressions des prédateurs tels les insectes et les mammifères herbivores (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992; Woodward and Coppock, 1995; Feucht *et al.*, 1997). Il a été montré que l'ingestion de tanins affecte l'intégrité du tube digestif des insectes phytophages (Ayres *et al.*, 1997). De plus, la présence des tanins rend les plantes moins appétentes pour les mammifères herbivores, à cause de la sensation d'astringence résultant de leur consommation. Cette astringence conduit alors à un arrêt de la consommation et protège ainsi les végétaux d'une prédation excessive (Jean-Blain, 1998; Bennick, 2002).

4.4. Localisation des tanins dans la plante

Chez les végétaux, tous les organes peuvent contenir des tanins : racines, rhizomes, écorce, bois, feuilles, fleurs, fruits et cynorrhodons (faux-fruits des rosacées), graines. Malgré tout, la localisation des tanins diffère selon les organes. Les tanins sont majoritairement stockés dans les tissus épidermiques et subépidermiques, mais peuvent être aussi présents dans le péricarpe des fruits et des racines. Dans une même espèce végétale synthétisant les deux classes de tanins, il y a une distribution des THs et des TCs dans des organes différents de la plantes (Jean-Blain, 1998).

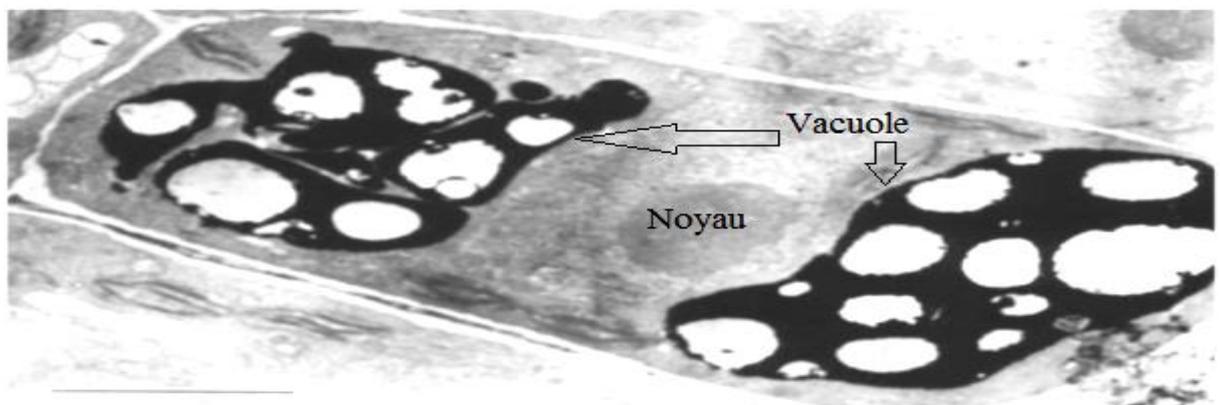


Figure 14: Micrographie montrant les TCs fixés à l'osmium (plages noires) d'une foliole de Sainfoin (*Onobrychis vicifolia* Scop.)

De même, au niveau cellulaire, les THs sont majoritairement présents dans les parois cellulaires et les espaces intracellulaires, alors que les TCs sont surtout stockés dans des vacuoles intracellulaires (figure 14) sous forme libre et, en proportion variable, liés aux fibres des parois cellulaires ou aux protéines cellulaires (Terrill *et al.*, 1992b; Frutos *et al.*, 2002).

4.5. Facteurs de variation de la teneur en tanins

La teneur en tanins d'une plante varie en fonction de plusieurs facteurs intrinsèques, tels que l'espèce et la variété, la partie ou le stade végétales, et extrinsèques, comme les conditions climatiques, pédologiques ou le stress de prédation (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992; Jean-Blain, 1998; Norton, 1999; Waterman, 1999).

4.5.1. L'espèce végétale et la variété

Au sein d'une même famille botanique, les espèces végétales présentent des différences de teneur et de nature des tanins. Pour prendre le seul exemple des légumineuses, la concentration en TCs diffère largement : 0,3g TCs/Kg de la MS dans le trèfle, 30g TCs/Kg MS dans le sainfoin (Koupai-Abyazani *et al.*, 1993; Marais *et al.*, 2000), 35g TCs/Kg MS dans le sulla (Hoskin *et al.*, 2000).

Au sein d'un même genre, il existe aussi des différences entre espèces. Des travaux ont mesuré des teneurs en TCs différentes entre le lotier pédonculé (*L.pedunculatus*) (77g TCs/Kg MS) (Foo *et al.*, 1997) et le lotier corniculé (*L.corniculatus*) (48g TCs/Kg MS) (Foo *et al.*, 1996). Enfin, des variations de concentration en TCs ont été observées entre les diverses variétés d'une même espèce de lotier corniculé (*L.corniculatus*) (Hedqvist *et al.*, 2000) ou de sainfoin (*O.viciifolia*) (Barrau, 2004).

4.5.2. La partie végétale

Les différents organes de la plante présentent des teneurs en tanins variables. En général, les plus fortes concentrations sont mesurées dans les fruits, les fleurs et les feuilles, et dérisoirement dans les tiges. Par exemple, il a été mesuré que les feuilles, les fleurs et les tiges de sainfoin contiennent respectivement 0,31%, 0,30% et 0,07% de tanins (Barrau, 2004).

4.5.3. Le stade végétal

Pour une espèce donnée, le stade végétatif influence également la teneur en tanins (Jean-Blain, 1998). Généralement, lors de la croissance de l'appareil végétatif, il y a une dilution des tanins. Dans les feuilles, la quantité et la qualité des tanins changent lors de la maturation. De même que la teneur en tanins diminue généralement lors du mûrissement des fruits.

Par exemple, la maturation des feuilles de chêne entre Avril et Septembre est accompagnée par des modifications de la teneur et de la structure (augmentation du degré de polymérisation) des tannins (Makkar H.P.S., *et al.*, 1991). Un processus similaire a été observé chez les légumineuses. Ainsi, la teneur en TCs du sainfoin varie de 27 à 16g/Kg de la MS pendant la phase de croissance (Borreani *et al.*, 2003).

La qualité des TCs varie aussi en fonction du stade végétatif (Koupai-Abyazani *et al.*, 1993; Marais *et al.*, 2000). Lors de la maturation des feuilles de sainfoin, des variations du degré de polymérisation (de 5 à 8,5) et du pourcentage de Prodelphinidols (de 60 à 95%) ont été observées (Koupai-Abyazani *et al.*, 1993).

4.5.4. Les conditions environnementales

La synthèse des tannins est généralement augmentée en réponse à un stress environnemental, quelque soit son origine : stress hydrique, appauvrissement du sol, ensoleillement trop fort (Bennick, 2002). De plus, la proportion de TCs sous forme libre ou liée aux fibres ou aux protéines est également sous l'influence des conditions climatiques et du stress nutritif (Frutos *et al.*, 2002). Ainsi, après une longue période de sécheresse, Feucht *et al.* (1997) ont observé une augmentation de 7,4 fois de la teneur en flavan-3-ols dans des feuilles jaunissantes d'hêtre par rapport aux feuilles vertes. La nature du sol affecterait aussi la qualité des TCs, puisque les grains de raisin cultivés sur un sol sableux avec peu de réserve en eau présentent une proportion de PDs plus faible que ceux cultivés sur un sol plus riche (Cadot and Miñana Castelló, 2006).

Un stress engendré par l'agression des végétaux par des herbivores ou des pathogènes induit une synthèse accrue de métabolites secondaires et un stockage important de tannins, en particulier des TCs, au niveau de la zone attaquée (Woodward and Coppock, 1995; Feucht *et al.*, 1997).

5- Les effets des tannins chez les ruminants

La consommation de plantes riches en tannins induit des effets contradictoires chez les ruminants. Il est important de distinguer les effets produits par les THs de ceux dus aux TCs. Les THs peuvent être responsables d'intoxications sévères, voire mortelles. A l'inverse, les TCs sont considérés comme étant de moindre toxicité, en particulier chez les ruminants et même si l'ingestion de grandes quantités de TCs peut avoir des effets néfastes sur les paramètres zootechniques et la physiologie digestive des animaux. Par ailleurs, les TCs ont été associés à des effets bénéfiques sur la santé et la production animale lorsqu'ils sont ingérés de façon modérée.

5.1. Effets des tannins hydrolysables

Les empoisonnements d'animaux après la consommation de plantes riches en tannins sont attribués à la présence de THs, en particulier de gallotannins (Mc Sweeney *et al.*, 2001; Makkar, 2003), responsables d'intoxications sévères chez les diverses espèces animales (Zhu *et al.*, 1992; Reed, 1995; Butter *et al.*, 1999; Norton, 1999; Min *et al.*, 2003; Mueller-Harvey, 2006).

Chez les ruminants, les THs sont hydrolysés par des bactéries dans le rumen provoquant la libération des acides galliques qui sont ensuite décarboxylés en pyrogallol, lui même converti en résorcinol (Singh *et al.*, 2001; Min *et al.*, 2003). Ces produits de dégradation sont ensuite absorbés et circulent dans le sang. Or, les métabolites de l'acide tannique, le résorcinol et le punicalagin, sont hépato- et néphro-toxiques (Mueller-Harvey, 2006).

Néanmoins, des études menées sur des intoxications expérimentales chez les ruminants ont montré que la toxicité des THs dépend de la qualité (structure chimique, PM) et de la quantité (dose) des THs ingérés (Zhu *et al.*, 1992; Frutos *et al.*, 2004).

5.2. Effets des tannins condensés

Pour les TCs, il semble que le principe « la dose fait le poison » reste valide, puisque des effets néfastes sur la production et la santé des animaux sont observés uniquement lors d'ingestions massives de TCs. Un apport faible à modéré de TCs produit des effets positifs alors que la consommation de plantes présentant des teneurs élevées en TCs aboutit à des effets néfastes sur les paramètres zootechniques, la physiologie digestive et la santé des animaux (Aerts *et al.*, 1999; Butter *et al.*, 1999; Mbhata *et al.*, 2002; Hervas *et al.*, 2003; Min *et al.*, 2003; Waghorn et Mc Nabb, 2003). Néanmoins, contrairement aux THs, les TCs sont rarement associés à une toxicité aigüe chez les ruminants (Butter *et al.*, 1999).

Tableau 2 : Effets des TCs sur la nutrition des petits ruminants.

Teneur en TC	Conséquences	Effets observés
< à 2%	Nulles ou faibles	Aucun effet sur l'ingestion volontaire
2 à 5 %	Bénéfiques	Augmentation de l'absorption d'acides aminés Augmentation du taux ovulation Augmentation de la production laine Augmentation du taux de croissance
> à 7%	Néfastes	Baisse du niveau d'ingestion Réduction de l'absorption d'acides aminés Baisse de la production laine Réduction du taux de croissance

Il est courant de distinguer trois types de conséquences en fonction de la teneur en TCs (Aerts *et al.*, 1999; Barry and Mc Nabb, 1999; Paolini, 2004) (voir tableau 2).

5.2.1. Effets bénéfiques des tannins condensés

Chez les ruminants, l'ingestion de quantités faibles à modérées (<45g TCs/Kg MS, dans le cas des légumineuses) de TCs a été associée à des effets bénéfiques sur les paramètres zootechniques, sur la physiologie digestive et sur la santé (Barry and Mc Nabb, 1999).

5.2.1.1. Amélioration des paramètres zootechniques

✓ Croissance et gain de poids

La consommation de plantes contenant des TCs en quantité modérée influe sur la croissance des jeunes animaux (Leathwick et Athkinson, 1996; Waghorn et Mc Nabb, 2003; Ramírez-Restrepo *et al.*, 2005; Rochfort *et al.*, 2008). Ainsi, un gain de poids moyen de 8% a été observé chez des agneaux recevant du lotier corniculé (*Lotus corniculatus* ; 2-4% TCs de la MS) (Aerts *et al.*, 1999). De même, chez des bovins, la consommation de feuilles de saule (*Salix sp.*; 2,7% TCs de la MS) a permis de meilleurs gains de poids, lors du pâturage sur prairie pauvre pendant l'été, par rapport aux animaux ne consommant pas de TCs (Moore *et al.*, 2003).

✓ Production et qualité du lait

Chez les ruminants, l'ingestion de TCs influence le niveau de production et la qualité du lait (Aerts *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2003; Molle *et al.*, 2003; Waghorn and Mc Nabb, 2003; Rochfort *et al.*, 2008). Lors d'une période de consommation de lotier corniculé (*L.corniculatus*), la production laitière a ainsi augmenté de 60% chez les bovins et de 21% chez les ovins (Min *et al.*, 2003). De même, chez des brebis en lactation, il a été montré que la distribution de foin ou d'ensilage de sulla (*Hedysarium coronarium*) a été associée à une augmentation de la production de lait (Leto *et al.*, 2002), sans que celle-ci soit associée à une augmentation de l'ingestion.

Les TCs affecteraient aussi la composition du lait. Ainsi, il a été observé une augmentation du taux protéique de 10% chez des vaches et de 12% chez brebis ingérant des TCs, ainsi que le taux de lactose (14% chez les brebis), par rapport aux animaux témoins (Aerts *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2003; Rochfort *et al.*, 2008). Leto *et al.* (2002) ont également remarqué une modification de la composition du lait.

✓ Production de laine

Comme la production de lait, l'effet de l'ingestion de TCs sur la production de laine est directement lié à leur teneur dans la ration (Aerts *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2003). Ainsi, un apport modéré de TCs, de l'ordre de 2 à 4% de la ration, a été associé à une augmentation de la production. Par exemple, la consommation de lotier corniculé a induit une augmentation de 11% de la

production de laine chez des ovins (Luque *et al.*, 2000), qui serait due à une absorption accrue d'acides aminés, en particulier de cystéine, indispensable pour la synthèse de la laine (Mc Nabb *et al.*, 1993).

✓ **Les performances reproductives**

Peu d'études ont considéré les effets potentiels des TCs sur la reproduction. Cependant, quelques unes ont montré que la consommation d'une légumineuse fourragère riche en TCs induit de meilleures performances reproductives chez les brebis, mesurées par une augmentation du taux d'ovulation (Min *et al.*, 2001; Rochfort *et al.*, 2008). Luque *et al.* (2000) observent une augmentation du taux d'ovulation des brebis pâturant du lotier corniculé. De même, une corrélation positive entre le nombre de jours de pâture sur du lotier corniculé (2 à 3% TCs) et le taux d'ovulation des brebis a été notée (Ramírez-Restrepo et Barry, 2005).

5.2.1.2. Absence d'effet sur l'ingestion volontaire d'aliments

La mastication des plantes entraîne la rupture des parois cellulaires, libérant ainsi les TCs contenus dans les vacuoles, dans la bouche de l'animal. Cette libération des TCs entraîne des effets sur l'ingestion volontaire d'aliments et peut modifier les fonctions ruminales et post-ruminales. Toutefois, pour les légumineuses tempérées, lorsque la teneur en TCs est faible à modérée (< 4.5% de la MS), la prise d'aliment n'est pas modifiée (Waghorn *et al.*, 1987; Terrill *et al.*, 1992a).

5.2.1.3. Effets sur la digestion des aliments

Les TCs affectent les différentes étapes de la digestion. En fait, leurs effets sur les paramètres zootechniques découlent des effets sur les transformations successives des aliments au niveau ruminal et post-ruminal. Chez les ruminants, le compartiment ruminal se caractérise par un pH de 6 à 7. A ces valeurs, les complexes formés TCs-protéines sont stables (Aerts *et al.*, 1999). Butter *et al.* (1999) ont proposé un schéma de la complexation et la dissociation des TCs avec les protéines alimentaires chez les ruminants selon le pH.

✓ **Effets sur la production de méthane**

L'effet bénéfique des TCs dans le rumen est lié à la protection des protéines vis à vis des dégradations ruminales. La complexation des TCs avec les protéines alimentaires ou leur fixation aux enzymes bactériennes réduisent globalement la protéolyse ruminale (Zimmer and Cordesse, 1996; Jean-Blain, 1998; Aerts *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2003). Ces phénomènes ont notamment été décrits chez des ruminants consommant des légumineuses fourragères (Theodorou *et al.*, 1999). L'une des conséquences principales en est la réduction de la production de méthane et d'ammoniaque (Mc Nabb *et al.*, 1993; Theodorou *et al.*, 1999; Hess *et al.*, 2006a; Hess *et al.*, 2006b; Animut *et al.*, 2008).

Certaines légumineuses (Acacia, sainfoin, lotier, sulla...) sont riches en tanins condensés qui limitent à la fois la dégradation des protéines alimentaires et la méthanogenèse ruminale (Martin *et al.*, 2006). A titre d'exemple, le lotier et le sulla ont diminué, de 50 et 30% respectivement, la méthanogenèse (exprimée en g CH₄/kg gain de poids) chez des agneaux en croissance (Waghorn et Clark, 2006). Ceci s'expliquerait par un effet direct des tanins sur l'activité des archae méthanogènes et par un effet indirect en diminuant la digestion des parois végétales (Tavendale *et al.*, 2005).

✓ Effets post-ruminaux

La protection des protéines alimentaires dans le rumen induit une augmentation du flux de protéines assimilables au niveau de l'intestin et, par conséquent, une l'absorption accrue en acides aminés (Mc Nabb *et al.*, 1993; Barry et Mc Nabb, 1999;Theodorou *et al.*, 1999; Makkar, 2003; Min *et al.*, 2003; Waghorn, 2008). Selon Butter *et al.* (1999), le pH acide de l'abomasum induit une dissociation des complexes TCs-protéines et la libération des protéines et des acides aminés permettant ainsi leur digestion et leur absorption au niveau intestinal (Zimmer et Cordesse, 1996; Butter *et al.*, 1999; Mc Sweeney *et al.*, 2001; Mc Sweeney *et al.*, 2008 in press; Waghorn, 2008). Une augmentation de 50% du flux d'azote post-ruminal a été mesurée chez des ovins consommant du lotier corniculé par rapport aux animaux témoins (Waghorn *et al.*, 1987).

5.2.1.4. Effets sur la santé des animaux

La consommation modérée de plantes riches en TCs a été associée à des effets bénéfiques sur la santé des ruminants (Waghorn and Mc Nabb, 2003). Ces effets ont surtout été évalués à partir de données sur les légumineuses fourragères (Min *et al.*, 2003; Ramírez-Restrepo and Barry, 2005).

✓ Prévention de la météorisation spumeuse

La consommation de plantes riches en TCs a généralement été associée à une prévention de la météorisation spumeuse (Ramírez-Restrepo and Barry, 2005; Rochfort *et al.*, 2008; Waghorn, 2008). Chez les ruminants, ce phénomène résulte d'une accumulation de gaz, issus de fermentations ruminales exacerbées, séquestré dans une mousse stable formée à partir des protéines solubles de la ration (Aerts *et al.*, 1999; Waghorn and Mc Nabb, 2003; Rochfort *et al.*, 2008). Ce désordre sanitaire est rencontré chez les ruminants consommant des légumineuses très nutritives et très riches en protéines, tels le trèfle (*Trifolium repens*) ou la luzerne (*Medicago sativa*). A l'inverse, la consommation de fourrages contenant des TCs (de l'ordre de 0,5% de la MS) est suffisante pour éviter la météorisation (Aerts *et al.*, 1999; Butter *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2003; Rochfort *et al.*, 2008).

La complexation des TCs avec les protéines alimentaires limiterait les fermentations dans le rumen et diminuerait le risque de météorisation (Zimmer and Cordesse, 1996; Waghorn and Mc

Nabb, 2003). De plus, les TCs inhiberaient la croissance et la multiplication des micro-organismes du rumen par leur fixation aux constituants des parois cellulaires, bloquant ainsi le transport moléculaire vital pour le micro-organisme, ou par l'agrégation des cellules entre elles ce qui bloquerait leur division (Pell *et al.*, 1999; Mc Sweeney *et al.*, 2008).

✓ **Prévention des épisodes de diarrhées**

La consommation de fourrages riches en TCs induit une augmentation de la matière sèche de la matière fécale, et par conséquent contribuerait à la prévention d'épisodes diarrhéiques (Min and al., 2001; Waghorn and Mc Nabb, 2003). En raison de ces matières fécales plus consistantes, les souillures de l'arrière train des ovins sont réduites, limitant ainsi l'apparition de myiases cutanées (Larsen *et al.*, 1994; Leathwick and Athkinson, 1996; Waghorn and Mc Nabb, 2003).

✓ **Effets sur le parasitisme gastro-intestinal**

Le troisième effet bénéfique des TCs sur la santé des ruminants concerne l'effet des TCs sur les nématodes GI (Min and Hart, 2002; Waghorn and Mc Nabb, 2003; Hoste *et al.*, 2006).

5.2.2. Effets néfastes des tannins condensés

Chez les ruminants, l'ingestion de forte quantité de TCs a des effets néfastes sur l'ingestion volontaire, sur les paramètres zootechniques et sur la physiologie digestive.

➤ **Réduction de l'ingestion volontaire des aliments**

La consommation de légumineuses fourragères à teneur élevée en TCs (>10% TCs de la MS) conduit à la réduction de l'ingestion volontaire (Barry and Mc Nabb, 1999), expliquée par une aversion pour le fourrage (Butter *et al.*, 1999). De même, l'incorporation de quebracho (1.5g/jour) à la ration des ruminants a été associée à une réduction de la prise d'aliments (Landau *et al.*, 2000; Clauss *et al.*, 2003). Chez les ruminants, cette réduction d'ingestion serait due à divers phénomènes. Le premier est l'astringence, c'est à dire la sensation d'assèchement de la cavité buccale, résultant de la complexation des TCs avec les protéines salivaires, en particulier avec les protéines riches en proline (PRPs) (Butter *et al.*, 1999; Gilboa *et al.*, 2000; Bennick, 2002; Haslam, 2007; Rochfort *et al.*, 2008). Le deuxième résulte d'effets rétroactifs suite à un malaise post-ingestion. L'ingestion de TCs perturberait également le système hormonal contrôlant la prise d'aliment volontaire (Zimmer and Cordesse, 1996).

➤ **Effets négatifs sur les paramètres zootechniques**

Une ingestion importante de TCs (>9% de la MS) a été associée à un effet négatif sur la production de laine (Barry, 1985; Luque *et al.*, 2000; Min *et al.*, 2003; Ramírez- Restrepo and Barry, 2005). De même, des teneurs élevées en TCs affecteraient négativement la production de lait. Chez les bovins, une corrélation négative a été observée entre la consommation d'*Acacia boliviana*

et de *Calliandra calothyrsus*, deux plantes tropicales présentant des teneurs élevées en TCs, et la production de lait (Maasdorp *et al.*, 1999). Par ailleurs, l'administration d'un inhibiteur des tannins (polyéthylène glycol, PEG) a provoqué une augmentation de la production de lait chez les chèvres consommant des plantes arbustives riches en TCs (Decandia *et al.*, 2000; Gilboa *et al.*, 2000).

➤ Effets sur la physiologie digestive

Les pertes de production liées à l'ingestion de fortes quantités de TCs seraient liées à des perturbations de la digestion. Ingérés en grande quantité, les TCs affecteraient l'intégrité de la structure des muqueuses digestives. Par exemple, des desquamations et des signes de dégénérescences et d'ulcérations ont été observés chez des moutons ingérant de fortes doses de quebracho (16% de la ration) (Hervas *et al.*, 2003). Chez les caprins, l'augmentation de la dose de TCs dans la ration a également été associée à une kératinisation de l'épithélium digestif (Mbhata *et al.*, 2002).

Au niveau du rumen, la complexation excessive des TCs avec les protéines et les fibres alimentaires les rendrait moins digestibles (Butter *et al.*, 1999; Mueller-Harvey, 2006; Mc Sweeney *et al.*, 2008). La consommation de TCs affecterait aussi la digestion des lipides et la production des acides gras (Butter *et al.*, 1999; Mueller-Harvey, 2006; Mc Sweeney *et al.*, 2008). Enfin, des ingestions massives de TCs peuvent perturber la digestibilité ruminale par une réduction globale d'activité enzymatique de la flore (Mc Sweeney *et al.*, 2001).

Dans l'intestin, les TCs affecteraient la physiologie digestive en interagissant avec les protéines de la membrane des cellules intestinales et en diminuant ainsi l'absorption de certaines molécules, dont les minéraux. De plus, la fixation spécifique aux enzymes pourrait affecter les dernières étapes de la digestion (Zimmer and Cordesse, 1996; Butter *et al.*, 1999; Mc Sweeney *et al.*, 2001; Hervas *et al.*, 2003; Waghorn, 2008).

5.2.3. Palier aux effets néfastes des tannins condensés

Pour palier aux effets néfastes des TCs, des phénomènes adaptatifs ont été observés chez les ruminants consommant des plantes riches en TCs. Par ailleurs, des procédés d'inactivations des TCs, soit par l'administration de polyéthylène glycol soit par des traitements chimiques des sources de TCs, ont été mis au point.

5.3. Inactivation des tannins condensés

5.3.1. Distribution de PEG aux animaux consommant des tannins condensés

Le polyéthylène glycol (PEG) est un polymère qui a la propriété de fixer les tannins et ainsi, de les inactiver (Rogosic *et al.*, 2008). La distribution de PEG aux ruminants consommant des plantes riches en TCs permettrait donc, théoriquement, de limiter leurs effets néfastes en les neutralisant (Mueller-Harvey, 2006; Waghorn, 2008).

De nombreuses études *in vitro* ont confirmé que le PEG inactivait les TCs et réduisait leur effets sur la digestibilité ruminale mesurée par la production de gaz (Cabral Filho *et al.*, 2005; Rubanza *et al.*, 2005; Alipour and Rouzbehan, 2007; Mlambo *et al.*, 2007). Toutefois, les études *in vivo* sur l'addition du PEG à la ration ont montré des résultats plus controversés (Perevolotsky *et al.*, 2006; Rogosic *et al.*, 2008). En général, l'administration de PEG a induit une restauration voire une augmentation des niveaux d'ingestion de plantes riches en TCs (Gilboa *et al.*, 2000; Decandia *et al.*, 2007 ; Rogosic *et al.*, 2008; Waghorn, 2008). Cependant, Decandia *et al.* (2000) n'ont observé aucun effet de l'incorporation de PEG à la ration de chèvres exploitant le parcours arbustif méditerranéen.

De plus, l'administration de PEG aux animaux consommant des TCs a été associée à des restaurations d'une digestibilité apparente comparable à celle des animaux témoins (Salawu *et al.*, 1997; Aharoni *et al.*, 1998). Cet effet s'expliquerait par une levée de l'inhibition des dégradations bactériennes par excès de TCs dans le rumen (Guimarães-Beelen *et al.*, 2006).

Enfin, de meilleures performances zootechniques ont été signalées lors de l'ingestion de PEG simultanément aux TCs (Decandia *et al.*, 2000; Gilboa *et al.*, 2000; Waghorn, 2008). Ainsi, une augmentation de la production de lait ou de gain de poids a été observée chez des ruminants consommant des plantes riches en TCs et recevant du PEG (Gilboa *et al.*, 2000; Landau *et al.*, 2002; Atti *et al.*, 2003; Waghorn, 2008). Cet effet du PEG semble étroitement lié à la quantité de TCs ingérée par les ruminants (Ben Salem *et al.*, 2005). Chez des ovins recevant du quebracho, Villalba et Provenza (2001) ont constaté une auto-régulation de la consommation de PEG en fonction de la teneur en TCs dans la ration.

Deuxième Partie

Matériel

Et

Méthodes

1. Description des sites d'étude

Les échantillons de plantes sont collectés à partir de quatre sites : Constantine (N 36° 19' 48.32''- E 6° 35' 04.99'', 600 m, altitude), Djelfa (N 34° 39' 63.66''- E 3° 15' 14.56'', 1214 m, altitude), Boussaâda (N 35° 12' 15.46''- E 4° 10' 54.30'', 669 m, altitude) et M'Sila (N 35° 43' 25.33''- E 4° 33' 24.93'', 490 m, altitude). Constantine est située à l'Est de l'Algérie, dans une région semi-aride avec un climat continental irrégulier, des précipitations annuelles de 350 à 700 mm. Djelfa, M'sila et Boussaâda sont situées dans le Centre-Nord au milieu des parcours steppiques arides des hauts plateaux. Le climat dans ces régions est de type *BSh*, selon la classification de Köppen, caractérisé par un été chaud et parfois extrêmement chaud, des hivers doux avec de faibles précipitations dont les moyennes annuelles sont comprises entre 100 et 300 mm.

La steppe algérienne se présente comme une vaste bande régionale s'étendant de la frontière tunisienne à la frontière marocaine sur 1000 kilomètres de long et 300 kilomètres de large entre les isohyètes 400 et 100 mm. C'est une région intermédiaire située au-delà du Tell maritime et humide et en deçà du désert saharien, pays des grands espaces plats et élevés où l'alfa et l'armoïse sont les plantes caractéristiques alors que l'arbre est rare ou absent. Cette steppe est connue comme espace de nomadisme et d'élevage ovin par excellence, 80 % du cheptel algérien (ovin et caprin) y est concentré.

2- Matériels biologiques

2.1. Echantillons testés

Le feuillage de neuf espèces ligneuses, réparties entre quatre familles de plantes à potentiel fourrager variable, sont retenues pour des études *in vitro* et *in situ*. Les espèces sélectionnées sont: *Acacia nilotica*, *Acacia horrida*, *Acacia saligna* (*syn. Acacia cyanophylla*), *Faidherbia albida* (*syn. Acacia albida*), *Albizia julibrissin* (*Acacia de Constantinople*), *Vicia faba* et *Punica granatum*. L'étude est menée comparativement à deux plantes à haut potentiel fourrager, largement répandues dans la steppe algérienne : *Atriplex halimus* L, et *Artemisia herba-alba* Asso.

Seule l'*Acacia albida* est collectée de la région de Boussaâda, au printemps 2009. Les échantillons des Mimosacées, *P.granatum* et *V.faba* sont collectés dans la wilaya de Constantine. Les feuilles de *V.faba* sont prises d'un champ cultivé après la récolte des gousses arrivées à maturation au mois d'Avril de la même année (2009). Pour l'échantillon d'armoïse (*A.herba alba*), la plante entière est récoltée de la région de M'Sila, à la fin du printemps en prenant le soin d'enlever les racines. Quant

aux feuilles de l'arbuste *A. halimus*, elles sont collectées dans la réserve naturelle de Zaafran dans la wilaya de Djelfa.

Le choix de ces espèces fourragères est basée sur une étude bibliographique ayant pour objectif principale l'utilisation du feuillage de certaines légumineuses arbustives, principalement les Acacias, comme fourrage afin de suppléer au déficit fourrager durant les saisons de sécheresse (Kumara Mahipala *et al.*, 2009 ; Reed, 1986; Dube *et al.*, 2001). Sachant que la plupart des espèces d'Acacia africaines sont pérennes, d'où leur intérêt.

2.2. Echantillonnage

Une série de récoltes de feuillage sur des plantes adultes est effectué, avec six à huit échantillons prélevés de différents spécimens d'arbres ou arbustes des espèces sélectionnées, afin d'avoir un aliquote représentatif de la biomasse végétale totale. Les feuilles sont coupées aux ciseaux des parties aériennes des plantes. Les échantillons sont séchés au laboratoire dans une étuve à 50 °c pendant 48 h afin d'arrêter toute activité biologique pouvant altérer la nature des substrats (Makkar, 2003a). Par la suite, les échantillons sont broyés et calibrés au tamis à 1mm pour l'analyse chimique et à 3 mm pour l'étude de la dégradabilité *in situ*.

2.3. Animaux utilisés

2.4.1. Etude *in situ*

La partie expérimentale utilisant les animaux pour l'étude *in situ*, est réalisée dans les structures d'élevage de la Station Agricole Expérimentale (Estacion Agricola Experimental, EAE). Un centre de recherche sis villa Marzanas, près de la localité de Grulleros distante de 15 km de l'Université de Léon (Espagne). La station fait partie d'un réseau de centres de recherche agronomique sous l'égide du Conseil Supérieur de la Recherche Scientifique (Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, CSIC). Cette station s'étend sur une superficie de 1500 m² et élève trois races d'ovins : Churra, Mérinos, Assaf. Les animaux utilisés dans notre étude sont de races Mérinos et Assaf. Durant les essais, les animaux sont maintenus dans des cages.

2.4.2. Etudes *in vitro*

Pour les besoins en jus de rumen, pour les différentes manipulations *in vitro* (production de gaz, digestibilités, méthane et acides gras volatiles) nous avons utilisé près de 15 ovins portant des canules permanentes de 60 mm de diamètre. Le jus de rumen est acheminé du lieu d'élevage au laboratoire de nutrition animale (Institut Vétérinaire, Université de Léon) dans des thermos préalablement chauffés à 39°C et saturés de CO₂.

3- Méthodes

3.1. Analyse chimique fourragère

Les analyses chimiques des fourrages sont réalisées selon les normes décrites par l'AOAC (2000) : la matière sèche (DM, method ID 934.01), les cendres (method ID 942.05) et les protéines brutes (CP, method ID 954.01). Toutes les analyses sont faites en trois répétitions.

3.1.1. Détermination de la matière sèche

Le taux de la matière sèche de chaque substrat est déterminé par dessiccation à 65 °C dans une étuve ventilée jusqu'à poids constant. Un gramme de substrat est introduit dans un cristalliseur préalablement taré pendant, au moins, 48 heures. Le poids du résidu caractérise la teneur en matière sèche de l'échantillon.

3.1.2. Détermination des sels minéraux

Cette analyse permet le calcul de la quantité de sels minéraux de l'échantillon. 3g de substrat, préalablement séché, sont placés dans un creuset en porcelaine, taré puis incinéré dans un four à moufle à 550°C pendant 5 heures. La perte de poids observée au cours de la calcination correspond à la matière organique et le poids du résidu à la matière minérale.

3.1.3. Détermination de la matière azotée totale

L'azote total (N) contenu dans les fourrages est dosé par la méthode de Kjeldahl. Pour cela, on utilise un auto-analyseur. Cette méthode de dosage comporte deux étapes, suivie d'un dosage par titrimétrie.

- Transformation de l'azote organique en azote ammoniacal : Cette réaction chimique est réalisée dans un appareil du type Kheldatherme (marque Gerhardt, Allemagne). L'azote organique d'un échantillon de 0,7g est transformé en azote minéral, sous forme de sulfate d'ammonium. La réaction chimique est réalisée à 350°C, en présence d'un catalyseur (sélénium) et d'acide sulfurique concentré, pendant une heure.

- Transformation de l'azote ammoniacal en ammoniaque : Cette réaction chimique est réalisée à l'aide d'une unité de distillation (marque Buchi K-314, Allemagne). Elle est faite en présence d'une base forte (NaOH, 10N). L'ammoniaque est récupérée par condensation de la vapeur d'eau, reprise

dans 25ml d'une solution d'acide borique à 4% (m/v) contenant un indicateur coloré (rouge de méthyle et bleu de méthylène). Cette solution est titrée par une solution d'HCl (0,1N). La teneur en azote est obtenue à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\text{Vol (HCl)(ml)} * 14 * 0,1}{\text{Prise d'essai} * \text{MS}(\%)}$$

La teneur en matières azotées totales (MAT), ou protéines brutes, résulte de la multiplication de la teneur en azote obtenue par le coefficient 6,25.

3.1.4. Détermination des composés de la paroi végétale

La détermination des composés de la paroi végétale est réalisée selon le procédé décrit par Van Soest et *al.* (1991).

3.1.4.1. Estimation de la fraction NDF

La fraction NDF correspond à la teneur en parois totales des fourrages (cellulose, hémicelluloses et lignine). Cette méthode au détergent neutre repose sur la solubilisation à pH neutre des protéines par le Lauryl sulfate de sodium et des substances pectiques par l'EDTA. L'appareil utilisé est un appareil de digestion automatique de marque ANKOM (ANKOM 200 Fiber Analyzer, 120v, Domestic, ANKOM[®] Technology Corp., Fairport, NY, USA). Le traitement avec la solution NDF permet de solubiliser les polymères de glucose non cellulosique.

❖ Réactifs

Sodium dodécyl sulfate (Sigma), éthylène diamine tétra acétique disodique dihydraté (Biochem), borate de sodium (Biochem), phosphate disodique anhydre (Sigma), tri éthylène glycol (Sigma).

▪ Préparation de la solution NDS

30g de sodium dodécyl sulfate; 18,61g éthylène diamine tétra acétique disodique dihydraté; 6,81 g borate de sodium; 4,56 g Phosphate disodique anhydre et 10,0 ml tri éthylène glycol sont introduits dans une fiole jaugée de 1000ml. Ces quantités sont dissoutes dans l'eau distillée. La solution est chauffée afin de faciliter la dissolution puis complétée au trait de jauge avec de l'eau distillée. Le pH est ajusté (solution NaOH, 1N) entre 6,9 à 7,1.

▪ Préparation de l'échantillon

Dans des sacs Ankom, appelés communément bag Daisy, (Fiber Filter bag, 25 microns porosity, ANKOM[®] Technology Corp., Fairport, NY, USA), sont libellées et munis de 500mg de substrat préalablement séché. Les sacs sont alors scellés par une thermo-scelleuse (ANKOM[®] 220v 50/60HZ Heat sealer; ANKOM[®] Technology Corp., Fairport, NY, USA). L'appareil est rempli de deux litres de la solution NDS. Les sacs sont introduits dans l'appareil et portés à ébullition pendant

60 mn. L'appareil est vidangé de la solution NDS. Les sacs sont alors rincés trois fois avec de l'eau distillée, préalablement chauffée à 80- 100°C pendant 10min. Les sacs sont ensuite lavés à l'acétone sous hotte puis séchés dans une étuve à 65°C jusqu'à poids constant (au moins 48 h).

3.1.4.2. Estimation de la fraction ADF

La fraction ADF correspond à la teneur en parois totales des fourrages (cellulose et lignine). La solution ADS permet d'hydrolyser à chaud les constituants cytoplasmiques, les hémicelluloses et les protéines.

❖ Réactifs

Bromure de tri-méthyle ammonium cétylique (Sigma), Solution acide sulfurique 1N (Biochem).

▪ Préparation de la solution ADS

Dans une fiole jaugée de 1000 ml, 20g de bromure de triméthylammonium cétylique sont introduits avec 300ml d'acide sulfurique 1N. La solution est complétée au trait de jauge.

▪ Préparation de l'échantillon

Les mêmes sacs de type 'Fiber Filter bag' sont utilisés, l'appareil est rempli de deux litres de la solution ADS. Ensuite, les sacs sont introduits dans l'appareil et portés à ébullition pendant 60 mn. L'appareil est ensuite vidangé et les sacs rincés trois fois à l'eau distillée chaude pendant 10min. Les sacs sont lavés à l'acétone sous hotte et mis à sécher jusqu'à poids constant dans une étuve à 65°C.

3.1.4.3. Estimation de la fraction ADL

Cette méthode comporte un traitement à l'acide sulfurique concentré. Le résidu correspond, en plus des cendres, à la lignine brute. Les sacs récupérés, après analyse ADF, sont traités par l'acide sulfurique concentré à 72% pendant trois heures. Les sacs sont rincés trois fois à l'eau distillée bouillante pendant 10min. Ils sont ensuite lavés à l'acétone et mis à séchage jusqu'à poids constant dans une étuve à 65°C.

3.2. Analyse des Polyphénols

Les analyses chimiques traditionnelles des aliments ne prennent pas en considération les composés du métabolisme secondaire et leurs effets antinutritionnels. Il y'a une large variété de techniques d'analyse qui ont été développées pour doser les composés secondaires. Les difficultés principales de leur caractérisation sont dues à l'existence d'une multitude de variété de ces composés et la diversité de leur structure chimique, ce qui nécessite différentes méthodes analytiques. La présence de ces facteurs antinutritionnels peut être déterminée qualitativement par des tests préliminaires physico-chimiques et des tests biologiques.

3.2.1. Test biologique des tanins (Tanins Bioassay)

Cet essai est réalisé selon la méthodologie proposée par Makkar *et al.*, (1995). L'approche consiste à utiliser du Polyéthylène glycol (PEG), un polymère qui a la propriété de fixer les tannins en les inactivant (Rogosis *et al.*, 2008) dans une expérience de production de gaz standard. Cette expérience est réalisée en premier lieu avant d'entamer toutes analyses chimiques des tanins dans un but économique.

- **Préparation de l'échantillon**

Les substrats séchés sont broyés en particules de 1mm.

- **Animaux utilisés**

Pour réaliser cet essai, sont utilisées trois brebis de race Assaf vides et non allaitantes, pesant environ 70 kg. Elles sont munies de canules permanentes (60 mm de diamètre) pour l'extraction du jus de rumen. Les animaux sont nourris au foin de luzerne (167 g CP, 502 g NDF, 355 g ADF and 71 g ADL kg⁻¹ DM). Les rations sont distribuées en deux repas égaux par jour à des horaires fixes. L'eau et les vitamines sont disponibles *ad libitum*.

Le liquide ruminal est prélevé le matin avant de nourrir les animaux. Le contenu de rumen des ovins est collecté et filtré à travers quatre couches de gaze chirurgicale puis directement transféré dans des Thermos préchauffés à 39 C° et saturés en CO₂ selon la méthode de (Nicolie *et al.*,1987). Les thermos sont hermétiquement fermés et transférés directement au laboratoire où ils sont traités au plus tard dans les 2 heures qui suivent la collecte.

3.2.2. Procédures

La production de gaz est mesurée dans des flacons de 100 ml contenant 400 mg de fourrage (Blummel and Orskov, 1993; Makkar, 2000). A cet effet, deux séries sont conduites : une série sans PEG et une autre série avec PEG. Les flacons de la série avec PEG reçoivent 2 ml d'une solution PEG 25% (m/v), soit 500 mg de PEG pour chacun d'eux. Pour la série sans PEG, on ajoute 2 ml d'eau distillée. Par la suite, chaque flacon reçoit 50 ml du liquide ruminal dilué (10 ml du jus de rumen et 40 ml de salive artificielle). Les flacons sont ensuite fermés avec des bouchons en butyl, puis sertis avec une capsule en aluminium. Les flacons sont secoués et placés dans l'incubateur à 39°C. Le suivi de la cinétique de fermentation est réalisé par la mesure de la pression de gaz (Theodorou *et al.*, 1994), à l'aide d'un pression mètre muni d'une sonde (Delta Ohm DTP704-2BGI, Herter Instruments SL, Barcelona). La mesure se fait sur plusieurs temps d'incubation : 6h, 12h, 24h et 48 heures. Deux flacons sont utilisés pour chaque substrat et chaque source d'inoculum (chaque jus de rumen est prélevé de trois moutons). Trois inoculum différents sont utilisés

séparément, ce qui donne trois répétitions pour chaque traitement avec ou sans PEG. L'activité biologique des tanins est calculée par le rapport entre le gaz mesuré dans les flacons avec PEG et le gaz enregistré dans les flacons sans PEG, pour chaque fourrage et chaque jus de rumen. Lorsque ce rapport enregistre des valeurs supérieures à 2, cela renseigne sur l'existence d'une activité biologique significative. L'analyse chimique, quantitative des polyphénols et tannins condensés, est alors fortement recommandée.

✓ Réactifs

- Solution tampon de bicarbonate : dissoudre 35g de NaHCO_3 et 4g de NH_4HCO_3 dans 1 litre d'eau distillée.
- Solution de macrominéraux : dissoudre 6,2g de KH_2PO_4 , 5,2g de Na_2HPO_4 et 0,6g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans un litre d'eau distillée.
- Solution de microminéraux : dissoudre 10g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 13,2 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dans 100 ml d'eau distillée.
- Solution de résazurine : dissoudre 0,1 g dans 100 ml d'eau distillée
- Solution réductrice : dissoudre 996mg de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ dans 94ml d'eau distillée puis ajouter 6ml de NaOH (1N) (4g dissout dans 100ml d'eau distillée).

• Préparation de la solution tampon de la fermentation in vitro

Le jus de rumen est collecté d'animaux fistulés avant le repas du matin, il est homogénéisé et filtré à travers 4 couches de gaze chirurgicales. Tous les éléments de verrerie utilisés sont maintenus à 39°C et barbotés de CO_2 avant utilisation. Le jus de rumen filtré, également maintenu à 39°C et barboté de CO_2 , est préparé juste avant le début de l'incubation. La quantité de substrat testée est de 500mg et la composition de la solution tampon est préparée suivant Tilley and Terry, Menke et *al.* Mais le jus de rumen est réduit de moitié, puisqu'il utilise seulement 200mg par seringue. Dans ce cadre, en plus de la production de gaz, le substrat résiduel est utilisé pour d'autres analyses. C'est pourquoi, la quantité de substrat utilisé est 500 mg.

• Composition du milieu de culture et procédure d'incubation

Les solutions sont mélangées dans l'ordre dans un Erlen maintenu à 39°C, sous agitation et un barbotage continu avec du CO_2 (Tableau 3). Après 5min, la solution tampon est ajoutée et maintenue sous agitation et barbotage de CO_2 . Quand la solution est réduite, sa couleur vire du bleu au rose puis devient incolore. Cela prend au moins 15 à 20min pour le processus de réduction.

Tableau 3 : Composition du milieu de culture

Solution	Tampon	Macro minéraux	Micro minéraux	Rézasurine	dH ₂ O	Réductrice	Jus Rumen
Volume (ml)	630	315	0,16	1,60	975	60	660

Durant cette période, le jus de rumen est homogénéisé. Ensuite 660 ml de jus de rumen filtré sont ajoutés et le mélange maintenu sous agitation et barbotage de CO₂ pendant 10min. Chaque flacon reçoit 40ml du mélange. Après remplissage, les flacons sont agités et incubés réglés à 39°C. Les flacons sont agités chaque heure pendant les premières 4 heures d'incubation et chaque deux heures pendant le reste du temps d'incubation. La cinétique de production de gaz est enregistrée après 6h, 12h, 24h et 48 heures. La production nette de gaz est calculée par soustraction du volume de gaz produit dans le flacon témoin (blanc) qui contient uniquement le jus de rumen et la solution tampon. L'addition du PEG au flacon blanc n'affecte pas la production de gaz car il est admis que la solution est inerte.

3.2.3. Dosage chimique des Polyphénols

3.2.3.1. Préparation de l'extrait

L'âge et le stade de développement des plantes affectent la nature et la teneur des complexes phénoliques. Par conséquent, il est important de définir leur stade de maturité au moment de la collecte. Le matériel végétal frais doit être conservé dans de la glace et à l'abri de la lumière. Le transport de grandes quantités de feuilles dans des sacs plastiques est à éviter. La température élevée dans ces sacs augmente au premier plan la transpiration, ce qui conduit au flétrissement et la dégradation des composés phénoliques.

Le broyage des échantillons est fait avec un hachoir muni d'une grille de 0,5 mm. Le but est de quantifier les polyphénols présents dans la plante et diffusant dans la phase liquide. Pour le processus d'extraction, le solvant généralement utilisé est une solution aqueuse de méthanol (50 %) ou une solution d'acétone (70 %). Ce dernier s'est montré le meilleur solvant pour l'extraction des polyphénols dans de nombreuses études.

Le matériel végétal sec (200mg) est introduit dans un bécher de 25ml de capacité, contenant 10ml d'une solution d'acétone (70 %). L'extraction est faite pendant 20min dans un bain marie à ultrasons (Branson 3210) rempli de glace pour empêcher l'augmentation de la température. Le

contenu est ensuite centrifugé pendant 10min à 3000g et à 4°C. Le surnageant est collecté et maintenu dans de la glace. Par contre, le culot est transféré au bécher en utilisant deux portions de 5ml de solution d'acétone (70 %), le même traitement que précédemment est réalisé (extraction pendant 20min dans un bain marie à ultra sons). Une centrifugation est ensuite effectuée, le surnageant est récupéré et traité comme il a été décrit antérieurement.

3.2.3.2. Dosage des polyphénols (Méthode de Folin Ciocalteu)

Elle est réalisée selon le procédé décrit par Makkar et *al.*, (1993). Ces tests sont basés sur le principe de l'oxydoréduction et l'utilisation du réactif Folin-Ciocalteu ou Folin-Denis réactifs. Une autre méthode utilisant le réactif chlorure ferrique est basée sur la propriété du métal complexant des composés phénoliques. La méthode de Folin-Ciocalteu, selon le procédé de Julkunen-Tiitto (1985), est largement utilisée pour les phénols totaux en raison de sa haute sensibilité et de sa reproductibilité. Cependant, la présence d'agents réducteurs interfère dans le dosage des molécules phénoliques.

✓ Réactifs

- Solution de FOLIN CIOCALTEAU (1N): le réactif de Folin (2N) est dilué avec un volume égal d'eau distillée. La solution est stockée et à 4°C dans des flacons sombres, elle est de couleur jaune dorée. Si sa couleur vire vers le vert olive, la solution devient inutilisable.
- Carbonate de Sodium (Na_2CO_3): 40g de carbonate de sodium décahydraté sont dissout dans 200ml d'eau distillée.
- Insoluble Polyvinylpyrrolidone.
- Acide tannic (0,1 mg/ml): 25 mg d'acide tannic (Merck) sont dissout dans 25 ml d'eau distillée. Cette solution est ensuite diluée au $1/10^{\text{ème}}$, elle est à utiliser de préférence *ex temporanement* (fraîche).

✓ Etalonnage

Tableau 4 : Composition de la solution étalon pour le dosage des PolyPhénols

Tube	Acide tannic (0,1 mg/ml) (ml)	Eau distillée (ml)	Folin Ciocalteu (ml)	Na_2CO_3 (ml)	Abs $_{725 \text{ nm}}$	Acide tannic (μg)
Blanc	0	0,5	0,25	1,25	0	0
T1	0,02	0,48	0,25	1,25	0,112	2
T2	0,04	0,46	0,25	1,25	0,218	4
T3	0,06	0,44	0,25	1,25	0,327	6
T4	0,08	0,42	0,25	1,25	0,432	8
T5	0,1	0,40	0,25	1,25	0,538	10

Abs : Absorbance

3.2.3.3. Analyse des phénols totaux

Des échantillons aliquotes de l'extrait contenant les tanins (0.02, 0.05 et 0.1) sont mis dans des tubes puis complétés avec 0,5ml d'eau distillée et 0,25ml de réactif de Folin puis 1,25 ml de Na₂CO₃. Les tubes sont mélangés au Vortex et leur absorbance mesurée après 40min. La quantité de phénols totaux est calculée comme équivalent d'acide tannique à partir de courbe étalon, le taux de phénols totaux est exprimé sur la base de la MS.

3.2.3.4. Dosage des tanins totaux à partir de l'extrait

Les tanins sont distingués des non tanins par une matrice solide, le PolyVinyl PolyPyrrolidone (PVPP). Une partie de l'extrait de plante est traitée avec du PVPP qui possède une haute affinité pour les tanins, éliminés de la solution par centrifugation après le traitement au PVPP. La différence entre la valeur totale des phénols avant et après le traitement (PVPP) donne la mesure des tanins totaux (Makkar, 2003a).

$\text{Tanins Totaux} = \text{Phénols totaux} - \text{Phénols qui ne précipitent pas avec PVPP}$
--

✓ Procédure

- Peser 100mg de PVPP dans des tubes à essai
- ajouter 1 ml d'eau distillée et 1 ml de l'extrait (la quantité de PVPP est suffisante pour fixer 2 mg de phénols totaux). Si le contenu de l'aliment est plus que 10 % de la MS, diluer l'extrait.
- Mélanger au Vortex et maintenir le tube à 4°C pendant 15min puis mélanger au Vortex une seconde fois.
- Centrifuger (3000 g pendant 10min) et collecter ensuite le surnageant. Ce dernier contient les phénols simples, autres que les tanins (les tanins sont précipités par le PVPP).
- Mesurer les phénols du surnageant comme précédemment (prendre le triplet du volume utilisé pour les phénols totaux).
- Exprimer le résultat en % de MS (Y).

3.2.3.5. Extraction des tanins condensés libres

La technique de dosage et d'extraction est déterminée selon le procédé de Ammar et *al.* (2008).

✓ Réactifs et procédure

Une solution acétone 70% est utilisée (pour préparer 1l = 700ml acétone + 300ml eau)

Dans des tubes à essais sont pesés 200mg de ce résidu sec avec 15ml de la solution d'acétone. Les tubes sont dégazés avec le gaz N₂ (inerte) et agités. Ensuite, les tubes sont laissés dans un bain d'eau glacée à 4°C. Les tubes sont agités pendant 15min puis fermés et portés dans un bain à ultrasons à 4°C pendant 20min. Ensuite, les tubes sont agités vigoureusement avec le vortex et centrifugés à 3000 g pendant 10min à 4°C. Le surnageant est repris avec des pipettes Pasteur (sans altération du résidu) dans des tubes à essais. Celui-ci constitue l'extrait ORIGINAL (EXT) qui contient les tanins extractibles ou tanins libres. Le surnageant, repris dans le tube à essais, est conservé à 4°C. Les tubes sont recouverts de feuille d'aluminium pour éviter leur exposition à la lumière. Le résidu restant dans le tube de centrifugation (RES) est séché à 50°C pendant toute une nuit. Il est ensuite stocké à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation pour la détermination des tanins condensés attachés.

3.2.4. Analyse des tanins condensés Proanthocyanidines (Méthode du HCl-Butanol)

Cette analyse est faite selon la technique de (Porter *et al.*, 1986) avec les modifications de Makkar (2003a) et l'utilisation des tanins condensés du quebracho comme standard.

3.2.4.1. Analyse des tanins condensés libre

✓ Réactifs

- n-butanol (Biochem).
- Acide chlorhydrique concentré (37-38%) HCl (Biochem).
- Sulfate ferrique ammoniacal FeNH₄ (SO₄) 2.12H₂O (Sigma).
- Standard: Quebracho purifié.

✓ Préparation des Solutions

- Solution Butanol-HCl (95:5 v/v) : 950ml du n-butanol sont mélangés à 50ml de HCl concentré (37-38%).
- Réactif Fer (2% de sulfate ferrique Ammoniacal en HCl 2N) : une solution HCl (2N) est d'abord préparée avec 16,6 ml de HCl concentré dans une fiole jaugée de 100ml, puis elle est ajustée au trait de jauge. La solution est maintenue dans un flacon de verre sombre.

✓ Etalonnage et préparation de la gamme standard (Hagerman, 1991)

- Le solvant utilisé est une solution d'acétone à 70% (v/v).
- Préparation de la solution mère: 25mg du quebracho purifié sont pesés dans une fiole jaugée de 25ml (on note le poids précis) et complétés au trait de jauge avec le solvant. Afin de préparer la gamme étalon, des dilutions sont reprises à partir de cette solution mère.
- Dans des tubes libellés et pourvus de bouchon, 250µl sont pipetés de l'extrait EXT et 250µl du solvant acétone, 70% sont ajoutés. Trois répétitions pour chaque tube sont réalisées.

- 3ml du réactifs butanol-HCl et 0,1 ml de la solution Fer réactive sont ajoutés pour chaque tube. Les tubes sont ensuite fermés à l'aide de bouchons et ils sont agités vigoureusement.
- Les tubes sont réchauffés dans un bain d'eau en ébullition à 100°C pendant 60min puis ils sont refroidis à l'abri de la lumière.
- Les absorbances de ces solutions sont déterminées à 550 nm.

3.2.4.2. Analyse des tanins condensés attachés

- 15ml de butanol-HCl et 0,5 ml de solutions de Fer sont ajoutés directement au résidu sec.
- Les tubes sont ensuite agités vigoureusement au vortex.
- Les tubes sont déposés dans un bain-marie (100°C) pendant 90min.
- Les tubes sont refroidis à température ambiante puis subissent une centrifugation à 3000g , 15min.
- Le surnageant est pipeté dans des cuves en quartz, la densité optique est mesurée à 550 nm.

3.3. Etude de la digestibilité *In vitro*

3.3.1. Digestibilité selon Tilley and Terry

L'inoculum (Jus de rumen) est prélevé de quatre brebis de race Assaf vides et non allaitantes, pesant environ 70 kg et munies de canules permanentes (60 mm de diamètre). Les animaux sont nourris au foin de luzerne (167g CP, 502g NDF, 355g ADF and 71g ADL kg⁻¹ DM). Les rations sont distribuées en deux repas égaux par jour à des horaires fixes. L'eau et les vitamines sont disponibles *ad libitum*.

La digestibilité *in vitro* de la matière sèche est déterminée selon la procédure ANKOM-DAISY (Ammar et *al.*, 1999) à laquelle deux approches différentes sont appliquées, celle proposée par Tilley and Terry (1963) et celle décrite par Van Soest et *al.* (1966). Les deux techniques sont menées séparément dans deux essais différents.

Un milieu de culture contenant les solutions macro et micro minérales est préparé selon les compositions décrites dans les tableaux 5 et 6. La solution de résazurine et la solution tampon bicarbonate sont préparées selon la procédure décrite par Van Soest et *al.* (1966). Le milieu est maintenu à 39°C et saturée en CO₂.

L'Oxygène du milieu est réduit par l'ajout d'une solution réductrice contenant de la cystéine-HCl et du Na₂S, selon la procédure décrite par Van Soest et *al.* (1966). Le mélange de couleur bleu est chauffé jusqu'à virage de la couleur vers le rose.

Tableau 5 : Préparation de la salive artificielle (Theodoreau et al., 1994)

Solution	Oligo-élément (Macro minérale)	Tampon	Éléments minéraux (micro minérale)	Réductrice	Oxydo-réduction
Elément	CaCl ₂ .2H ₂ O 13,2 g MnCl ₂ .4H ₂ O 10,0 g CoCl ₂ .6H ₂ O 8,0 g Q.s.p. 1000ml	NaHCO ₃ 35,0 g NH ₄ HCO ₃ 4,0 g Q.s.p. 1000ml	Na ₂ HPO ₄ 5,7 g KH ₂ PO ₄ 6,2 g MgSO ₄ .7H ₂ O 0,6 g Q.s.p. 1000ml	NaOH (1N) 4 ml Na ₂ S.9H ₂ O 0,625 g. L-Cystéine 0,625 g. Q.s.p. 100 ml	Résazurine 0,1 g. Q.s.p. 100 ml

La solution est barbotée avec un flux continu de CO₂, ce qui entraîne la réduction de la salive artificielle indiquée par le virage de la couleur du rose au transparent.

A cette étape, le jus de rumen est ajouté dans le milieu dans la proportion (1V/4V). 400 mg de substrat sec sont pesés dans des sacs Daisy composés de fibres artificielles (taille de 5cm × 5cm, taille des pores de 20 µ). Quatre répétitions sont réalisées pour chaque substrat en deux séries, ce qui donne 8 répétitions en tout (quatre sacs par échantillon x2). Ces sacs sont ensuite thermo-scillés avec un Heat sealer et placés dans des jarres d'incubation. Chaque jarre est un récipient étanche en verre de 5L de capacité.

Tableau 6 : Composition de la salive artificielle (Theodoreau et al. (1994))

Solution	Micro minérale	Tampon	Macro minérale	Résazurine	Réductrice	dH ₂ O Q.s.p
Volume (ml)	4,80	950	950	4,80	190	4000

La jarre est fermée avec un couvercle en plastique muni d'une vanne unique de manière à éviter l'accumulation des gaz de fermentation. Chaque jarre d'incubation est remplie avec 2 litres de jus de rumen tamponné. Les jarres sont ensuite placés dans l'appareil (Ankom Daisy système de digestion II, ANKOM Technology Corp, Fairport, New York, USA) à 39°C.

L'appareil permet une rotation continue afin de faciliter l'immersion effective des sacs Daisy dans la solution ruminale.

Après 48h d'incubation, les sacs sont retirés des jarres et lavés à l'eau froide puis rincés abondamment avec de l'eau distillée. Ils sont ensuite soumis à une digestion pepsine-HCl (2g pepsine/1000ml HCl, 0,1N), selon la procédure décrite par Tilley et Terry (1963). Ils sont ensuite rincés à l'eau froide puis lavés à l'aide d'une machine à laver pendant 5min. Ils sont alors pesés après séchage dans une étuve à 100°C pendant 48h. Cette mesure permet de

calculer la digestibilité apparente *in vitro* (AIVD), selon la méthode originale de Tilley et Terry (1963).

La digestibilité apparente de la matière sèche organique des fourrages est déterminée selon la formule:

$$AIVD(\%) = 100 * \frac{(MS_i - MS_r) - MS_b}{MS_i}$$

Où :

- MS_i : prise d'essai sec introduite dans chaque batch,
- MS_r : correspond à la matière sèche résiduelle après fermentation,
- MS_b représente la moyenne du résidu sec du blanc.

Afin de déterminer la digestibilité réelle *in vitro* (TIVD), ces sacs sont soumis à un traitement avec une solution de Neutral Detergent Solution (NDS) à 100°C pendant 1h, selon le protocole décrit par Van Soest et *al.* (1966). Elle est déterminée selon les procédés décrits par Makkar (2000) et Blummel and Becker (1997). Cette opération a pour but de libérer les microorganismes adhérant aux substrats non dégradés. A la fin de la fermentation, les sacs Daisy sont traités avec la solution NDS (neural detergent solution). Les échantillons sont portés à ébullitions à 100°C pendant une heure dans l'appareil ANKOM, puis lavés abondamment avec de l'eau distillée et séchés dans une étuve à 105°C pendant au moins 24h.

$$TIVD (\%) = 100 * \frac{(MS_i - MS_r)}{MS_i}$$

Où :

- MS_i : Résidu sec dans chaque batch,
- MS_r : correspond à la matière sèche résiduelle après digestion avec la solution NDS.

3.3.2. Production de gaz et digestibilité à 144 h

3.3.2.1. Inoculum

Le jus de rumen, utilisé comme inoculum, est prélevé de six moutons de race Mérinos d'âge mûr (49,4 ± poids 4,23 kg) équipés d'une canule ruminale de 60 mm de diamètre. Les animaux sont nourris avec 1 kg de foin de luzerne (composition /kg de MS sèche: 167 g CP, 502 g NDF, ADF 355 g, 71 g ADL), une fois par jour avec accès libre à l'eau, aux minéraux et vitamines. Le liquide ruminal (phase solide plus phase liquide) est prélevé avant le repas du matin et transféré dans des bouteilles thermos préalablement chauffées à 39°C et saturées en CO₂. Au laboratoire, le liquide ruminal des moutons est bien mélangé, puis filtré à travers quatre

couches de (gaze) mousline et barboté avec du CO₂ à 39°C. Toute la manipulation est réalisée sous un flux constant de CO₂.

Durant toute l'expérience, 3 jus de rumen sont employés, au nombre de répétitions de notre expérience, ce qui fait de l'inoculum la variable aléatoire. Deux moutons sont utilisés pour la préparation de chaque jus de rumen et par conséquent pour chaque répétition. Nonobstant aussi que le volume total de jus de rumen est réparti en deux parties égales. Un Volume aliquote est réservé pour l'expérience de Production de Gaz (144h) et un autre pour la Digestibilité 144h.

3.3.2.2. Description du système de fermentation de Theodureau

Dans ce procédé, la fermentation est réalisée dans des flacons en verre (batch) de 100 ml de capacité (Theodureau et *al.*, 1994). Ce type de système permet l'accumulation des gaz fermentaires dans l'atmosphère intérieure du flacon dont la pression est mesurée à différents intervalles de temps à l'aide d'un pression-mètre. L'avantage majeur de l'utilisation de ce type de système réside dans la facilité qu'il présente pour la détermination de la digestibilité réelle. En effet, le système de seringue de Menke nécessite la filtration à l'aide de verre fritté, ce qui engendre des pertes et donc des erreurs de calculs.

La technique de production de gaz *in vitro* est une simulation de la dégradation des aliments par le microbiote du rumen. A l'origine, elle a été développée par Menke et *al.*, (1979), dans des seringues de verre. La technique a ensuite été modifiée par Menke K.H. and Steingass H., (1988), Theodureau et *al.*, (1994), en remplaçant les seringues par des flacons en verre. A la fin de la fermentation, le gaz est mesuré à l'aide d'un pression-mètre. C'est une technique simple et peu coûteuse, basée donc sur la mesure de la production de gaz (méthane et gaz carbonique principalement), utilisés comme marqueurs métaboliques de la fermentation des substrats.

Les profils de production de gaz sont obtenus par une adaptation de la technique décrite par Theodorou et *al.* (1994), 500 mg de chaque substrat sont incubés dans des flacons en verre de 120ml de capacité. A chaque flacon, 50ml du liquide ruminal dilué sont ajoutés (10ml du jus de rumen et 40ml de salive artificielle). Les flacons sont ensuite fermés avec des bouchons de butyl, puis sertis avec une capsule en aluminium. Les flacons sont secoués et placés dans l'incubateur à 39°C. Le suivi de la cinétique de fermentation est réalisé par la mesure de la pression de gaz (Theodorou et *al.*, 1994) à l'aide d'un pression-mètre muni d'une sonde (Delta Ohm DTP704-2BGI, Herter Instruments SL, Barcelona), à différents temps d'incubation : 3h, 6h, 9h, 12h, 16h, 21h, 26h, 31h, 36h, 48h, 60h, 72h, 96h, 120h et 144h.

Afin de faire les corrections nécessaires, des flacons témoins (blancs) sont aussi incubés. Pour cela, quatre flacons ne contenant que l'inoculum liquide du rumen sont incubés pour être utilisés pour déterminer la production de gaz en l'absence de substrat et l'utiliser en compensation des flacons contenant le substrat étudié.

L'emploi de modèles mathématiques permet la prédiction des performances métaboliques du microbiote ruminal. Cette technique permet aussi le suivi de la cinétique de la fermentation microbienne.

Les incubations sont réalisées en trois séries en employant trois jus de rumen différents. Chaque jus de rumen provient de deux animaux. Chaque série est réalisée en deux répétitions (deux flacons/substrat /jus de rumen). Soit 6 répétitions pour chaque échantillon. Le volume de gaz (ml/g MS) produit après 24h d'incubation (G24) est utilisé comme indice de digestibilité et de valeur nutritive et énergétique, Menke et Steingass (1988).

Afin d'estimer les paramètres cinétiques de production de gaz, les données de production de gaz sont déterminées par le modèle exponentiel proposé par France et *al.* (2000) :

$$G = A [1 - e^{-k(t-L)}]$$

Où

- G (ml) représente la production cumulative de gaz à l'instant t;
- A (ml) est la production de gaz asymptotique;
- c (h⁻¹) est le taux fractionnaire de la production de gaz ;
- L (h) est le temps de latence.

Selon France et *al.* (2000), la dégradabilité effective ED (g/g MS) dans le rumen pour une vitesse de passage (k, h⁻¹) peut être estimée selon la formule :

$$ED = ((c \times D144)/(c+k)) e^{-kL}$$

Où : K (% h⁻¹) correspond au temps de séjour des aliments dans le rumen. Elle est calculée pour k=0.03 h⁻¹ qui est généralement considéré comme le temps de séjour des particules dans le rumen de moutons recevant une ration à base de fourrage grossier.

3.3.2.3. Potentiel de Disparition de la Matière sèche (D144h)

La digestibilité *in vitro* pendant 144h est estimée par le potentiel de disparition de la matière sèche (D144, g/g MS). Ce potentiel est déterminé par la procédure ANKOM-DAISY

(Ammar et *al.*, 1999). L'expérience est menée en même temps que celle de la technique de Production de gaz, décrite plus haut, et en respectant le même plan de travail : utilisation de trois jus de rumen issus des six animaux déjà cités.

400 mg de substrat sec sont pesés dans des sacs Daisy (taille de 5cm × 5cm, taille des pores de 20 µ). Trois répétitions sont réalisées pour chaque substrat. Ces sacs sont ensuite thermo-scellés et placés dans des jarres d'incubation de 5L de capacité.

Après 144h d'incubation, les sacs sont retirés des jarres et lavés à l'eau froide puis rincés abondamment avec de l'eau distillée puis à nouveau lavés à l'aide d'une machine à laver pendant 5min. Après séchage pendant 48 h dans une étuve à 100° ils sont alors pesés. Cette mesure permet de calculer la digestibilité apparente *in vitro* (AIVD) selon la méthode originale de Tilley et Terry (1963). Afin de déterminer la digestibilité réelle *in vitro* (TIVD), ces sacs sont soumis à un traitement avec une solution de Neutral Detergent Solution (NDS) à 100°C pendant 1h. Les NDF expriment ainsi la TIVD.

3.4. Analyse des gaz en présence du PolyEthylèneGlycol

3.4.1. Préparation des échantillons

La quantité de substrat pesée dans chaque flacon est de 400mg. Comme pour la technique de production de gaz, 50ml de la solution rumen et de salive artificielle (1v/4v) sont ajoutés au flacon. Deux séries de flacons sont conduites, une série sans PEG et une série avec PEG. Les flacons de la série avec PEG reçoivent 2 ml d'une solution PEG 25% (m/v), soit 500mg de PEG pour chaque flacon. Pour la série sans PEG, on ajoute 2 ml d'eau distillée. Ensuite, chaque flacon reçoit 50ml du liquide ruminal dilué (10ml du jus de rumen et 40ml de salive artificielle). Les flacons sont ensuite fermés avec des bouchons en butyl, puis sertis avec une capsule en aluminium. Les flacons sont secoués et placés dans l'incubateur à 39°C. Les bouteilles sont ensuite laissées dans une étuve à 39°C pendant 24h. Afin de faire les corrections nécessaires, des flacons blancs sont aussi incubés, ils ne contenant que l'inoculum liquide du rumen. Deux répétitions, seulement, sont réalisées. Par conséquent, deux jus de rumen extraits de deux moutons de race Merinos sont utilisés pour cette expérience (un flacon/substrat/jus de rumen).

Le suivi de la cinétique de fermentation est réalisé par la mesure de la pression de gaz (Theodorou et *al.*, 1994), à l'aide du pression-mètre muni d'une sonde.

3.4.2. Analyses chromatographiques

La production de méthane est analysée par chromatographie en phase gaz (SHUMADZU GC-14B) selon la technique de Van Nevel (1970). La température du four de l'injecteur est de 130°C, celle du four de la colonne est de 100°C et celle du détecteur FID est de 120°C.

La colonne est une colonne capillaire de 23 mètre de longueur et de 2,1 mm de diamètre intérieur (stainless steel column), remplie avec une phase stationnaire du type 60-80 mesh carboxen 1000. Le volume injecté varie de 100 à 200 µl. Le gaz vecteur est l'hélium (Pression 100 kPa). Le mode d'élution se fait à débit constant. La concentration du gaz est déterminée par l'utilisation d'une courbe-étalon établie grâce à un gaz standard certifié (Alphagaz, N° 0735562.00).

Après 24h d'incubation, les flacons sont placés dans un bain de glace afin d'interrompre la fermentation. Un système de seringues graduées munies d'une valve est utilisé d'une part pour permettre la mesure de la pression en millilitre et, d'autre part, pour permettre le prélèvement d'un échantillon de gaz en vue de son analyse chromatographique. Le volume du dioxyde de carbone est calculé par différence entre le gaz total enregistré et le volume du méthane produit. La différence entre le volume net de gaz produit dans des flacons contenant ou non du PEG est une mesure de l'effet des tanins.

Un autre paramètre calculé est l'augmentation en méthane (AM) exprimée en % après addition du PEG, il est exprimé selon l'équation:

$$AM (\%) = \frac{\text{Production du méthane avec PEG(ml)} - \text{Production du méthane sans PEG (ml)}}{\text{Production du méthane sans PEG (ml)}} \times 100$$

A partir du volume de gaz, la production des acides gras de courtes chaînes ou acides gras volatiles (AGV) (short-chain fatty acids, SCFA) peut être calculée à partir de l'équation suivante (Makkar H.P.S. 2010).

$$SCFA \text{ (mmol/40 ml)} = -0.0601 + (0.0239 \times \text{Gas (ml)}); \text{ (sans PEG)}$$

$$SCFA \text{ (mmol/40 ml)} = 0.0521 + (0.0207 \times \text{Gas (ml)}); \text{ (avec PEG)}$$

$$SCFA \text{ (mmol/40 ml)} = -0.00425 + (0.0222 \times \text{Gas (ml)}); \text{ (avec et sans PEG)}$$

Cette équation peut être généralisée aux incubations de substrats issus d'arbres et d'arbustes

L'un des facteurs déterminant le volume de gaz produit lors de toute fermentation est la proportion molaire des AGV. Lorsque le coefficient de corrélation R^2 est proche de 1, ceci suppose que la concentration des AGV totaux peut être calculée. Cependant, il faut remarquer que la relation entre AGV (mmol/séringue) doit prendre en considération la déduction de la pression atmosphérique du volume total de gaz produit.

Ces calculs sont valides seulement à pression atmosphérique de 1.

3.5. Etude de la dégradabilité *in situ*

3.5.1. Animaux utilisés

Pour cette expérience cinq ovins mâles de race Merinos, castrés et âgés de 12 mois, avec un poids moyen de $80,5 \pm 3,5$ kg, sont retenus dont trois, seulement, utilisés pour notre expérimentation. Les animaux sont logés dans des hangars et séparés dans des cages.

Les animaux sont munis de fistules permanentes de 60 mm de diamètre et reçoivent une ration journalière de 1,2 kg de foin dactyle (90,1% MS, 9,2% MM, 42,5% CP), distribuée en deux repas égaux à 8 heures le matin et 16 heures le soir. L'eau et les vitamines sont disponibles *ad libitum*.

3.5.2. Procédure

C'est une technique complémentaire de la technique de la production de gaz *in vitro*. Son principe consiste à évaluer l'activité métabolique du microbiote ruminal *in situ* et à déterminer la dégradation du substrat *in vivo*. Elle est réalisée selon la méthodologie décrite par Michalet-Doreau et *al.* (1987) et détaillée par López et *al.* (1991, 1999). Pour cette expérience, les échantillons doivent avoir une granulométrie de 3 mm. 3g de chaque fourrage sont pesés et placés dans des sachets ou dans des sacs en nylon de dimensions externes 14 x 13 cm et de 40-50 μ m (figure 15). Les sacs sont préalablement identifiés selon un code mentionnant le point cinétique, le substrat et la répétition. Ils sont ensuite thermo-scellés afin d'assurer leur étanchéité. Un œillet est fixé sur le haut de chaque sachet. Pour cela, deux soudures, situées à 3cm de la première soudure sont réalisées afin de réduire les dimensions à 5 x 10 cm.



Figure 15 : Sacs en nylon pour l'étude de la digestibilité *in sacco*.

Les sachets sont réunis par point de cinétique et par animal et attachés ensemble à l'aide d'une ficelle en nylon indigestible. 3 répétitions sont effectuées par point cinétique et pour chaque substrat (3 répétitions/3 moutons/temps/substrat). Assemblés en paquet, les sachets sont alors lestés à un anneau de plomb. Ce dernier est lié par une ficelle à l'extérieur de la canule et il reste suspendu dans le rumen. Les sachets sont introduits juste avant le repas du matin.

Les mesures cinétiques de fermentation ruminale sont effectuées après 24h et 96h d'incubation. Après chaque temps d'incubation, la ficelle est coupée et les sachets correspondants sont retirés du rumen. Ils sont ensuite lavés sommairement sous un courant d'eau froide. Ils subissent un deuxième lavage dans une machine à laver, à raison de 5 à 6 cycles de 5min, jusqu'à clarté de l'eau. Puis, ils sont pesés après séchage pendant 48h à 70°C afin de calculer la disparition *in situ* de la matière sèche. Les sachets sont ensuite vidés de leurs contenus et des prises d'essais sont prélevées à partir des résidus afin de déterminer la disparition *in situ* de la matière azotée totale et de la fraction de la paroi totale.

En parallèle, pour estimer la fraction de matière sèche immédiatement soluble dans le rumen, des sachets contenant la même quantité de fourrage sont placés individuellement dans des béchers contenant 250ml de salive artificielle (Vérité R. and Demarquilly C., 1978), puis ils sont agités vigoureusement pendant une heure à 39°C. La solution est ensuite filtrée à travers du papier filtre Dumax afin de déterminer les pertes en particules (pertes physiques). Les sachets et les filtres sont ensuite séchés pendant 48h à 70°C. La fraction soluble est égale à la différence entre la fraction totale disparue du sachet et les pertes physiques.

3.5.3. Calculs

Les résultats de la dégradation *in sacco* sont exprimés en pourcentage de substrat résiduel ou dégradé, par rapport à la prise d'essai initiale.

3.5.3.1. Digestibilité de la matière sèche

$$MS \text{ disparue} = \frac{MS \text{ incubée} - MS \text{ résiduelle}}{MS \text{ incubée}}$$

MS incubé = poids de l'échantillon et MS résiduelle = poids final – poids bague vide.

3.5.3.2. Digestibilité de la matière azotée totale

$$CP \text{ disparue} = \frac{CP \text{ incubée} - CP \text{ résiduelle}}{CP \text{ incubée}}$$

$$CP \text{ incubée} = \frac{MS \text{ incubée} \times \% \text{ CP dans l'échantillon}}{100}$$

$$CP \text{ résiduelle} = \frac{MS \text{ résiduelle} \times \% \text{ CP dans le résidu}}{100}$$

3.5.3.3. Digestibilité de la fraction NDF

$$NDF \text{ disparue} = \frac{NDF \text{ incubée} - NDF \text{ résiduelle}}{NDF \text{ incubée}}$$

$$NDF \text{ incubée} = \frac{MS \text{ incubée} \times \% \text{ NDF dans l'échantillon}}{100}$$

$$NDF \text{ résiduelle} = \frac{MS \text{ résiduelle} \times \% \text{ NDF dans le résidu}}{100}$$

3.6. Analyses statistiques

Une analyse de la variance (Steel et Torrie, 1980) est réalisée sur les données de la digestibilité *in vitro*, la cinétique de production de gaz et la dégradabilité *in situ*, en prenant en compte l'espèce fourragère comme source de variation (effet fixe) et la source d'inoculum (effet aléatoire) comme facteur de blocage. Le test de comparaison multiple de Tukey's est utilisé pour déterminer la moyenne qui diffère du reste du groupe. Elles sont considérées significativement différentes pour une valeur de probabilité ($P < 0,05$).

Des coefficients de corrélations linéaires de Pearson sont déterminés par paires entre les variables étudiées. Le regroupement des espèces fourragères à partir d'une analyse multi-variée de toutes les données enregistrées (composition chimique, concentrations en tanins et activité biologique, digestibilité *in vitro*, cinétique de fermentation de production de gaz et données *in situ* de dégradabilité) et l'évaluation de l'influence relative de chaque variable sur ce regroupement sont établies par une analyse des composants principaux.

Les paramètres des modèles mathématiques sont déterminés par les programmes numériques et itératifs NLIN (régressions non linéaires) du logiciel SAS. Des analyses de la variance et des matrices de corrélation sont réalisées respectivement par les programmes MIXED, CORR et FACTOR, avec le logiciel SAS (SAS Institute, 2000).

Troisième Partie

Résultats

Et

Discussion

1- Composition chimique des fourrages

1.1. Teneurs en matières minérales (MM)

La composition chimique des échantillons étudiés est présentée dans le tableau 7. On y observe des taux de matière sèche (MS) relativement élevés. Les valeurs les plus élevées sont enregistrées chez les deux espèces arbustives *A.albida* et *P.granatum* avec des valeurs assez proches de (918 g/Kg) et (915 g/Kg), respectivement. Les valeurs les plus basses sont notées chez *A.halimus* et *V.faba* avec des taux respectifs de (871 g/Kg) et (888 g/Kg). Il est important de remarquer que les échantillons des espèces *A.albida* et *P.granatum* sont collectés des régions de Boussaâda et de M'Sila. Des régions situés dans une zone caractérisé par un climat aride ce qui explique un peu ces taux élevés en MS. A contrario, la légumineuse *V.faba* est collectée de la wilaya de Constantine, plus exactement de la région de Zighoud Youcef où le climat peut être classé de semi-aride à subhumide.

Tableau 7 : Composition chimiques (g/kg MS) des plantes fourragères collectées

Espèce	MS								
	(g/ kg)	OM	PB	MM	NDF	ADF	ADL	Hémi	cellu
<i>Artemisia herba-alba</i>	901	920	122,6	80	359	273	115,5	86	157,5
<i>Atriplex halimus</i>	871	815	156,6	185	253	113	47,4	140	65,6
<i>Acacia nilotica</i>	900	920	243,0	80	290	198	126,4	92	71,6
<i>Acacia horrida</i>	904	895	217,3	105	551	200	73,7	351	126,3
<i>Acacia cyanophylla</i>	913	899	156,6	101	447	255	147,5	192	107,5
<i>Acacia albida</i>	918	936	252,0	64	430	269	139,7	161	108
<i>Albizia julibrissin</i>	904	872	186,1	128	264	92	49,9	172	42,1
<i>Vicia Faba. L var, faba</i>	888	857	193,8	112	179	121	39,9	58	81,1
<i>Pinuca granatum</i>	915	911	109,0	85	222	155	95,1	67	59,9

ADF: Acid Detergent Fibre; ADL: Acid Detergent Lignin; Cellu: cellulose ; Hemi: hemicellulose; MM : matière minérale ; PB : Protéines Brutes; MS: matière sèche; NDF: Neutral Detergent Fibre; OM: matière organique.

Les plantes étudiées présentent des valeurs de la matière minérale (MM) très variables. Le taux le plus faible de la MM est observé chez *A.albida* avec une valeur de (64 g/kg MS), la valeur la plus élevée est enregistrée chez *A.halimus* (185 g/ Kg MS).

Les *Atriplex* sont des halophytes, arbustes des sols salins (saltbush). Les plantes fourragères des régions arides voire désertiques telles que le genre *Atriplex*, sont caractérisées par des valeurs très élevées en matière minérales (Bhattacharya and Al-Assiri, 1988 ; Bokhari *et al.*, 1990 ; Ahmed M. El-Waziry, 2007). Selon Spear (1994), la concentration des éléments minéraux dans les plantes varie fortement avec le type de sol, le climat, le stade de la maturité et la saison de la récolte.

1.2. Teneurs en Protéines Brutes (PB)

L'*A. halimus* est très riche en Crude Protéine très digestible et pauvre en fibres et tanins d'où l'intérêt de son utilisation comme fourrage. Seulement, l'utilisation des feuilles de cette plante nécessite la disponibilité de grandes quantités d'eau pour l'abreuvement. En milieu aride cette teneur élevée en sel limite grandement sa consommation (Al-Soqeer, 2008; Ben Salem *et al.*, 2010).

La teneur en Protéines Brutes (PB) est considérablement élevée chez les plantes étudiées (>100 g/kg MS) (Figure 16). Cette teneur varie de 252 à 109 (g/kg MS) chez *A.albida* et *P.granatum*, respectivement.

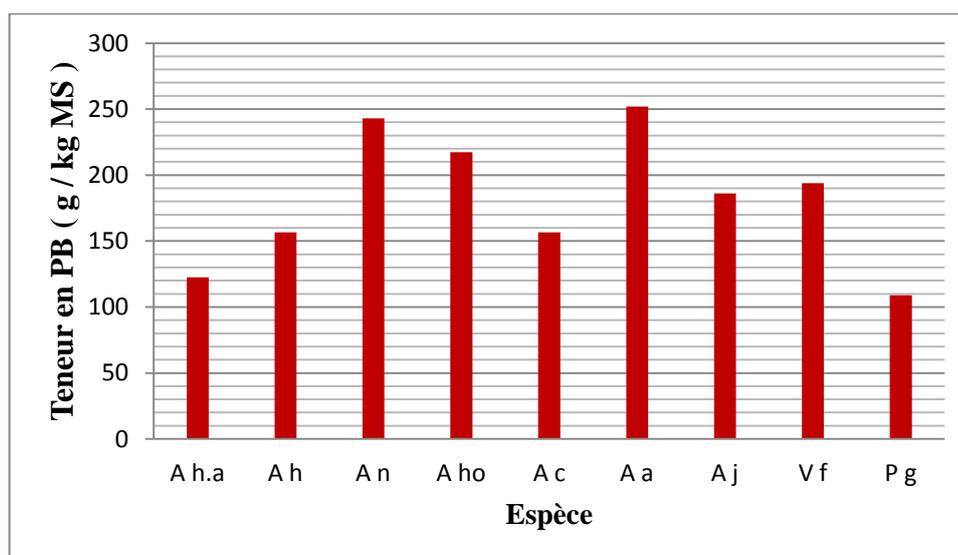


Figure 16 : Teneur en PB (g/kg MS) des espèces étudiées

A h.a : *A herba alba* ; A h: *A.halimus*; A n: *A.nilotica*; A ho:*A.horrída*;

A c:*A.cyanophylla*; A a: *A.albida*; A j: *A.julibrissin*; Vf: *Vicia faba*; Pg:*P.granatum*

Le taux de PB requis pour le fonctionnement optimal du rumen doit dépasser les 7 à 8% de la matière sèche (Van Soest, 1994). Selon les travaux de Paterson *et al.* (1996), les fourrages dont les teneurs en matière azotée sont inférieurs à 70 mg/g de MS exigent une supplémentation azotée pour améliorer leur ingestion par les ruminants. Norton *et al.*, (2003) stipule que ce type de fourrages ne peut pas fournir les minima d'azote nécessaire au microbiote ruminale pour assurer une

activité métabolique maximum. D'après Cabiddu *et al.*, (2000), la plupart des plantes arbustives fourragères du pourtour méditerranéen ont une faible valeur nutritive, à cause, entre autres, d'une teneur faible en PB.

En Algérie la steppe joue un rôle primordial dans le système agropastoral. Près de 80% du cheptel, ovins et caprins, s'y trouve (FAO, 2009). La steppe à *Artemisia herba-alba* avec ses sept millions d'hectares de parcours occupe une bonne place dans l'alimentation des petits ruminants (Le Houerou, 1989a). Mais peu de données sont disponibles sur la valeur nutritive pour les ruminants de cette plante médicinale. Pour les PB nous rapportons la concentration de 122,6 g/kg MS. Dans une étude menée par El Aich (1991), sur *A. herba-alba* collectée dans la steppe orientale du Maroc, il obtient une valeur comparable (114 g/ kg MS) alors que Ben Salem *et al.* (1994) et Gasmi Boubakar *et al.* (2006), en Tunisie, trouvent des valeurs moins élevées. Ces différences seraient en relation avec la proportion des différents organes de la plante récoltés et le stade végétatif de la plante. La production en biomasse aérienne du genre *Artemisia* peut aller de 200 à 250 kg MS / ha (Merzak, 1990). Dans les zones arides, les plantes halophytiques sont très répandues dans les sols salins. Les halophytes ont une biomasse plus développée que les plantes non halophytique. En Algérie l'*Atriplex halimus* produit 3,7 t MS /ha, cinq fois plus que la production de l'armoise blanche (0,8 t MS /ha) (Baumer, 1991). Notre étude présente une composition chimique de l'*A.halimus* en ADF, NDF, ADL et PB en accord avec celle obtenue par Luigi Stringi *et al.*, (2009) ; Al-owaimier *et al.*, (2008, 2011); Nefzaoui *et al.*, (1991) mais plus faible que celle obtenue par Haddi *et al.*, (2009). La biomasse comestible (les feuilles) de l'atriplex a une teneur en protéines relativement élevée (156,6 g /kg MS), plus riche en MM avec une valeur de 185,0 g /kg MS contre 80,0 g /kg MS pour *A.herba-alba*.

Parmi les plantes riche en PB étudiées, nous citons la légumineuse cultivée, *Vicia faba* (fève), dont la teneur en PB dans les feuilles est de 193,8 g /kg MS. En Algérie, la fève (*V. faba*) est retenue surtout pour la consommation humaine sous forme de gousses fraîches, ou en grains secs. En cas de fortes productions, l'excédent en grains secs peut être incorporé dans l'alimentation du bétail (Maatougui, 1996, Micek *et al.*, 2012). La culture de la fève fait partie de nos systèmes agraires depuis longtemps dans différentes zones agro-écologiques du pays. En Algérie la culture de la fève est la plus importante parmi les légumineuses alimentaires avec 58.000 hectares soit 44,3 % de la superficie totale réservée à cette catégorie de cultures. Sa production moyenne annuelle est de 254.000 quintaux au cours de la période 1981 - 1990 (Maatougui, 1996). Cette culture est répandue sur tout le territoire national, cultivée sur les plaines côtières, les plaines sub-littorales et dans les zones sahariennes, spécialement les wilayates de l'Ouest (Ouffroukh et Aggad, 1996). L'autre

espèce arbustive retenue par notre étude est le grenadier, *Pinuca grantum* dont les feuilles recèlent un taux en PB de 10,9 % de la matière sèche. Cette valeur est relativement élevée au taux, minimal de 7% de la matière sèche, requis pour un bon fonctionnement de la flore ruminale (Van Soest, 1994). Seules les vertus médicinales du fruit de cette plante sont étudiées dans la bibliographie scientifique de par le monde, aucune étude sur la valeur nutritive et les effets de la consommation des feuilles des pomegranates sur le rumen n'est répertoriée. Seule la pulpe, et, à moindre échelle, les feuilles du grenadier attirent l'attention en raison de leurs apparentes propriétés antibactérienne cicatrisantes, immunomodulatrice, anti-athérosclérotiques et des capacités antioxydantes. L'activité antioxydante a souvent été associée à une diminution du risque de diverses maladies et de la mortalité. Des études montrent qu'il existe une corrélation positive entre le stress oxydatif et certaines maladies chez les bovins (Shabtay *et al.*, 2008 ; Al-Zoreky, 2009).

Toutes les feuilles des espèces d'Acacia étudiées ont des valeurs élevées en PB. Les feuilles des différentes espèces d'Acacia peuvent être utilisées comme compléments pour les ruminants nourris avec des fourrages de faible qualité, en particulier pendant la saison sèche. Les teneurs élevées en PB chez les Acacias de notre étude sont comparables à ceux rapportés par Topps (1997), Abdulrazak *et al.*, (2000) et Rubanza *et al.*, (2003). Les variations dans la composition chimique du feuillage des plantes fourragères étudiées peuvent être dues, en grande partie, à des facteurs génotypiques. L'accumulation des nutriments dans les plantes est une propriété spécifique (Minson, 1990) qui varie selon les espèces et les genres. Les différences observées dans le contenu en PB entre les espèces sont dues au stade de croissance. Topps (1997) obtient des teneurs en PB élevées, de 210 et 319 g / kg MS dans les jeunes feuilles, comparativement à 153 et 219 g / kg MS dans les feuilles matures chez *Acacia tortilis* et *Acacia sénégale*, respectivement. Dans la même étude, Topps rapporte, également, de faibles teneurs en PB dans les bourgeons par rapport aux feuilles à n'importe quel stade de la croissance.

1.3. Teneurs en composants pariétaux

La digestibilité des ligneux par les ruminants est en grande partie conditionnée par leur teneur en parois totales. Van Soest (1982) note que la richesse en parois cellulaires notamment en lignocellulose a une influence négative sur la digestibilité. Notre étude montre que les teneurs en parois totales (NDF) varient de façon significative en fonction de l'espèce. Les plus faibles teneurs sont notées chez *Vicia faba* (179 g/kg MS), tandis que de fortes teneurs sont rencontrées chez *A. horrida* (551 g/ kg MS) (Figure 17). Fall *et al.*,(1997) en étudiant des espèces ligneuses rencontrées en zone sahélienne, trouve des teneurs similaires (400 g /kg MS et 420 g /kg MS). Nitis (1992), en

région tropicale d'Asie, obtient des résultats comparables (361 g /kg MS à 640 g/ kg MS). En plus de l'espèce, il y a certainement une influence de la région climatique, car, nos résultats sont inférieurs à ceux rapportés pour des fourrages tempérés (600 g /kg MS) et qui varient de 530 à 690 g / kg MS (Abdulrazak, *et al.*, 2000 ; Rubanza *et al.*, 2005 ; Kumara Mahipala, *et al.*, 2009).

Les teneurs en Lignocellulose (ADF) varient de façon très significative avec l'espèce. De faibles teneurs sont observées chez *A julibrissin*, *Atriplex halimus* et *Vicia faba* avec des valeurs de (92 g/kg MS), (213 g/kg MS) et (121g /kg MS) respectivement. Quant aux valeurs les plus élevées, se retrouvent chez les espèces ligneuses et à leur tête *A.herba-alba* (273 g/ kg MS), surtout les Acacias avec des valeurs allant de 198 g/kg chez *A.nilotica* à 269 g/kg MS *A.albida*.

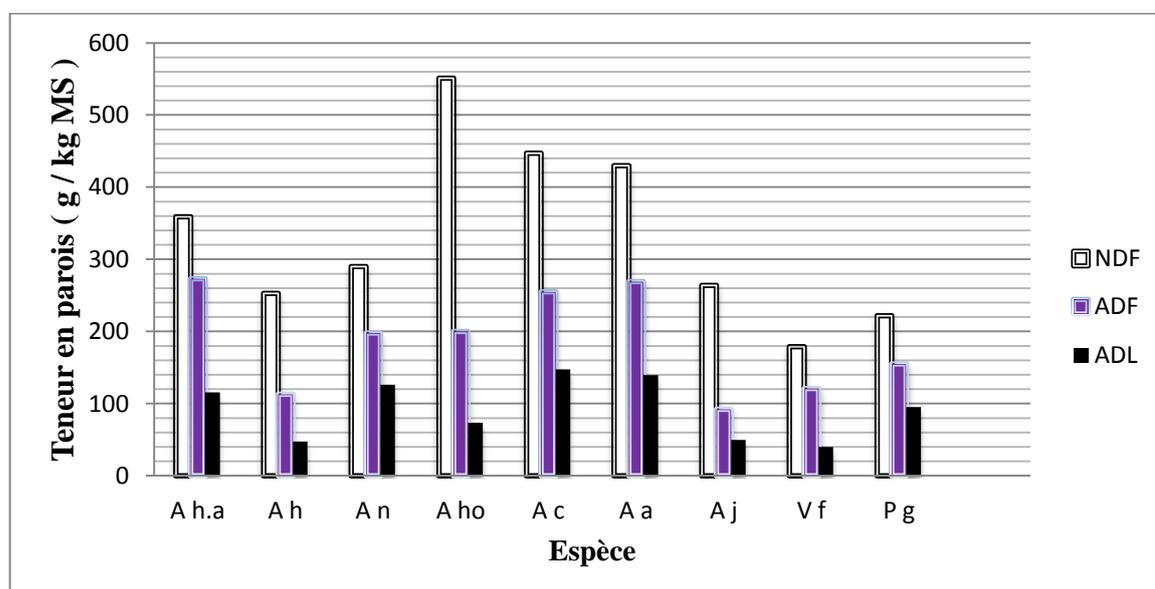


Figure 17 : Teneur en composants pariétaux en fonction de l'espèce végétale

A.h.a : *A herba alba* ; A.h : *A.halimus*; A.n : *A.nilotica*; A.ho:*A.horrida*;

A.c:*A.cyanophylla*; A.a : *A.albida*; A.j : *A.julibrissin*; Vf: *Vicia faba*; Pg:*P.granatum*

A.cyanophylla et *A.albida* se révèlent être plus riches en lignine (ADL) avec des teneurs voisines de 139,7 à 147,5 g/kg MS, respectivement. Par contre les teneurs les plus basses se rencontrent chez *V.faba* et *A.julibrissin* avec des valeurs, relativement proches de 39,9 g/ kg MS et 49,9 g/ kg MS. Les teneurs moyennes observées sont classées par ordre croissant, respectivement de 73,7 - 95,1 – 115,5 – 126,4 (g /kg MS) chez *A.horrida*, *P.granatum*, *A.herba-alba*, *A.nilotica* (Figure 17).

Les différences en NDF, ADF et ADL pourraient être dues à des différences spécifiques. L'accumulation de fibres dans la cellule est sous le contrôle du génotype. Le stade de croissance est

un facteur à prendre en considération. Le contenu en fibres augmente avec la maturité avancée du feuillage en raison de la lignification. Les teneurs en fibres obtenues dans cette étude sont comparables à celles rapportées par Reed (1986) et Topps (1997) chez d'autres espèces d'Acacia. De faibles teneurs en NDF, ADF et ADL contenus dans les feuilles d'*A.nilotica* sont comparables à celles rapportées par Rubanza *et al.* (2003). Ces derniers auteurs rapportent des teneurs en NDF, ADF et ADL de 182, 68 et 44 g / kg de matière sèche, respectivement. De même, Reed (1986) obtient des valeurs en NDF allant de 204 à 224 g / kg MS, 200 à 230 g / kg de matière sèche, et 452 à 473 g / kg de matière sèche dans *A.seyal*, *A.nilotica* et *A.drepanolobium*, respectivement. De faibles valeurs en NDF et ADF chez les espèces d'Acacia pourraient être associées à une haute digestibilité.

Le taux élevé en lignine dans les feuilles de certaines espèces d'Acacias, par exemple *A. albida* (147,5 g / kg MS), *A. cyanophylla* (139,7 g / kg MS) et *A.nilotica* (126,4 g / kg MS) pourrait être associé à une faible digestibilité. Rubanza *et al.*, (2003) rapporte des teneurs en lignine comparables chez *A. polyacantha* (145 g / kg MS) et *A. drepanolobium* (101 g / kg MS) récoltées dans des régions semi-arides de Tanzanie.

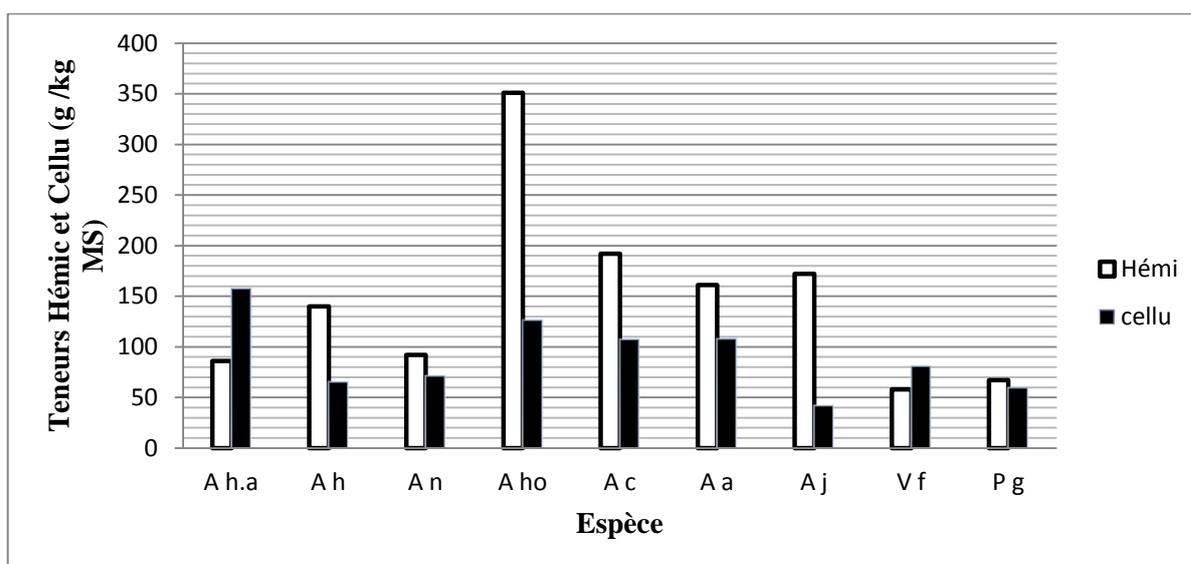


Figure 18 : Teneur en hémicellulose et cellulose en fonction de l'espèce végétale

A h.a : *A herba alba* ; A h: *A.halimus*; A n: *A.nilotica*; A ho:*A.horrida*;

A c:*A.cyanophylla*; A a: *A.albida*; A j: *A.julibrissin*; V f: *Vicia faba*; P g:*P.granatunum*

Le calcul des fractions hémicellulosiques et cellulosiques montre des résultats très disparates. *A.horrida* se détache avec une valeur de 351 g / kg MS en hémicellulose et *A.herba-alba* avec 157,5 g / kg MS en cellulose (Figure 18). Le facteur déterminant en cette teneur est le stade de maturité (âge) et le génotype de la plante (Coen and Dehority, 1970 ;).

Chez les plantes vertes, le composant fibrillaire est abondant et formé de cellulose, alors que la matrice est formée de pectines, d'hémicelluloses et de glycoprotéines.

Les plantes fourragères, avec un contenu relativement faible en parois cellulaires, ont par conséquent une valeur nutritive plus élevée par rapport aux graminées (Lowry *et al.*, 1992). Les plantes immatures ont des teneurs plus faibles en parois cellulaires, surtout en hémicellulose, que les plantes ayant atteint un stade avancé de maturité. Le pâturage de feuilles de légumineuses est généralement plus facile à digérer que la tige (Minson, 1990).

Les hémicelluloses peuvent constituer une importante portion de glucides fourragers, leur utilisation comme source d'énergie par l'animal ruminant est d'un intérêt particulier. Les premières études classiques, avec essais de digestion, indiquent qu'une certaine perte de pentose se produit dans le système digestif des ruminants (Mc Anally, 1942 ; Marshall, 1949).

1.4. Teneurs en Polyphénols

1.4.1. Dosage chimique

La concentration des composés phénoliques, dans les feuilles des arbres et arbustes examinés, révèlent des variations considérables entre les espèces. *P.granatum* montre la plus forte concentration des Phénols Totaux (PT) avec une concentration de 224,6 (g/kg MS).

Tableau 8 : Composition en Polyphénols (g/kg MS) et activité biologique des tanins

Plant species	Composition chimique						+PEG/-PEG ^a			
	PT	PNP	TT	TCI	TCL	TCT	6h	12h	24h	48h
<i>Artemisia. herba-alba</i>	47,3	2,2	45,1	43,6	29,2	72,8	0,58	1,06	1,05	1,01
<i>Atriplex halimus</i>	28,7	1,5	27,2	21,5	22,9	44,4	0,30	0,95	0,99	1,01
<i>Acacia nilotica</i>	213,4	7,9	205,5	117,3	609,0	726,3	1,73	2,23	1,75	1,54
<i>Acacia horrida</i>	98,9	7,2	91,7	89,2	386,5	475,7	0,61	1,15	1,09	1,14
<i>Acacia cyanophylla</i>	204,8	7,1	197,7	179,9	451,3	631,2	1,12	1,72	1,67	1,73
<i>Acacia albida</i>	31,1	3,3	27,8	35,5	26,2	59,7	0,85	1,45	1,36	1,43
<i>Albizia julibrissin</i>	104,8	3,9	100,9	84,8	502,3	587,1	0,85	1,21	1,18	1,16
<i>Vicia Faba. L</i>	69,0	9,3	59,7	26,9	32,5	59,4	0,80	0,99	1,01	1,08
<i>Pinuca granatum</i>	224,6	2,8	221,8	65,2	22,0	87,2	0,72	1,10	1,04	1,06

PT : Phénols Totaux, **PNP** : Phenols Non Précipitable par le PVPP, **TT** : Tanins Totaux, **TCL** : Tanins Condensés Libres, **TCI** : Tanins Condensés liés, **TCT**: Tanins Condensés Totaux.^aActivité biologique = au ratio entre la production de gaz mesurée à différents temps d'incubation additionnée de PEG vs. Control (i.e., Gaz PEG / Gaz Control).

Les valeurs les plus basses sont enregistrées chez *A.halimus* et *A.albida* avec des concentrations respectives de 28,7 g/kg MS et 31,1 g/kg MS. Les valeurs des Tanins Condensés Libres (TCL) et les Tanins Condensés Totaux (TCT) sont extrêmement élevées chez *A.nilotica* avec des valeurs de 609,0 g/kg MS et 726,3 g/kg MS, respectivement. A l'exception de *A.halimus*, *V.faba* et *A.albida* qui ont les valeurs en TCT les plus faibles (44,4 g/kg MS, 59,4 g/kg MS et 59,7 g/kg MS) les autres fourrages présentent des valeurs moyennes variant de 475,7 g/kg MS et 631,2 g/kg MS chez *A.horrída* et *A.cyanophylla* (tableau 8 et figure 19).

Dans la plupart des espèces étudiées, les TCL forment une grande partie des TCT, y compris les Tanins Condensés liés aux protéines et les tanins Condensés liés aux fibres. Il est important de mentionner qu'une forte proportion de TCT est récupérée sous forme TCL qui peut être responsable des éventuels effets néfastes sur la fermentation microbienne des aliments dans le rumen (Barry et McNabb, 1999).

Reed (1986), Abdulrazak *et al.*, (2000) et Rubanza *et al.*, (2003) rapportent des teneurs élevées en composés phénoliques et en tanins dans les feuilles de certaines Acacia. Des résultats aussi élevés en tanins condensés sont obtenus dans les travaux de Ammar *et al.*, (2008), Alvarez *et al.*, (2005) pour des arbustes du Nord de l'Espagne.

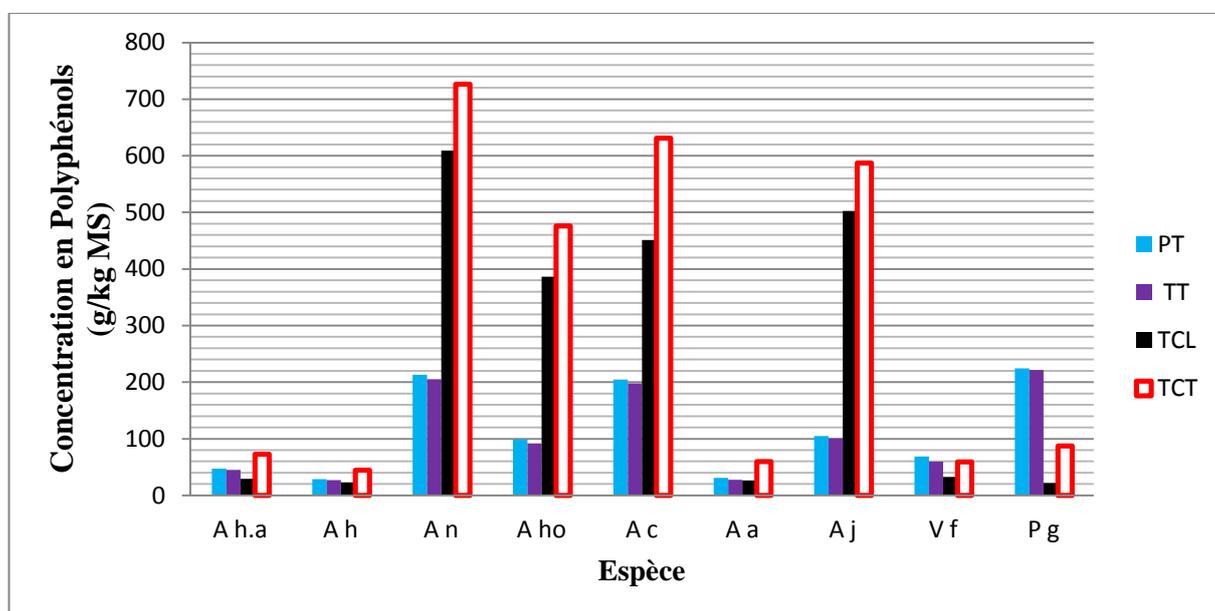


Figure 19: Concentration en Polyphénols des espèces fourragères étudiées

A h.a : *A herba alba* ; A h: *A.halimus*; A n: *A.nilotica*; A ho: *A.horrída*;

A c: *A.cyanophylla*; A a: *A.albida*; A j: *A.julibrissin*; V f: *Vicia faba*; P g: *P.granatum*

Ces différences en concentration peuvent être dues à la saison durant laquelle ces fourrages sont récoltés (Makkar *et al.*, 2007). Les échantillons de feuilles matures de *A.albida* sont récoltés à la fin du printemps (mai), mais *A.nilotica* est récoltée au début de l'automne (septembre). Les variations saisonnières en polyphénols, d'une manière générale, suivent des modèles différents dans chaque espèce végétale (Hagerman, 1988). Vaithyanathan et Singh (1989) rapportent que les feuilles de diverses espèces d'arbres ont répondu différemment aux variations saisonnières, par rapport à leur teneur en tanin. Certaines espèces montrent une augmentation de la teneur en tanin en été et d'autres en hiver. Le même résultat est obtenu par Gupta *et al.*, (1992), en notant une nette augmentation de la teneur en tanin en saison estivale.

Le stress hydrique induit des augmentations de teneur en TC (Anuraga *et al.*, 1993), mais la répartition entre les tannins libres et liés ou non aux protéines dépend du stress subit durant la croissance de la plante (Iason *et al.*, 1995). Il existe aussi une relation positive entre l'intensité lumineuse et la quantité de polyphénols produits dans une plante (Mole et Waterman 1987). Lees *et al.*, (1994) observent une augmentation de la teneur en TC dans le lotier pédonculé Cav. (*Lotus uliginosus*) quand la température est de 30°C comparée à 20°C, alors qu'il n'en est pas de même pour le lotier corniculé. Des teneurs plus élevées en TC ont été également observées sur des sols acides peu fertilisés alors que celles-ci sont plus faibles sur des sols très fertilisés (Kelman et Tanner 1990, Aurère *et al.*, 2012).

En plus, avec l'évolution du stade de développement la proportion de feuilles dans la biomasse de la plante entière diminue. Cela laisse supposer, les feuilles étant plus riches en TC que les tiges, que la teneur en TC diminue comme l'ont observé Borreani *et al.*, (2003), avec du sainfoin et du sulla, et Pilluza *et al.*, (2000) avec du sulla. Les résultats obtenus avec le sainfoin, variété Perly, récolté à des stades et des cycles différents par Theodoridou *et al.*, (2010) indiquent peu de variations de la teneur en TC. A l'inverse, Bell *et al.*, (1992), avec des feuilles de coton, Koupai-Abyazani *et al.*, (1993a) avec du sainfoin, Theodoridou *et al.*, (2011a, 2011b, 2012), avec 3 variétés de sainfoin, observent une augmentation de la teneur en TC avec le stade de développement. Ces résultats, apparemment contradictoires avec ceux rapportés plus haut, peuvent néanmoins s'expliquer : pendant la période de croissance, les plantes produisent une quantité importante de biomasse, et la synthèse des composés phénoliques est faible alors que pendant la floraison, la croissance est ralentie et le carbone serait disponible pour la synthèse des TC (Iason *et al.*, 1993).

Les variations considérables entre les différents composés phénoliques affichée (Figure 19) peuvent être liés, non seulement aux espèces fourragères elles même, mais aussi à la méthode

d'analyse (Ammar *et al.* 2005). Avec des plantes riches en tanins, une difficulté majeure est le manque de techniques de laboratoire précises pour leurs dosages (Palmer et McSweeney, 2000). Les méthodes colorimétriques doivent être utilisées avec prudence, car elles ne donnent pas un dosage quantitatif précis. Les différences entre les valeurs observées et celles de la littérature, concernant les concentrations en tanin, peuvent être dues à la nature des tests utilisés, la nature des tanins dosés dans les différentes espèces fourragères, le stade de croissance et, également, l'influence des facteurs édaphiques et climatiques (Rubanza *et al.*, 2005). En raison de la grande variation de leur structure, la mesure de la teneur en TC est complexe. Les méthodes de dosage les plus couramment utilisées sont des méthodes colorimétriques: HCL-butanol (Porter *et al.*, 1986 ; Terrill *et al.*, 1992a)(voir chapitre matériels et méthodes), méthode à la vanilline, (Broadhurst et Jones 1978, Terrill *et al.*, 1992a) ou basées sur la précipitation des protéines. Méthode de diffusion radiale (Hagerman 1987).

Ces méthodes permettent de doser des entités différentes et restent imparfaites en raison notamment d'un manque de standards appropriés et de leur non spécificité (Aufrère *et al.*, 2012) . La méthode de diffusion radiale permet de déterminer l'activité biologique mais est mal adaptée pour mesurer la teneur en TC (Aufrère *et al.*, 2012). La comparaison des résultats des différents travaux de la littérature reste donc difficile (Schofield *et al.*, 2001). Enfin, très récemment, la méthode par la thiolysse (Gea *et al.*, 2011 ; d'après Aufrère *et al.*,2012) qui est à la fois qualitative et quantitative, permet de mesurer la teneur en TC et d'avoir des indications sur leur structure. Cependant à l'heure actuelle, elle n'est pas applicable à tous les modes de conservation de fourrage, en particulier aux ensilages (Aufrère *et al.*,2012). Ainsi, le concept selon lequel une teneur en TC dans la plante inférieure à 50 g/kg MS serait bénéfique pour la santé et la nutrition de l'animal (Barry et Mc Naab 1999) est obsolète et ne reste valable que lorsque le dosage a été réalisé par la méthode vaniline-HCl ou par la méthode HCl-butanol (Aufrère *et al.*,2012). De plus, les recommandations de Barry et McNaab (1999) proviennent d'expérimentations réalisées avec du lotier et ne sont pas applicables pour d'autres fourrages contenant une concentration plus élevée en TC estimée par la même méthode d'analyse. Par exemple le Sulla (teneur en TC = 72 g/kg MS) et le sainfoin (teneur en TC = 80 g/kg MS) ont une valeur nutritive élevée (Ulyatt et Egan 1979, Stienezen *et al.*, 1996). La teneur plus faible en TC du lotier corniculé par rapport à celle du lotier pédonculé n'est pas suffisante à elle seule pour expliquer leurs effets différents du point de vue nutritionnel (Aufrère *et al.*,2012).

Il est important de signaler que la concentration des TC dans une cellule est contrôlée principalement par son génotype, avec un effet secondaire exercé par l'environnement. Dans une étude sur le lotier (*Lotus corniculatus*) Ross et Jones, (1983) et Dalrymple *et al.*, (1984b) montrent que le mode de transmission des gènes de tanins est monogénique. Le caractère est sous l'influence d'un gène nucléaire dominant multiallélique. Il a été déterminé, en utilisant des clones d'un germoplasme de lotier présentant des concentrations variables en tanins condensés, que l'hérédité de ce caractère est sous la dépendance de gènes à effets additifs. Ces résultats laissent entendre que la concentration en tanins condensés peut être manipulée dans certaines plantes grâce à un programme de sélection massale (Miller et Ehlke, 1996).

L'utilisation des PB à partir de feuilles d'Acacia pâturables peut être limitée par le niveau élevé (> 80 g / kg MS) des composés phénoliques et de tanins et surtout des niveaux encore plus élevés (> 50 g / kg MS) des tannins condensés. Ces niveaux élevés de tanins empêchent l'utilisation des PB de ces fourrages comme supplément pour les ruminants (Aerts *et al.*, 1999).

1.4.2. Activité biologique des tanins

Pour le criblage de l'activité biologique des tanins, la méthode la plus révélatrice de cette activité reste la technique « Tanin bio-assay » suivie par une quantification chimique des tanins (Jayanegara *et al.*, 2011). D'après Vitti *et al.*, (2005) le dosage chimique de la teneur en tanins est un mauvais indicateur de leur activité biologique. Le meilleur moyen est l'utilisation de la technique de production de gaz en incorporant le PEG (Makkar, 2003a). En inhibant les tanins, le PEG met en évidence leur effet biologique sur la digestion. La différence observée entre les volumes de gaz, en présence et en absence de PEG, indique le taux de protéines protégées par les tanins (Tolera *et al.*, 1997; Getachew *et al.*, 2002).

Dans la présente étude, les rapports les plus élevés, obtenus en calculant le ratio (+PEG/-PEG), s'observent chez *A.nilotica*, *A.cyanophylla* et, à moindre degré, chez *A.Julibrissin* (Figure 16). L'augmentation de la production de gaz due à l'inclusion de PEG dans l'incubation représente l'effet quantitatif des tanins (Makkar *et al.*, 1995). Le volume cumulé de gaz à 24 h et 48 h après l'inoculation sert pour les comparaisons en présence et en absence de PEG, car il est probable que la fermentation complète dans le rumen survient dans les 24 à 48 h de la consommation du fourrage chez les ruminants (Mlambo *et al.*, 2009).

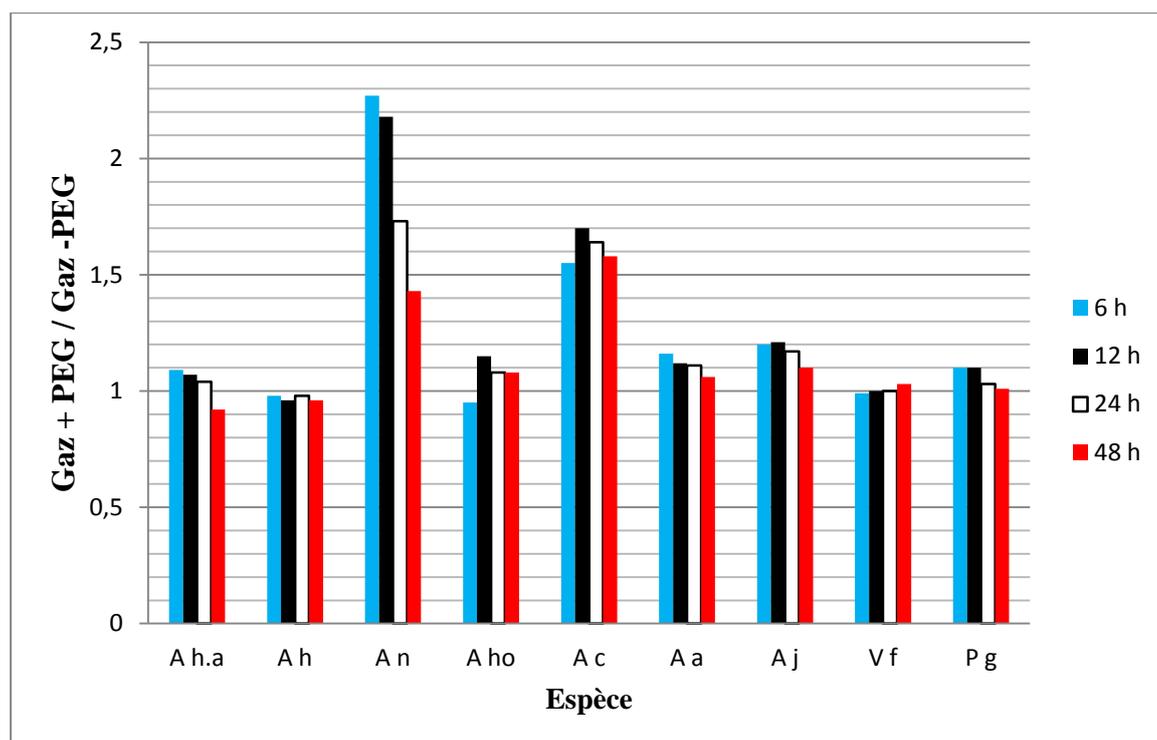


Figure 20 : Ratio (+PEG/-PEG) mesurant l'activité biologique des tanins (Makkar, 2003)

A h.a : *A herba alba* ; A h : *A.halimus*; A n : *A.nilotica*; A ho: *A.horrida*;

A c: *A.cyanophylla*; A a : *A.albida*; A j : *A.julibrissin*; Vf: *Vicia faba*; Pg: *P.granatunum*

Cela montre que les tanins condensés contenus dans ces trois espèces ont la plus grande activité biologique et par conséquent les plus antinutritionnels parmi les espèces évaluées. Dans des études similaires sur d'autres espèces d'Acacias, la production de gaz augmente significativement après addition du PEG. Cette augmentation est due, principalement aux tanins condensés présents dans le feuillage des fourrages utilisés, essentiellement les Acacias (Osuga *et al.*, 2007; Kumara Mahipala *et al.*, 2009).

Les concentrations obtenues des tannins, avec les différentes techniques sont positivement corrélées ($p < 0,0001$). La corrélation des TCT contenus dans ces trois Acacias avec leurs activité biologique est significativement élevée ($r = 0,69$, $p = 0,03$; $r = 0,80$, $p = 0,0092$; $r = 0,81$, $p = 0,0071$; $r = 0,81$, $p = 0,0096$) à 6 h, 12 h, 24 h et 48 h d'incubation, respectivement. Ces résultats sont compatibles avec les conclusions de Mlambo *et al.*, (2009) et Kumara Mahipala *et al.*, (2009). Des études antérieures ont montré que les tanins condensés peuvent provoquer un fort effet dépressif sur l'activité microbienne et par conséquent sur la production de gaz mesurée *in vitro* (Salawu *et al.*, 1997; Herv'as *et al.*, 2003) et sur l'efficacité de la croissance microbienne (Getachew

et al., 2008). Les tanins condensés ont un effet néfaste sur les bactéries cellulolytiques en inhibant leur activité (Salawu *et al.*, 1997; Herv'as *et al.*, 2003).

L'analyse des données mentionnées dans le tableau 12 montre que l'effet du PEG sur le volume de gaz produit ainsi que l'effet « espèce » pour l'ensemble des échantillons étudiés sont significatifs ($p < 0,0001$). L'interaction de ces deux facteurs (espèce x PEG) influe significativement cette production ($p < 0,001$). Cependant, l'activité biologique des tannins condensés dépend, aussi, de leur structure chimique et de leurs concentrations (Monagas *et al.*, 2010).

Il est important de signaler aussi que pour les fourrages riches en tannins la méthode de Van Soest et Robertson (1980) permettant de déterminer la teneur en constituants pariétaux (NDF) n'est pas applicable telle quelle. En effet, ces derniers peuvent se lier aux protéines ou se complexer avec les constituants pariétaux, ce qui entraîne un biais dans les résultats (Makkar *et al.*, 1995, Pagan *et al.*, 2009).

L'autre intérêt d'utiliser des légumineuses, à tannins, conservées sous forme d'ensilage réside dans le fait que les TC sont capables de se fixer aux protéines conduisant à une moindre hydrolyse de ces dernières pendant le stockage et à une bonne conservation de l'ensilage sans ajout de conservateur, comme l'ont montré Albrecht et Muck (1991) et Theodoridou *et al.*, (2012). Par ailleurs, l'activité biologique des TC est plus faible dans les ensilages que dans le fourrage vert correspondant, pour du sainfoin étudié à deux stades de développement (fin floraison au premier cycle de végétation et début floraison au deuxième cycle de végétation) (Aufrère *et al.*, 2012). Cela s'explique par des concentrations en TC extractibles et non extractibles plus faibles dans l'ensilage (Theodoridou *et al.*, 2011b). Toutefois, ces résultats sont en désaccord avec ceux obtenus par Minné *et al.*, (2002) avec du Lotier corniculé et du Sulla, et par Scharenberg *et al.*, (2007) avec du Sainfoin. Ces auteurs ne rapportent pas de modifications de teneur en TC dans l'ensilage par rapport au fourrage vert. Cependant, ils constatent que la teneur en tannins libres est réduite dans l'ensilage. Cette altération se ferait au cours de la mise en silo, qui cause une rupture cellulaire et la libération des TC, ceux-ci pouvant se combiner à d'autres molécules (Minné *et al.* 2002).

Selon Aufrère *et al.*, (2012) les relations entre la teneur, la structure et la capacité des TC à se lier aux protéines sont complexes et les résultats dépendent en partie de l'espèce végétale, du stade de développement de la plante, de son mode de conservation, de son environnement, mais aussi des méthodes de dosages utilisées qui ne mesurent pas toutes les mêmes entités. La structure des TC est un vaste domaine de recherche et a été peu étudiée jusqu'à maintenant sur les fourrages (Aufrère *et al.*, 2012). Lorsqu'elle a été mesurée, la relation entre la structure chimique et l'activité biologique n'est pas simple à interpréter (Waghorn, 2008 ; Theodoridou *et al.*, 2010, 2011a, b et

2012). En conséquence la structure des TC ne pourra pas toujours être prise en compte pour expliquer l'effet des TC sur les paramètres de la valeur alimentaire (Aufrere *et al.*, 2012).

2- Etude de la digestibilité des fourrages

2.1. Digestibilité de la matière sèche

2.1.1. Digestibilité *in vitro* selon la méthode de Tilley et Terry

La composition chimique seule ne suffit pas pour apprécier la valeur nutritive d'un aliment. Elle doit être couplée à la digestibilité et l'ingestibilité de cet aliment. Celles-ci déterminent le niveau de métabolisation des éléments nutritifs révélés par les analyses chimiques. La digestibilité de la matière sèche des fourrages peut être déterminée avec le concours d'animaux (méthode *in vivo*). Cette méthode est onéreuse et nécessite de gros moyens. En outre, elle n'est pas utilisable d'une manière courante pour de nombreux échantillons. Pour faire face à ce problème, plusieurs méthodes d'estimation de la digestibilité en laboratoire (*in vitro*) sont disponibles. Parmi elles, la méthode en deux étapes développée par Tilley et Terry (1963) s'est bien imposée. Sa mise en œuvre exige cependant du jus de rumen provenant de ruminants fistulés. La technique de Tilley et Terry est largement utilisée en raison de sa commodité. Le taux de matière sèche dégradée après une durée d'incubation déterminée est pris comme index de la digestibilité des fourrages. La précision de la prévision de la digestibilité augmente avec la durée d'incubation des échantillons dans le jus rumen.

Pour notre étude, les potentiels de digestibilité *in vitro* de la Matière Sèche les plus élevés sont ceux de l'*Atriplex halimus* et de *Vicia faba* par rapport à des valeurs de digestibilité significativement faibles ($p < 0,05$) obtenues avec le feuillage de toutes les espèces d'acacias confondues (Tableau 9 et figure 21). Les valeurs obtenues de la digestibilité apparente (AIVD), la digestibilité réelle (TIVD) et la digestibilité selon Tilley et Terry (IVDTT) de l'*Atriplex* et de la fève sont respectivement de 0,702, 0,823, 0,761 (g / g MS) et 0,672, 0,823, 0,745 (g / g MS).

Les faibles valeurs de la digestibilité de *A. cyanophylla* et *A. nilotica*, (0,307, 0,480, 0,457 g /g MS) et (0,396, 0,643, 0,497 g / g MS) pour respectivement l'AIVD, TIVD et IVD-TT, sont dues à leur contenu élevé en lignine et Tanins. En effet, la TIVD et la IVD-TT montrent des corrélations significativement négatives avec l'ADL ($r = - 0,89$, $p = 0,0010$ et $r = - 0,89$, $p = 0,0011$), respectivement. Il est un fait bien établi que la concentration de la lignine des fourrages est négativement corrélée avec la digestibilité (Jung et Deetz, 1993).

Tableau 9 : Digestibilité *in vitro* de la matière sèche (g /g MS) selon Tilley et Terry

	Temps d'incubation	48h		96h
	Digestibilité	Jus de rumen		Pepsine
	Espèce	AIVD	TIVD	IVD-TT
Asteraceae	<i>Artemisia herba-alba</i>	0,509 ^d	0,590 ^e	0,558 ^{ef}
Chenopodiaceae	<i>Atriplex halimus</i>	0,702 ^a	0,823 ^a	0,761 ^a
Fabaceae -	<i>Acacia nilotica</i>	0,396 ^{ef}	0,643 ^d	0,497 ^{fg}
Leguminosae	<i>Acacia horrida</i>	0,571 ^c	0,703 ^c	0,657 ^c
	<i>Acacia cyanophylla</i>	0,307 ^g	0,480 ^f	0,457 ^g
	<i>Acacia albida</i>	0,430 ^{fe}	0,583 ^e	0,567 ^{def}
	<i>Albizia julibrissin</i>	0,451 ^{de}	0,723 ^{bc}	0,634 ^{cde}
	<i>Vicia Faba. L</i>	0,672 ^a	0,823 ^a	0,745 ^{ab}
Lythraceae	<i>Pinuca granatum</i>	0,607 ^{bc}	0,762 ^b	0,664 ^{bc}
	SEM	0,0214	0,0187	0,0171

AIVD: Apparent *in vitro* Digestibility; IVD-TT: *in vitro* Digestibility of Tilley & Terry; TIVD: True *in vitro* Digestibility; ^{a, b, c, d, e, f, g} moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distincts ($P < 0,05$). S.E.M.: Erreur Standard des Moyennes.

La lignine, entièrement indigestible, représente une barrière physique limitant l'accès des enzymes microbiennes à la paroi cellulaire (Van Soest, 1994). La teneur en fibres (NDF, ADF, ADL) est une composante importante des aliments pour animaux. Elle représente la fraction la plus difficile à digérer. Présentes dans un aliment en quantité importante, les fibres semblent altérer le métabolisme et les fermentations dans la panse. La lignine par exemple est la fraction de NDF quasi indigeste qui durcit les parois cellulaires entraînant ainsi une diminution de la digestibilité. Les valeurs de la digestibilité *in vitro* des feuilles d'*A.cyanophylla*, *A.nilotica* et *A.albida* sont inférieures à celles enregistrées *in vitro* par Ben Salem *et al.*, (1997); Rubanza *et al.*, (2005); Mlambo *et al.*, (2009); Getachew *et al.*, (2000). Le coefficient de digestibilité du fourrage dépend donc de la proportion et de la digestibilité des membranes. Celle-ci diminue quand augmente la proportion des membranes dans la plante ainsi que leur lignification. En termes histologiques, on peut dire que les tissus celluloses (parenchymes ...) sont entièrement digestibles alors que les tissus lignifiés (sclérenchyme, tissus conducteurs ...) sont presque entièrement indigestibles; on les retrouve réduits à l'état de fines particules dans les fèces (Gorshkova *et al.*, 2000).

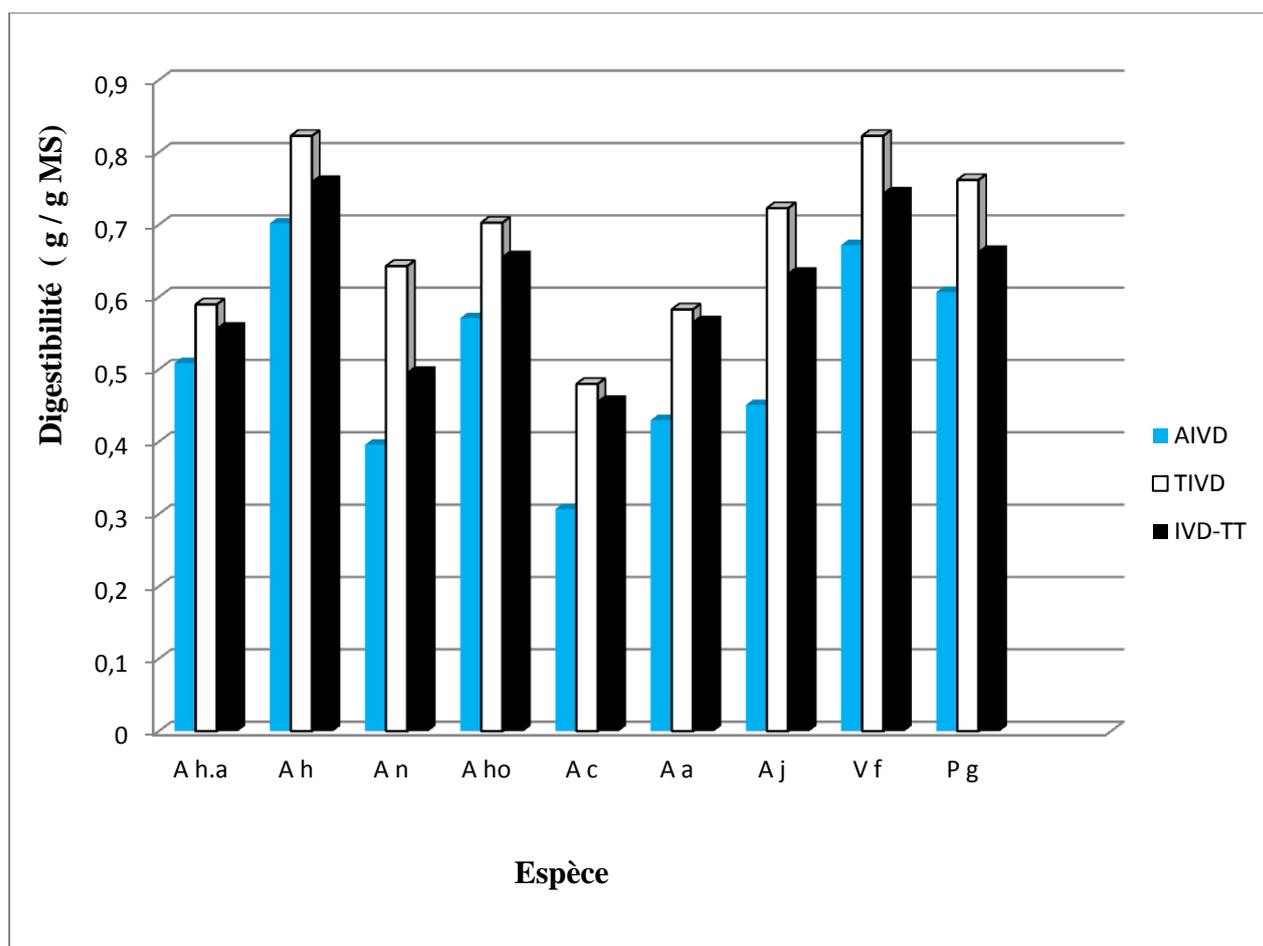


Figure 21 : Digestibilités des fourrages (g /g Ms) selon la méthode de Tilley et Terry

A h.a : *A herba alba* ; A h: *A.halimus*; A n: *A.nilotica*; A ho:*A.horrida*;

A c:*A.cyanophylla*; A a: *A.albida*; A j: *A.julibrissin*; Vf: *Vicia faba*; Pg:*P.granatium*

Ces résultats montrent, aussi, que la digestibilité des fourrages est clairement entravée par les teneurs élevées en tanins condensés (TCs) comme il est rapporté, dans une étude similaire par Jayanegara et Palupi, (2010). La complexation des TCs avec les protéines alimentaires ou leur fixation aux enzymes bactériennes réduisent globalement la protéolyse ruminale (Zimmer et Cordesse, 1996; Jean-Blain, 1998; Aerts *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2003). Ces phénomènes ont notamment été décrits chez des ruminants consommant des légumineuses fourragères (Theodorou *et al.*, 1999). Au niveau du rumen, la complexation excessive des TCs avec les protéines et les fibres alimentaires les rendraient moins digestibles (Butter *et al.*, 1999; Mueller-Harvey, 2006; Mc Sweeney *et al.*, 2008). La consommation de TCs affecterait aussi la digestion des lipides et la production des acides gras (Butter *et al.*, 1999; Mueller- Harvey, 2006; Mc Sweeney *et al.*, 2008). Enfin, des ingestions massives de TCs peuvent perturber la digestibilité ruminale par une réduction globale des activités enzymatiques de la flore (Mc Sweeney *et al.*, 2001).

2.1.2. Dégradabilité *in situ* (*in sacco*)

Selon Preston (1986), la dégradabilité de la matière sèche d'un aliment de bonne valeur nutritive doit être égale ou supérieure à 50% (0,5 g / g MS) après 24 heures d'incubation dans le rumen. Dans notre étude ce n'est pas le cas pour *A.cyanophylla*, *A.herba-alba* et à un degré moindre pour *A.nilotica* ($p=0,05$) avec respectivement des taux de 0,386 (g / g MS), 0,452 (g / g MS) et 0,508 (g / g MS) (Tableau 10 et figure 22).

Tableau 10 : Cinétique de dégradation *in sacco* de la matière sèche (g/ g MS) des fourrages

Espèce	<i>A. herba alba</i>	<i>Atriplex halimus</i>	<i>Acacia nilotica</i>	<i>Acacia horrida</i>	<i>Acacia saligna</i>	<i>Acacia albida</i>	<i>Albizia julibrissin</i>	<i>Vicia faba</i>	<i>Pinuca granatum</i>	SEM
0 H	0,249 ^d	0,325 ^c	0,183 ^t	0,195 ^{ef}	0,205 ^e	0,242 ^d	0,340 ^{bc}	0,464 ^a	0,343 ^b	0,0171
24 H	0,452 ^{dc}	0,679 ^b	0,508 ^{cd}	0,536 ^c	0,387 ^e	0,562 ^c	0,742 ^b	0,829 ^a	0,867 ^a	0,0315
96 H	0,600 ^b	0,839 ^a	0,697 ^b	0,628 ^b	0,640 ^b	0,662 ^b	0,830 ^a	0,857 ^a	0,902 ^a	0,0223

0H, 24H, 96H : Temps d'incubation ; ^{a, b, c, d, e, f, g} moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distincts ($P < 0,05$). S.E.M.: erreur standard des moyennes.

Nombreuses études sont menées sur la dégradabilité des fourrages ligneux, principalement les Acacias. Néanmoins, une comparaison des divers travaux effectués portant sur le même fourrage s'avère difficile en raison d'une grande variation dans les procédures d'expérimentation (constituants de la plante analysés, protocole d'analyse, mode d'échantillonnage et de préparation de l'échantillon). On sait également que la composition chimique d'un fourrage, dont dépend la dégradabilité, est influencée par le mode de culture, la nature du sol, l'ensoleillement, la saison et le stade végétatif. En outre, les résultats obtenus à partir de la technique des sachets en nylons sont peu reproductibles. Le rumen n'est pas un milieu stable et homogène et il existe de grandes modifications du milieu ruminal au cours du jour ainsi que d'un compartiment à l'autre.

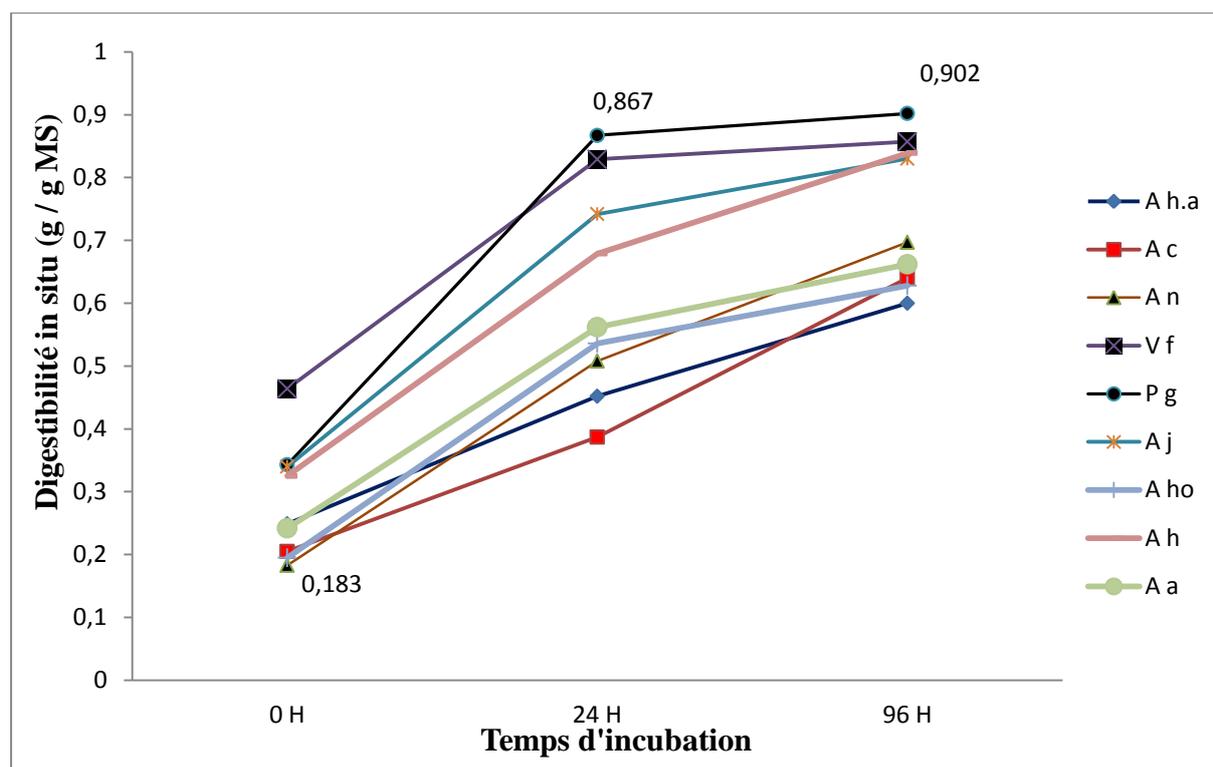


Figure 22 : Evolution de la disparition, *in sacco*, de la matière sèche des substrats récoltés.

A h.a : *A herba alba* ; A h: *A.halimus*; A n: *A.nilotica*; A ho:*A.horrida*;

A c:*A.cyanophylla*; A a: *A.albida*; A j: *A.julibrissin*; Vf: *Vicia faba*; Pg:*P.granatum*

2.1.2.1. Cinétique de dégradation de la Matière Sèche *in sacco*.

Les paramètres de la cinétique de dégradation de la matière sèche en utilisant les sachets en nylon (*in sacco*) des différents substrats étudiés sont présentés dans le tableau 14. L'analyse de variance nous a permis de remarquer que la disparition de la matière sèche variait très significativement en fonction de l'aliment utilisé et du temps d'incubation ($p < 0,05$).

Les valeurs du Washing loss (pertes dues au lavage au temps T0) sont comprises entre 18,3 % et 46,4 %. La valeur la plus élevée est notée chez *V. faba*, tandis que la valeur la plus basse est observée chez *A.nilotica* ($p < 0,05$). Exception faite des taux enregistrés chez *V.faba* et *P.granatum*, (0,464 g/100g MS) et (0,343 g/100g MS) tous les autres substrats montrent des valeurs relativement faibles ($p < 0,05$). Quant aux taux enregistrés au temps T24, nous observons toujours la même tendance, avec *P.granatum* et *V.faba* enregistrant des valeurs significativement supérieures, respectivement de 0,867 et 0,829 (g/100g MS) ($p < 0,05$) (voir figure 22).

Nous notons que la digestibilité à 96 heures de l'ensemble des substrats étudiés peut être groupée en deux classes bien distinctes $p < 0,05$) (Voir Tableau 14). Elle est moins disparate que celle de 24 heures du fait que le plateau (digestibilité maximale) peut être atteint à partir de 72.

Rettigner (1999), au cours d'un travail sur la dégradabilité de certains fourrages, et de sous-produits d'industrie d'origine tropicale, suggère l'insertion d'un temps d'incubation supplémentaire de 72 H afin d'obtenir une meilleure représentation de la courbe de dégradabilité et d'atteindre le plateau de dégradabilité, c'est-à-dire le temps où aucune dégradation significative n'a lieu. En effet le temps d'incubation maximal de 48 heures précédemment choisi n'avait pas permis d'obtenir une description de la cinétique de dégradation ainsi que pour les fibres brutes de la majorité des aliments testés, le plateau de dégradabilité n'ayant pas été atteint (Boukary-Mori H., 2000).

La durée du temps d'incubation nécessaire, pour identifier clairement le plateau de dégradabilité, doit être adaptée à la nature de l'échantillon analysé. Ainsi un temps d'incubation de 48 h est suffisant pour les aliments protéiques et certains fourrages tandis qu'au moins 72 h d'incubation sont nécessaires pour la majorité des fourrages. Si une grande différence est constatée entre 48 et 72 heures, il est alors nécessaire d'inclure un temps de 96 heures pour obtenir une description de la cinétique de dégradation plus adéquate.

Malgré certaines différences dans la conduite de nos travaux avec ceux rencontrés dans la bibliographie nous considérons que nos résultats sont comparables avec plusieurs. Dans des études utilisant six acacias endémiques du Kenya (*Acacia.brevispica*, *nubica*, *tortilis*, *seyal*, *nilotica*, et *mellifera*) Abdulrazak *et al.* (1996, 1998, 2000) obtiennent des valeurs de la fraction soluble (waching loss ou digestibilité à 0 heure) comprises entre 0,146 à 0,505 g / kg MS. Une vitesse de dégradation comprise entre, 0,021 et 0,1115 h⁻¹. Pour *A.nilotica*, il obtient, respectivement, une dégradabilité à 96 heures, un potentiel de dégradation (A) et une dégradabilité effective de 609, 642, 346 (g / kg MS).

En se basant sur le potentiel de dégradabilité, les échantillons étudiés peuvent être classés comme suit : *P.granatum* >*V.Faba* >*A.halimus* >*A. julibrissin*>*A.nilotica*>*A.albida* >*A.cyanophylla* >*A.horrída* >*A.herba alba*.

2.1.2.2. La digestibilité *in vitro* et la dégradabilité *in sacco* de la matière sèche

Afin de mieux apprécier les différents résultats obtenus avec les deux méthodes utilisées, la méthode de digestibilité de la matière sèche *in vitro* de Tilley et Terry et la méthode de dégradabilité de la matière sèche *in sacco*, il nous est apparu important de comparer la concordance de leurs résultats. A cet effet nous observons une corrélation positive entre les différentes digestibilités des deux méthodes (Tableau 11).

En comparant les différents taux obtenus par les deux méthodes, on constate que les valeurs mesurées par la technique des sachets de nylon sont systématiquement supérieures aux coefficients obtenus par la technique de Tilley et Terry ($p < 0,05$). La moyenne des taux obtenue pour l'ensemble des substrats analysés par la méthode *in situ* est de 0,739 (g / g MS) contre un taux de 0,615 (g / g MS) (Voir figure 22).

Tableau 11: Corrélation entre les digestibilités *in vitro* et *in sacco* de la matière sèche.

	AIVD	TIVD	IVDTT	<i>In situ</i> 0h	<i>In situ</i> 24h	<i>In situ</i> 96h
TIVD	0,891 **	1				
IVDTT	0,947 ***	0,934 ***	1			
<i>In situ</i> 0h	0,666 *	0,739 *	0,754 *	1		
<i>In situ</i> 24h	0,681 *	0,846 *	0,773 *	0,858 **	1	
<i>In situ</i> 96h	0,597 ns	0,806 **	0,694 *	0,82 **	0,935 ****	1

* $< 0,5$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$, **** $< 0,00001$, ns $> 0,05$.

Des constatations identiques ont été rapportées par Combe–Dinuis et Weeler (1979) à propos de la digestibilité de la matière sèche de paille traitée à la soude : après 48 heures d'incubation, les auteurs obtiennent, avec la technique des sachets de nylon, des coefficients supérieurs de 4 points aux valeurs mesurées par la technique de Tilley et Terry. L'obtention de valeurs plus élevées avec la technique *in sacco* peut provenir d'une différence dans l'établissement de l'état d'équilibre entre le substrat (aliments), les réactifs (enzymes) et les produits de la réaction (métabolites). Dans la technique des sachets, une faible quantité d'aliments est mise en incubation dans une grande masse de réactifs, les produits de la réaction sont éliminés en continu de telle sorte que l'équilibre est fortement déplacé vers la production des métabolites. Dans la technique de Tilley et Terry seuls les gaz peuvent s'échapper ; après quelques temps de fermentation, une accumulation de métabolites freine la réaction (Istasse *et al.*, 1990).

Il est important de signaler que compte tenu de la lourdeur des mesures de digestibilité *in vivo*, plusieurs méthodes alternatives sont proposées pour évaluer plus facilement, voire en routine,

la digestibilité des fourrages. Contrairement aux études *in vivo*, elles présentent l'intérêt d'évaluer spécifiquement ces aliments.

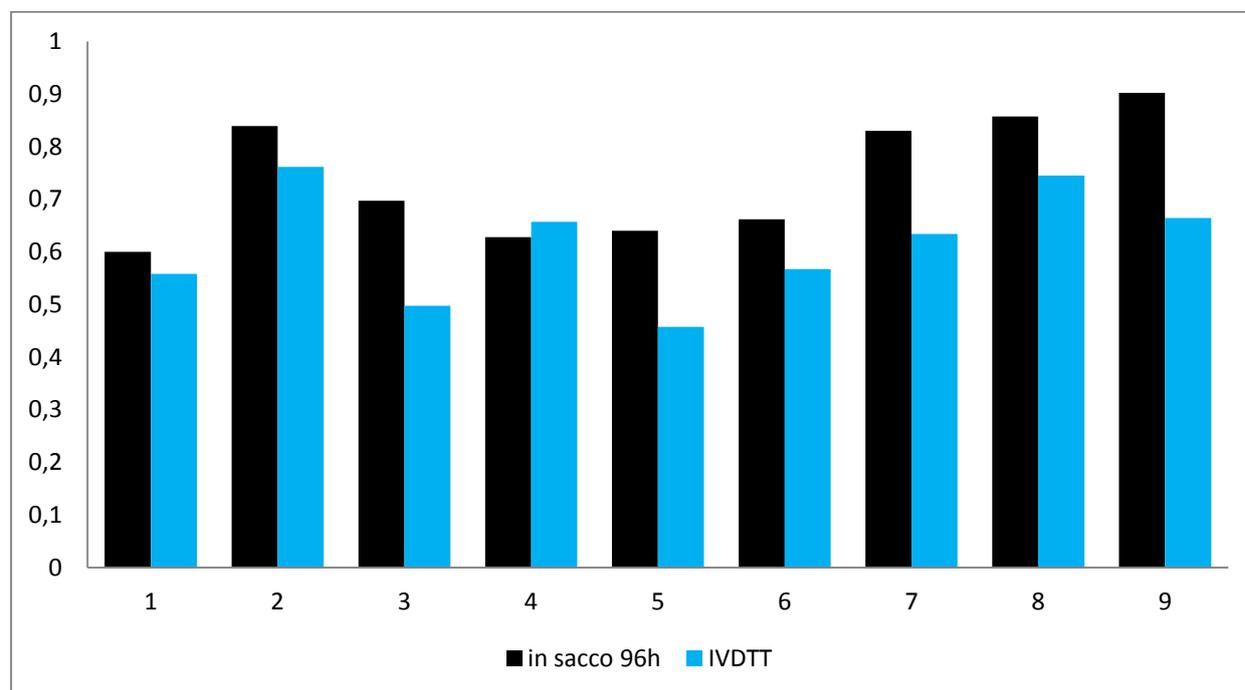


Figure 23 : Comparaison entre la digestibilité *In sacco* et la digestibilité de Tilley et Terry ($p < 0,05$).

L'application de la méthode de Tilley et Terry aux fourrages tempérés permet de prévoir leur digestibilité avec une grande précision (l'écart-type résiduel des estimations est voisin de 2 points) pour des ensembles de fourrages botaniquement homogènes et de bonne valeur nutritive. Les prévisions sont moins précises avec les fourrages pauvres, en particulier ceux des régions chaudes, dont la teneur en azote peut être limitante pour l'activité microbienne. Quant à la précision de la méthode *in sacco*, elle plus faible pour les fourrages riches en ADL et pauvres en azote, ce qui est fréquemment le cas des fourrages tropicaux, avec lesquels du matériel microbien resterait attaché aux fibres dans le résidu final (Michalet Doreau and Ould Bah, 1992).

La prédiction de l'IVDTT et la digestibilité *in sacco* de la MS en prenant en considération la composition en ADL est réalisée. Des équations de régression différentes sont obtenues, mais dans les deux cas nous observons un effet négatif de la composition en ADL sur la digestibilité de la matière sèche (voir figure 19).

- Digestibilité de Tilley et Terry, IVDTT ; $y = -357,45x + 312,82$ ($R^2 = 0,801$)

- Digestibilité *In sacco* de la matière sèche ; $y = -238,95x + 269,48$ ($R^2 = 0,443$)

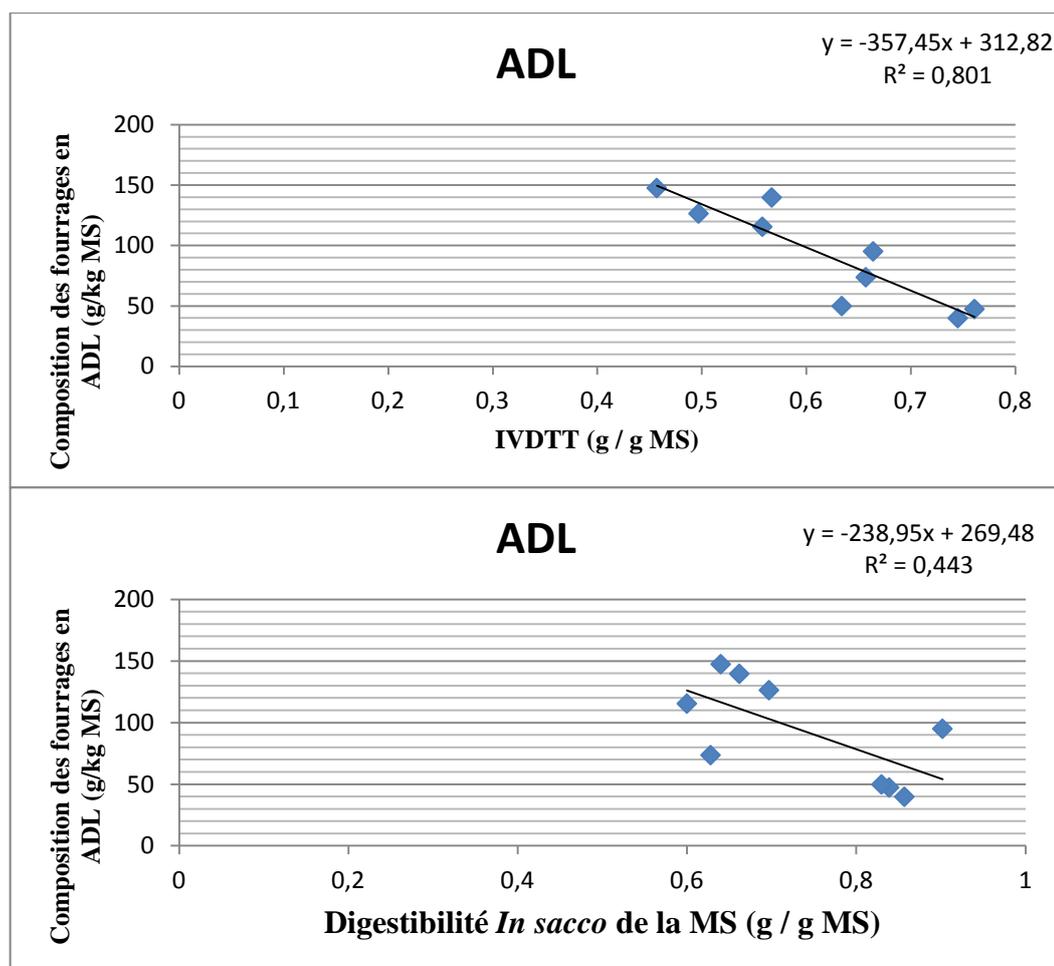


Figure 24 : Relation entre la composition en ADL et la digestibilité de la matière sèche.

Ce résultat est corroboré par l'analyse de corrélation entre les deux types de digestibilités suscitées et une partie de la composition chimique des échantillons étudiés (Tableau 11). Nous remarquons que la composition en ADL est négativement corrélée avec les digestibilités, apparente (AIVD) et la digestibilité de Tilley et Terry (IVDTT) ($r = -0,9$; $p < 0,001$) ainsi qu'avec les digestibilités *in situ*, mais à un degré moindre ($r = -0,7$, $p < 0,05$). L'effet de la fraction NDF sur la digestibilité de la matière sèche est un peu paradoxal, si l'on tient compte de la différence observée entre les coefficients de corrélation obtenus avec les deux méthodes. Nous avons respectivement $r = -0,4$, $-0,6$, $-0,5$ ($p > 0,05$) pour l'AIVD, TIVDIVDTT et $r = -0,8$, $-0,7$, $-0,8$ ($p < 0,5$) pour l'*in situ* 0h, *In situ* 24h, *In situ* 96h. Par contre l'effet de la matière organique n'est pas significatif ($p > 0,05$).

Tableau 12 : Corrélation entre la digestibilité *in vitro*, *in sacco* et la composition chimique

	AIVD	TIVD	IVDTT	IS0h	IS24h	IS96h	OM	PB	NDF
TIVD	0,9 **	1							
IVDTT	0,9 ***	0,9***	1						
IS0h	0,7 *	0,7 *	0,7 *	1					
IS24h	0,7 *	0,8*	0,8*	0,8 **	1				
IS 96h	0,6 ns	0,8 **	0,7 *	0,8**	0,9 ****	1			
OM	-0,6ns	-0,7*	-0,7*	-0,6ns	-0,4ns	-0,6 ns	1		
PB	-0,3ns	-0,1ns	-0,2ns	-0,3ns	-0,2ns	-0,3ns	0,2 ns	1	
NDF	-0,4ns	-0,6ns	-0,5ns	-0,8*	-0,7*	-0,8**	0,4ns	0,3ns	1
ADL	-0,78*	-0,9***	-0,9***	-0,7*	-0,7*	-0,7*	0,8*	0,1**	0,5ns

IS: *In situ* (*In sacco*); * $<0,5$, ** $<0,01$, *** $<0,001$, **** $<0,0001$, ns $>0,05$.

La méthode classique de Tilley et Terry (1963) a été supplantée par la méthode du « gaz-test » ou « gas production » de Hohenheim (Menke *et al.*, 1979) qui présente l'intérêt d'être bien standardisée et de s'appuyer sur des mesures de production de gaz faciles à lire. Des variantes de cette méthode, bien adaptées à des mesures en cinétique, sont proposées par Cone *et al.*, (2002). Les résultats de la digestibilité *in vitro* en utilisant la méthode de production de gaz sont traités dans les parties qui suivent.

2.2. Cinétique de dégradation *in sacco* de la fraction NDF

Les paramètres cinétiques de dégradation de la fraction pariétale des échantillons analysés sont résumés dans le tableau 13.

La dégradabilité de la NDF est statistiquement différente entre les espèces étudiées, aux différents temps d'incubation ($P<0,05$). Pour le premier traitement au temps de T0, zéro heures (washing loss), elle est comprise entre 0,163 et 0,501 (g/100 g MS). La valeur la plus élevée est notée chez *V. Faba* et la plus faible est enregistrée chez *A.herba alba*. Aux termes de l'incubation (96 heures), la disparition de la NDF est comprise entre 0,889 et 0,367 (g/100 g MS). En concordance avec le washing loss (T0), la valeur la plus élevée est notée pour *V. Faba* par contre *A.albida* enregistre la valeur la plus faible. La dégradation effective (ED) est statistiquement variable entre les fourrages ($P<0,05$). Elle est comprise entre 25,8 et 62,1%. La dégradabilité la plus élevée est observée chez *V. Faba* et la plus faible pour *A.albida*.

La faible digestibilité de la fraction NDF des Acacias, est largement discutée dans plusieurs travaux (Makkar *et al.*, 1995; Woodward and Reed, 1997 ; Ben Salem *et al.*, 1999b ; Abdulrazak *et al.*, 2001 ; Alam *et al.*, 2007).

Tableau 13 : Dégradation *in sacco* de la fraction NDF (g/ g MS) des fourrages collectés.

Espèce	<i>A. herba alba</i>	<i>Atriplex halimus</i>	<i>Acacia nilotica</i>	<i>Acacia horrida</i>	<i>Acacia saligna</i>	<i>Acacia albida</i>	<i>Albizia julibrissin</i>	<i>Vicia faba</i>	<i>Pinuca granatum</i>	SEM
0 H	0,163 ^f	0,201 ^e	0,283 ^d	0,324 ^c	0,385 ^b	0,277 ^d	0,159 ^f	0,501 ^a	0,293 ^d	0,020
24 H	0,81 ^{cd}	0,310 ^g	0,397 ^f	0,500 ^e	0,634 ^b	0,311 ^g	0,575 ^d	0,749 ^a	0,629 ^{bc}	0,028
96 H	0,683 ^{cd}	0,664 ^d	0,531 ^f	0,601 ^e	0,769 ^b	0,367 ^g	0,725 ^{bc}	0,889 ^a	0,767 ^b	0,028

0H, 24H, 96H : Temps d'incubation ; ^{a, b, c, d, e, f, g} moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distincts (P < 0,05). S.E.M.: erreur standard des moyennes.

Les Fibres au Détergent Neutres comprennent l'hémicellulose, la cellulose et la lignine. Déjà traitée dans les paragraphes précédents, il est établi que la lignine est indigestible, tandis que la digestibilité de l'hémicellulose et la cellulose varie. La digestibilité de la cellulose est plus lente que celle de l'hémicellulose. La dégradabilité des ligneux varie dans le sens inverse de leur teneur en parois qui semble déterminer leur profil de dégradation. La ligno-cellulose en particulier détermine négativement la dégradabilité des ligneux. Les légumineuses ont moins de fibre NDF totale, mais en raison d'une plus grande lignification, ont généralement une digestibilité inférieure de la fibre NDF (Oba et Allen., 1997b).

Chez la vache laitière plus la digestibilité de la NDF, NDF Digestibility (NDFD), est élevée, plus sa consommation n'augmente. Oba et Allen (1997) définissent que chaque pourcentage d'augmentation de la NDFD permet à la vache de consommer 0,167 kg de matière sèche de plus. Hoffman et Bauman (2003) utilisent des rations à base d'ensilage de trèfle et différentes proportions d'ensilage de maïs afin d'obtenir des taux de NDFD des fourrages variables. Plus la NDFD augmente, plus la consommation de matière sèche ou de NDF et la production de lait ne s'élevaient. Par contre pour le mouton, Mertens (1973) constate que la corrélation entre le contenu des parois cellulaires et sa consommation de matière sèche est de - 0,76. La dégradabilité des substrats riches en lignine varie dans le sens inverse de leur teneur en parois qui semble déterminer leur profil de dégradation. La ligno-cellulose, en particulier, détermine négativement la dégradabilité des ligneux (Figure 25). Aussi, les variations observées sur la digestibilité des ligneux sont essentiellement dues

à l'espèce ligneuse et à sa composition chimique. En résumé, la génétique végétale influence également la digestibilité de la fibre NDF. La teneur en fibres (NDF, ADF, ADL) est une composante importante des aliments pour animaux. Elle représente la fraction la plus difficile à digérer. Présentes dans un aliment en quantité importante, les fibres semblent altérer le métabolisme et les fermentations dans la panse. La lignine par exemple est la fraction de NDF quasi indigeste qui durcit les parois cellulaires entraînant ainsi une diminution de la digestibilité.

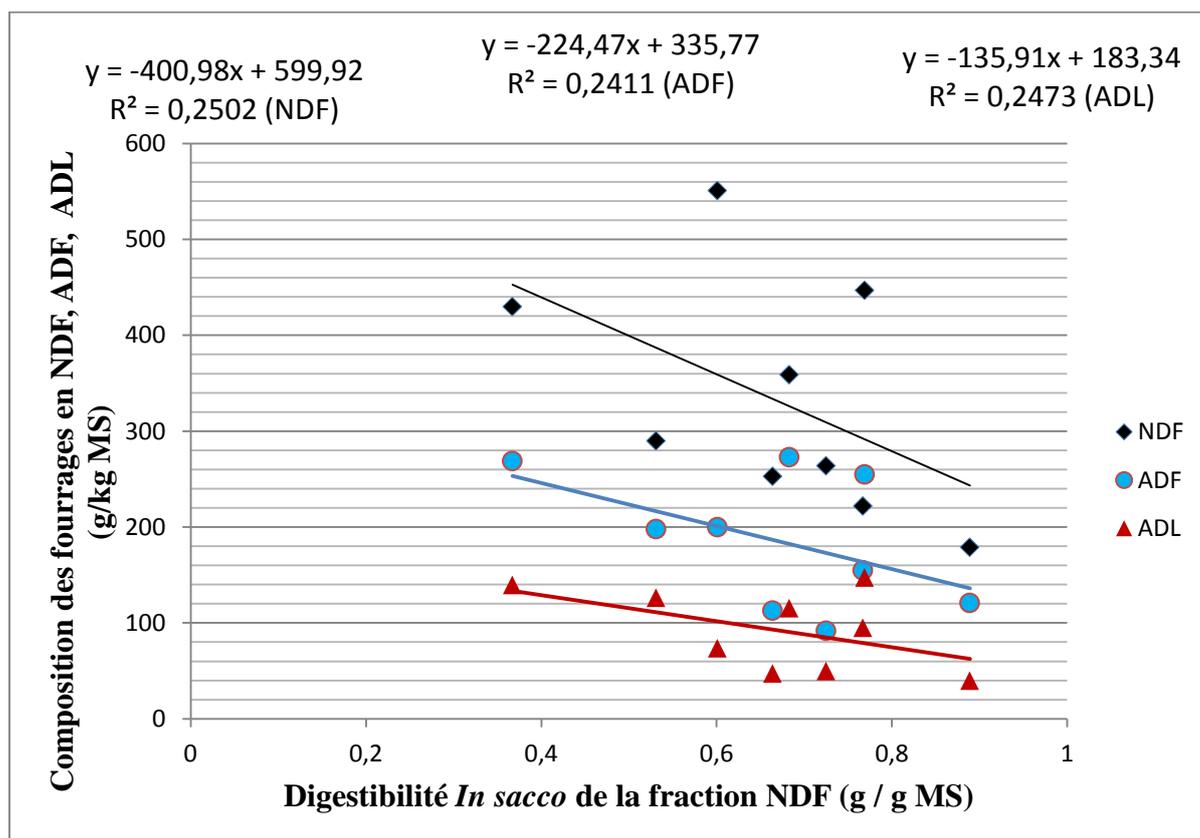


Figure 25 : Relation entre les composants pariétaux et la digestibilité de la NDF

A ce propos, Baumer (1997) note que la digestibilité des constituants pariétaux augmente avec la teneur en constituants pariétaux mais diminue avec celle de la lignine. Aussi, on assiste à une diminution accentuée de l'ingestion volontaire lorsque la valeur des éléments constitutifs des parois cellulaires est supérieure à 60% (Van Soest, 1965 cité par Miranda, 1989). La relation négative entre la concentration de la lignine et de la digestibilité de la paroi cellulaire est vérifiée quelle que soit la méthode d'analyse de la digestibilité employée, *in vivo* ou *in vitro* (Jung *et al.*, 1997). Généralement, la pente de cette relation négative est moins accentuée pour les légumineuses que les graminées, ce qui suggère que la lignine est plus inhibiteur de la digestion chez les graminées (Van Soest, 1964 ; Buxton et Russell, 1988). A l'opposé, des études microscopiques

suggèrent que la lignine peut être plus inhibitrice dans les légumineuses que les graminées car les tissus des légumineuses sont plus lignifiés, donnant des parois plus épaisses. Pratiquement plus indigestes que les parois minces des graminées (Engels, and Jung, 1998; Jung et Engels, 2002). Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer comment la lignine peut inhiber la digestion de la paroi cellulaire, cependant, il est maintenant généralement admis que la lignine agit simplement comme une barrière physique empêchant les enzymes microbiennes d'atteindre leurs cibles polysaccharidiques (Chesson, 1993 ; Jung et Deetz, 1993).

Les variations de dégradabilité *in sacco* des substrats ne reflètent pas toujours les variations d'activité fibrolytique des microorganismes du rumen, en raison de problèmes d'échanges entre le contenu ruminal et le contenu du sachet, incluant la pénétration des microorganismes à l'intérieur du sachet et l'évacuation des produits terminaux de la fermentation hors du sachet (Michalet-Doreau et Nozière 1999).

Certains auteurs estiment que la prédiction de la digestion ruminale des parois par la dégradabilité *in sacco* n'est pas très précise, elle est généralement sous estimée. Une hypothèse fréquemment avancée pour expliquer cette sous-estimation de la digestion ruminale par les mesures *in sacco* concerne la plus faible activité des microorganismes présents dans le sachet que dans le contenu ruminal. Le nombre de bactéries cellulolytiques, l'activité des enzymes fibrolytiques (Nozière et Michalet-Doreau, 1996) et le pH (Marinucci *et al.*, 1992, Nozière et Michalet-Doreau, 1996) sont plus faibles à l'intérieur des sachets que dans le contenu ruminal environnant. Cependant la relation positive entre l'activité des enzymes fibrolytiques microbiennes et la dégradabilité *in sacco* des parois des fourrages, observée par de nombreux auteurs (Silva *et al.*, 1987, Huhtanen *et al.*, 1995) apparaît curvilinéaire (Nozière *et al.*, 1996). Ceci suggère qu'il existe une valeur d'activité seuil au-dessus de laquelle les variations d'activité fibrolytique microbienne n'induisent pas de variation de la cinétique de dégradation des constituants pariétaux. Dans les conditions d'alimentation définies pour la mesure de la dégradabilité *in sacco* (Michalet-Doreau *et al.*, 1987), l'activité fibrolytique des micro-organismes présents dans les sachets est supérieure à ce seuil, de telle sorte que la sous estimation de la digestion par la méthode des sachets ne peut s'expliquer par un potentiel d'activité microbienne plus faible dans les sachets.

Une autre hypothèse avancée concerne le conditionnement des échantillons de fourrage avant incubation. *In vivo*, la mastication permet, par déchirement des tissus, d'augmenter les espaces intercellulaires et donc la surface exposée aux micro-organismes (Pond *et al.*, 1987). Elle

facilite également l'hydratation des parois végétales (Wattiaux *et al.*, 1992), permettant aux micro-organismes de pénétrer à l'intérieur de la cellule par capillarité (Weimer, 1993), ce qui favorise l'accessibilité des constituants pariétaux aux enzymes microbiennes. Dans les sachets, le fourrage est broyé, ce qui permet d'accroître la surface exposée aux micro-organismes (Bowman and Firkins, 1993), mais ne permet pas une hydratation optimale des cellules. L'accessibilité des constituants pariétaux aux enzymes microbiennes est donc moindre dans les sachets que dans le contenu ruminal (Olubobokun *et al.*, 1990). Cette accessibilité plus faible limiterait l'action des enzymes des micro-organismes présents dans le sachet, et serait le principal facteur responsable de la sous-estimation de la vitesse de dégradation par la méthode des sachets. Celle-ci serait fonction du mode de conditionnement des échantillons, mais cet aspect reste mal connu (Michalet-Doreau et Nozière, 1999).

En alimentation des ruminants, aucune méthode de laboratoire n'a encore été proposée pour quantifier la fraction indigestible des parois végétales, qui représente le déterminant principal de la teneur en énergie nette des aliments et des régimes (Jarrige, 1981). Néanmoins, les résultats obtenus par Archimède *et al.*, (2009) et d'autres analyses des données de la littérature (Sauvant *et al.*, 2007) témoignent que la méthode *in situ* permet une bonne évaluation de la fraction pariétale indigestible des régimes. Par ailleurs, Sauvant *et al.*, (2008b) montrent que la dégradabilité *in situ* de la fraction NDF des aliments concentrés et coproduits était étroitement liée à la digestibilité du NDF (Chapoutot *et al.*, 2010).

2.3. Cinétique de dégradation *in sacco* de la matière azotée

La digestibilité *in situ* de la matière azotée des espèces étudiées est résumée dans le tableau 14. La solubilisation des MAT est une étape essentielle de dégradation dans le rumen ; elle conditionne le flux d'azote microbien entrant dans le duodenum si la teneur en énergie fermentescible de l'aliment ne limite pas la synthèse des protéines microbiennes (Makkar *et al.*, 2007). La solubilité représentée par la digestibilité au temps T=0 (Washing loss), montre que la valeur la plus élevée est observée chez *A.horida*, elle est en moyenne de 55,3%. Quant aux taux les plus faibles sont observés chez *P.granatum* avec une valeur moyenne de 23,9% (p<0,05). Pour les digestibilités à 96 h, nous constatons que le résultat le plus marquant est l'égalité de la digestibilité entre quatre fourrages, en l'occurrence, *A.herba alba*, *V.faba*, *A.halimus* et *P.granatum* (p = 0,05).

Tableau 14 : Cinétique de la dégradation *in sacco* de la matière azotée

Espèce	<i>A. herba alba</i>	<i>Atriplex halimus</i>	<i>Acacia nilotica</i>	<i>Acacia horrida</i>	<i>Acacia saligna</i>	<i>Acacia albida</i>	<i>Albizia julibrissin</i>	<i>Vicia faba</i>	<i>Pinuca granatum</i>	SEM
0 H	0,308 ^{de}	0,284 ^e	0,413 ^b	0,553 ^a	0,329 ^d	0,369 ^c	0,297 ^{de}	0,312 ^{de}	0,239 ^f	0,0172
24 H	0,526 ^c	0,586 ^{bc}	0,638 ^b	0,588 ^b	0,586 ^{bc}	0,718 ^b	0,436 ^d	0,444 ^d	0,737 ^a	0,0178
96 H	0,896 ^a	0,859 ^a	0,761 ^b	0,739 ^b	0,677 ^c	0,751 ^b	0,722 ^{bc}	0,875 ^a	0,859 ^a	0,0149

0H, 24H, 96H : Temps d'incubation ; ^{a, b, c, d, e, f, g} moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distincts (P < 0,05). S.E.M.: erreur standard des moyennes.

Dans la plupart des systèmes d'évaluation de la valeur azotée des aliments, il est nécessaire de pouvoir apprécier la quantité de protéines alimentaires qui échappe à la dégradation microbienne dans le rumen (Michalet-Doreau and Nozière, 1999). Les systèmes d'évaluation de la valeur azotée des aliments reposent actuellement sur l'estimation de deux fractions d'acides aminés réellement absorbés dans l'intestin grêle: une fraction alimentaire et une fraction microbienne. Or la quantité d'acides aminés d'origine alimentaire absorbée dépend d'abord de la teneur en matières azotées du fourrage et de leur dégradabilité dans le rumen. La mesure directe de l'azote alimentaire dégradé dans le rumen est lourde, car elle nécessite la mesure des flux d'azote total et microbien au niveau du duodénum (Aufrère *et al.*, 2001).

D'une manière générale, il est implicitement admis dans la technique des sachets que les constituants azotés qui quittent le sachet sont immédiatement dégradés dans le rumen et ne participent donc pas à la fourniture d'acides aminés d'origine alimentaire, et que la quantité d'azote qui reste dans le sachet correspond à la fraction azotée alimentaire non dégradée. Or certains peptides ou protéines solubles subsistent dans le milieu d'incubation (Aufrère *et al.*, 2012) et s'accumuleraient temporairement dans le rumen (Williams et Cockburn, 1991). Cette hypothèse est confirmée par les études menées par Rémond *et al.*, (1997) sur le pois, dans lesquelles une quantité non négligeable d'azote soluble non ammoniacal transite avec la phase liquide du rumen et contribue à augmenter le flux d'azote alimentaire au niveau duodénal de 30 %. Quant à la MS présente dans le sachet après incubation, elle a essentiellement pour origine l'aliment, mais une proportion variable est d'origine microbienne (Ould-Bah *et al.*, 1989, Beckers, 1998 ; Wanderley *et al.*, 1999).

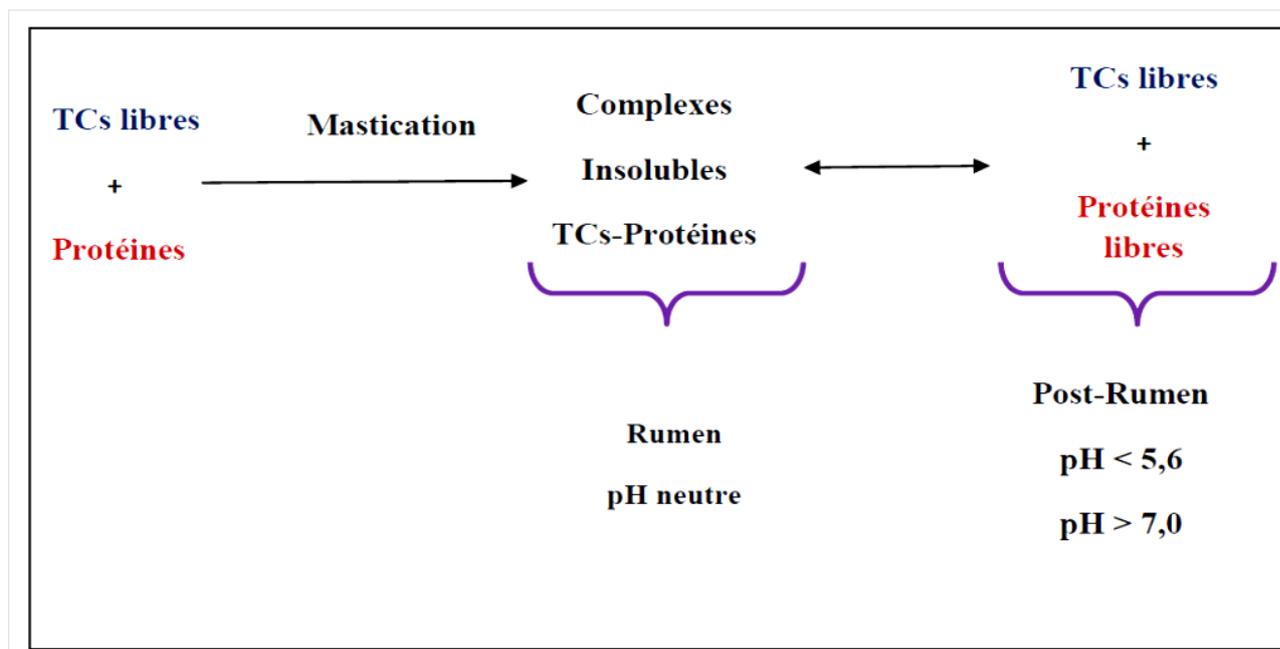


Figure 26 : Schéma représentant la complexation/dissociation des tannins condensés (TCs) avec les protéines alimentaires (Butter *et al.*, 1999).

Ces phénomènes ont notamment été décrits chez des ruminants consommant des légumineuses fourragères (Theodorou *et al.*, 1999). L'une des conséquences principales est la réduction de production de méthane et d'ammoniaque (Mc Nabb *et al.*, 1993; Theodorou *et al.*, 1999; Hess *et al.*, 2006a; Hess *et al.*, 2006b; Animut *et al.*, 2008). La protection des protéines alimentaires dans le rumen induit une augmentation du flux de protéines assimilables au niveau de l'intestin et par conséquent, une absorption accrue en acides aminés (Mc Nabb *et al.*, 1993; Barry et Mc Nabb, 1999; Theodorou *et al.*, 1999; Makkar, 2003; Min *et al.*, 2003; Waghorn, 2008).

Selon Butter *et al.*, (1999), le pH acide de l'abomasum induit une dissociation des complexes Tanins Condensés-protéines et la libération des protéines et des acides aminés permettant ainsi leur digestion et leur absorption au niveau intestinal (Zimmer et Cordesse, 1996; Butter *et al.*, 1999; Mc Sweeney *et al.*, 2001; Mc Sweeney *et al.*, 2008; Waghorn, 2008). Une augmentation de 50% du flux d'azote post-ruminal est mesurée chez des ovins consommant du lotier corniculé, riche en Tanins Condensés, par rapport aux animaux témoins (Waghorn *et al.*, 1987).

Des études un peu récentes montrent que la distribution de feuillage, contenant des teneurs en Tanins Condensés inférieures à 3% de la MS, n'a pas eu d'incidence sur l'ingestion volontaire de la ration chez des caprins (Alonso-Diaz *et al.*, 2008c), des ovins (Alonso-Diaz *et al.*, 2008a) ou des bovins (Sandoval- Castro *et al.*, 2005).

3- Fermentations et production de gaz *in vitro*

3.1. Production de Gaz à 144 heures

Les résultats de la fermentation et la production de gaz *in vitro* durant 144 heures des différents substrats analysés sont rapportés dans le tableau 15. Les profils fermentaires sont significativement différents ($p < 0,05$). Aux termes des 144 heures *V.faba* s'est montrée la plus productive en gaz avec 235,9 ml / g MS, suivie par *P.granatum* avec 206,3 ml / g MS. La performance la plus faible est enregistrée chez *A.albida* avec 76,7 ml / g MS.

Il faut rappeler que la méthode production de gaz *in vitro* de Menke *et al.*, (1979) est aujourd'hui largement utilisée pour estimer la digestibilité et l'énergie métabolisable des aliments pour les ruminants (Menke et Steingass, 1988 ; Getachev *et al.*, 2004).

Tableau 15: Production de gaz cumulative en (ml/g MS) des fourrages étudiés.

Espèce	<i>A. herba alba</i>	<i>Atriplex halimus</i>	<i>Acacia nilotica</i>	<i>Acacia horrida</i>	<i>Acacia saligna</i>	<i>Acacia albida</i>	<i>Albizia julibrissin</i>	<i>Vicia faba</i>	<i>Pinuca granatum</i>	SEM
3h	23,7 ^{bc}	9,9 ^d	16,5 ^{cd}	11,4 ^d	16,2 ^{cd}	15,1 ^{cd}	19,2 ^{bcd}	46,2 ^a	28,5 ^b	1,57
6h	44,6 ^{bc}	23,2 ^e	34,2 ^{cde}	28,1 ^{de}	31,0 ^{cde}	27,9 ^{de}	39,1 ^{bcd}	93,7 ^a	51,3 ^b	2,94
9h	62,2 ^{bc}	37,8 ^e	48,4 ^{cde}	50,8 ^{cde}	42,1 ^{de}	37,5 ^e	56,7 ^{bcd}	131,3 ^a	68,1 ^b	3,88
12h	76,1 ^b	52,2 ^d	57,8 ^{cd}	72,3 ^{bc}	49,3 ^d	42,4 ^d	72,2 ^{bc}	157,3 ^a	84,2 ^b	4,56
16h	92,7 ^b	71,8 ^c	68,5 ^c	93,4 ^b	56,4 ^{cd}	47,0 ^d	91,4 ^b	175,8 ^a	99,2 ^b	4,97
21h	113,3 ^b	93,8 ^{cd}	80,4 ^{de}	113,8 ^b	63,7 ^{ef}	51,3 ^f	112,0 ^{bc}	187,8 ^a	115,6 ^b	5,27
26h	131,8 ^b	117,2 ^b	94,1 ^c	131,0 ^b	73,0 ^d	54,8 ^d	128,2 ^b	197,8 ^a	136,3 ^b	5,53
31h	142,4 ^b	131,7 ^b	104,7 ^c	143,0 ^b	81,5 ^d	57,3 ^e	138,1 ^b	204,3 ^a	148,4 ^b	5,67
36h	150,1 ^b	141,2 ^b	113,6 ^c	151,9 ^b	88,2 ^d	59,1 ^e	144,6 ^b	209,0 ^a	158,3 ^b	5,77
48h	160,8 ^{bc}	155,0 ^{bc}	129,3 ^d	165,2 ^{bc}	100,8 ^e	63,5 ^f	154,5 ^c	216,9 ^a	173,3 ^b	5,86
72h	172,7 ^{cd}	174,9 ^{bcd}	146,3 ^e	184,2 ^{bc}	119,5 ^f	69,7 ^g	166,7 ^d	226,9 ^a	190,2 ^b	5,97
96h	177,9 ^c	185,4 ^{bc}	156,0 ^d	195,1 ^b	130,1 ^e	73,1 ^f	173,3 ^c	232,1 ^a	198,5 ^b	6,03
120h	180,0 ^c	190,8 ^{bc}	163,4 ^d	202,2 ^b	137,4 ^e	75,2 ^f	177,5 ^{cd}	234,7 ^a	203,2 ^b	6,04
144h	181,3 ^{cd}	194,4 ^{bc}	168,9 ^d	206,3 ^b	141,9 ^e	76,7 ^f	180,2 ^{cd}	235,9 ^a	206,3 ^b	6,03

^{a, b, c, d, e, f} moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distincts ($P < 0,05$).

S.E.M: erreur standard des moyennes.

Cette méthode permet d'évaluer rapidement la valeur nutritive des aliments et de mettre en évidence la présence d'éléments ayant des propriétés anti-nutritionnelles dans leur composition (Sandoval-Castro *et al.*, 2003). Elle simule le processus de fermentation des aliments dans le rumen à partir duquel les gaz CO₂ et NH₄ sont produits.

La production de gaz "in vitro" des espèces étudiées évolue progressivement juste après l'incubation de la même façon, suivant une allure ascendante pour atteindre un pic vers 120 h d'incubation pour la plupart des échantillons (figure 27). Le profil de fermentation des substrats s'allonge jusqu'à 120 heures pour se stabiliser. Ce profil est justement caractéristique des fourrages fibreux qui manifestent un temps de latence plus ou moins élevé et passent une période de séjour longue dans le rumen (Chermiti, 1997).

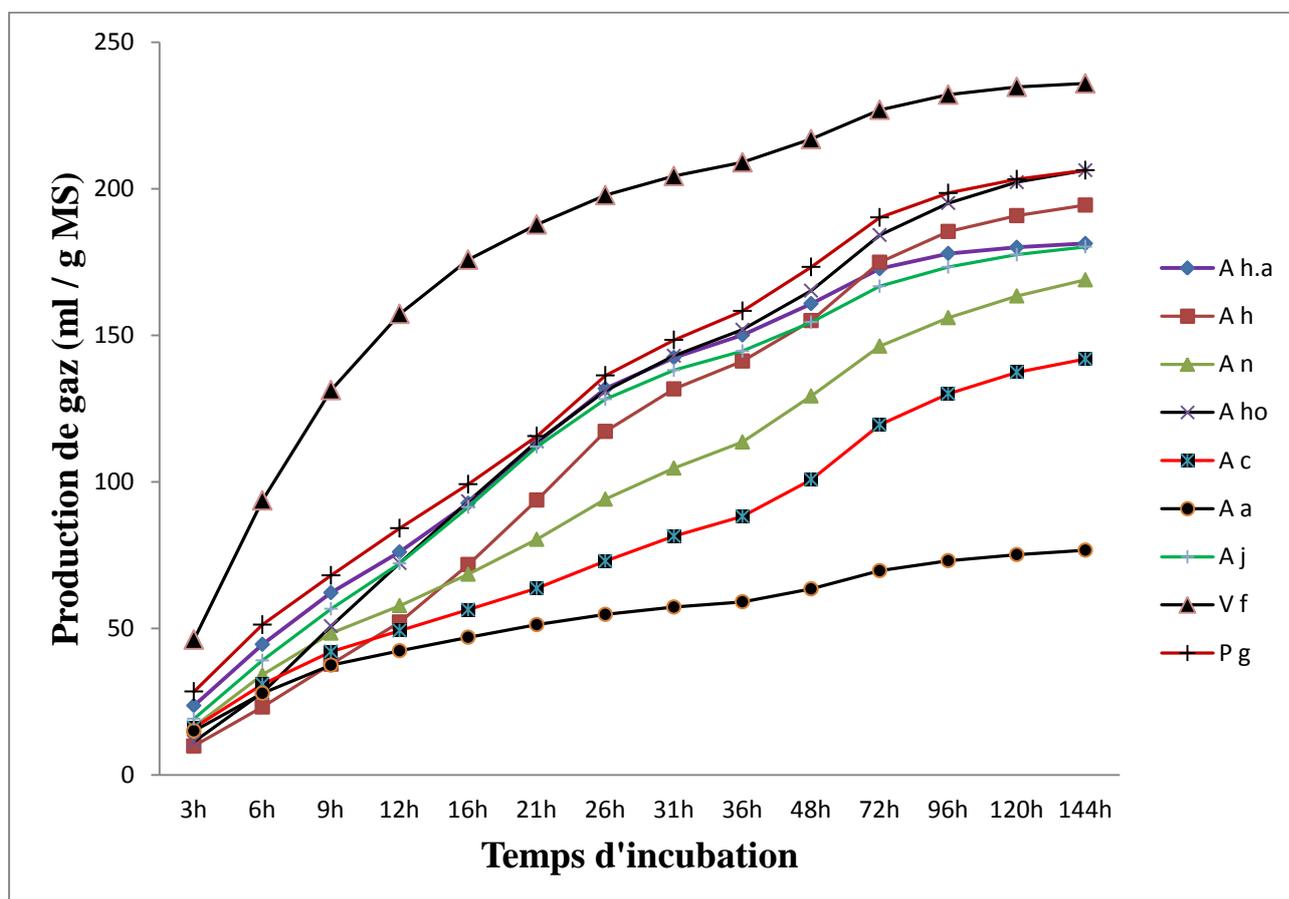


Figure 27: Cinétique de production de gaz (ml / g MS) des fourrages collectés.

A h.a : *A herba alba* ; A h: *A.halimus*; A n: *A.nilotica*; A ho:*A.horrida*;

A c:*A.cyanophylla*; A a: *A.albida*; A j: *A.julibrissin*; Vf: *Vicia faba*; Pg:*P.granatum*

Pour qu'il y ait production de gaz il faut un substrat fermentescible et des microorganismes capables de le dégrader. La faible production de gaz chez *A.albida*, *A.cyanophylla*, et *A.nilotica* pourrait être due, d'une part à l'incapacité du microbiote ruminal à se développer et, d'autre part, de l'existence de substances anti-nutritionnelles qui inhiberaient la croissance bactérienne. C'est le cas, le fait que les feuilles de la légumineuse *Vicia faba* soit plus fermentescible que les autres légumineuses arbustives s'expliquerait par l'adaptation progressive des microorganismes à des substances inhibitrices à des doses assez faibles. Il faut rappeler que *V.faba* est une légumineuse cultivée avec la concentration la plus faible en Tannins Condensés (59,4 g / kg MS) (Voir la composition chimique plus haut) parmi tous les substrats étudiés. Cette faculté d'adaptation est observée par bon nombre d'auteurs sur différentes espèces fourragères, notamment les légumineuses, contenant des facteurs anti-nutritionnelles tels que les tannins (Topps, 1998).

Une production de gaz basse indique une faible dégradabilité. Mais il est important de remarquer que certains fourrages riches en CP, le cas échéant chez les Acacias de notre étude, peuvent produire moins de gaz pendant la fermentation, malgré un degré de dégradabilité élevé (Cone et Van Gelder, 1999). Par conséquent, le faible niveau de G144 (Voir Tableau 18) enregistré chez *A.albida* pourrait être dû à leur teneur élevée en CP. La même observation est soulignée dans plusieurs résultats dont ceux de Kumara Mahipala *et al.* (2009) avec *A. saligna* (syn. *Acacia cyanophylla* Lindl.). Pour le feuillage de *A. nilotica*, *A.horrída*, *A. cyanophylla* et *P.granatum*, où les composés phénoliques totaux forment une proportion appréciable de la matière sèche, une surestimation des digestibilités *in vitro* (IVD) peut être observée. Ce résultat est en accord avec celui rapporté par Mlambo *et al.*, (2008), avec *Acacia nilotica*, *Acacia erubescens*, *Acacia sieberiana* et *Acacia.erioloba*. A l'inverse le feuillage de *V.faba*, *A. halimus* et *P. granatum* présente des valeurs de digestibilités plus élevées avec de faibles concentrations des Tannins Condensés Totaux (TCT).

Les valeurs élevées des différentes cinétiques de dégradation (MS, NDF, MAT) de *P.granatum* sont confirmées par la technique de production de gaz. Ceci peut être expliqué par le fait que cet arbre (le grenadier) est très adapté aux climats des zones arides et semi-arides, connu pour sa richesse en tanins hydrolysables (HTs), en particulier dans les fruits et un peu moins dans les feuilles (Hussein *et al.*, 1997). Beaucoup de composés phénoliques, surtout les tannins hydrolysables sont solubles dans l'eau et par conséquent seront solubilisés et perdus dans un système de dégradation *in situ* plutôt que dégradé par la microflore (Mueller-Harvey, 2006).

Les Tannins hydrolysables (HTs), contrairement aux Tannins Condensés, sont partiellement dégradés dans le tractus gastro-intestinal et plusieurs précurseurs peuvent être tirés dont le glucose et des composés phénoliques qui peuvent être absorbés à partir du tractus gastro-intestinal, entraînant des intoxications aux animaux (Waghorn *et al.*, 1999; Makkar 2002). Cependant, la plupart des chercheurs s'accordent à dire que les Tannins Condensés ne sont pas dégradés dans l'intestin des animaux et donc ne sont pas toxiques (Makkar *et al.*, 1995; Makkar, 2000). Ben Salem (2005) fait également état d'une corrélation négative entre les composés secondaires, la production de gaz *in vitro* et la digestibilité de la matière sèche de *Acacia saligna* en utilisant un inoculum d'ovins. Malgré la teneur en protéines, la propriété anti-nutritive des tanins peut donc réduire la valeur du fourrage et rendre ces plantes presque inutilisables pour l'alimentation animale (Hess *et al.*, 2006b).

3.2. Cinétique de production de gaz et digestibilité à 144 heures

Les paramètres cinétiques de production de gaz et la digestibilité à 144 heures sont présentés dans le tableau 16. Les résultats sont significativement différents ($p < 0,05$).

Tableau 16: Paramètres cinétiques de la fermentation des fourrages étudiés

Plant species	A (ml/g)	c (/h)	L (h)	G24 (ml/g)	D144 (g/g MS)	ED (%)	VM (ml/g/h)
<i>Artemisia herba-alba</i>	177,7 ^{cd}	0,0500 ^{bc}	0,79 ^{bc}	123,7 ^{bc}	0,734 ^b	46,3 ^c	6,20 ^b
<i>Atriplex halimus</i>	192,8 ^{bc}	0,0384 ^c	2,95 ^a	106,4 ^{cd}	0,840 ^a	44,2 ^c	4,59 ^{bcde}
<i>Acacia nilotica</i>	165,9 ^d	0,0333 ^c	0,05 ^c	90,5 ^{de}	0,553 ^d	33,4 ^d	3,97 ^{cde}
<i>Acacia horrida</i>	200,9 ^b	0,0425 ^c	1,88 ^{ab}	121,9 ^{bc}	0,700 ^c	42,4 ^c	5,56 ^{bcd}
<i>Acacia cyanophylla</i>	136,9 ^e	0,0313 ^c	0,00 ^c	71,7 ^{ef}	0,361 ^f	25,9 ^e	3,07 ^e
<i>Acacia albida</i>	71,6 ^f	0,0690 ^{ab}	0,00 ^c	56,2 ^f	0,484 ^e	43,1 ^c	3,55 ^{de}
<i>Albizia julibrissin</i>	188,6 ^{bc}	0,0431 ^c	0,00 ^c	124,3 ^{bc}	0,704 ^c	48,1 ^{bc}	6,05 ^{bc}
<i>Vicia Faba</i>	226,7 ^a	0,0919 ^a	0,26 ^c	200,6 ^a	0,853 ^a	68,5 ^a	14,56 ^a
<i>Pinuca granatum</i>	202,7 ^b	0,0429 ^c	0,05 ^c	130,0 ^b	0,862 ^a	52,2 ^b	6,26 ^b
<i>S.E.M</i>	8,59	0,0038	0,215	7,74	0,023	2,27	0,65

A: asymptotique de production de gaz, c: vitesse de fermentation; L :temps de latence, G24: Production de Gaz à 24 h d'incubation ; D144 : Digestibilité à 144 h, ED: Dégradation théorique pour une vitesse moyenne de 0,03 h⁻¹; VM : vitesse moyenne, ^{a, b, c, d, e, f} moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distincts ($P < 0,05$). S.E.M.: erreur standard des moyennes.

Les plantes les plus fermentescibles sont les mêmes déjà citées plus haut, en l'occurrence la légumineuse *V.faba* suivie par *P.granatum* et *A.halimus*. Les acacias représentés par *A.cyanophylla*, surtout, enregistre les plus faibles paramètres. Pour la production de gaz à 24 heures (G24), par exemple, la valeur la plus élevée s'observe chez *V.faba* (200,6 ml/g MS) et la plus faible chez *A.cyanophylla* (71,7 ml/g MS). *V.faba* est la plus rapidement fermentée ($0,0919 \text{ h}^{-1}$), elle est suivie de *A. albida* ($0,0690 \text{ h}^{-1}$), alors que *A. nilotica* et *A.cyanophylla* enregistrent la vitesse de fermentation la plus faible ($0,0333 \text{ h}^{-1}$; $0,0313 \text{ h}^{-1}$, respectivement).

Les mêmes tendances mentionnées lors des études sur les digestibilités *in vitro* et *in situ* sont corroborées par les analyses des paramètres cinétiques de production de gaz. La méthode de production de gaz *in vitro* s'est révélée être un outil fiable pour l'évaluation des aliments parce que la production de gaz est bien corrélée avec la synthèse des protéines microbiennes (Krishnamoorthy *et al.*, 1999), la digestibilité *in vivo* (Khazaal *et al.*, 1993) et la digestibilité *in vitro* (Ammar, 2002). La digestibilité *in vitro* pendant 144 heures est estimée par le potentiel de disparition de la matière sèche (D144, g/g MS). Ce potentiel est déterminé en utilisant la procédure ANKOM-DAISY décrite par Ammar *et al.*, 1999 (Voir chapitre Matériel et méthode). Le potentiel le plus faible est observé chez *A.cyanophylla* avec une valeur de 0,361 g/g MS. Talonnée de près par *A. albida* (0,484 g/g MS). Le potentiel des trois acacias ne dépasse guère le seuil de 60% de disparition de la matière sèche, ce qui représente une mauvaise performance (Makkar, 2000).

3.3. Effet de la composition chimique sur la production de gaz

Les corrélations entre les volumes de gaz produits et la composition chimique des substrats étudiés sont montrées dans le tableau 17. Seule la fraction ADL est significativement et négativement corrélée à la production de gaz au delà du temps d'incubation de 16 heures ($p < 0,05$). Ceci signifie que cette fraction n'est atteinte par le processus de dégradation qu'à partir de ce stade de fermentation. Le coefficient de corrélation reste relativement stable jusqu'au terme du processus de fermentation, 144 heures, ce qui suggérerait que le taux de dégradation de cette fraction reste inchangé. En effet la fraction ADL est reconnue comme étant un rempart indigestible pour toute la microflore ruminal.

Les corrélations existantes entre les paramètres cinétiques de production de gaz *in vitro* et la composition chimique et phénolique des fourrages étudiés sont résumées dans le tableau 18. Les résultats saillants montrent que les paramètres G24, D144 et ED sont négativement corrélés avec la fraction ADL et NDF qui sont respectivement, $r = -0,86$ ($p < 0,0001$), $r = -0,79$ ($p < 0,001$), $r = 0,80$ ($p < 0,0001$) pour l'ADL et $r = -0,61$ ($p < 0,05$), $r = -0,66$ ($p < 0,05$), $r = -0,63$ ($p < 0,05$) pour les NDF.

Pour les TCT nous notons aussi une corrélation négative mais avec seulement la D144 et la ED, $r = -0,6$ ($p < 0,01$) et $r = -0,64$ ($p < 0,01$), respectivement. La matière azotée totale est, quant à elle, positivement corrélée avec deux paramètres, en l'occurrence le potentiel de production de gaz représenté par l'asymptote A et la vitesse de dégradation c, $r = 0,73$ ($p < 0,01$) et $r = 0,58$ ($p < 0,05$), respectivement. Un taux élevé en protéine brute dans l'alimentation favorise la multiplication microbienne dans le rumen, qui à son tour détermine le degré de fermentation (Njidda and Nasiru, 2010). Ceci est en contradiction avec les résultats obtenus par Khazaal *et al.* (1994a), Longuo *et al.*, (1989) (d'après Boufennara *et al.*, 2012) dont les résultats ne montrent aucune corrélation entre la MAT et la production de gaz *in vitro*.

La concentration des composés phénoliques sont négativement corrélés, et de manière significative à la production de gaz en comparaison de la dégradabilité de la matière sèche *in situ* (Khazaal *et al.*, 1994b). Ben Salem (2005) fait état d'une relation similaire entre la G24 et NDF en utilisant des jus de rumen de moutons, de bovins et de buffles. Des études sur le feuillage d'arbres montrent des résultats similaires aux notre (Peng, 2005; Rakhmani *et al.*, 2005 ; Ben Salem *et al.*, 2006).

Il faut signaler que les différences entre les paramètres cinétiques de production de gaz signifient des différences de la valeur nutritive qui est, généralement, étroitement liée à la composition chimique des fourrages (Kamalak *et al.*, 2005b; Salem, 2005). La valeur élevée du paramètre G24 (Production de gaz à 24 heures), 200,6 ml / g MS, chez *V.faba* renseigne sur la grande activité fermentaire dans les premières 24 heures de fermentation par rapport aux autres substrats. Le phénomène contraire est observé chez les autres plantes, en particulier *A.albida* avec un G24 de 56,2 ml / g MS. Les différences dans la production de gaz pourraient être dues, aussi, à la proportion et à la nature, des fibres (Rubanza *et al.*, 2003). En effet les niveaux élevés en fibres et en composés secondaires chez *A.albida*, *A.cyanophylla* et *A.nilotica* sont certainement responsables de leur production de gaz réduite par rapport aux autres espèces. Par conséquent, les différences entre la digestibilité des fourrages peuvent aussi être due à l'étendue de la lignification des NDF (Van Soest, 1994; Fonseca *et al.*, 1998).

La méthode « gas production » est recommandée aussi pour évaluer les actions des facteurs anti-nutritionnelles sur le microbiote ruminal en utilisant des fourrages méditerranéens (Khazaal *et al.*, 1994) et africain, reconnus riches en métabolites secondaires (Siaw *et al.*, 1993; Bonsi *et al.*, 1995b). Cette méthode est le meilleur moyen pour l'étude des interactions des tanins et des saponines et de déterminer leurs effets sur l'efficacité de la synthèse des protéines microbiennes. Il est constaté que les effets de la présence simultanée des tanins et des saponines sur la fermentation dans le rumen sont additifs et pas contradictoires (Makkar *et al.*, 1995a). Longland *et al.*, (1995)

fait état d'une relation inverse, significative, entre l'accumulation de gaz à différents moments de l'incubation et des tanins contenu dans un échantillons d'aliments pour animaux.

Tableau 17: Coefficients de corrélation entre la production de gaz et la composition chimique des fourrages collectés.

	G3h	G6h	G9h	G12h	G16h	G21h	G26h	G31h	G36h	G48h	G72h	G96h	G120h	G144h
MS	-0,06ns	-0,15ns	-0,23ns	-0,28ns	-0,35ns	-0,41ns	-0,47 ns	-0,49 ns	-0,51 ns	-0,51 ns	-0,53 ns	-0,54 ns	-0,54 ns	-0,54 ns
OM	-0,06ns	-0,15 ns	-0,22ns	-0,28ns	-0,36ns	-0,42ns	-0,47 ns	-0,49 ns	-0,50 ns	-0,50 ns	-0,53 ns	-0,54 ns	-0,54 ns	-0,54 ns
MAT	-0,23ns	-0,16 ns	-0,12ns	-0,14ns	-0,17ns	-0,24ns	-0,32 ns	-0,36 ns	-0,38 ns	-0,40 ns	-0,42 ns	-0,43 ns	-0,42 ns	-0,41 ns
NDF	-0,60ns	-0,59 ns	-0,54ns	-0,52ns	-0,52ns	-0,52ns	-0,54 ns	-0,54ns	-0,5 ns	-0,53 ns	-0,50 ns	-0,48 ns	-0,4 ns	-0,46 ns
ADF	-0,26ns	-0,33 ns	-0,37ns	-0,43ns	-0,50ns	-0,55ns	-0,60ns	-0,61ns	-0,62ns	-0,62ns	-0,63 ns	-0,63 ns	-0,63 ns	-0,6 ns
ADL	-0,31ns	-0,40 ns	-0,49ns	-0,57ns	-0,66*	-0,73*	-0,77*	-0,78*	-0,78*	-0,77*	-0,76*	-0,75*	-0,74*	-0,73*
PT	0,03 ns	-0,01 ns	-0,07ns	-0,09ns	-0,13ns	-0,16ns	-0,14 ns	-0,12 ns	-0,09 ns	-0,04 ns	0,008ns	0,038ns	0,068ns	0,09ns
TCT	-0,3ns	-0,33 ns	-0,32ns	-0,31 ns	-0,31ns	-0,31ns	-0,31ns	-0,29 ns	-0,28 ns	-0,24 ns	-0,19 ns	-0,16 ns	-0,12 ns	-0,10 ns

G3h : gaz produit à 3 heures ; **ADF**: Acid Detergent Fibre; **ADL**: Acid Detergent Lignin; **MAT** : Matière Azotée Totales; **NDF**: Neutral Detergent Fibre; **OM**: matière organique. **PT** : Phénols Totaux ; **TCT**: Tanins Condensés Totaux. ***< 0,5**, **ns >0,05**.

Tableau 18 : Coefficient de corrélation entre la composition chimique et les paramètres cinétique de la production de gaz

	A	c	G24	D144	ED	MAT	NDF	ADF	ADL	OM	TP	TT	FCT
MAT	0,73 **	0,58 *	0,043 ns	-0,12 ns	-0,002 ns								
NDF	0,51ns	0,08 ns	-0,614 *	-0,658*	-0,631*	0,06 ns							
ADF	0,171ns	-0,28 ns	-0,74 **	-0,66 *	-0,70 **	-0,15 ns	0,7**						
ADL	0,20 ns	-0,21 ns	-0,86*****	-0,79****	-0,80****	-0,16ns	0,64*	0,88*****					
OM	0,3ns	0,12ns	-0,24 ns	-0,23ns	-0,20ns	-0,1 ns	0,2ns	0,4ns	0,3 ns				
TP	-0,25ns	0,13ns	0,13ns	0,3ns	0,34ns	-0,50ns	-0,33ns	-0,09ns	-0,01ns	0,43ns			
TT	-0,26ns	0,12ns	0,12ns	0,27ns	0,33ns	-0,51ns	-0,32ns	-0,09ns	0,001ns	0,43ns	0,99*****		
FCT	0,02ns	-0,15ns	-0,20ns	-0,48ns	-0,47ns	0,11ns	0,16ns	0,26ns	0,32ns	-0,13ns	-0,17ns	-0,18ns	
TCT	0,18 ns	0,14 ns	-0,43 ns	-0,6 **	-0,64**	0,15 ns	0,32 ns	0,34 ns	0,34 ns	0,18ns	-0,001ns	-0,003ns	0,70**

A: asymptotique de production de gaz ; **c**: vitesse de fermentation; **G24**: Production de Gaz à 24 h d'incubation ; **D144** : Digestibilité à 144 h, **ED**: Dégradation théorique pour une vitesse moyenne de 0,03 h⁻¹; **ADF**: Acid Detergent Fibre; **ADL**: Acid Detergent Lignin; **MAT** : Matière Azotée Totales; **NDF**: Neutral Detergent Fibre; **OM**: matière organique. **TP** : Phénols Totaux ; **TT** : Tanins Totaux, **FCT**: Tanins Condensés Libres ; **TCT**: Tanins Condensés Totaux.

*<0,5, **<0,01, ***<0,001, ****<0,0001, ns>0,05.

4- Etude de l'effet des Tanins sur la digestibilité

4.1. Effet du PEG sur la digestibilité réelle de la matière sèche

Les effets du PEG sur la digestibilité Apparente (AIVD) et la digestibilité réelle (TIVD) sont résumés dans le tableau 19. Le PolyEthylène Glycol (PEG) se combinant aux TC supprime leurs effets, sans affecter les enzymes microbiennes et digestives (Jones et Mangan, 1977, Barry et Manley 1986). Ce qui permet d'étudier l'effet des TC sur les paramètres digestifs et nutritionnels par rapport au même fourrage étudié sans ajout de PEG. De prime abord, nous remarquons que les digestibilités des fourrages (AIVD et TIVD) sont significativement différentes ($p < 0,05$). Une comparaison entre ces digestibilités, sans PEG et avec PEG, de chaque fourrage pris deux à deux, montre que l'effet significatif du PEG ($p < 0,05$) n'est observé que chez *Acacia nilotica*. La digestibilité apparente ainsi que la digestibilité réelle de cette espèce en présence et en absence de PEG sont respectivement 0,350 -0,505 (g/g MS) et 0,584-0,686 (g/g MS). L'effet conjugué du facteur fourrage et du facteur PEG sur la AIVD n'est pas significatif ($p < 0,01$). Quant aux résultats de la production de gaz nous notons que l'effet du PEG sur le volume de gaz produit après six heures d'incubations n'est pas significatif à $p = 0,01$. Dans la même lecture, nous enregistrons, aussi, un effet d'interaction non significatif entre le PEG et le substrat (Espèce*PEG) ($p > 0,05$). Par contre, nous remarquons des différences significatives ($p < 0,05$) dans la production de gaz en présence et en absences de PEG pour deux acacias, seulement, *Acacia nilotica* et *Acacia cyanophylla*. Les effets espèce et les effets d'interaction sont tous significatifs ($p < 0,0001$).

A l'exception des feuilles de *A.nilotica*, l'addition du PEG n'a exercé aucun effet significatif ($p < 0,05$) sur la digestibilité de la matière sèche, AIVD et/ou TIVD. D'après Makkar *et al.*, 1995, la réaction entre le PEG et les tanins dans les échantillons de feuilles riches en tanins diminue globalement la digestibilité *in vitro* de la MS. Les tanins et le PEG forment des complexes non digestibles qui ne peuvent être dégradés par les microorganismes du rumen. De ce fait, l'inclusion de PEG dans les mélanges d'incubation contenant des fourrages riches en tanins est susceptible d'entraîner une sous-estimation dans la digestibilité de la matière sèche (McSweeney *et al.*, 1999. Palmer et Jones, 2000).

4.2. Effet du PEG sur la cinétique de production de gaz

Les résultats de l'effet du PEG sur la production de gaz sont résumés dans le tableau 19. L'effet significatif ($p < 0,05$) du PEG n'est observé que chez deux espèces, seulement, *A.cyanophylla* et *A.nilotica* (figure 28). Cet effet n'est perceptible qu'à partir de 12 heures d'incubation. Pour la

première mesure effectuée après 6 heures d'incubation nous ne notons aucun effet significatif ($p < 0,05$). Les paramètres cinétiques de production de gaz, en présence et en absence de PEG, après 48 heures d'incubation sont présentés dans le tableau 20. Les différences entre les espèces analysées sont significatives ($p < 0,05$). Pour les comparaisons intra espèce, en présence et en absence de PEG, des paramètres cinétiques de production de gaz, A et c (tableau 20), nous obtenons des différences significatives dues à l'effet du PEG chez trois espèces d'acacia seulement, *A.nilotica*, *A.cyanophylla* et *A.albida*. L'effet du PEG sur l'asymptote de production de gaz (A) et la vitesse de fermentation (c) est significatif ($p < 0,05$). Les valeurs obtenues, respectives, en présence et en absence de PEG chez *A.albida* et *A.cyanophylla*, pour le premier paramètre cité, sont de (52,50-112,25 ml / g MS) et (86,78-157,57 ml / g MS), et chez *A.albida* et *A.nilotica* avec des paires de vitesses (0,057- 0,0363 h⁻¹) et (0,068-0,0243 h⁻¹). Quant à la digestibilité effective, l'effet du PEG est perceptible ($p < 0,05$) chez le même trio d'espèce représenté par *A.nilotica*, *A.cyanophylla* et *A.albida* (voir Tableau 19).

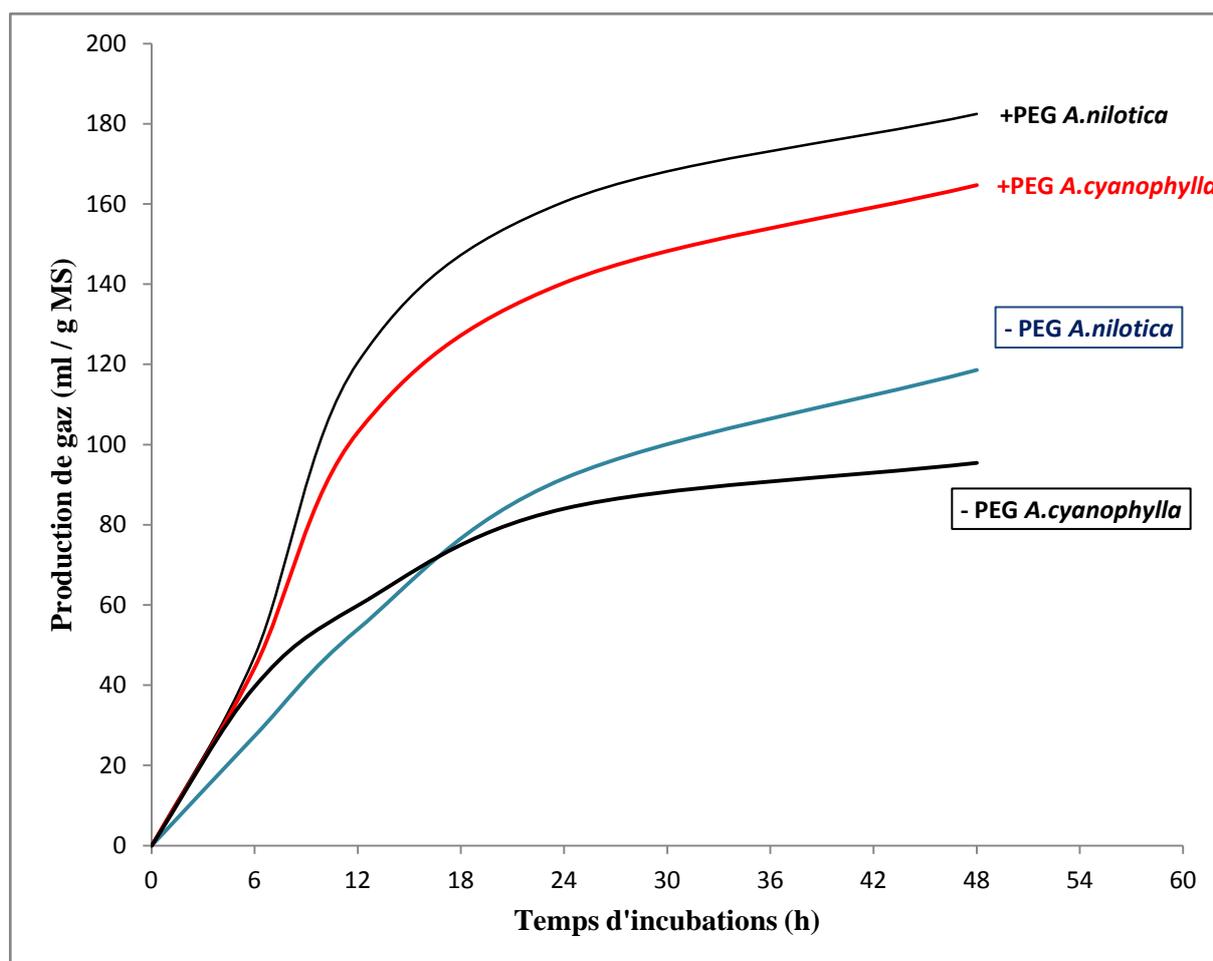


Figure 28 : Effet du Polyéthylène Glycol sur la production de gaz chez *A.nilotica* et *A.cyanophylla*

Ces résultats rejoignent ceux rapportés par plusieurs auteurs dont celles de Makkar *et al.*, (1995); Abdulrazak *et al.*, (2000); Mlambo *et al.*, (2005). À l'exception, de *A.horrida* et *A.julibrissin* où le PEG n'a pas eu d'influence significative sur le volume de gaz produit et les paramètres cinétiques ce qui ne coïncide pas avec les concentrations relativement élevées en Tanins Condensés. Ceci serait dû au fait que l'effet de l'addition du PEG dépend non seulement de la quantité mais aussi du type des tanins présents dans ces espèces arbustives. En ce qui concerne la vitesse de production de gaz (c), l'ajout du PEG a modifié la vitesse de fermentation de certains substrats incubés, surtout les échantillons riches en tanins condensés, ce qui corrobore les résultats des travaux avancés par Getachew *et al.*, (2000) et Seresinhe et Iben (2003).

La technique de production de gaz *in vitro* (Menke *et al.*, 1979; Theodorou *et al.*, 1994; Mauricio *et al.*, 1999; Schofield, 2000) couplée à l'utilisation de PEG semble avoir un potentiel prometteur pour l'évaluation des effets antinutritionnels liés aux Polyphénols (Ammar *et al.*, 2008). Il est suggéré que la compréhension des relations structure- activité des tanins est particulièrement importante, ce qui nécessite le développement de nouvelles méthodes de quantification qui se rapportent aux structures chimiques et à leur activité biologique.

La production de gaz est essentiellement le résultat de la fermentation des hydrates de carbone en acétate, propionate et butyrate (Grings *et al.*, 2005,). La production de gaz issue de fermentation des protéines est relativement faible par rapport aux fermentations glucidiques (Wolin, 1960). La contribution des lipides dans le volume de gaz produit est négligeable (Getachew *et al.*, 1998).

Les tanins en excès par rapport à la quantité liée aux protéines peuvent inhiber certaines enzymes, microbiennes ou digestives (Barry et Forss, 1983) et diminuer la vitesse et l'importance de la dégradation des parois dans le rumen et par conséquent la production de gaz.

La digestion potentielle ou théorique (ED) des glucides semble être non affectée par les tanins (Amlan et Saxena, 2010). Une étude sur le lotier (*L.pedunculatus*) montre que de fortes concentrations en TCs (95 et 100,6 g /kg de MS) réduisent la digestion ruminale des glucides rapidement fermentescibles et de l'hémicellulose, mais cela est contrebalancé par l'augmentation de la digestion post-ruminal (Barry et Manley, 1984; Barry *et al.*, 1986). La digestion des glucides chez les moutons nourris de *L.corniculatus* contenant 25-35 g /kg MS, de tanins condensés n'est pas affectée par les tanins (Waghorn *et al.*, 1987).

Dans une étude chez les ovins, Tiemann *et al.*, (2008) rapporte que le remplacement d'une légumineuse *Vigna unguiculata* (sans tanin) avec *C.calothyrsus* et *F. macrophylla* (plantes riches en

tanins) déprime la digestibilité de la matière organique et des fibres. Les fortes concentrations en tanins présentes dans *Terminalia chebula* diminuent aussi la dégradabilité *in vitro* (Patra *et al.*, 2008). Cependant, lorsque *T.chebuala* est donnée aux moutons avec un apport de 10 g /kg MS, la digestibilité ruminale des fractions glucidiques et fibreuses augmente (Patra *et al.*, 2008). Ceci pourrait être attribué à l'augmentation du nombre de la flore bactérienne fibrolytique dans le rumen. Les tanins, à des concentrations élevées dans les régimes alimentaires, qui restent libres après liaison aux protéines, peuvent déprimer la digestion des fibres par complexation avec la lignocellulose empêchant ainsi la digestion microbienne (Barry et Manley, 1984). En inhibant directement les enzymes des bactéries cellulolytiques et les activités fibrolytiques (Bae *et al.*, 1993).

Bien que la nature de la liaison chimique avec les hydrates de carbone ne soit pas encore déterminée clairement, il est indiqué que cette liaison est relativement indépendante du pH, et est influencée par le type de tanins (Poids Moléculaire, flexibilité et la solubilité dans l'eau) présent dans le fourrage (Seigler, 2009).

Tableau 19: Effet du PEG sur la digestibilité (apparente et réelle) et la production de gaz après 48 h d'incubation des fourrages collectés

	Digestibilité 48h (g/g MS)				Production de gaz (ml/g MS)							
	AIVD		TIVD		6h		12h		24h		48h	
	-PEG	+PEG	-PEG	+PEG	-PEG	+PEG	-PEG	+PEG	-PEG	+PEG	-PEG	+PEG
<i>A. h . alba</i>	0,456 ^d	0,479 ^d	0,604 ^{de}	0,604 ^{ef}	35,94 ^{bc}	20,83 ^{bc}	72,84 ^{cd}	77,49 ^{cd}	125,64 ^b	131,80 ^b	151,56 ^b	152,88 ^b
<i>A. halimus</i>	0,663 ^{ab}	0,691 ^{ab}	0,836 ^{ab}	0,855 ^a	27,39 ^{bc}	8,11 ^c	68,11 ^{cd}	64,84 ^d	127,26 ^b	126,02 ^b	167,20 ^b	168,47 ^b
<i>A. nilotica</i>	0,350 ^{ef} _x	0,505 ^{cd} _y	0,584 ^e _x	0,686 ^{cd} _y	27,38 ^{bc}	47,28 ^{ab}	53,98 ^{de} _x	120,57 ^b _y	91,57 ^c _x	160,54 ^b _y	118,58 ^b _x	182,45 ^b _y
<i>A. horrida</i>	0,589 ^{bc}	0,594 ^{bc}	0,746 ^c	0,753 ^{bc}	54,65 ^b	33,27 ^{bc}	101,93 ^b	116,78 ^b	147,17 ^b	160,13 ^b	169,07 ^b	191,90 ^b
<i>A. cyanophylla</i>	0,277 ^f	0,349 ^e	0,527 ^f	0,565 ^f	39,66 ^{bc}	44,44 ^{ab}	59,88 ^{de} _x	103,13 ^{bc} _y	84,00 ^{cd} _x	140,34 ^b _y	95,40 ^b _y	164,71 ^b _x
<i>A. albida</i>	0,440 ^{de}	0,454 ^{de}	0,645 ^d	0,652 ^{de}	19,93 ^c	16,94 ^{bc}	35,71 ^e	51,92 ^d	53,72 ^d	72,98 ^c	58,28 ^c	83,60 ^c
<i>A. julibrissin</i>	0,688 ^a	0,707 ^a	0,738 ^c	0,756 ^{bc}	50,89 ^{bc}	43,14 ^{bc}	92,18 ^{bc}	111,99 ^{bc}	135,02 ^b	159,21 ^b	162,99 ^b	189,67 ^b
<i>A. Faba</i>	0,720 ^a	0,725 ^a	0,873 ^a	0,868 ^a	98,31 ^a	78,81 ^a	167,87 ^a	166,75 ^a	210,24 ^a	211,41 ^a	226,14 ^a	243,29 ^a
<i>A. granatum</i>	0,533 ^{cd}	0,590 ^{bc}	0,799 ^b	0,822 ^{ab}	48,21 ^{bc}	34,75 ^{bc}	93,71 ^{bc}	102,80 ^{bc}	149,71 ^b	155,91 ^b	178,91 ^b	189,39 ^b
SEM	0,0036	0,030	0,028	0,025	6,64	4,33	7,23	6,65	8,54	7,24	9,40	8,28
Effet	p											
Espèce	<,0001		<,0001		<,0001		<,0001		<,0001		<,0001	
PEG	<,0001		<,0005		0,0126		<,0001		<,0001		<,0001	
Espèce*PEG	0,0143		0,0075		0,0667		<,0001		0,0002		0,0009	

AIVD : Apparent In vitro Digestibility ; TIVD : True In vitro Digestibility ; PEG : PolyéthylèneGlycol ; x, y : moyenne dans deux colonnes affectées de lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) ; a, b, c, d, e, f, moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes ($P < 0,05$). S.E.M.: erreur standard des moyennes.

^{x,y} Les moyennes du même fourrage de la même ligne, pour chaque paramètre, suivies de lettres différentes sont significativement différents à $p = 0,05$.

Tableau 20 : Effet du PEG sur les paramètres cinétiques de production de gaz des fourrages étudiés

PEG	G48 (ml/ g MS)		A (ml/ g MS)		c (h ⁻¹)		ED (g / g MS)	
	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Artemisia herba alba</i>	151,56 ^b	152,88 ^b	173,07 ^{bc}	187,07 ^{bc}	0,040 ^{ab}	0,035 ^b	0,223 ^{cde}	0,250 ^{cde}
<i>Atriplex halimus</i>	167,20 ^b	168,47 ^b	242,07 ^a	272,07 ^a	0,018 ^b	0,021 ^b	0,249 ^{cd}	0,234 ^{de}
<i>Acacia nilotica</i>	118,58 ^{b_x}	182,45 ^{b_y}	154,67 ^c	174,23 ^{bc}	0,068 ^{a_y}	0,024 ^{b_x}	0,141 ^{e_x}	0,328 ^{bcd_y}
<i>Acacia horrida</i>	169,07 ^b	191,90 ^b	166,10 ^c	193,10 ^b	0,052 ^{ab}	0,057 ^{ab}	0,359 ^b	0,351 ^{bc}
<i>Acacia cyanophylla</i>	95,40 ^{b_y}	164,71 ^{b_x}	86,78 ^{d_x}	157,57 ^{bc_y}	0,065 ^{ab}	0,055 ^{ab}	0,161 ^{de_x}	0,220 ^{e_y}
<i>Acacia albida</i>	58,28 ^c	83,60 ^c	52,50 ^{d_x}	112,25 ^{c_y}	0,057 ^{ab_y}	0,036 ^{b_x}	0,220 ^{cde_x}	0,256 ^{cde_y}
<i>Albizia julibrissin</i>	162,99 ^b	189,67 ^b	173,13 ^{bc}	190,90 ^b	0,054 ^{ab}	0,047 ^b	0,374 ^b	0,424 ^{ab}
<i>Vicia Faba</i>	226,14 ^a	243,29 ^a	213,80 ^{ab}	231,47 ^{ab}	0,079 ^a	0,092 ^a	0,512 ^a	0,493 ^a
<i>Pinuca granatum</i>	178,91 ^b	189,39 ^b	188,87 ^{bc}	196,73 ^{ab}	0,046 ^{ab}	0,043 ^b	0,292 ^{bc}	0,331 ^{bcd}
SEM	9,40	8,28	11,15	9,28	0,0042	0,0045	0,0223	0,0180
Effet	p							
Espèce	<,0001		<,0001		<,0001		<,0001	
PEG	<,0001		<,0001		0,0768		0,0002	
Espèce*PEG	0,0009		0,1983		0,1288		0,0004	

+/- : +PEG/-PEG ; A: asymptotique de production de gaz, c: vitesse de fermentation; G48: Production de Gaz à 48 h d'incubation ; ED: Dégradation théorique pour une vitesse moyenne de 0,033 h⁻¹; a, b, c, d, e, f, moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes (P < 0,05). S.E.M.: erreur standard des moyennes. ^{x,y} Les moyennes du même fourrage de la même ligne, pour chaque paramètre, suivies de lettres différentes sont significativement différents à p = 0,05.

4.3. Effet du facteur race sur la production de gaz

Nous présentons dans le tableau 21 les résultats de la production de gaz en présence de PEG dans deux essais utilisant le jus de rumen de deux races différentes, en l'occurrence la race Assaf et Merinos.

Tableau 21 : Différences observées dans la production de gaz entre deux races ovines

Race	Assaf		Mérinos	
	-	+	-	+
<i>Artemisia herba alba</i>	125,64 ^b	131,80 ^b	108,50 ^{cd}	103,64 ^d
<i>Atriplex halimus</i>	127,26 ^b	126,02 ^b	121,87 ^c	118,68 ^{cd}
<i>Acacia nilotica</i>	91,57 ^{cx}	160,54 ^{by}	96,96 ^{dce}	142,38 ^{by}
<i>Acacia horrida</i>	147,17 ^b	160,13 ^b	140,47 ^b	140,81 ^{bc}
<i>Acacia cyanophylla</i>	84,00 ^{cdx}	140,34 ^{by}	92,42 ^{dc}	140,03 ^{bcy}
<i>Acacia albida</i>	53,72 ^d	72,98 ^c	90,30 ^e	97,19 ^d
<i>Albizia julibrissin</i>	135,02 ^b	159,21 ^b	145,63 ^b	155,20 ^b
<i>Vicia Faba</i>	210,24 ^a	211,41 ^a	182,22 ^a	180,15 ^a
<i>Pinuca granatum</i>	149,71 ^b	155,91 ^b	113,16 ^c	101,17 ^d
SEM	8,54	7,24	6,75	6,56
Effet	p			
Espèce	<,0001		<,0001	
PEG	<,0001		<,0001	
Race	<,0001		<,0001	
Espèce*PEG	<,0001		<,0001	
Espèce*PEG*Race	<,0001		<,0001	

+/- : +PEG/-PEG ; S.E.M.: erreur standard des moyennes. ^{x,y} Les moyennes du même fourrage de la même ligne, pour chaque paramètre, suivies de lettres différentes sont significativement différents à $p = 0,05$.

Le résultat montre l'existence d'une différence significative ($p < 0,0001$) entre le microbiote ruminal des deux races utilisés (figure 29). Toutes les interactions sont significatives ($p < 0,0001$). Ce résultat est corroboré par plusieurs travaux dont ceux réalisés par Lopez *et al.*, 2001.

Les différences entre les races et les génotypes des moutons dans de nombreux aspects de leur biologie fondamentale (reproduction, lactation et la croissance) sont bien connues. Néanmoins, les différences entre les races dans la digestibilité et la dégradabilité ruminales des aliments ne sont étudiées que récemment, avec des résultats controversés. Ainsi, si certains auteurs détectent des

différences significatives entre les races de moutons dans la digestibilité des fourrages (Amor, 1994; Givens et Moss, 1994; Manzke *et al.*, 1997; Lourenço *et al.*, 2000), d'autres ne concluent qu'à des différences négligeables (Ranilla *et al.*, 1998). Plusieurs travaux, *in situ* et *in vitro*, sont également menés pour étudier les différences entre les races dans la dégradabilité ruminale des aliments. En général, la dégradabilité est plus grande dans le rumen des races locales que dans le rumen d'espèces non indigènes et /ou races améliorées (Ranilla *et al.*, 1997.; Manso *et al.*, 1999; Sebek et Everts, 1999).

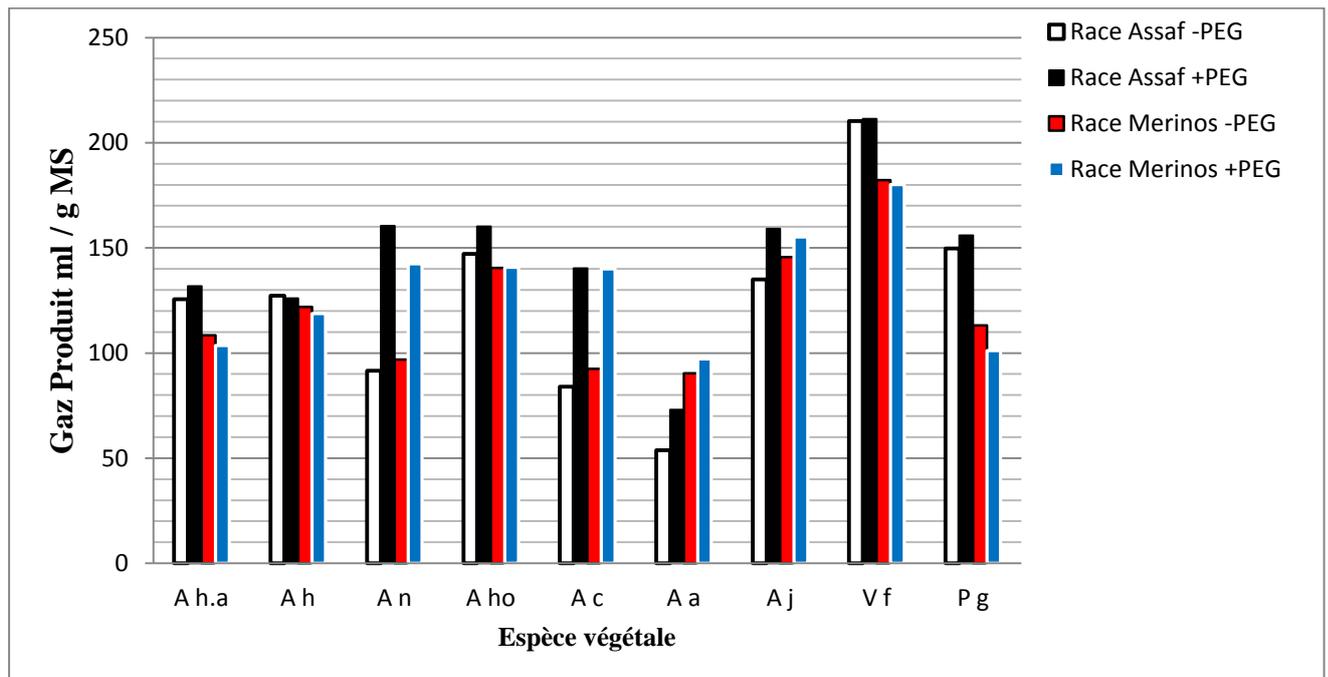


Figure 29 : Production de gaz à 24h d'incubation par le microbiote des races Assaf et Mérinos.

A h.a : *A herba alba* ; A h: *A.halimus*; A n: *A.nilotica*; A ho:*A.horrida*;

A c:*A.cyanophylla*; A a: *A.albida*; A j: *A.julibrissin*; Vf: *Vicia faba*; Pg:*P.granatum*

Ranilla *et al.* (1997 et 2000) constatent que la dégradabilité de certains aliments est plus élevée chez l'espèce ovine espagnole Churra que chez l'espèce Mérinos, bien que ces différences soient plus grandes avec des aliments ayant une concentration en parois cellulaires plus élevées. Ce résultat est comparable au notre, en particulier pour *V.faba*, *P.granatum* et *A. herba alba*. Cependant, aucune différence significative n'a été observée pour le reste des espèces. Exception faite d'une supériorité de la race Mérinos avec *Acacia albida* ($p < 0,05$) (figure 29).

Les différences entre les races dans la digestion ruminale et la dégradation des aliments semblent dépendre des races étudiées et du type d'alimentation utilisée. Les différences sont plus prononcées entre les races adaptées aux différentes conditions environnementales et d'alimentation (Mann *et al.*, 1987; Givens et Moss, 1994). La capacité digestive aurait été développée pour

l'adaptation à des situations marginales. La différence entre les races est plus marquée dans la digestion des aliments de mauvaise qualité (Lopez *et al.*, 2001). Ranilla *et al.*, (1998) et Lourenço *et al.*, (2000) ont conclu que les différences entre les races dans la digestibilité et l'utilisation des aliments ne sont perceptibles qu'avec des fourrages de mauvaise qualité offerts à des niveaux proches de l'*ad libitum*.

Des études comparatives ont montré des différences entre plusieurs espèces de ruminants (bovins, caprins, ovins et camélins) dans l'utilisation des fourrages grossiers qui seraient liées à des différences dans leur comportement alimentaire et leurs processus digestifs respectifs (Dulphy *et al.*, 1995). Ces différences (observées même entre les races de la même espèce), recommandent des stratégies d'alimentation distinctes en prenant en considération leurs capacités d'adaptation et de survie dans leur environnement naturel (Van Soest, 1994). Ces différences de race ont des implications importantes quant à l'adéquation de génotypes particuliers pour la mise en place de systèmes extensifs de production animale, et ces variations intra spécifique doivent être évaluées.

Le phénotype est le produit des interactions entre le génotype et son environnement. En général, les espèces et les races élevées dans un environnement particulier sont bien adaptées grâce, en particulier, à la sélection des éleveurs. En conséquence, des races se trouvant dans un environnement spécifique peuvent ne pas avoir les mêmes performances lorsqu'elles sont placées dans un autre milieu (Lopez *et al.*, 2001). Le génotype des animaux et leur état physiologique peut affecter leur consommation en nutriments (Molina *et al.*, 2000). Ceci peut être dû en partie, soit aux différences dans la capacité physique à ingérer des aliments, soit par des différences dans la rétention des aliments dans le rumen ou les intestins qui dépendent de leur taille (Weston, 1982).

L'utilisation des petits ruminants, notamment les ovins, dans les études sur la digestibilité et le métabolisme, surtout les techniques *in situ*, est largement acceptée, en partie à cause de la facilité de manipulation des animaux, les coûts réduits d'entretien des animaux et des exigences d'alimentation plus faibles en comparaison aux bovins qui nécessite des coûts exorbitants. En effet, les valeurs des digestibilités obtenues chez les moutons sont acceptées comme la norme mondiale pour la plupart des systèmes d'alimentation pour ruminants (Cone *et al.*, 1996, 2002).

L'énergie métabolisable (EM) et la digestibilité de la matière organique (DMO) des échantillons sont prédits à l'aide de la méthode de Menke et Steingass (1988). (plus la valeur numérique est élevée, plus la valeur nutritionnelle de l'échantillon est bonne). L'EM et la DMO ont été calculées d'après les teneurs en constituants chimiques (protéines brutes et minéraux), et la

production de gaz observée après 24 h de fermentation en présence et en absence de PEG pour voir l'effet des Tanins sur ces deux paramètres.

5- Effets des Tanins sur la production de Méthane

5.1. Energie métabolisable et digestibilité de la matière organique

L'énergie métabolisable (EM) et la digestibilité de la matière organique après 24 heures d'incubation (DMO24) des échantillons sont prédits à l'aide de la méthode de Menke et Steingass (1988). La production de gaz observée après 24 h de fermentation en présence et en absence de PEG permet de mesurer l'effet des Tanins sur ces deux paramètres. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 22.

Tableau 22 : Effet du PEG sur la DMO24 et l'Energie Métabolisable des fourrages collectés

<i>PEG</i>	G24 (ml/200mg MS)		EM (MJ / Kg MS)		DMO24(g/100g MO)	
	-	+	-	+	-	+
<i>A. herba alba (Aha)</i>	56,07 ^{cd}	69,66 ^d	4,42 ^d	4,295 ^{ef}	30,89 ^{de}	30,03 ^e
<i>A. halimus (Ah)</i>	69,44 ^c	84,68 ^{cd}	4,98 ^c	4,895 ^{de}	35,49 ^c	34,91 ^d
<i>A. nilotica (An)</i>	55,04 ^{dce} x	115,21 ^b y	5,08 ^c x	6,22 ^{ab} y	36,13 ^c x	43,56 ^{ab} y
<i>A. horrida (Aho)</i>	88,06 ^b	106,82 ^{bc}	5,84 ^b	5,845 ^{bc}	41,02 ^b	41,07 ^{bc}
<i>A. cyanophylla (Ac)</i>	39,99 ^{de} x	106,05 ^{bc} y	4,18 ^d x	5,47 ^{cd} y	29,70 ^e x	38,18 ^{cd} y
<i>A. albida (Aa)</i>	37,88 ^e x	63,23 ^d y	4,67 ^{cd}	4,86 ^e	33,38 ^{cd}	34,62 ^d
<i>A. julibrissin (Aj)</i>	93,26 ^b x	121,21 ^b y	5,80 ^b	6,060 ^{bc}	40,70 ^b	42,37 ^b
<i>V. Faba (Vf)</i>	129,79 ^a	146,17 ^a	6,84 ^a	6,780 ^a	47,43 ^a	47,06 ^a
<i>P. granatum (Pg)</i>	60,73 ^c	67,20 ^d	4,47 ^d	4,15 ^f	31,15 ^{de}	29,02 ^e
SEM	6,75	6,56	0,198	0,208	1,34	1,43
Effet	p					
Espece	<,0001		<,0001		<,0001	
PEG	<,0001		<,0001		<,0001	
Espèce*PEG	<,0001		<,0001		<,0001	
Classement des fourrages	Vf>Aj>An>Aho >Ac>Ah>Aha>Pg>Aa		Vf> An >Aj > Aho> Ac>Ah>Aa>Aha>Pg		Vf>An>Aj>Aho>Ac >Ah>Aa>Aha>Pg	

DMO24: Digestibilité de la matière organique après 24 heures d'incubation ; G24 : Production de gaz après 24 heures d'incubation ; ME : Energie Métabolisable.

La valeur de l'énergie métabolisable, sans ajout de PEG, la plus élevée est enregistrée chez la légumineuse *Vicia faba* avec une valeur de 6,84 MJ/kg MS. Les valeurs les plus faibles sont observées, avec égalité statistique, chez *A.herba alba* et *P. granatum* (p= 0,05), avec les valeurs de 4,42 MJ/kg MS et 4,47 MJ/kg MS, respectivement.

L'effet du PEG sur la EM est significatif (p<0,05) chez *A.nilotica* et *A.cyanophylla* avec des valeurs respectives, en absence et en présence de PEG, de 5,08 ; 6,22 MJ/kg MS, et de 4,18 ; 5,47 MJ/kg MS. La même tendance est observée pour les valeurs de la digestibilité de la matière organique (Tableau 21). L'interaction entre le PEG et l'espèce végétale testée comme fourrage présente un effet significatif (p<0,0001).

Dans une étude utilisant les feuilles mélangées aux pédicelles de six espèces d'acacias, collectées au Kenya, dont *A.nilotica*, Abdulrazak *et al.*, (2000) obtiennent des valeurs de la EM et la DMO24 supérieures à nos valeurs (voir Tableau 22). Par contre dans une autre étude réalisée en Egypte par El Waziri *et al.*, (2007) et utilisant *Acacia saligna* (syno. *A.cyanophylla*) et *Atriplex halimus*, à l'état frais et ensilées, il obtient des résultats comparables aux nôtres. Rubanza *et al.*, (2005), dans une étude similaire utilisant le PEG, testant six espèces d'acacias de Tanzanie (*A. angustissima*, *A. drepanolobium*, *A. nilotica*, *A. polyacantha*, *A. tortilis* et *A. senegal*), obtient un effet significatif du PEG sur la EM et la DMO24, ainsi que l'interaction entre le PEG et l'espèce utilisée (p<0,001).

Tableau 23 : Données de la littérature sur la DMO24 et la ME des Acacias

Espèce	<i>A.brevispica</i>		<i>A.nubica</i>		<i>A.tortilis</i>		<i>A.nilotica</i>		<i>A.mellifera</i>		^a Abdulrazak <i>et al.</i> 2000 /// Rubanza <i>et al.</i> 2005
EM	11,7	4,4	13,1	7,7	11,1	9,1	11,6	9,1	12,0	9,1	
DMO24	480	344	640	607	516	702	484	706	490	602	
Espèce	<i>A.angustissima</i>		<i>A.senegal</i>		<i>A.tortilis</i>		<i>A.nilotica</i>		<i>A. polyacantha</i>		

^a Auteur dont les résultats de ses travaux sont inscrits à gauche

A travers ces résultats nous estimons que le gain le plus élevé, en énergie pour l'animal, pouvant échapper au microbiote ruminal grâce l'action des tanins condensés, est enregistré chez *Acacia nilotica* et *Acacia cyanophylla*. L'action des TC sur la digestion des matières azotées dans le rumen et dans l'intestin a des conséquences importantes sur la nature et la voie d'excrétion des matières azotées non utilisées et sur l'azote retenu par l'animal (Doreau *et al.*, 2011).

Dans notre étude, la plus grande amélioration dans la fermentation (GP24 et EM et DMO24) s'est produite chez *A.nilotica*, malgré le fait que cet arbre présente les plus hauts niveaux en composés phénoliques, représentés par des concentrations élevées en tannins condensés libres (Voir Tableau 12) (Ben Salem *et al.*, 2006), alors que les tannins condensés liés semblent être inertes, et n'affectent pas la fermentation microbienne (Makkar et Becker, 1998). Une fois libérés dans le jus de rumen à la suite de l'activité microbienne, les TCL peuvent influencer sur la croissance bactérienne.

Le PEG a une plus grande capacité de désactiver les tanins extractibles libres que les tanins liés aux fibres et peut réduire leurs effets négatifs ; ce qui peut refléter la relation négative entre les paramètres de fermentation et les composés phénoliques (Tableau 17). L'ajout de PEG pendant l'incubation à de fourrages riches en tanin et en NDF provoque l'augmentation de la production de gaz (Getachew *et al.*, 2000a), suggérant que les tanins libérés à la suite de la dégradation des NDF par le microbiote du rumen sont peu actifs biologiquement avec un impact mineur sur les fermentations. La présence de composés secondaires dans les feuilles de différentes espèces d'arbres, même à la même concentration, produit des effets de différentes magnitudes sur les paramètres de production de gaz et la digestibilité (Makkar *et al.*, 1995b), ce qui conforte l'hypothèse de l'importance de la relation entre la structure du composé secondaire et son activité (Beauchemin et McGinn 2005). Toutefois, l'amélioration de la valeur nutritive du feuillage par la supplémentation de PEG peut être due à la nature et l'activité des composés secondaires.

L'effet des tannins sur la dégradabilité de la matière organique, surtout les protéines, a un impact sur le risque de météorisation au pâturage. Les légumineuses contenant des tannins ne présentent pas de risque de météorisation puisque les protéines sont faiblement dégradées et ne peuvent constituer ces réseaux protéiques.

5.2. Matière organique réellement dégradée et production des AGV

Les résultats de la production des acides gras volatiles (AGV), le facteur de partition (PF) et la production de la biomasse bactérienne (BM) sont représentés dans le tableau 24. Les différences entre les espèces sont significatives pour les trois paramètres ($p < 0,05$). L'addition de PEG augmente de façon significative ($p < 0,05$) la production des AGV (à partir de 0,240 à 0,426 (mmol/g MS) chez *A.nilotica* et de 0,173 à 0,385 (mmol/g MS) chez *A.cyanophylla*. Parmi les légumineuses arbustives, la production la plus élevée en AGV en présence de PEG, est observée chez *A. julibrissin* (0,452 mmol/200mg MS) et la valeur la plus basse est notée chez *P. granatum* (0,212 mmol/ 200mg MS). Le facteur de partition reflète l'efficacité de la biosynthèse des protéines microbiennes par le microbiote à partir du substrat ingéré. Ce paramètre exprime la répartition de la matière organique

réellement dégradée pour la production de la biomasse microbienne et la production de gaz. Il correspond au rapport de la quantité en matière organique réellement dégradée (mg), nécessaire pour produire 1 ml de gaz (Blümmel et Becker, 1997). En absence de PEG, les valeurs du facteur de partition (FP) sont comprises entre 1,99 et 3,43 (mg/ml) (Tableau 27). En présence de PEG, l'intervalle des valeurs est compris entre 2,2 et 4,4 (mg/ml). Ces valeurs sont relativement en accord avec l'intervalle établie par Blümmel et *al.* (1997) qui s'étend entre 2,75 et 4,41 mg/ml mais sont en deçà des résultats obtenus pour des fourrages riches en tanins (3,1-16 mg/ml) (Getachew *et al.*, 2000).

Tableau 24 : Production des AGV, facteur de partition et biomasse bactérienne

PEG	AGV (mmol /200 mg)		FP (mg/ml)		BM (mg)	
	-	+	-	+	-	+
<i>A. herba alba</i> (Aha)	0,245 ^{cd}	0,223 ^d	2,72 ^b	3,30 ^{bc}	132,90 ^{cd} _x	188,77 ^{bc} _y
<i>A. halimus</i> (Ah)	0,304 ^c	0,290 ^{cd}	2,82 ^b	3,34 ^{bc}	163,71 ^{bc} _x	225,27 ^b _y
<i>A. nilotica</i> (An)	0,240 ^{cd} _x	0,426 ^b _y	2,65 ^b	2,43 ^d	125,35 ^d _x	166,41 ^{cd} _y
<i>A. horrida</i> (Aho)	0,387 ^b	0,388 ^{bc}	2,40 ^{bc}	2,75 ^{cd}	143,61 ^{cd} _x	196,69 ^{bc} _y
<i>A. cyanophylla</i> (Ac)	0,173 ^{de} _x	0,385 ^{bc} _y	2,84 ^b _x	2,20 ^d _y	116,955 ^d	126,18 ^d
<i>A. albida</i> (Aa)	0,164 ^e	0,195 ^d	3,80 ^a	3,91 ^{ab}	180,70 ^{ab} _x	226,23 ^b _y
<i>A. julibrissin</i> (Aj)	0,410 ^b	0,452 ^b	2,36 ^{bc}	2,55 ^{cd}	144,93 ^{cd} _x	191,87 ^{bc} _y
<i>V. Faba</i> (Vf)	0,572 ^a	0,563 ^a	1,99 ^c	2,26 ^d	126,45 ^d _x	176,49 ^c _y
<i>P. granatum</i> (Pg)	0,265 ^c	0,212 ^d	3,43 ^a _x	4,40 ^a _y	205,54 ^a _x	279,20 ^a _y
SEM	0,03	0,029	0,12890	0,180	6,851	10,03
Effet	p					
Espec	<,0001		<,0001		<,0001	
PEG	<,0001		0,001		<,0001	
Espèce*PEG	<,0001		0,0004		0,0199	
Classement des fourrages	Vf>An>Aj>Aho>Ac >Ah>Aa>Aha>Pg					

AGV:Acide Gras Volatile; FP: Facteur de Partition ; BM : Biomasse Microbienne.

La production de biomasse microbienne (BM) est significativement influencée par la nature du substrat et par le traitement au PEG ($p < 0,0001$), par contre l'effet de l'interaction du facteur

substrat et du facteur PEG n'est pas significative ($p = 0,0199$). En présence de PEG, les valeurs de la BM varient de 279,20 mg à 126,18 mg.

Ces différences sont probablement dues aux différentes substances anti nutritionnelles (Polyphénols) que renferment les substrats ainsi que leurs éventuelles interactions. En effet, les saponines sont des molécules naturelles de défaunation qui agissent principalement sur la population des protozoaires ciliés, ce qui pourrait avoir pour effet une augmentation quantitative du microbiote (Makkar, 2003c ; Makkar, 2005, Makkar *et al.*, 2007).

Il est important de remarquer que d'après Makkar (2010), la méthode basée sur la production de gaz et la détermination de la matière organique réellement dégradée par le traitement du résidu de substrat après une fermentation de 24h pour calculer la masse microbienne ne fonctionne pas bien pour les aliments riches en tannins. Des valeurs élevées du FP peuvent être obtenues et ceci est dû à plusieurs facteurs :

- La solubilisation des tanins qui ne contribuent ni à la production de gaz ni à la production d'énergie mais favorisent plutôt la perte de la matière sèche.
- Le rôle essentiel de la fraction soluble cellulaire (contenu azoté et lipides), qui contribue à la production de gaz.
- La présence hypothétique des complexes tanins-protéines insolubles dans les résidus non dégradés mène à une sous-estimation de la matière organique dégradée qui fait baisser les valeurs de PF.

L'amélioration substantielle de la production en AGV en présence de PEG chez *A. nilotica* et *A. cyanophylla* suggère une intensification de l'activité fermentaire et une production élevée de la masse des micro-organismes quand un aliment riche en énergie et en protéine est incubé (Getachew *et al.*, 2000a). Ceci n'est pas le cas pour *A. cyanophylla* qui montre une stabilité de la production de la BM, ceci pourrait être dû à sa faiblesse, relative, en énergie métabolisable et en fibres digestibles. Il est pratiquement prouvé que la supplémentation à des légumineuses déficientes en énergie de graminées riches en cellulose et en hémicellulose stimule l'activité fermentaire des micro-organismes en créant un environnement favorable pour leur croissance (Makkar 2003). La dépression de la digestibilité en l'absence de PEG chez *A. nilotica* et *A. cyanophylla* peut être due à la nature de la toxicité *in vitro* des tanins contre le microbiote ruminal (Osuji et Odenyo, 1997) et chez les ovins précisément (Odengo *et al.*, 2007).

L'interprétation de ces résultats nécessite d'autres travaux plus poussés afin de déterminer la cinétique de la croissance bactérienne en présence de chaque substrat. En effet, la croissance

bactérienne comporte plusieurs étapes ; une phase de latence, croissance, une étape stationnaire et enfin la déclinaison (Van Soest, 1994). Les phases de la croissance microbienne par rapport à un temps d'incubation varient entre substrats et les comparaisons de la BM dans les systèmes en Batch peut entraîner à des conclusions erronées. Cela pourrait être le cas de l'analyse du FP après 24,0 h d'incubations sans égard aux différences spécifiques de chaque substrat de la cinétique de croissance microbienne (Blümmel *et al.*, 2003).

5.3. Effet du polyéthylène glycol sur la partition du carbone et de l'hydrogène

5.3.1. Production de gaz total en présence de PEG

L'utilisation de la Chromatographie en Phase Gazeuse pour étudier la stœchiométrie des fermentations après 24 heures d'incubation en présence et en absence de PEG donne les résultats présentés dans le tableau 25. La production *in vitro* de gaz total (GT), CO₂ et de méthane est significativement différente entre les espèces fourragères utilisées ($p < 0,05$). La production de gaz totale la plus élevée, en absence et en présence de PEG, est enregistrée chez *V.faba* avec les valeurs de 5,79-6,53 (mmol/g MS). La différence la plus significative dans la production de gaz total, en absence et en présence de PEG, est observée chez *A.cyanophylla* et *A.nilotica* ($p < 0,001$) (figure 30). L'effet du PEG sur la production de gaz total est significatif ($p < 0,05$) chez tous les acacias. Aucune différence significative de la production de gaz n'est observée ($p < 0,05$), en absence et en présence de PEG, chez quatre espèces fourragères, en l'occurrence, *A.herba alba*, *A.halimus*, *V.faba* et *P.granatum*. L'interaction des facteurs espèces et PEG est aussi significative ($p < 0,0001$). Comme il est montré plus haut, la production de gaz est négativement corrélée avec les tanins d'une manière générale et les tanins condensés en particulier. Nous tenons à rappeler qu'au niveau du rumen, la protéolyse est partiellement inhibée par la présence des tanins (Barry et Manley, 1984). Ces résultats, gaz total produit en absence de PEG, sont en partie liés à des baisses des activités enzymatiques directement dues aux tanins (Makkar *et al.*, 1988 ; McAlister *et al.*, 1994) à cause de leurs inaccessibilité aux fractions glucidiques et protéiques.

Tableau 25 : Stœchiométrie de la production des gaz *in vitro* (mmol/g MS) en présence et en absence du PEG

PEG	CO2		CH4		CO2/CH4		CH4/GT		GT	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Artemisia herba alba</i>	1,986 ^{de} x	2,697 ^d y	0,517 ^{cd} y	0,413 ^e x	3,84 ^d x	6,52 ^{bc} y	0,208 ^a	0,133 ^{cde}	2,50 ^{cd}	3,10 ^d
<i>Atriplex halimus</i>	2,762 ^{bc}	3,124 ^{cd}	0,338 ^{fg} x	0,656 ^d y	8,17 ^a y	4,76 ^{de} x	0,109 ^c	0,173 ^{ab}	3,10 ^c	3,78 ^{cd}
<i>Acacia nilotica</i>	1,999 ^{cde} x	4,395 ^{ab} y	0,458 ^{de} x	0,748 ^c y	4,36 ^{cd}	5,87 ^{bcd}	0,186 ^{ab}	0,146 ^{bcd}	2,46 ^{cde} x	5,14 ^b y
<i>Acacia horrida</i>	3,371 ^b	3,997 ^{bc}	0,560 ^c x	0,771 ^c y	6,02 ^{bc}	5,18 ^{cde}	0,142 ^{bc}	0,162 ^{abc}	3,93 ^b x	4,77 ^{bc}
<i>Acacia cyanophylla</i>	1,502 ^e x	4,001 ^{bc} y	0,283 ^g x	0,733 ^{cd} y	5,31 ^{bcd}	5,46 ^{cde}	0,158 ^b	0,154 ^{abcd}	1,78 ^{de} x	4,73 ^{bc} y
<i>Acacia albida</i>	1,517 ^e x	2,516 ^d y	0,173 ^h x	0,307 ^f y	8,74 ^a	8,22 ^a	0,103 ^c	0,108 ^e	1,69 ^e x	2,82 ^d y
<i>Albizia julibrissin</i>	3,450 ^b x	4,496 ^{ab} y	0,713 ^b x	0,915 ^b y	4,85 ^{bcd}	4,92 ^{de}	0,1710 ^{ab}	0,169 ^{ab}	4,16 ^b x	5,41 ^b y
<i>Vicia Faba</i>	4,619 ^a	5,328 ^a	1,175 ^a	1,198 ^a	3,93 ^d x	4,45 ^e y	0,203 ^a	0,184 ^a	5,79 ^a	6,53 ^a
<i>Pinuca granatum</i>	2,326 ^{cd}	2,631 ^d	0,385 ^{ef}	0,368 ^{ef}	6,06 ^b	7,14 ^{ab}	0,142 ^{bc}	0,123 ^{de}	2,71 ^c	3,00 ^d
SEM	0,2394	0,23011	0,06766	0,06518	0,4101	0,2903	0,0088	0,0059	0,30129	0,292841
Effet	p									
Espec	<,0001		<,0001		<,0001		<,0001		<,0001	
PEG	<,0001		<,0001		0,3102		0,0268		<,0001	
Espèce*PEG	<,0001		<,0001		<,0001		<,0001		<,0001	

CO2 : Dioxyde de carbone ; CH4 : Méthane ; GT : Gaz Total ; ^{a, b, c, d, e, f} moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement différentes (P < 0,05). x, y moyennes dans la même ligne pour chaque paramètre affectées de lettres différentes sont significativement différentes (P < 0,05). S.E.M.: Erreur Standard des Moyennes.

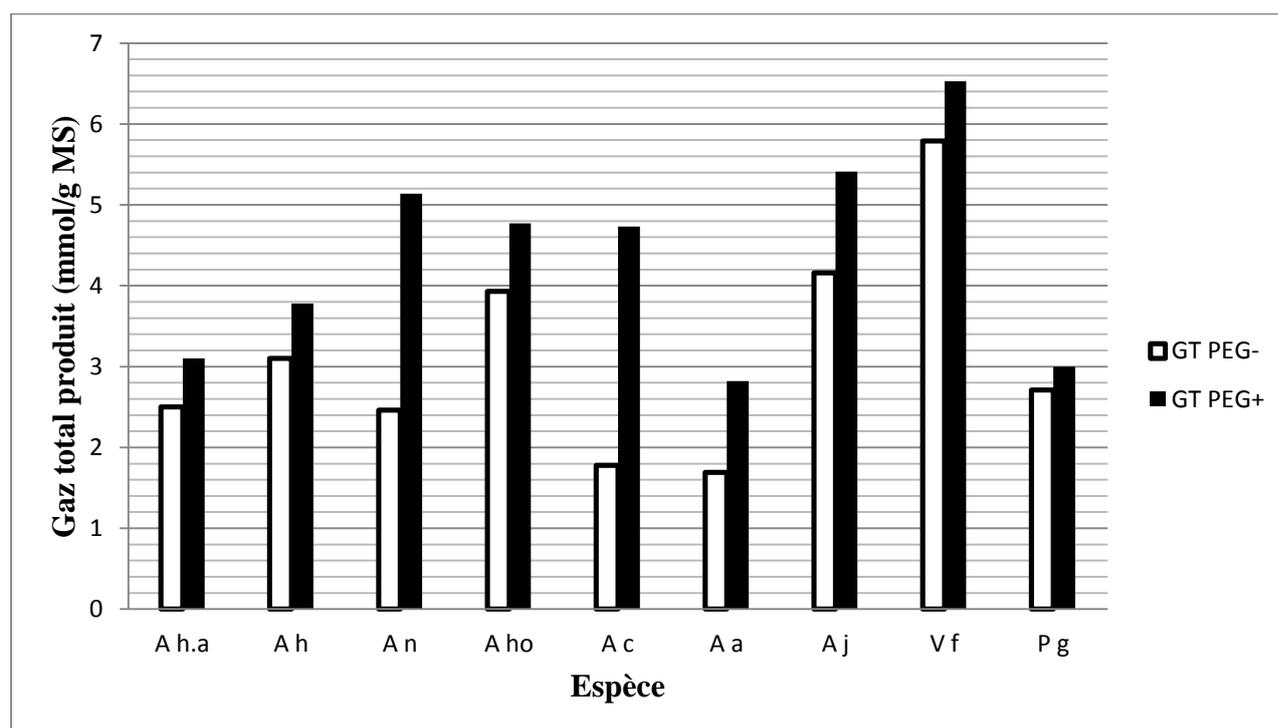


Figure 30 : Gaz total produit (mmol/g MS) en absence et en présence de PEG

A h.a : *A herba alba* ; A h: *A.halimus*; A n: *A.nilotica*; A ho:*A.horrida*;
 A c:*A.cyanophylla*; A a: *A.albida*; A j: *A.julibrissin*; V f: *Vicia faba*; P g:*P.granatum*

5.3.2. Effet des tanins condensés sur la production de CO₂ et CH₄.

Le rôle du rumen est essentiel dans la partition globale de carbone. Au niveau du rumen le flux de carbone fermenté se répartit entre la biomasse microbienne (25 %), les acides gras volatils (AGV) (56 %) et les gaz (19 %) produits. Les principales causes de variation de cette partition sont le profil des AGV et l'efficacité de la croissance microbienne (Sauvant et Giger Reverdin, 2009).

Les détails de la production de CO₂ et CH₄, en absence et en présence de PEG, sont résumés dans le tableau 25. A l'exception de *V.faba* et *P.granatum*, l'effet du PEG est significatif chez la plupart des espèces fourragères analysées ($p < 0,05$) (Figure 31). La même lecture peut être faite pour l'effet significatif des tanins condensés, en absence de PEG, sur cette même production. La relation entre les deux effets n'est plus à démontrer. Par contre il est bon de préciser que l'activité anti-nutritive des tanins varie entre les espèces végétales, en raison de la nature, la structure chimique des tanin (Dalzell et Kerven, 1998), le degré de polymérisation (Schofield *et al.*, 2001), les processus biochimiques et aux relations tanin structure-activité biologique (Haslam, 1998).

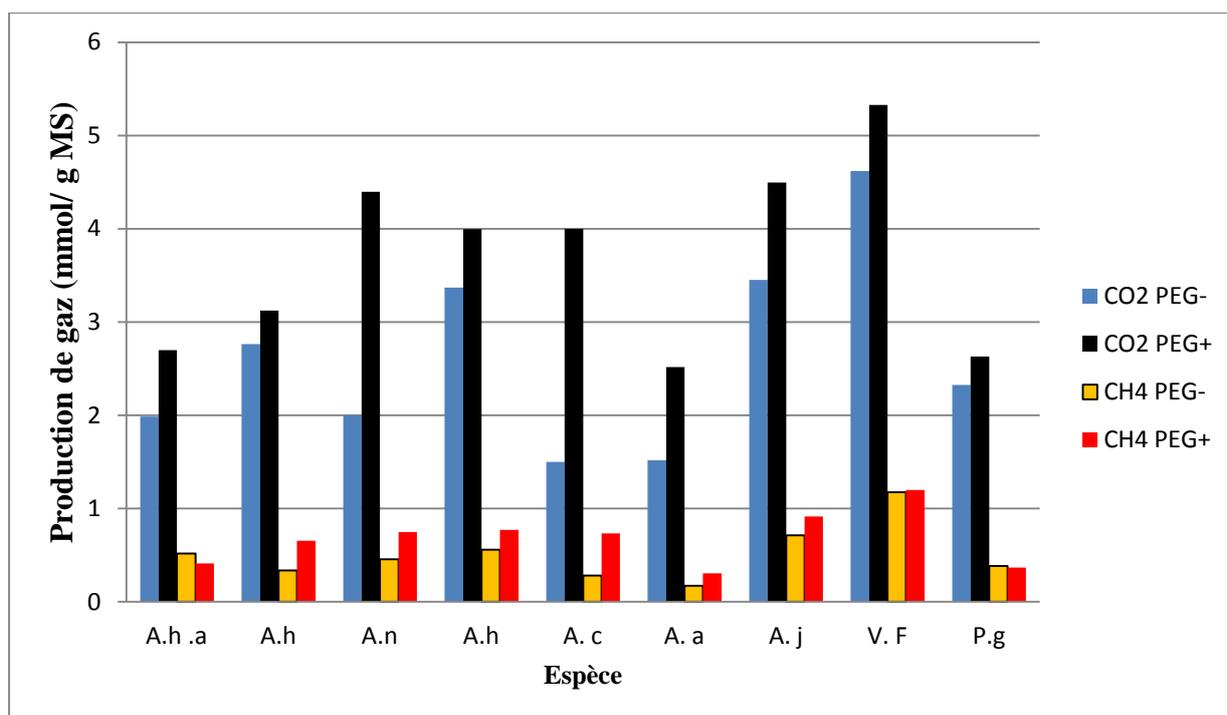


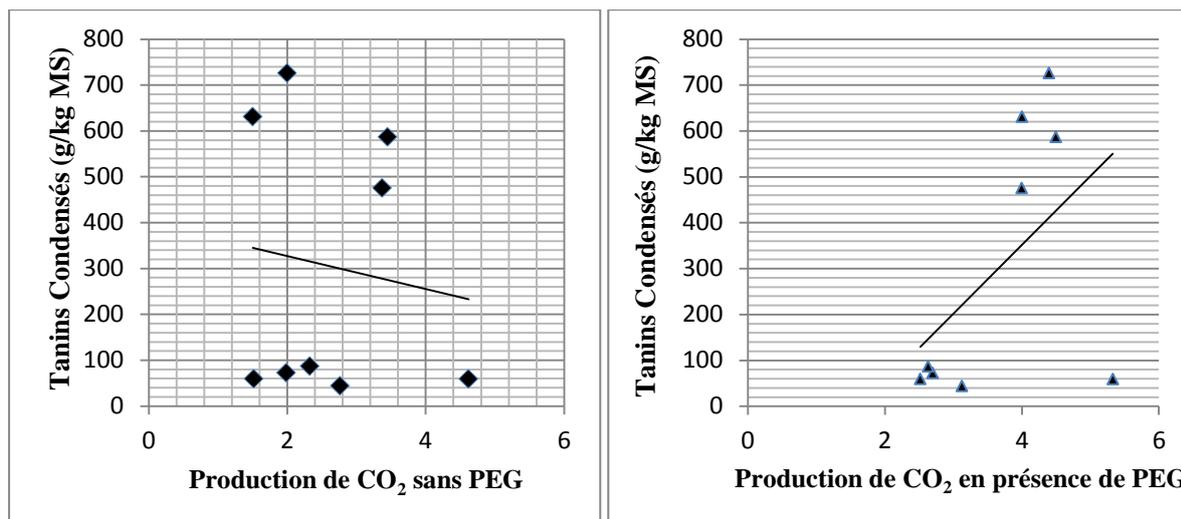
Figure 31 : Production de CO₂ et de CH₄ (mmol/g MS) en Présence et en absence de PEG.

A h.a : *A herba alba* ; A h: *A.halimus*; A n: *A.nilotica*; A ho:*A.horrida*;

A c:*A.cyanophylla*; A a: *A.albida*; A j: *A.julibrissin*; Vf: *Vicia faba*; Pg:*P.granatum*

La production de méthane CH₄ et de dioxyde de carbone CO₂ par les animaux est d'origine digestive. L'émission de CO₂ d'origine digestive s'ajoute à la production de CO₂ d'origine métabolique (respiration de l'animal). La production de CH₄ et de CO₂ d'origine fermentaire est le résultat de la dégradation anaérobie de la biomasse végétale ingérée, et ce, par les microorganismes présents dans le tube digestif. Tous les animaux d'élevage produisent donc du CH₄ et du CO₂. Cependant, les ruminants (bœuf, mouton, chèvre) excrètent des quantités plus grandes de ces gaz que les monogastriques (volaille) (Chouinard Y., 2000).

La relation entre la production de CO₂ avec la concentration des tanins condensés totaux (TCT) est représentée par la droite de régression (Figure 32). En absence de PEG la droite présente une pente négative ($y = -36,023x + 399,05$; $R^2 = 0,0164$). Par contre l'ajout de PEG élimine l'effet des tannins montrant un effet positif ($y = 149,83x - 247,57$; $R^2 = 0,2575$).

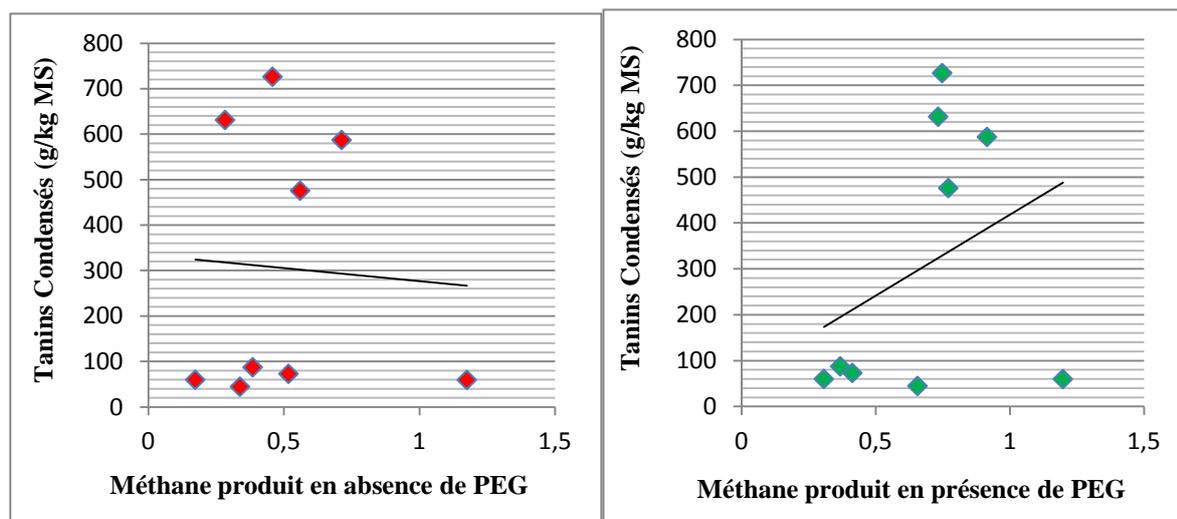


$y = -36,023x + 399,05 ; R^2 = 0,0164$

$y = 149,83x - 247,57 ; R^2 = 0,2575$

Figure 32 : Relation entre la production de CO₂ et les Tanins Condensés.

Le même résultat est observé pour l'effet des TCT sur la production de méthane (figure 32). En absence de PEG, les tannins influencent négativement cette production ($y = -57,78x + 334,41 ; R^2 = 0,0034$). Le PEG efface cet effet négatif complètement ($y = 352,45x + 65,629 ; R^2 = 0,1179$).



$y = -57,78x + 334,41 ; R^2 = 0,0034$

$y = 352,45x + 65,629 ; R^2 = 0,1179$

Figure 33 : Relation entre la production de Méthane et les Tanins Condensés.

La production de gaz à partir de la dégradation des protéines est relativement faible par rapport à la fermentation des glucides (Wolin, 1960). La contribution des matières grasses dans la production de gaz est négligeable (Getachev *et al.*, 1998).

Chez les ruminants, la digestion des glucides s'effectue principalement par l'action des microorganismes anaérobiques du rumen. Le rumen contient plus de 60 espèces de bactéries à une concentration totale de 10^9 à 10^{10} bactéries (microflore) par millilitre. Le fluide ruminal contient

beaucoup moins de protozoaires (microfaune), soit environ 10^6 protozoaires par millilitre, mais ces derniers étant plus gros que les bactéries, ils composent environ la moitié de la masse des microorganismes du rumen. La digestion des glucides alimentaires s'effectue en deux étapes. Les osides (glucides complexes) sont d'abord dégradés en oses (glucides simples) puis les oses sont utilisés (fermentés) par les microorganismes. Les bactéries du rumen sont classifiées parfois selon le type de substrat qu'elles hydrolysent. On peut parler de bactéries cellulolytiques, amylolytiques, dextrinolytiques et saccharolytiques. L'hydrolyse des osides produit principalement du glucose, du fructose, du xylose et des acides uroniques (provenant des pectines et des hémicelluloses) qui sont convertis en xylose. Durant l'hydrolyse extracellulaire, les microbes s'attachent au matériel végétal et sécrètent des enzymes qui attaquent les fragments, libérant ainsi des unités de glucides simples.

Les oses libérés sont rapidement absorbés par les bactéries, de sorte qu'ils sont rarement détectés dans le rumen. Les oses sont métabolisés par les bactéries afin de produire de l'ATP nécessaire à leur métabolisme (entretien, croissance et division). Le métabolisme des microorganismes étant anaérobie, le pyruvate ne peut pas emprunter le cycle de Krebs et les produits terminaux de la digestion sont principalement les acides gras volatils (l'acétate, le propionate et le butyrate), les gaz (le CO_2 , l'hydrogène, et le CH_4) et l'eau (Tableau 26). Le pyruvate est un intermédiaire important, mais n'est généralement pas retrouvé en concentration importante dans le fluide ruminal. L'acétate constitue en moyenne 65 % des acides gras volatils produits, le propionate près de 20 % et le butyrate environ 10 %. Avec un régime riche en concentrés, la proportion d'acétate diminue tandis que la proportion de propionate augmente.

Tableau 26 : Produits terminaux de digestion microbienne des glucides chez le ruminant

Substrat	Produit1	Produit2	Produit3
Hexose	2 Pyruvates	4 H	
Pyruvate + H_2O	Acétates + +	CO_2	2 H
2 Pyruvate + 4H	Butyrate	2CO_2	2H_2
Pyruvate + 4 H	Proionate	H_2O	
$\text{CO}_2 + 8 \text{ H}$	CH_4	$2\text{H}_2\text{O}$	

L'ensemble des réactions présentées dans le tableau 26 montre que la production d'acétate est reliée à la production de CH_4 , alors que celle du propionate est reliée à la production de CO_2 . Il existerait également une relation inverse entre la production de propionate et elle de CH_4 .

Finalement, d'autres travaux ont montré que les concentrations de CH₄ et de CO₂ évoluent en sens inverse au cours de la journée; les concentrations de l'un étant maximales dans le contenu ruminal au moment où les concentrations de l'autre sont minimales (Vermorel, 1995).

Les tanins se fixent préférentiellement aux protéines (Hagerman, 1989) mais aussi à des polyosides telles les celluloses, hémicelluloses ou pectines (Mangan, 1988). Les tanins sur les protéines hydrosolubles et peut modifier leur rôle (inhibition de l'activité des enzymes) et générer leur précipitation. L'association tanins-protéines est essentiellement un phénomène de surface (Mc Manus *et al.*, 1985). Dans les conditions engendrant la précipitation des protéines, deux situations sont envisageables : si la concentration des protéines est faible, les tanins se fixent en formant une monocouche autour de chaque molécule, si elle est élevée, les tanins peuvent se fixer sur plusieurs protéines à la fois en formant un réseau.

Les liaisons formées sont, dans un premier temps, réversibles mais évoluer vers des liaisons irréversibles (Haslan, 1994). En général, l'addition de Polyéthylène Glycol ou de Polyvinylpyrrolidone (PVPP) dans un milieu contenant des tanins et une protéine provoque la rupture des liaisons non covalentes tanins-protéines au profit de l'élaboration de liaisons Tanins-PEG (Hagerman, 1989). Bien que Leinmüller *et al.*, (1991) rapportent quelques exemples d'activation d'enzymes par les tanins, le plus souvent une corrélation négative est observée entre la présence de tanins dans une plante et la dégradation enzymatique de celle-ci. Ceci est vrai pour sa fraction protéique mais aussi pour les autres fractions telles que la fraction glucidique (McLeod, 1974). Les effets des tanins condensés au niveau moléculaire et l'exemple de la protéolyse montrent que ces molécules ont une capacité importante à se fixer sur diverses molécules, générant un encombrement spatial, et une insolubilisation de certains de certains polymères hydrosolubles. Chez les ruminants l'ingestion de plantes riches en tanins se traduit par une moindre utilisation digestive et métabolique (Zimmer et Cordesse, 1996).

Une adaptation des ruminants utilisant des fourrages riches en tanins est observée, les glandes parotides sont hypertrophiées (Butler et Mole, 1988). Cette hypertrophie s'accompagne d'une production élevée d'une catégorie particulière de protéines salivaires (Mehansho *et al.*, 1983 ; Jansman *et al.*, 1994a). Ces protéines se fixent sur les tanins dès leur ingestion, lors de la mastication et de l'insalivation, et les neutralisent. Elles sont riches en proline présentant une structure spécifique des tanins habituellement ingérés de façon à avoir une affinité suffisamment

élevée pour que les tanins liés à ces protéines de la mastication jusqu'à l'excrétion dans les fèces (Hagerman *et al.*, 1992).

5.3.3. Production de méthane et perte d'énergie

L'analyse de la variance ne montre aucun effet significatif du PEG sur le rapport (CO₂/CH₄) (p=0,031) (Tableau 28). Mis à part pour deux fourrages, *A.albida* et *A.julibrissin*, les différences observées sont significatives après addition de PEG. L'effet du facteur espèce est par contre significatif (p<0,0001). Ces différences seraient dues au facteur fourrage. A travers ce rapport nous pouvons déceler le comportement contrasté de la microflore ruminal en présence de différents substrats ayant des compositions chimiques différentes. Le cas le plus illustratif est celui de l'*Atriplex halimus* où le rapport chute de moitié en présence de PEG. La particularité de l'*Atriplex* est sa composition modérée en Tanins Condensés (44,4 k/kg MS). Ce qui est recommandé chez les plantes à tanins pour leur utilisation comme fourrage et par ricochet peut réduire la production de méthane en favorisant une autre voie de catabolisme (Aerts *et al.*, 1999). Par contre chez *A.herba alba* nous constatons l'effet contraire, le rapport CO₂/CH₄, passe du simple au double significativement (p<0,05). Ces deux résultats contrastés, montre la complexité de la microflore ruminale et sa capacité à s'adapter à différents aliments en un laps de temps relativement court, 24 heures seulement.

La proportion de méthane produit par rapport au volume de gaz total (CH₄/GT) varie, significativement (p<0,05) en présence et en absence de PEG (Tableau 24). L'effet du PEG sur ce rapport n'est pas significatif (p>0,02). Par contre l'effet du fourrage utilisé est significatif (p<0,0001). En absence de PEG, le rapport le plus faible (p<0,05) est noté chez *A.albida* (0,103) par contre le ratio le plus élevé est observé chez *V.faba* (0,203). La réponse de la production de méthane dans le rumen est variable (Doreau *et al.*, 2011).

5.4. Utilisation des Acacias pour la réduction du méthane

Comme indiqué dans le tableau 25, l'addition de PEG augmente d'une manière significative la production de CH₄ (p<0,05), essentiellement chez tous les Acacias. Ce qui suggère que l'effet des tanins sur la production de méthane est aussi significatif (p<0,05). L'effet le plus remarquable est observé chez *Acacia nilotica* et *A.cyanophylla*, en absence de PEG. En effet que la réduction de cette production est directement influencée par les tanins condensés dont ces deux espèces sont très riches (voir Tableau 12).

Certains travaux suggèrent que les légumineuses sont à l'origine d'une émission de méthane entérique plus faible que les graminées. A l'inverse, la consommation d'aliments riches en amidon

qui favorise la production de propionate, réduira les quantités de méthane produit. Une méta analyse réalisée sur 101 expérimentations et 290 traitements a permis de montrer que la part d'énergie métabolisable perdue sous forme de méthane diminue significativement lorsque la proportion de concentré (ou de céréales) représente plus de 40% de la ration (Sauvant et Giger-Reverdin 2007). L'inhibition importante de la méthanogénèse observée à partir de 80% de concentré dans la ration traduit une acidose ruminale et correspond à une baisse significative de la digestion et des performances zootechniques.

McCaughey *et al* (1999) observe une diminution de 10% de la production de méthane par kg de gain de poids sur des bovins à viande au pâturage, lorsque les graminées sont remplacées par un mélange graminées-luzerne. Un tel effet n'est pas relevé avec du trèfle blanc ou violet (Beever *et al* 1985, Van Dorland *et al* 2007, Hammond *et al.*, (2011). Carulla *et al.*, (2005) et Niderkorn *et al.*, (2011) n'observent aucun effet significatif de la luzerne ou du trèfle violet apporté en substitution à du ray-grass sur l'émission de méthane par kg de MS, toujours lors d'essais *in vivo*. L'effet de la luzerne parfois observé pourrait laisser penser que la réduction de méthane serait due à la richesse de la luzerne en malate, un acide organique contribuant à réduire la production de méthane, ou à certains métabolites secondaires comme les saponines.

Conclusion

Conclusion

Cette thèse avait pour objectif principal d'étudier les effets des polyphénols, contenus dans le feuillage des *Acacias*, sur les fermentations ruminales, afin de mieux cerner les paramètres majeurs d'une meilleure utilisation de ces essences comme fourrage pour les ruminants.

Le feuillage des *Acacias*, collecté de régions arides et semi-arides de notre pays s'est révélé riche en tanins condensés. Dans leur écosystème local, ces légumineuses ligneuses sont adaptées aux sols pauvres et résistent remarquablement aux stress hydrique. Certaines sont endémiques de l'Algérie, comme *A. nilotica* et *A. albida* et *A. horrida*.

Dans un second volet, nous avons effectué des investigations sur l'effet de ces substrats sur la réduction de la production de méthane, en vue de réduire les pertes en matières azotées qui induisent des pertes énergétiques et, par ricochet, la minimisation des effets néfastes des émanations de méthane sur l'environnement.

Dans ce cadre, ce travail a consisté à étudier plusieurs aspects relatifs à ces fourrages :

- 1- Détermination de la composition chimique des échantillons collectés.
- 2- Etude de la fermentescibilité des substrats retenus par le microbiote ruminal d'ovins, et donc indirectement leur valeur nutritive, par des techniques *in vitro* et *in vivo* (*in sacco*).
- 3- Etude des effets antinutritionnels des tanins condensés sur la fermentescibilité et la digestibilité de ces fourrages riches en composés secondaires.
- 4- Etude de l'effet des tanins condensés des plantes collectées sur la méthanogenèse ruminale.

L'analyse chimique standard des substrats donne pour quatre espèces (*A. herba alba*, *A. horrida*, *A. cyanophylla* et *A. albida*) des taux élevés en fibres (NDF et ADF) et pour d'autres, surtout les *Acacia* (*A. nilotica*, *A. cyanophylla* et *A. albida*), des concentrations importantes en lignine (ADL). Les *Acacia* détiennent les valeurs les plus élevées en PB, ce qui est un bon paramètre quant à leur valorisation comme fourrage. Néanmoins, la présence des tanins en grande quantité chez les *Acacia*, conjuguée à leur taux élevé en lignine, ne les prédispose pas à une utilisation comme fourrage principal. Mais, ils pourraient être envisagés comme additif ou comme palliatif au déficit fourrager en période de disette.

Les tanins sont des molécules complexes et variées, ils peuvent se lier aisément à de nombreuses molécules, en particulier les protéines, et perturber ainsi certains mécanismes biologiques. Ingérés en faibles quantités, ils présentent des intérêts zootechniques avérés tel que la diminution de la météorisation chez les ruminants.

Les zones à végétation riche en tanins occupent des surfaces importantes en Algérie. La gestion de ces espaces peut être envisagée pour l'élevage de cheptels, les caprins étant les mieux indiqués. Les ovins pourraient aussi être concernés mais avec une démarche préalable d'élimination ou à défaut d'atténuation des effets des tanins : procédés physiques ou chimiques (Makkar et Singh, 1992), traitement à l'urée (Makkar et Singh, 1993), ajout de produits complexants pour les neutraliser (Barry et Manley, 1984). L'utilisation du feuillage d'*Acacia*, surtout, doit se faire d'une manière graduelle pour permettre l'adaptation du microbiote ruminal et éviter les cas d'intoxication engendrés par leurs effets antinutritionnels.

Les essais de digestibilité *in vitro* et *in sacco* confirment raisonnablement les appréhensions sur la qualité fourragère de la plupart des échantillons utilisés. Leurs taux élevés en lignine ne les préfigurent pas, à priori, à un statut de fourrage de qualité, malgré leur richesse en matières azotées et en NDF. La répétabilité de nos mesures de digestibilité est comparable à celle obtenue par d'autres auteurs avec des dispositifs expérimentaux plus complexes, plus onéreux et plus lourds à mettre en oeuvre. Nos résultats indiquent qu'une alternative applicable peut être envisagée afin de permettre la valorisation nutritionnelle de plantes riches en Tannins condensés ou même en d'autres métabolites secondaires jugés indésirables. Pour ce qui concerne les *Acacia*, cela consisterait à donner à l'animal leur feuillage après un séchage à l'ombre qui neutraliserait l'effet de leurs tannins. Les molécules de tannins sont dégradées, après un long séjour après la collecte, à l'air libre. Ceci est conforté par nos essais réalisés avec PEG. L'effet biologique le plus significatif des tanins condensés, mis en évidence par notre technique de dosage des gaz, est observé seulement chez *A. nilotica* et *A. cyanophylla*. Cette situation confirme l'existence de différences de structure entre ces anthocyanidines, ce qui expliquerait leurs effets relativement variables d'une espèce à l'autre.

L'activité méthanogène du microbiote ruminal, mesurée à travers les effets spécifiques des tanins par l'utilisation du PEG, montre que les tanins influencent à différents degrés la production de méthane. Par ailleurs, les résultats obtenus montrent bien que l'addition du PEG n'a presque aucun effet significatif sur la production de gaz total pour *A. horrida*, malgré son contenu élevé en tanins.

Les différences entre les races et les génotypes ovins sont bien connues. Cependant, les différences entre les races dans la digestibilité et la dégradabilité ruminales des aliments ne sont étudiées que depuis peu, avec des résultats controversés. Il est dès lors important que de tels travaux soient réalisés sur des génotypes locaux afin de mieux contextualiser et donc de mieux valoriser nos résultats. Une telle démarche permettrait également de définir les mesures adéquates sur la promotion éventuelle de ces essences forestières dans les programmes de reboisement des zones steppiques, notamment pour endiguer la désertification résultant de l'utilisation intensive des

parcours et de l'avancée du désert. Cet aspect est d'autant plus opportun qu'un second « barrage vert » est désormais au programme du pays.

Références bibliographiques

- Abdulrazak, S.A., Fujihara, T., Ondiek, T., Ørskov, E.R., (2000). Nutritive evaluation of some Acacia from Kenya. *Anim. Feed Sci. Technol.* **85**, 89–98.
- Aerts, R.J., Barry, T.N., McNabb, W.C., (1999). Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages: a review. *Agric. Ecosyst. Environ.* **75**, 1–12.
- Aharoni, Y., Gilboa, N. et Silanikove, N. (1998). Models of suppressive effect of tannins. Analysis of the suppressive effect of tannins on ruminal degradation by compartmental models. *Anim. Feed Sci. Technol.* **71** (3-4), 251-267.
- Ahmed M. El-Waziry., (2007). Nutritive Value Assessment of Ensiling or Mixing Acacia and Atriplex Using *In Vitro* Gas Production Technique. *R Journal of Agri and Bio Sci*, **3(6)**: 605-614.
- Alam, M. R., Amin, M.R., Kabir, A.K.M.A., Moniruzzaman, M., McNeill, D.M., (2007). Effect of tannin in *Acacia nilotica*, *Albizia procera* and *Sesbania acculeata* foliage determined *in vitro*, *in sacco* and *in vivo*. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **20(2)**: 220-228.
- Albrecht, K.A., Muck, R.E., (1991). Proteolysis in ensiled forage legumes that vary in tannin concentration. *Crop. Sci.* **31**: 464–469.
- Alipour, D. et Rouzbehan, Y., (2007). Effects of ensiling grape pomace and addition of polyethylene glycol on *in vitro* gas production and microbial biomass yield. *Anim. Feed Sci. Technol.* **137** (1-2), 138-149.
- Alonso-Diaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Aguilar-Caballero, A.J., (2008a). *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Vet Parasitol* **153**, 313-319.
- Al-Owaimer, A.N. El-Waziry, A.M. Koohmaraie M. and Zahran, S.M. (2011). The use of Ground Date Pits and *Atriplex halimus* as Alternative Feeds for Sheep. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **5(5)**: 1154-1161.
- Al-Owaimer, A.N., S.M. Zahran and B.A. Al-Basam, (2008). Effect of feeding some types of Atriplex SPP. In complete diet on growth performance and digestibility of growing lambs. *Agri. Res. Bulletin No*, King Saud Univ. Riyadh. Saudi Arabia, **161**: 5-19.
- Al-Soqeer, A.A., (2008). Nutritive value assessment of *Acacia* species using their chemical analyses and *in vitro* gas production technique. *Res. J. Agr. Biol. Sci.* **4**, 688-694.
- Álvarez del Pino, M.C., Hervás, G., Mantecón, A.R., Giráldez F.J., Frutos, P., (2005). Comparison of biological and chemical methods, and internal and external standards, for assaying tannins in shrub species. *J. Sci. Food Agric.* **85**, 583-590.
- Al-Zoreky, NS., (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica Granatum* L.) fruit peels. *Int J Food Microbiol* **134**: 244–248.
- Ammar, H., (2002). Composición química, digestibilidad y cinética de fermentación ruminal *in vitro* de arbustos. PhD thesis, Universidad de León, Spain.
- Ammar, H., López S., Bochi, O., Garcia, R., Ranilla, M.J., (1999). Composition and *in vitro* digestibility of leaves and stems of grasses and legumes harvested from permanent mountain meadows at different maturity stages. *J. Anim. Feed Sci.* **8**, 599-610.
- Ammar, H., Lopez, S., Kammoun, M., Bodas, R., Giraldez, F.G., Gonzalez, J.S. (2008). Feeding quebracho tannins to sheep to enhance rumen fermentative activity to degrade browse shrubs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **147** (1-3), 90-104.
- Amor, J., (1994). Diurnal patterns of intake and rumination in sheep as affected by different factors. Tesis doctoral, Universidad de León.

- Animut, G., Puchala, R., Goetsch, A.L., Patra, A.K., Sahl, T., Varel, V.H. et Wells, J. (2008). Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. *Anim. Feed Sci. Technol.* **144**, 228-241.
- Anuraga, M., Duarsa, P., Hill, M. J. and Lovett, J. V., (1993). Soil moisture and temperature affect condensed tannin concentrations and growth in *Lotus corniculatus* and *Lotus pedunculatus*. *Aust. J. Agric. Res.* **44**:1667.
- AOAC., (2000). Official method of analysis (17th Edition) Volume I. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Maryland, USA.
- Archimède, H., Sauvart, D., Assoumaya, C., Fanchone, A., Boval, M., (2009). Fourrages tropicaux : valeur alimentaire comparée aux fourrages tempérés et évaluation au pâturage. *Renc. Rech. Ruminants*, **16**: 17- 24.
- Asquith, T.N., Butler, L.G., (1985). Use of dye-labeled protein as spectrophotometric assay for protein precipitants such as tannin. *J. Chem. Ecol.* **11**, 1535±1544.
- Atti, N., Ben Salem, H., Priolo, A., (2003). Effects of polyethylene glycol in concentrate or feed blocks on carcass composition and offal weight of Barbarine lambs fed *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage. *Anim. Res.* **52**, 363-375.
- Aufrère, J., Dominique, G., Melcion, J.P., Demarquilly C., (2001). Degradation in the rumen of lupin (*Lupinus albus* L.) and pea (*Pisum sativum* L.) seed proteins: Effect of heat treatment. *Anim. Feed Sci. Technol.* **92**, 215–236.
- Aufrère, J., Graviou, D., Baumont, R., Detour, A., Demarquilly, C., (2000). Degradation in the rumen of proteins from fresh lucerne forage in various stages of growth and conserved as silage or hay. *Ann. Zootech.*, **49**, 461-474.
- Aufrère, J., Theodoridou, K., Baumont, R., (2012). Valeur alimentaire pour les ruminants des légumineuses contenant des tannins condensés en milieux tempérés. *INRA Prod. Anim*, **25** (1), 29-44.
- Ayres, M.P., Clausen, P.H., Maclean, S.F., Redman, A.M., Reichart, P.B., (1997). Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. *Ecology* **78** (6), 1696-1712.
- Baba-Moussa, F., Akpagana, K., Bouchet, Ph., (1999). Comparaison de l'activité antifongique des feuilles et des écorces de *Pteleopsis suberosa* G. Don (Combretaceae). *Acta Bot. Gallica*, **145** (3), 233-238.
- Baldwin, R.L., Wood, W.A., Emery, R.S., (1962). Conversion of lactate-C14 to propionate by the rumen microflora. *J. Bacteriol.*, **83**, 907-913.
- Barone R., (1997). Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 3 : Splanchnologie 1. Appareil digestif. Appareil respiratoire. 3ème ed. Paris : Vigot, 853 p.
- Barrau, E., (2004). Etude de l'activité anthelminthique du sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop.*) sur les parasites gastro-intestinaux de la chèvre. Toulouse, France.
- Barry T.N., Manley T.R., Duncan S.J., (1986). The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep: 4. sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. *Br. J. Nutr.*, **55**, 123–137.
- Barry, T.N and McNabb, W.C, (1999). The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *Br J Nutr.* **81**:263–272.
- Bauchop, T.T., (1979). The rumen anaerobic fungi colonizer of plant fibre. *Ann. Rech. Vet.*, **10**(2/3) 246-248.
- Baumer M. 1997. Agroforesterie pour les productions animales CTA, 340 p.
- Baumer, M., (1991). Trees as browse and to support animal production. In; Legume trees and other fodder trees as protein sources for livestock. Proceedings of the FAO Expert Consultation held at the Malaysian Agricultural Research and Development Institute.
- Beauchemin K.A., McGinn S.M., (2005). Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *J. Anim. Sci.*, **83**, 653-661.

- Beckers, Y. (1998). Etude méthodologique de la dégradabilité rumionale et de la digestibilité intestinale vraies des matières azotées totales des aliments concentrés et des acides aminés. Unpublished doctoral thesis, FUSAGx, Gembloux, Belgique.
- Beever, D.E., Thomson, D.J., Ulyatt, M.J., Cammell, S.B., Spooner, M.C., (1985). The digestion of fresh perennial ryegrass (*Lolium perenne* L. cv. Melle) and white clover (*Trifolium repens* L. cv. Blanca) by growing cattle fed indoors. *Brit. J. Nutr.*, **54**, 763-775.
- Bell, A.A., El-Zik, K.M., Thaxton, P.M., (1992). Chemistry, biological significance, and genetic control of proanthocyanidins in cotton (*Gossypium spp.*). In: Hemingway R.W., Laks P.E. (Eds). Plant polyphenols, synthesis, properties, significance. Plenum Press, London, UK, 571-595.
- Ben Salem H., Nefzaoui A., Ben Salem L., (1998). Fodder shrubs as supplements to poor quality roughages fed to sheep. In: Gintzburger G., M. Bounejmate and A. Nefzaoui (eds.). Fodder Shrub Development in Arid and Semi-arid Zones. Proceedings of the Workshop on Native and Exotic Fodder Shrubs in Arid and Semi-arid Zones, 27 October-2 November 1996, Hammamet, Tunisia. ICARDA, Aleppo (Syria). Vol. I: 197-202.
- Ben Salem, H., Ben Salem, I., Ben Saïd, M.S., (2005). Effect of the level and frequency of PEG supply on intake, digestion, biochemical parameters by goats given kermes oak (*Quercus coccifera* L.)-based diets. *Small Rum. Res.* **56**, 127-137.
- Ben Salem, H., Nefzaoui, A., Abdouli, H., (1994). Palatability of shrubs and fodder trees measured on sheep and dromedaries. 1. Methodological approach. *Anim. Feed Sci. Tech.* **46**, 143-153.
- Ben Salem, H., Norman, H.C., Nefzaoui, A., Mayberry, D.E., Pearce, K.L., Revell D.K., (2010). Potential use of oldman saltbush (*Atriplex nummularia* Lindl.) in sheep and goat feeding. *Small Ruminant Res.* **91**, 13-28.
- Ben Salem, H.S., Abidi, S., Makkar, H.P.S., Nefzaoui, A. (2005). Wood ash treatment, a cost-effective way to deactivate tannins in *Acacia cyanophylla* I Lindl. foliage and to improve digestion by Barbarine sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* **123**, 93-108.
- Bennick, A., (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit. Rev. Oral Biot. Med.*, **13**: 184- 196.
- Bhattacharya, A.N., Al-Assiri, A.S., (1988). Nutritional evaluation of some commonly browsed range shrubs/forbs and other feed resources in the desert range of northern Saudi Arabia. WAAP-88, Helsinki, pp: 287.
- Blümmel, M., Zerbini, E., Reddy, B.V.S., Hash, C.T, Bidinger, F.R., Ravi D., (2003). Improving the production and utilization of sorghum and pearl millet as livestock feed: methodological problems and possible solutions. *Field Crops Research* **84**: 123–142.
- Bokhari, U.G., F. Alyaesh, M. Al-Noori., (1990). Nutritional characteristics of important desert grasses in Saudi Arabia. *J. Range Manage*, **43**: 203.
- Bonsi, M.L.K., Osuji, P.O., Tuah, A.K., (1995b). Effect of supplementing teff straw with different levels of leucaena or sesbania leaves on the degradabilities of teff straw, sesbania, leucaena, tagasaste and vernonia and on certain rumen and blood metabolites in Ethiopia Menz sheep, *Anim. Feed Sci. Technol.* **52**, 101 – 129.
- Borreani, G., Peiretti, P.G. et Tabacco, E. (2003). Evolution of yield and quality of sainfoin (*Onobrychis viciifolia scop.*) in the spring growth cycle. *Agronom.* **23**, 193-201.
- Borreani, G., Peiretti, P.G., Tabacco, E., (2003). Evolution of yield and quality of sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop.*) in the spring growth cycle. *Agronomie*, **23**, 193-201. ISSN: 0249-5627.
- Boufennara, S., Lopez, S., Bousseboua, H., Bodas, R., Bouazza, L., (2012). Chemical composition and digestibility of some browse species collected from Algerian arid rangelands. *Span.j.Agric Research.* **10** (1), 88-98.

- Boukary-Mori, H., (2000). Rumen dry matter degradability of successive cuts of *Panicum maximum* and *Leucaena leucocephala* leaves and stems, and of various tropical roughages, by the nylon bags technic. Thesis, University of Liege.
- Bourbouze A., (2006). Systèmes d'élevage et production animale. *Sécheresse*, **17**(1-2), 31-46.
- Bravo, L., (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. **56**: 317-333.
- Broadhurst, R.B., Jones, W.T., (1978). Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agric.*, **29**, 788-794.
- Broberg G., (1958). Measurements of the redox potential in rumen contents. IV. In vivo measurements. *Nord. Vet. Med.*, **10**, 263-268.
- Brugère H., (1983). Biochimie du rumen – Aspects physiologiques. *Bull. GTV225*, **3**, 5-22.
- Bruneton, J., (1999). Les tanins. Ed. Editions médicales internationales, Paris, 369-404.
- Bryant MP, Robinson IM., (1963). Apparent incorporation of ammonia and amino acid carbon during growth of selected species of rumen bacteria. *J. Dairy Sci.*, **46**, 150-154.
- Bryant MP, Small N, Bouma C, Robinson I., (1958). Studies on the composition of the rumina flora and fauna of young calves. *J. Dairy Sci.*, **41**, 1747-1767.
- Butter, N.L., Dawson, J.M. et Buttery, P.J., (1999). Effects of dietary tannins on ruminants. In: *Secondary Plant Products* Nottingham-University-Press, Nottingham, pp. 51-70.
- Buxton, D. R., and Russell, J.R., (1988). Lignin constituents and cell-wall digestibility of grass and legume stems. *Crop Sci.* **28**:553-558.
- Cabiddu, A., Decandia, M., Sitzia, M., Molle, G., (2000). A note on the chemical composition and tannin content of some Mediterranean shrubs browsed by Sarda goats. In: Ledin, I., orand-Fehr, P. (Eds.), *Sheep and Goat Nutrition: Intake, Digestion, Quality of Products and Rangelands. Cahiers Options Méditerranéennes*, **52**, pp. 175–178.
- Cabral Filho, S.L.S., Abdalla, A.L., Bueno, I.C.S., Nozella, E.F., Rodrigues, J.A.S. (2005). Ruminant fermentation and degradability of sorghum cultivar whole crop, and grains, using an *in vitro* gas production technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* **123-124** (1), 329-339.
- Cadot, Y. et Miñana Castelló, M.T.C., M., (2006). Flavan-3-ol compositional changes in grape berries (*Vitis vinifera L. cv Cabernet Franc*) before veraison, using two complementary analytical approaches, HPLC reversed phase and histochemistry. *Analytica Chimica Acta.* **563** (1-2), 65-75.
- Carulla, J.E., Kreuzer, M., Machmüller, A., Hess, H.D., (2005). Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Austr. J. Agric. Res.*, **56**, 961-970.
- Chapoutot, P., Dorléans, M., Sauvart, D., (2010). Etude des cinétiques de dégradation dans le rumen des constituants pariétaux des aliments concentrés et coproduits agroindustriels. *INRA Prod. Anim.* **23**(3), 285-304.
- Cheng, K.J., Costerton, J.W., (1980). Adherent rumen bacteria-their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. In: Ruckebush, Y.T.P. (Ed.), *Digestive physiology and metabolism in ruminants*. Falcon house, Lancaster, England, pp. 227-250.
- Chermi A., (1997). Prédiction de l'ingestion volontaire des fourrages chez les ovins à partir des caractéristiques chimiques et de dégradation ruminale. *Options Méditerranéennes. Série Séminaires.*, **34**: 37-41.
- Chesson A., Forsberg, C.W., (1988). Polysaccharide Degradation by Rumen Microorganisms. In : Hobson PN, editors. *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Science Publisher, 251-277. 527 p.
- Chesson, A., (1993). Mechanistic models of forage cellwall degradation. In: *Forage Cell-Wall Structure and Digestibility* (HG Jung et al, eds), Madison, WI, USA, 347-376.
- Chouinard, Y., (2000). Production et émission du méthane et du gaz carbonique par les ruminants. In 65ème Congrès de l'Ordre des agronomes du Québec. 10 p.

- Chung, K.T., Wei Ch.I., Johnson, M.G (1998). Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Food Sci Technol*; **9**:168-75.
- Clauss, M., Lason, K., Gehrke, J., Lechner-Doll, M., Fickel, J., Grune, T., Streich, W.J., (2003). Captive roe deer (*Capreolus capreolus*) select for low amounts of tannic acid but not quebracho: fluctuation of preferences and potential benefits. *Comp. Biochem. physiol. (Part B: Biochem. Mol. Biology)* **136** (2), 369-382.
- Coen, J. A., and B. A. Dehority. (1970). Degradation and utilization of hemicellulose from intact forages by pure cultures of rumen bacteria. *Appl. Microbiol.* 20:362.
- Coleman, G.S., (1975). The interrelationship between rumen ciliate protozoa and bacteria. In: Mc Donald, W., Warner, A.C.I. (Eds.), *Digestion and metabolism in the ruminant*. The university of New England publ, Armidale, USA, pp. 149-164.
- Collingborn, F.M.B., Gowen, S.R., Mueller-Harvey, I., (2000). Investigations into the biochemical basis for nematode resistance in roots of three *Musa* cultivars in response to *Radopholus similis* infection. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5297–5301.
- Cone, J. W., Van Gelder, A. H., Bachmann, H., (2002). Influence on inoculum source on gas production profiles. *Anim. Feed Sci. Technol.* **99**:221-231.
- Cone, J.W., Van Gelder, A.H., Vissler, G.J.W., Oudshoorn, L., (1996). Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Anim. Feed Sci. Technol.* **61**, 113–128.
- Czerkawski F.M, Cheng K.J., (1988). Compartmentation in the rumen. In : Hobson PN, Ed. *The rumen microbial ecosystem*, Elsevier Science Publishing, New York, 361-385. 527 p.
- Dalrymple, R. H., Baker, P. K., Gingher, P. E., Ingle, D. L., Pensack, J. M. Ricks., C. A., (1984b). A repartitioning agent to improve performance and carcass composition of ,roilers. *Poult. Sci.* **63**:2376.
- Dalzell S.A. and Kerven G.L. (1988). A rapid method for the measurement of Leucaena Spp. Proanthocyanidins by the proanthocyanidin (butanol/HCl) assay. *J. of the Sci.food and Agri.* **78**, 405-416.
- Dawson K.A, Allison M.J., (1988). Digestive disorders and nutritional toxicity. In: Hobson PN, editors. *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Science Publisher, New York, 445-459.527.
- Decandia, M., Cabiddu, A., Sitzia, M., Molle, G., (2007). Polyethylene glycol influences feeding behaviour of dairy goats browsing on bushland with different herbage cover. *Livestock Sci.*
- Decandia, M., Sitzia, M., Cabiddu, A., Kababya, D. et Molle, G. (2000). The use of polyethylene glycol to reduce the anti-nutritional effects of tannins in goats fed woody species. *Small Rum. Res.* **38**, 157-164.
- Demeyer D, and Van Nevel, C., (1979). Protein fermentation and growth by rumen microbes. *Ann.Rech. Vet.*, **10**, 275-9.
- Doreau, M., Martin, C., Eugène, M., Popova, M., Morgavi, D.P., (2011). Leviers d'action pour réduire la production de méthane entérique. *INRA Prod. Anim.*, **24** (5), 461-474.
- Dulphy, J.-P., Balch, C.C., Doreau, M., (1995). Adaptation des espèces domestiques á la digestion des aliments lignocellulosiques. In *Nutrition des ruminwús donestiques. Ingestion et digestion* (ed. R. jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M.-H. Farce and M. journet), pp. 759-803. INRA, Paris.
- El Aich A., (1992). Fodder Trees and Shrubs in Range and farming systems in North Africa. In: *Legume Trees and Other Fodder Trees as Protein Sources for Livestock*. FAO Animal Production and Health, Paper 102. FAO, Rome, pp. 61-73.
- El-Waziry, A.M., (2007). Nutritive Value Assessment of Ensiling or Mixing Acacia and Atriplex Using In Vitro Gas Production Technique. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, v.3, n.6, p. 605-614.
- Engels, F.M., andJung, H.G., (1998). Alfalfa stem tissues: cell-wall development and lignification. *Annals of Botany* **82**: 561-568.

- Euzéby, J.P.** Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire :
[http : //www.bacterio.cict.fr/bacdico/garde.html](http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/garde.html)
- Fall, T.S, Elhadji, T., Kéba, N., N'Dèye, S., N'Diaye, B., Mohammed, S., (1997). Utilisation des fruits de *Faidherbia albida* pour l'alimentation des bovins d'embouche paysanne dans le bassin arachidier au Sénégal. *Livestock Research for Rural Development*. **9**, Number 5.
- FAO., (2009). FAOSTAT statistical database. Rome (available at faostat.fao.org).
- Feucht, W and Treutter, D., (1999). The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defense. In Principles and Practices in Plant Ecology – Allochemical Interactions. Eds. Inderjit, K M M Dakshini and C L Foy. pp. 307–338. CRC Press, Boca Raton.
- Feucht, W., Treutter, D., Christ, E., (1997). Role of flavanols in yellowing beech trees of the Black forest. *Tree Physiol.* **17**, 335-340.
- Fonseca, A.J.M., Dias-da-Silva, A.A., Orskov, E.R., (1998). *In sacco* degradation characteristics as predictors of digestibility and voluntary intake of roughages by mature ewes. *Anim. Feed Sci. Tech.*, **72**, 205–219.
- Fonty, G., Forano, E., Gaudet, G., Komisarczuck, S., Gouet, P., (1987). Données nouvelles sur les bactéries cellulolytiques du rumen. *Reprod. Nutr. Dev.* **28**, 19-32.
- Fonty, G., Joblin, K.N., (1991). Rumen anaerobic fungi : their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fibre digestion. In: Tsuda, T., Sasaki, Y., Kawashima, R. (Eds.), Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. Academic Press, San Diego, USA, pp. 655-679.
- Fonty, G., Jouany, J.P., Forano, E., Gouet, Ph., (1995). L'écosystème microbien du réticulorumen. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (Eds.), Nutrition des ruminants domestiques, ingestion et digestion. Paris, France, pp. 299-348.
- Fonty, G., Jouany, J.P., Sénaud, J., Gouet, P., Grain, J., (1984). the evolution of microflora, microfauna and digestion in the rumen of lambs from birth to 4 months. *Can. J. An. Sci.* **64** suppl., 165-166.
- Foo, L.Y., Lu, Y., Mc Nabb, W.C., Waghorn, G. et Ulyatt, M.J. (1997). Proanthocyanidins from *Lotus pedunculatus*. *Phytochemistry* **45**, 1689-1696.
- Foo, L.Y., Newman, R., Waghorn, G., Mc Nabb, W.C., Ulyatt, M.J., (1996). Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus*. *Phytochemistry* **41**, 617-624.
- Forsberg, C.W., Cheng, K.J, White, B.A., (1997). Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. In :; RI Mackie and BA White (Eds.), *Gastrointestinal Microbiology*, Chapman and Hall, New York, p. 319-379. 676 p.
- Forsberg, C.W., Lam, K., (1977). Use of adénosine 5'-triphosphate as an indicator of the microbiota in rumen contents. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 528-537.
- France J., Dijkstra J., Dhanoa M.S., López S., Bannink A., (2000). Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. *Brit. J. Nutr.* **83**, 143-150.
- Frutos, P., Hervas, G., Ramos, G., Giraldez, F.J. et Mantecon, A.R. (2002). Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. *Anim. Feed Sci. Technol.* **95**, 215-226.
- Frutos, P., Raso, M., Hervas, G., Mantecon, A.R., Pérez, V., Giraldez, F.J., (2004). Is there any detrimental effect when a chestnut hydrolysable tannin extract is included in the diet of finishing lambs ? *Anim. Res.* **53**, 127-136.
- Gasmi-Boubaker, A., Kayouli, C., Buldgen, A., (2006). Feed blocks as a supplement for goat kids grazing natural Tunisian rangeland during the dry season. *Anim. Feed Sci. Tech.* **126**:31-41.
- Getachew, G., Makkar, H. P. S., Becker, K., (2002a). Tropical browses: Contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. *J. Agric. Sci.* **139**: 341-352.

- Gilboa, N., Perevolotsky, A., Landau, S., Nitsan, Z., Silanikove, N., (2000). Increasing productivity in goats grazing Mediterranean woodland and scrubland by supplementation of polyethylene glycol. *Small Rum. Res.* **38** 183-190.
- Gill, F.L., Dewhurst, R.J., Dungait, J.A.J., Evershed, R.P., Ives, L., Li, C., Pancost, R.D., Sullivan, M., Bera, S., Bull, I.D., (2010). Archaeol – a biomarker for foregut fermentation in modern and ancient herbivorous mammals? *Org. Geochem.* **41**, 467–472.
- Givens, D.I., Moss, A.R., (1994). Effect of breed, age and body studies. weight of sheep on the measurement of apparent digestibility of dried grass. *Anim. Feed Sci. Technol.* **46**, 155–162.
- Goad DW, Goad CL, Nagaraja TG. (1998). Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *Journal of Animal Science.* **76**:234-241.
- Gorshkova, T. A., Salnikov, V. V., Pogodina, N. M., Chemikosova, S. B., Yablokova, E. V., Vulanov, . Ageeva, A. V., Van Dam, J. E. G., Lozovaya, V. V., (2000). .Composition and Distribution of Cell Wall Phenolic Compounds in Flax (*Linum usitatissimum* L.) Stem Tissues. *Annals of Botany* .**85**: 477±486.
- Grings, EE, Blümmel, M., Südekum, K.-H., (2005). Methodological considerations in using gas production techniques for estimating ruminal microbial efficiencies for silage-based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* **123–124**, 527–545.
- Guimarães-Beelen, P.M., Berchielli, T.T., Beelen, R., Medeiros, A.N., (2006). Influence of condensed tannins from Brazilian semi-arid legumes on ruminal degradability, microbial colonization and ruminal enzymatic activity in Saanen goats. *Small Rum. Res.* **61** (1), 35-44.
- Gupta, B. K., Ahuja, A. K., Malik, N. S., (1992). Seasonal variation in antiquality factors of *Leucaena leucocephala* in India. *Leucaena Res. Rep.* 13:26.
- Gutmann, M., Feucht, W., (1994). Histochemical localization of catechins and procyanidins. *Acta Horticulturae* **381**, 797- 801.
- Guyot, S., Marnet, N., Drilleau, J.F., (2001). Thiolytic-HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerisation states. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 14-20.
- Haddi, M-L., Arab, H., Yacoub, F., Hornick, J-L., F Rollin., Mehennaoui, S., (2009). Seasonal changes in chemical composition and *in vitro* gas production of six plants from Eastern Algerian arid regions. *Liv.Rese.Ru. Deve.* **21** (4).
- Hagerman, A.E., (1987). Extraction of tannins from fresh and preserved leaves. *J. Chem. Ecol.* **13**, 437-449.
- Hagerman, A.E., (1992). Tannin protein interactions. *ACS Symposium Series*, 506: 236-247.
- Kepler, C.R. and Tove, S.B. (1967). Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. III. Purification and properties of a linoleate Δ^{12} -*cis*, Δ^{11} -*trans*-isomerase from *Butyrivibrio fibrosolvens*. *J. Biol. Chem.*,**242**: 5686-5692.
- Hagerman, A.E., (2002). Tannin chemistry. www.users.muohio.edu/tannin.pdf.
- Hammond, K.J., Hoskin, S.O., Burke, J.L., Waghorn, G.C., Koolaard, J.P., Muetzel, S., (2011). Effects of feeding fresh white clover (*Trifolium repens*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on enteric methane emissions from sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **166-167**, 398-404.
- Haslam, E., (1989). Plant Polyphenols. In: Haslam E (ed) Vegetable Tannins. *Cambridge University Press*. pp. 15-89.
- Haslam, E., (1998). Practical Polyphenolics : From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action. *Cambridge University Press*. 422 pages.
- Haslam, E., (1998). Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action. Cambridge: Cambridge University Press; 1998. p.422.
- Haslam, E., (2007). Vegetable tannins-lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*, **68**: 2713-2721.

- Hassig, A., Liang W. X., Schwabl, H., Stampfli, K., (1999). Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. *Med. Hypotheses* **52**, 479-481.
- Hatano, T., Kusuda, M., Inada, K., Ogawa, T.O., Shiota, S., Tsuchiya, T., Yoshida, T., (2005). Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, **66**: 2047-2055.
- Hedqvist, H., Mueller-Harvey, I., Reed, J. D., Krueger, C. G., Murphy, M., (2000). Characterisation of tannins and *in vitro* protein digestibility of several *Lotus corniculatus* varieties. *Anim. Feed Sci. Technol.* **87**, 41–56.
- Heldt, H.-W., Piechulla, B., Heldt, F., (2011). Plant biochemistry - 4th ed. / Hans-Walter Heldt, Birgit Piechulla ; in cooperation with Fiona Heldt. Amsterdam. Vert. van: Pflanzenbiochemie. - Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag. : Elsevier Academic Press. **XXIV**, 622 p ill.
- Hellal, B., Ayad, N., Maatoug, M., Boularas M., (2007). Influence du « fatras » sur la biomasse foliaire de l'alfa (*Stipa tenacissima* L.) de la steppe du Sud oranais (Algérie occidentale). *Sécheresse* ;**18** : 65-71.
- Hervas, G., Perez, V., Giraldez, F.J., Mantecon, A.R., Almar, M.M., Frutos, P., (2003). Intoxication of sheep with quebracho tannin extract. *J. Comp. Pathol.* **129** (1), 44-54.
- Hess, H.D., Tiemann, T.T., Noto, F., Carulla, J.E. et Kreuzer, M. (2006a). Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock. *Int. Congress Series* **1293**, 164-167.
- Hess, H.D., Tiemann, T.T., Stürm, C.D., Carulla, J.E., Lascano, C.E. et Kreuzer, M. (2006b). Effects of tannins on ruminal degradation and excretory pattern of N and implications for the potential N emission from the manure. *Int. Congress Series* **1293**, 339-342.
- Hillaire, MC., Jouany, J.P., Fonty, G., (1990). Wheat straw degradation in Rusitec, in the presence or absence of rumen anaerobic fungi. *Proc Nutr Soc.* **49**, 127A.
- Hoffman, P. C., and Bauman, L.M., (2003). Strategies to improve milk yield of lactating dairy cows fed red clover silage. *Prof. Anim. Sci.* **19**:178-187.
- Hoskin, S. O.; Wilson, P. R.; Barry, T. N.; Charleston, W. A. G.; Waghorn, G. C., (2000). Effect of forage legumes containing condensed tannins on lungworm (*Dictyocaulus* sp.) and gastrointestinal parasitism in young red deer (*Cervus elaphus*). *Res.Vet. Sci.* **68**, 223-230.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., Alonso-Diaz, M.A., Brunet, S. and Houzangbe- Adote, S. (2008). Identification and validation of bioactive plants for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Tropical Biomedecine* **25**, 56-72.
<http://www.FAO.org/agp/AGP/AGPC/doc/Publicat/Gutt-shel/x5556eoj.htm>.
- Huhtanen, P., Jaakkola, S., Kukkonen, U., (1995). Ruminal plant cell wall digestibility estimated from digestion and passage kinetics utilizing mathematical models. *Anim. Feed Sci. Technol.* **52**, 159-173.
- Hungate, R.E., (1966). The rumen and its microbes. Academic Press, New York and London.
- Hungate, R.E., (1966a). The rumen bacteria. In : Hungate (ed.) *The rumen and its microbes*. Academic press, **8-90**. 533 p.
- Hungate, R.E., (1966b). The rumen bacteria. In: Hungate, R.E. (Ed.), *The rumen and its microbes*. Academic Press INC, New york and London, pp. 8-10.
- Hussein, S.A.M., Barakat, H.H., Merfort, I., Nawwar, M.A.M., (1997). Tannins from the leaves of *Punica granatum*. *Phytochemistry*, **45**, 819-23.
- Iason G.R., Hartley S.E., Duncan A.J., (1993). Chemical composition of *Calluna vulgaris* (*Ericaceae*): do responses to fertilizer vary with phenological stage. *Biochem. Syst. Ecol.*, **21**, 315-321.
- Iason G.R., Hodgson J., Barry T., (1995). Variation in condensed tannin concentration of a temperate grass (*Holcus Lanatus*) in relation to season and reproductive development. *J. Chem. Ecol.*, **21**, 1103-1112.

- Istasse, L., Gielen, M., Dufrasne, L., Clinquart, A., Van Eenaeme, C., Bienfait, J.M., (1990). Ensilage de maïs plante entière, comparaison de 4 variétés. 2. Performances zootechniques. *Landbouwtijdschrift - Revue de l'Agriculture* **43**, 996-1005.
- Jansman, A. J. M., Frohlich, A. A., Marquardt, R. R., (1994). Production of proline-rich proteins by the parotid glands of rats is enhanced by feeding diets containing tannins from faba beans (*vicia faba* L.). *J. Nutr.* **124**,249.
- Jarrige, R., (1978). Digestion. In *Alimentation des ruminants*. Ed. INRA Publ. Route de Saint-Cyr, 78000 Versailles, 23-45.
- Jarrige, R., (1981). Les constituants glucidiques des fourrages : variations, digestibilité et dosage. In : *Prvision de la Valeur Nutritive des Aliments des Ruminants*. INRA Pubi, Versailles.
- Jayanegara, A., Wina, E., Soliva, C.R., Marquadt, S., Kreuzer, M., Leiber, F., (2011). Dependence of forage quality and methanogenic potential of tropical plants on their phenolic fractions as determined by principal component analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* **163**(2): 231 – 243.
- Jean-Blain, C., (1998). Aspects nutritionnels et toxicologiques des tannins. *Revue de Médecine Vétérinaire.* **149**, 911-920.
- Joblin, K., (1999). Ruminant acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. *Austr. J. Agri. Res.*, **50**, 1307-1313.
- Johns, A.T., (1952). The mechanism of propionic acid formation by *Clostridium propionicum*. *J. Gen. Microbiol.*, **6**, 123–127.
- Johnson, K.A., Johnson, D.E., (1995). Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.*, **73**, 2483-2492.
- Jones, W.T., Mangan, J.L., (1977). Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *J. Sci. Food Agric.*, **28**, 126–136.
- Julkunen-Tiitto, R., (1985). Phenolics constituents in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agr. Food Chem.*, **33**: 213-217.
- Jung, H.G., and Deetz, D.A., (1993). Cell wall lignification and degradability. p. 315-346, In H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield, and J. Ralph, eds. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, USA.
- Jung, H.G., and Engels, F.M., (2002). Alfalfa stem tissues: cell-wall deposition, composition, and degradability. *Crop Sc.* **42**: 524-534.
- Jung, Y.D., and Ellis, L.M., (2001). Inhibition of tumour invasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea. *Int. J. Exp. Pathol* **82**: 309–316.
- Kamalak, A., Canbolat, O., Gurbuz, Y., Erol, A., Ozay, O., (2005b). Effect of maturity stage on chemical composition, *in vitro* and *in situ* dry matter degradation of tumbleweed hay (*Gundelia tournefortii* L.). *Small Rumin. Res.* **58**:149-156.
- Kelman W.M., Tanner G.J., (1990). Foliar condensed tannin levels in *lotus* species growing on limed and unlimed soils in South- Eastern Australia. *Proc. N.Z. Grassland. Assoc.*, **52**, 51-54.
- Khazaal, K., Dentinho, M. T., Ribeiro, J. M., Ørskov, E. R., (1993). A comparison of gas production during incubation with rumen contents *in vitro* and nylon bag degradability as predictors of the apparent digestibility *in vivo* and the voluntary intake of hays. *Anim. Prod.*, **57** (1): 105-112.
- Khazaal, K.A., Boza, J., Orskov, E.R., (1994b). Assessment of phenolic-related antinutritive effects in Mediterranean browse: a comparison between the use of the *in vitro* gas production technique with or without insoluble polyvinylpyrrolidone or nylon bag. *Anim. Feed Sci. Technol.* **49**, 133±149.
- Khazaal, K.A., Orskov, E.R., (1994a). The *in vitro* gas production technique: an investigation on its potential use with polyvinylpyrrolidone for the assessment of phenolic related anti-nutritive factors in browse. *Anim. Feed.Sci. Technol.* **47**, 305±320.

- Kotarski, S.F., Waniska, R.D., Thurn, K.K., (1992). Starch hydrolysis by the ruminal microflora. *J. Nut.*, **122**, 178-190.
- Koupai-Abyazani, M. R., A. D. Muir, B. A. Bohm, G. H. N. Towers., M.Y. Gruber., (1993b). The proanthocyanidin polymers (condensed tannins) in some species of sainfoin (*Onobrychis*). *Phytochemistry* (Oxf.) **34**: 113-117.
- Koupai-Abyazani, M.R., McCallum, J., Muir, A.D., Bohm, B.A., Towers, G.H.N., Gruber M.Y., (1993a). Developmental changes in the composition of proanthocyanidins from leaves of ainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) as determined by HPLC analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1066-1070.
- Krause, D.O., Denman, S.E., Mackie, R.I., Morrison, M., Rae, A.L., Attwood, G.T., McSweeney, C.S., (2003). Opportunities to improve fiber degradation in the rumen : microbiology, ecology and genomics. *FEMS Microb. Rev.*, **27**, 663-693.
- Krishnamurthy, L., Johansen, C., Sethi, S.C., (1999). Investigation of factors determining genotypic differences in seed yield of nonirrigated and irrigated chickpeas using a hysiological model of yield determination. *J. Agron. Crop Sci.* **183**, 9–17.
- Kumara Mahipala, M.B.P., Krebs, G.L., McCafferty, P., Gunaratne, L.H.P., (2009). Chemical composition, biological effects of tannin and in vitro nutritive value of selected browse species grown in the West Australian Mediterranean environment. *Anim. Feed.Sci. Technol.*, **153**: 303-215.
- Landau, S., Silanikove, N., Nitsan, Z., Barkai, D., Baram, H., Provenza, F.D. Perevolotsky, A., (2000). Short-term changes in eating patterns explain the effects of condensed tannins on feed intake in heifers. *Applied Anim. Behaviour Sci.* **69** (3), 199-213.
- Lazarus, S.A., Kelm, M.A., Wächter, G.A., Hamerstone, J.F. and Schmitz, H.H. (2003). Analysis and purification of proanthocyanin oligomers. In „Methods of Polyphenol Analysis“. Santos-Buelga, C. and Williamson, G. Eds. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2003. Chapter 12.
- Le Houerou, H.N., (1981). Impact of man and his animals on mediterranean vegetation. In : DiCastari F, Goodal DW, Spetch RL, eds. *Mediterranean-type shublands*. Amsterdam : Elsevier.
- Le Houérou, H.N., (1989a). The shrublands of Africa. In: *The biology and utilization of shrubs*. McKell, C.M. (ed.), Academic Press. pp. 119–143.
- Le houerou, H.N., (1989b). An assesement of the economic feasibility of fodder shrubs plantations (with particular reference to Africa). In: *The biology and utilization of shrubs*. McKell, C.M. (ed.), Academic Press. pp. 603–629.
- Leathwick, D.M. et Athkinson, D.S., (1996). Influence of different proportions of *Lotus corniculatus* in the diet of lambs on dags, flystrike and animal performance. In: *New Zealand Society of Animal Production*, pp. 99-102.
- Lees G.L., Hinks C.F., Suttill N.H., (1994). Effect of high temperature on condensed tannin accumulation in leaf tissues of big trefoil (*Lotus uliginosus* Schkur). *J. Sci. Food Agric.*, **65**, 415-421.
- Leto, G., Todaro, M., Di Noto, A.M., Alicata, M.L., (2002). Comparaison of Sulla-hay and Sulla-silage in the lacting ewes and their effects on milk and cheese characteristics. *Small Rum. Res.* **45**, 301-306.
- Lewis, D., Elsdén, S.R., (1967). The fermentation of l-threonine, l-serine, l-cysteine and acrylic acid by a Gram-negative coccus. *Biochem J.*, **60**, 683–692.
- Lim, Y. Y., Lim, T. T., Tee, J. J. (2007). Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*, **103**: 1003-1008.
- Longland, A.C., Theodorou, M.K., Sanderson, R., Lister, S.J., Powell, C.J., Morris, P., (1995). Non-starch polysaccharide composition and in vitro fermentability of tropical forage legumes varying in phenolic content. *Anim. Feed Sci. Technol.* **55**: 161-177.

- López S., Carro M.D., Gonzales J.S., Overjero F.J. 1991. Rumen degradation of the main forage species harvested from permanent mountain meadows in Northwestern Spain. *J. Agric. Sci.* **117**, 363-369.
- López, S., Dhanoa, M.S., Dijkstra, J., Bannink, A., Kebreab, E., France, J., (2007). Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* **135**, 139-156.
- López, S., France, J., Dhanoa, M.S., Mould, F., Dijkstra, J., (1999). Comparison of mathematical models to describe disappearance curves obtained using the polyester bag technique for incubating feeds in the rumen. *J. Anim. Sci.* **77**, 1875-1888.
- López, S., Frutos, P., Mantecón, A. R., Giráldez., F. J., (2001). Comparative digestion of herbage by two breeds of sheep: effects of grass maturity stage and level of intake. *Animal Science*, **73**:513-522.
- Lourenço, A.L., G., Dias-da-Silva, A. A., Fonseca, A.J.M., Azevedo, J. T. (2000). Effects of live weight, maturity and genotype of sheep fed a hay-based diet, on intake, digestion and live weight gain. *Lives.Pro. Sci.*, **63**: 297-296.
- Lowry, J.B., Schlink, A.C., Hoffman, D., (1992). Evaluation of three tropical legumes in diets for growing rabbits. *Asi-Aust. J. Ani Science* **5**, 257-259.
- Luigi Stringi., Dario Giambalvo, Gaetano Amato, Giuseppe Di Miceli., (2009). Productivity of an *Atriplex halimus* shrubbery and effects of grazing on lambs. *Ital.J.Anim.Sci.* **8** (Suppl. 2), 549-551.
- Luque, A., Barry, T.N., Mc Nabb, W.C., Kemp, P.D. et Mc Donald, M.F. (2000). The effect of grazing *Lotus corniculatus* during summer-autumn on reproductive efficiency and wool production in ewes. *Aust. J. Agric. Res.* **51**, 385-391.
- Maasdorp, B.V., Muchenje, V. et Titterton, M. (1999). Palatability and effect on dairy cow milk yield of dried fodder from the forage trees *Acacia boliviana*, *Calliandra calothyrsus* and *Leucaena leucocephala*. *An. Feed Sci. Technol.* **77** (1-2), 49-59.
- Maatougui, M.H., (1996). Situation de la culture des fèves en Algérie et perspectives de relance. Rehabilitation of faba bean. Ed. actes, Rabat (Maroc) pp. 17-32.
- MacKie, R.I., White, B.A., (1990). Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism : potential impact on nutrient output. *J. Dairy Sci.*, **73**, 2971-2995.
- Magdalena, L., and Gabryelak, T., (2006). Study of interactions between phenolic compounds and H₂O₂ or Cu(II) ions in B14 hinese hamster cells. *Cell Biology International.*, **30**, 761-768.
- Makkar, H. P. S., (2000). Quantification of Tannins in Tree Foliage. A Laboratory Manual for the FAO/IAEA Co-ordinated Research Project on Use of Nuclear and Related techniques to Develop Simple Tannin Assays for Predicting and Improving the safety and Efficiency of Feeding Ruminants on Tanniniferous Tree Foliage. Joint FAO/IAEA of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Animal Production and Health Sub-programme, FAO/IAEA Working Document. IAEA, Vienna, Austria.
- Makkar, H.P., Dawra, R.K. et Singh, B., (1991). Tannin levels in leaves of some oak species at different stages of maturity. *J. Sci. Food Agric.* **54**, 513- 519.
- Makkar, H.P.S. (2003a). Quantification of Tannins: a laboratory Manual, 2 nd edition, International Center for Agricultural Research in the dry areas, Aleppo, Syria.
- Makkar, H.P.S. (2003b). Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage. A Laboratory Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Makkar, H.P.S. (2003c). Tannin assays, effects and fate of tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich tree and shrub foliage. *Sma. Ru.t Res.*, **49**, 241–256.
- Makkar, H.P.S., (2010). *In Vitro Screening of Plant Resources for Extra-Nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies*. P.E. Vercoe et al. (eds.), Copyright © International Atomic Energy Agency. Published by Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht 2010.

- Makkar, H.P.S., Bluemmel, M., Becker, K., (1995). Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidone and polyethylene glycol with tannins and their implications in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques, *Brit. J. Nutr.* **73** , 897–913.
- Makkar, H.P.S., Bluemmel, M., Borowy, N.K., Becker, K. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods, *J. Sci. Food Agric.* **61** , 161–165.
- Makkar, H.P.S., Goodchild, A.V., (1996). Quantification of tannins: A laboratory manual, 25 pages, Pasture, forage and livestock program, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria.
- Makkar, H.P.S., Singh, B., (1992). Effect of steaming and autoclaving oak (*Quercus incana*) leaves on levels of tannins, fibre and lignin and *in sacco* dry matter digestibility. *J.Sci. Food Agric.*, **59**, 469-472.
- Makkar, H.P.S., Singh, B., (1993). Effect of storage and urea addition on detannification and *in sacco* dry matter digestibility of mature oak (*Quercus incana*). *Anim. Feed Sci. Technol.*, **41**, 247-259.
- Mann, D. L., Goode, L., Pond, K. R., (1987). Voluntary intake, gain, digestibility, rate of Passage and gastrointestinal tract fill in tropical and temperate breeds of sheep. *J. Ani. Science.*, **64**:880-886.
- Manso, T., Castro, T., Mantecón, A. R., Rodríguez, G. and Falagán, A. (1999). Rumen degradation of shrub communities from semi-arid lands in the Southeast of Spain in two sheep genotypes (Segureña vs. Merino).] *Archivos de Zootecnia.* **48**: 95-100.
- Manzke, V., Munchow, H., Befzin, B., Hasselmann, I., (1997). Investigations of digestive and metabolic mechanisms of adaption of several breeds of sheep and goats to malnutritional conditions. *Int. J.Mamm. Bio.*, **62**:124.
- Marais, J.P.J., Mueller-Harvey, I., Brandt, E.V., Terreira, D., (2000). Polyphenols, condensed tannins and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (Sainfoin). *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3440–3447.
- Marinucci M.T., Dehority B.A., Loerch S.C., (1992). *In vitro* and *in vivo* studies of factors affecting digestion of feeds in synthetic fiber bags. *J. Anim. Sci.*, **70**, 296-307.
- Marounek, M., Bartos, S., Kalachnyuk, G.I, (1982). Dynamics of the redox potential and rH of the rumen fluid of goats. *Physiologia Bohemoslovaca.*, **31**, 369-374.
- Marshall, R.A.,(1949). The digestion of pentosans in hay by sheep. *Br J Nutr.*3(1):1–1.
- Martin C, Millet L, Fonty G, Michalet-Doreau, B (2001). Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial community with rumen solid digesta. *Reprod. Nutr. Dev.*, **41**, 413-424.
- Martin, C., Morgavi, D., Doreau, M., Jouan, J.P., (2006). Comment réduire la production de méthane chez les ruminants ? *Fourrages* , **187**, 283-300.
- Mauricio, R.M., Mould, F.L., Dhanoa, M.S., Owen, E., Channa, K.S., Theodorou, M.K., (1999). A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.* **79**, 321–330.
- Mbhata, K.R., Downs, C.T. et Nsahlai, I.V. (2002). The effect of graded levels of dietary tannin on the epithelial tissue of the gastro-intestinal tract and liver and kidney masses of boer goats. *Anim. Sci.* **74**, 579-586.
- Mc Sweeney, C.S., Collins, E.M.C., Blackall, L.L., Seawright, A.A., (2008). A review of antinutritive factors limiting potential use of *Acacia angustissima* as a ruminant feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* **145** (1-4), 271-284.
- Mc Sweeney, C.S., Palmer, B., Mc Neill, D.M. et Krause, D.O., (2001). Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* **91** (1-2), 83-93.

- McAllister T.A., Bae, H.D., Yanke, L.J., Cheng K.J., Muir A., (1994b). Effect of condensed tannins from birdsfoot trefoil on the endoglucanase activity and the digestion of cellulose filter paper by ruminal fungi. *Can. J. Microbiol.*, **40**, 298-305.
- McAnally, R.A., (1942). Digestion of straw by the ruminant. *Biochem J.* **36**(3-4):392–399.
- McCaughy, W.P., Wittenberg K., Corrigan D., (1999). Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. *Can. J. Anim. Sci.*, **79**, 221-226.
- McNabb, W.C., Waghorn, G.C., Barry, T.N., Shelton, I.D., (1993). The effect of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on the digestion and metabolism of methionine, cystine and inorganic sulphur in sheep. *Br. J. Nutr.* **70**:647.
- Mehansho, H., Butler, L. G., Carlson, D. M., (1987). Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: Interactions, induction and defense mechanisms. *Ann. Rev. Nutr.* **7**:423.
- Menke, K. H. and 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**. pp. 7-55.
- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. and Schneider, W., (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. agric. Sci.*, **93**: 217-222.
- Merzak, S. (1990). Contribution à la définition d'une utilisation appropriée des parcours à Armoise dans l'Oriental. Mémoire de fin d'étude de l'institut Agronomique et Vétérinaire, Hassan II, Rabat.
- Micek, P., Kulig, B., Woźnica, P., Sajdak, A., (2012). The nutritive value for ruminants of faba bean (*Vicia faba*) seeds and naked oat (*Avena nuda*) grain cultivated in an organic farming system. *J. An. and Feed Sciences*, **21**, 773-786.
- Michalet-Doreau, B et Ould-Bah, M.Y., (1992). *In vitro* and *in sacco* methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen: a review. *Anim Feed Sci Technol* **40**, 57–86.
- Michalet-Doreau, B., et P. Nozière, P., (1999). Intérêts et limites de l'utilisation de la technique des sachets pour l'étude de la digestion ruminale. *INRA Prod. Anim.* **12** (3), 195-206.
- Michalet-Doreau, B., Fernandez, I., Peyron, C., Millet, L., (2001). Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reprod. Nutr. Dev.*, **41**, 187-194.
- Miller, P.R. and Ehlke, N.J., (1996). Condensed tannins in birdsfoot trefoil: genetic relationships with forage yield and quality in NC-83 germplasm. *Euphytica* **92**: 383–391.
- Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T., McNabb, W.C., (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages : a review. *An Feed Sci Tech.* **106**, p. 3-19.
- Min, B. R. and Hart, S.P., (2002). Tannins for suppression of internal parasites. *J. Ani. Science* **81**, 102-109.
- Minato, H., Endo, A., Ootome, Y., Uemura, T., (1966). Ecological treatise on the rumen fermentation. II. The amylolytic and cellulolytic activities of fractionated bacterial portions attached to the rumen solids. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **12**:53-61.
- Minneé, E.M.K., Woodward, S.L., Waghorn, G.C., Laboyrie, P.G., (2002). The effect of ensiling forage legumes on condensed tannins. *Agron. N.Z.* 32/33, 117-119.
- Minson, Dennis J., (1990). Forage in Ruminant Nutrition. Academic Press, Inc., NY.
- Mlambo, V., Mould, F.L., Smith, T., Owen, E., Sikosana, J.L.N., Mueller-Harvey I., (2009). *In vitro* biological activity of tannins from *Acacia* and other tree fruits: Correlations with colorimetric and gravimetric phenolic assays. *S. Afr. J. Anim. Sci.* **39**, 131-143.
- Mlambo, V., Sikosana, J.L.N., Mould, F.L., Smith, T., Owen, E. et Mueller-Harvey, I. (2007). The effectiveness of adapted rumen fluid versus PEG to ferment tannin-containing substrates *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* **136** (1-2), 128-136.

- Mole S., Waterman P.G., (1987). Tannic acid and proteolytic enzymes : enzyme inhibition or substrate deprivation. *Phytochemistry*, **26**, 99- 102.
- Molina-Alcaide, E., Martín-García, A. I., Aguilera, J. F., (2000). A comparative study of nutrient digestibility, kinetics of degradation and passage and rumen fermentation pattern in goats and sheep offered good quality diets. *Livest. Prod. Sci.* **64**:215–223.
- Molle, G., Decandia, M., Fois, S., Ligios, S., Cabiddu, A. et Sitzia, M. (2003). The performance of Mediterranean dairy sheep given access to sulla (*Hedysarum coronarium L.*) and annual ryegrass (*Lolium rigidum Gaudin*) pastures in different time proportions. *Small Rumin. Res.* **49**, 319-328.
- Monagas, M., Quintanilla-López, J.E., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Lebrón-Aguilar, R., (2010). MALDI-TOF MS analysis of plant proanthocyanidins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **51**: 358–372.
- Moore, K.M., Barry, T.N., Cameron, P.N., Lopez-Villalobos, N. et Cameron, D.J. (2003). Willow (*Salix sp.*) as a supplement for grazing cattle under drought conditions. *Anim. Feed Sci. Technol.* **104** (1-4), 1-11.
- Mueller-Harvey, I. and McAllan, A.B., (1992). Tannins - their biochemistry and nutritional properties. In I.M. Morrison, ed. *Advances in plant cell biochemistry and biotechnology*, Vol 1, 151-217. JAI Press, London.
- Mueller-Harvey, I., (2001). Analysis of hydrolysable tannins - a review. *Animal Feed Science Technology.* **91**, (1–2), 3-20.
- Mueller-Harvey, I., (2006). Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, **86**, 2010-2037.
- Mulas, M., et Mulas, G., (2004). Potentialités d'utilisation stratégique des plantes des genres *Atriplex* et *Opuntia* dans la lutte contre la désertification. Short and Medium- Term Priority Environmental Action Programme (SMAP).
- Nefzaoui, A., Chermiti, A., (1991). Place et rôles des arbustes fourragers dans les parcours des zones arides et semi-arides de la Tunisie. *Options Méditerranéennes - Série Séminaires – N° 16* : 119-125.
- Newbold C.J., Lopez S., Nelson N., Ouda J.O., Wallace R.J., Moss A.R., (2005). Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation in vitro. *Brit. J. Nutr.*, **94**(1), 27-35.
- Nicolie J.A., Javanivic M., Zeremsk. (1987). Application of modified *in vitro* procedure in the prediction of organic matter digestibility of feed stuffs for ruminants. *Acta. Vetrenaria (Beograd)*. **37**: 3-12 p.
- Niderkorn, V., Martin, C., Le Morvan, A., Rochette, Y., Brison, A., Baumont, R., (2011). Effect of increasing proportion of alfalfa in alfalfa-ryegrass mixed diets on intake, digestion and methane emissions in sheep. Proc. 8th Int. Symp. Nut. Herb., 6-9 septembre, Aberystwyth, Royaume-Uni, 563.
- Nitis, I.M., (1992). Fodder shrubs and trees in smallholder farming systems in the tropics. In: *Proceedings of a Workshop on Natural Resource Development and Utilization*. Commission of European Communities, DG XII, Brussels. pp. 36-51.
- Njidda, AA. and A. Nasiru, A., (2010). *In vitro* Gas Production and Dry Matter Digestibility of Tannin-Containing Forages of Semi-Arid Region of North-Eastern Nigeria. *Pakistan J.Nutr*, **9**: 60-66.
- Norton, B.W (2003). The nutritive value of tree legumes In: Forage Tree Legumes in Tropical Agriculture. Gutteridge R G and Shelton H M (Editors).
- Norton, B.W., (1999). The significance of tannins in tropical animal production. In: *Tannins in livestock and human nutrition*, ACIAR proceedings N.92 (BROOKER, ed.), pp.14-23 Adelaide, Australia.

- Nozière, P., et Michalet-Doreau, B., (1996). Validation of *in sacco* method: influence of sampling site, nylon bag or rumen contents, on fibrolytic activity of solid-associated microorganisms. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **57**, 203-210.
- Oba, M and Allen, M., (1997). Evaluation and the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage. Effects on dry matter intake and milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **82**:589.
- Odongo, N.E., Bagg, R., Vessie, G., Dick P., Or-Rashid, M.M., Hook, S.E., Gray, J.T., Kebreab, F., France J., McBride B.W., (2007). Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **90**, 1781-1788.
- Olubobokun J.A., Craig, W.M., Pond, K.R., (1990). Effects of mastication and microbial contamination in ruminal *in situ* forage disappearance. *J. Anim. Sci.*, **68**, 3371-3381.
- Osuga, I.M., Maindi, C.N., Abdulrazak, S.A., Nishino, N., Ichinohe, T., Fujihara, T., (2007). Potential nutritive value and tannin bioassay of selected *Acacia* species from Kenya. *J. Sci. Food. Agr.* **87**, 1533-1538.
- Ouffroukh, A. et Aggad H., (1996). Contribution à la connaissance des maladies à virus des légumineuses alimentaires : état actuel sur les recherches des viroses affectant la fève (*Vicia faba* L.) en Algérie. *Céréaliculture, Inst. techn. gr. cult. (I.T.G.C.)*, (**29**) : 35 - 38.
- Ould-Bah, M.Y., (1989). Adaptation de la technique *in sacco* à l'étude de la dégradation dans le rumen de l'azote des fourrages et application à l'étude des fourrages verts et conservés. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier, 186p.
- Pagan, S., Wolfe, R.M., Terrill, T.H., Muir, J.P., (2009). Effect of drying method and assay methodology on detergent fiber analysis in plants containing condensed tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **154**, 119-124.
- Palmer, B., Jones, R.J., (2005). In vitro digestion studies using ¹⁴C-labelled polyethylene glycol (PEG): the effect of sample pretreatment on dry matter and nitrogen digestibility as well as PEG binding of *Calliandra calothyrsus* *Anim. Feed Sci. Technol.* **86** (2000) 149±155.
- Palmer, B., McSweeney, C., (2000). Tannins in *Calliandra calothyrsus*: effect of polyethylene glycol (PEG) and an evaluation of 19 accessions. In: Brooker, J.D. (Ed.), Tannins in Livestock and Human Nutrition. Proceedings of the International Workshop, Adelaide, Australia, May 31–June 2, 1999. *ACIAR Proceedings.* **92**, 36–39.
- Paolini, V., Fouraste, I. and Hoste, H. (2004). *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin on third-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology*, **129**, 69-77.
- Paterson, J., Cohran, R., Klopfenstein, T., (1996). Degradable and undegradable protein response of cattle consuming forage-based diets. Proceedings of the third grazing livestock nutrition conference. Iudkins M.B., Mc Collum III F.T (Eds.), *proc. West.Sec. Am. Soc. Anim. Sci.* **47** (Suppl.1), 94-103.
- Patra, J. K., Rath, S. K., Jena, K., Rathod, V.K., Thatoi, H.N., (2008). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of seaweed (*Sargassum* sp.) extract: A study on inhibition of Glutathione-S-transferase activity. *Turkish J. Biol.* **32**, 119-125.
- Paynter, M.J.B., Hungate, R.E., (1968). Characterization of *Methanobacterium mobilis*, sp. Isolated from the bovine rumen. *J. Bacteriol.*, **95**, 1943-1951.
- Pelmont G., (1993). Bactéries et environnement. In : EDP Sciences Editeur : Les bactéries pour les technologies de l'environnement, 15-68.
- Peng, Y., (2005). Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J.Pha. Biom. Analy*, Fujian/Shanghai, v. **39**, n. 3-4, p. 431-437.
- Perevolotsky, A., Landau, S., Silanikov, N., Provenza, F., (2006). Upgrading tannin-rich forages by supplementing ruminants with polyethylene glycol (PEG). In: *Herbivores: assessment of*

- intakes, digestibility and the roles of secondary compounds*, SANDOVAL-CASTRO, HOVELL, TORRES-ACOSTA et AYALA-URGOS (Eds.), Nottingham, UK, pp. 221-234.
- Pharmacopée européenne., (2011). 7.0-Tom1 (2.8.14) EDQM. Conseil de l'Europe Strasbourg, France.
- Pilluzza, G., Bullita, S., Deroma, M., Odoardi, M., (2000). The accumulation of condensed annins in local populations of sulla. *Cahiers Options Méditerranéennes*, **45**, 199-202.
- Plumlee, K.H., Johnson, B., Galey, F.D., (1998). Disease in cattle dosed orally with oak or tannic acid. In: Toxic plants and other natural toxicants, (Garland T. and Barr A.C., eds.), CAB International, Wallingford, UK, pp. 549-553.
- Pond, K.R., Ellis W.C., Lascano, C.E., Akin, D.E., (1987). Fragmentation and flow of grazed coastal bermuda grass through the digestive tract of cattle. *J. Anim. Sci.*, **65**, 609- 618.
- Popova M, Morgavi D.P., X Doreau V, Martin C. (2011). Production de méthane et interactions microbiennes dans le rumen. *Productions Animales*, numéro 5. INRA.
- Porter, L.J., Hrstich, L.N., Chan, B.G., (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidins and delphinidin. *Phytochemistry*, **1**, 223-230.
- Preston, T. R and Leng, R. A., (1986). Matching livestock production systems to available resources. ILCA, Addis Ababa, Ethiopia. 331 pp.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M., (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, **36**, 781-784.
- Rakhmania, S., J.D. Brooker, J.D., G.P. Jones, G.P., Palmer, B., (2005). Composition of condensed tannins from *Calliandra calothyrsus* and correlation with in sacco digestibility *Anim. Feed.Sci. Technol.* **121**, 109-124.
- Ramírez-Restrepo, C.A. et Barry, T.N., (2005). Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. *An. Feed Sci. Technol.* **120** (3-4), 179-201.
- Ranilla, M. J., Carro, M. D., Giráldez, F. J., Mantecón, A. R. and González, J. S., (2000). Comparison of rumen fermentation patterns and in vitro degradation of grazed herbage in Churra and Merino sheep. *Livestock Production Science* **62**:193-204.
- Ranilla, M. J., Carro, M. D., Valdés, C., Giráldez, F. J. and López, S., (1997). A comparative study of ruminal activity in Churra and Merino sheep offered alfalfa hay. *Ani. Science* **65**:121-128.
- Reed, J. D., (1995). Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Ani. Sci.*, **73**, 1516-1528.
- Reed, J.D., (1986). Relationship among soluble phenolics, insoluble proanthocyanidins and fibre in East African browse species. *Journal of Range Management*. **39** (1):5-7.
- Remond B., Brugere H., Poncet C., Baumont R., (1995). Le contenu du réticulo-rumen. In: R. Jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M.H. Farce and M. Journet (ed.) : *Nutrition des Ruminants Domestiques*, INRA, Paris, 253-298.
- Rémond, D., Aufrère, J., Bernard, L., Poncet, C., Peyronnet, C., (1997). Nitrogen value of protein rich leguminous seeds : ruminal degradability of raw and extruded pea, and lupin. *Renc. Rech. Ruminants*, **4**: 133-136.
- Rettigner, C., (1999). Détermination *in sacco* de la dégradabilité de la matière sèche, des protéines brutes, des fibres brutes et de la matière organique de différents aliments d'origine tropicale destinés au bétail. Travail de fin d'étude, Université de Liège.
- Richelle, M., Tavazzi, I., Offord, E., (2001). Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa and tea) prepared per cup serving. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 3438-3442.
- Rochette, Y., Fabre, M., Jouany, J.P., Martin, C., (2005). Procédure de vérification du système de collecte de méthane émis par les ruminants. *Cah. Tech. INRA*, **54**, 3-10.
- Rochfort, S., Parker, A.J. et Dunshea, F.R. (2008). Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*, **69** (2), 299-322.

- Rogosic, J., Estell, R.E., Ivankovic, S., Kezic, J. et Razov, J. (2008). Potential mechanisms to increase shrub intake and performance of small ruminants in mediterranean shrubby ecosystems. *Small Rum. Res.* **74** (1-3), 1-15.
- Rogosic, J., Pfister, J.A., Provenza, F.D. et Grbesa, D. (2006). Sheep and goat preference for and nutritional value of Mediterranean maquis shrubs *Small Rum. Res.* **64** (1-2), 169-179.
- Roque, J.L., (1991). Anomalies de la digestion microbienne ruminale. Aspects pathologiques. Thèse Med. Vet., Toulouse. 99 p.
- Ross, M.D, and Jones, W.T., (1983). A genetic polymorphism for tannin production in *Lotus corniculatus* and its relationship to pyranide polymorphism. *Theor Appl Genet* ., **64**:263-268.
- Rubanza, C.D.K., Shem, M.N., Otsyina, R., Bakengesa, S.S., Ichinoche, T., Fujihara, T. (2005). Polyphenolics and tannins effects on *in vitro* digestibility of selected Acacia species leaves. *Anim. Feed Sci. Technol.* **119** (1-2), 129-142.
- Rubanza, C.D.K., Shem, M.N., Otyina, R., Nishino, N., Ichinohe, T., Fujihara, T., (2003). Content of phenolics and tannins in leaves and pods of some *Acacia* and *Dichrostachys* species and effects on *in vitro* digestibility. *J. Anim Feed Sci.*, **12**: 645-663.
- Russel, J.B., Hino, T., (1985). Regulation of lactate production in *S. bovis* : a spiraling effect that contributes to rumen acidosis. *J Dairy Sci.*, **68** (7) 1712-1721.
- Russell, J.B., Strobel, H.J., (1993). Microbial energetics. In: J.M. Forbes and J. France (ed.) : Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism, Cab International, Wallingford, 165-186.
- Russell, J.B., Wallace R.J., (1988). Energy yielding and consuming reactions. In: P.N. Hobson and R.J. Wallace (ed.) (1989). *The Rumen Microbial Ecosystem*, Elsevier Applied Science, London, 185-216.
- Russell, J.B., Wallace, R.J., (1989). Energy yielding and consuming reactions. In: P.N. Hobson and R.J. Wallace (ed.): *The Rumen Microbial Ecosystem*, Elsevier Applied Science, London, 185-216.
- Salawu, M.B., Acamovic, T., Stewart, C.S., Hovell, F.D.D., Mc Kay, I., (1997). Assessment of the nutritive value of *Calliandra calothyrsus*: *in sacco* degradation and *in vitro* gas production in the presence of Quebracho tannins with or without Browse Plus. *Anim. Feed Sci. Technol.* **69** (1), 219-232.
- Sales, M., Lucas, F., Blanchart, G., (2000). Effects of ammonia and amino acids on the growth and proteolytic activity of three species of rumen bacteria : *Prevotella albensis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, and *Streptococcus bovis*. *Curr. Microb.*, **40**, 380-386.
- Sandoval-Castro, C.A., Lizarraga-Sánchez, H.L. and Solorio-Sánchez, F.J., (2005). Assessment of tree fodder preference by cattle using chemical composition, *in vitro* gas production and *in situ* degradability. *Anim. Feed Sci. Technol.* **123-124**: 277-289.
- Satge, B., (1993). Le pH du rumen étude bibliographique. Thèse Med. Vet. Toulouse. 200p.
- Sauer, F.D. and Teather, R.M. (1987). Changes in oxidation reduction potentials and volatile fatty acid production by rumen bacteria when methane synthesis is inhibited. *Journal of Dairy Science* **70**, 1835-40.
- Sauvant, D., (1993). La production de méthane dans la biosphère : le rôle des animaux d'élevage. *Courrier de la cellule Environnement INRA*, **18**, 67-70.
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., (2007). "Empirical modelling by meta-analysis of digestive interactions and CH₄ production in ruminants". In *Energy and Protein Metabolism and Nutrition* (I. Ortigues-Marty Ed), Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, pp.561-562.
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., (2009). Modélisation des interactions digestives et de la production de méthane chez les ruminants. *INRA Prod. Anim.*, **22**, 375-384.
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Serment, A., Broudiscou L., (2011). Influences des régimes et de leur fermentation dans le rumen sur la production de méthane par les ruminants. In : *Gaz à*

- effet de serre en élevage bovin : le méthane. Doreau M., Baumont R., Perez J.M. (Eds). Dossier, *INRA Prod. Anim.* **24**, 433-446.
- Sauvant, D., Schmidely, P., Daudin, J. J., St-Pierre, N. R., (2008b). Meta-analyse of experimental data in animal nutrition. *Animal*, **2**, 1203-1214.
- Schäfer, G., Engelhard, M., Müller, V., (1999). Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 570-620.
- Scharenberg, A., Arrigo, Y., Gutzwiller, A., Wyss, U., Hess, H., Kreuzer, M., Dohme, F., (2007). Effect of feeding dehydrated and ensiled tanniferous sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on nitrogen and mineral digestion and metabolism of lambs. *Arch. Anim. Nutr.*, **61**, 390-405.
- Schofield P., Mbugua D.M., Pell A.N., (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Anim Feed Sci Tech.*, **91**, 21-40.
- Schofield, P., (2000). Gas production methods. Pages 209-232 in Farm Animal Metabolism and Nutrition. J. P. F. D'Mello, ed. CAB International, Wallingford, Oxon, U.K.
- Sebek, L.B.J. and Everts, H., (1999). *In situ* rumen degradation of dry matter and crude Protein in ewes and dairy cows. *Ani. Science.* **68**: 801-808.
- Seigler, S.D., (2009).** Handbook of natural colorants. Edited by Thomas Bechtold, Rita Mussak. John Wiley and Sons, Ltd.
- Seresinhe, T. and Pathirana, K.K., (2000).** Associative effects of tree legumes and cutting height on the yield and nutritive value of *Panicum maximum* (cv VRI 435) *Tropical Grasslands.*, **34** (2) 103-109.
- Shabtay, A., Eitam, H., Tadmor, Y., Orlov, A., Meir, A., Weinberg, P., Weinberg, Z.G., Chen, Y., Brosh, A., Izhaki, I. and Kerem, Z. (2008). Nutritive and antioxidative potential of fresh and stored pomegranate industrial waste as a novel beef cattle feed. *J. Agric. Food Chem.* **56**(21):10063-10070.
- Sharp, R., Ziemer, C.J., Marshall, D.S, Stahl, D.A., (1998). Taxon-specific associations between protozoal and methanogens populations in the rumen and a model system. *FEMS Microb. Ecol.*, **26**, 71-78.
- Siaw, D.E.K.A., Osuji, P.O., Nsahlai, I.V., (1993). Evaluation of multipurpose tree germplasm: the use of gas production and rumen degradation characteristics. *J. Agri. Science*, Cambridge, **120**:319-330.
- Silanikove, N., Nitsan, Z., Perevolotsky, A., (1994). Effect of daily supplementation with polyethylene glycol on intake and digestion of tannin-containing leaves (*ceratonia siliqua*) by sheep. *J. Agri. Food Chem.*, **42**, 2844-2847.
- Silva, A.T., Wallace, R.J., Orskov, E.R., (1987). Use of particle- bound microbial enzyme activity to predict the rate and extent of fibre degradation in the rumen. *Br. J. Nutr.*, **57**, 407-415.
- Singh, B., Bhat, T.K. et Sharma, O.P. (2001). Biodegradation of tannic acid in an *in vitro* ruminal system. *Livestock Prod. Sci.* **68** (2-3), 259-262.
- Skillman, L.C., Evans, P.N., Strömpl, C, Joblin, K.N., (2006). 16S rDNA directed PCR primers and detection of methanogens in the bovine rumen. *Lett. Appl. Microb.*, **42**, 222-228.
- Slyter, L.L., (1976). Influence of acidosis on rumen function. *J Anim. Sci.*, **43**, 910-929.
- Smith, P.H and Hungate, R.E., (1958). Isolation and characterization of Methanobacterium ruminantium n. sp. *J. Bacteriol.*, **75**, 713-718.
- Song, J.M., Lee, K.H., Seong, B.L., (2005). Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Res.* **68** (2), 66-74.
- Spear, J.W., (1994). Mineral in forages. In: Forage quality, Evaluation and utilization. Faher J.R. (Eds.), National Conference on Forage Quality, Lincoln. pp, 281-317.
- Statistical Analysis System Institute Inc. (1990). SAS/STAT® user's guide Int **Vol. 1**, version 6, Fourth Edition, Cary, NC, USA.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., (1980). Principles and Procedures of Statistics. McGraw-Hill, New York. Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J., 1994. A

- simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* **48**, 185–197.
- Stewart, C.S., Flint, H.J., Bryant, M.P., (1997). The rumen bacteria. The rumen microbial ecosystem. In : Hobson PN, and Stewart C.S. (Eds), London, Blackie Academic and Professional, UK, pp. 10-72.
- Stewart, C.S., Bryant, M.P., (1988). The rumen bacteria. In : Hobson PN, editors. *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Science Publisher, New York, 21-75. 527 p.
- Tavendale, M.H., Lane G. A., Schreurs N.M., Fraser K., Meagher L.P. (2005). “The effects of condensed tannins from *Dorycnium rectum* on skatole and indole ruminal biogenesis for grazing sheep”, *Austr. J. Agr. Res.*, **56**, 1331-1337.
- Terril, T.H., Rowan, A.M., Douglas, G.B., Barry, T.N., (1992b). Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *J Sci Food Agric.*, **58**, 321-329.
- Theodoridou K., Aufrère J., Andueza D., Lemorvan A., Picard F., Pourrat J., Baumont R., (2012). Effect of condensed tannins in wrapped silage bales of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on *in vivo* and *in situ* digestion in sheep. *Animal*, **6**, 245-253.
- Theodoridou K., Aufrère J., Andueza D., Lemorvan A., Picard F., Stringano E., Stringano E., Pourrat J., Mueller-Harvey I., Baumont R., (2011a). Effect of plant development during first and second growth cycle on chemical composition, condensed tannins and nutritive value of three sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) varieties and Lucerne. *Grass Forage Sci.*, **66**, 402-414.
- Theodoridou K., Aufrère J., Niderkorn V., Andueza D., Lemorvan A., Picard F., Baumont R., (2011b). *In vitro* study of the effects of condensed tannins in sainfoin on the digestive process in the rumen at two vegetation cycles. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **170**, 147-159.
- Theodorou, M.K., Barahona, R., Kingston-Smith, A., Sanchez, S., Lascano, C., Owen, E., Morris, C. (1999). News perspectives on the degradation of plant biomass in the rumen in the absence and presence of condensed tannins. In: *Tannins in livestock and human nutrition : ACIAR Proceedings* (BROOKER, ed.), Camberra, Australia.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J., (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* **48**, 185±197.
- Tiemann, T.T., Lascano, C.E., Wettstein, H-R., Mayer, A.C., Kreuzer M., Hess, H.D., (2008). Effect of the tropical tannin-rich shrub legumes Calliandra calothyrsus and Flemingia macrophylla on methane emission and nitrogen and energy balance in growing lambs. *Animal* **2**: 790–799.
- Tilley J.M.A and Terry R.A., (1963). A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Brit. Grassl. Soc.* **18**, 104-111.
- Tiret, L., (2001). Physiologie de la digestion. Polycopié, Ecole Nationale Vétérinaire d’Alfort, Unité Pédagogique de Physiologie et Thérapeutique. 69 p.
- Tolera, A., Khazaal, K., Ørskov, E. R., (1997). Nutritive evaluation of some browses species. *Anim. Feed Sci. and Technol.* **67**: 181-195.
- Topps, J.H., (1998). Study of protein-rich forages for their nutritional characteristics as supplementary feeds for ruminants in the semi-arid tropics. Summary reports of European Commission supported STD-3 projects (1992-1995). CTA.6p.
- Topps, J. H., (1997). Forage legumes as protein supplements to poor quality diets in the semi-arid tropics. In: Wallace, R.J and Lahloukassi, A. (Eds.), Rumen Ecology Research Planning. Proceedings of workshop held at ILRI, 13-18 March 1995, Addis Ababa, Ethiopia.
- Treutter D., (1989). *Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4 dimethylaminocinnamaldehyde*. *Journal of Chromatography.*, **467**:185-193.
- Vaithyanathan, S. and Singh, M., (1989). Seasonal changes in tannin contents in some top feeds in arid region. *Indian Journal of Animal Science.*, **59**: 1565–1567.

- Van Nevel, C. J and Demeyer, D.I., (1981). Effect of methane inhibitors on the metabolism of rumen microbes *in vitro*. *Arch. Tierernäh.*, **31**, 141-51.
- Van Dorland, H.A., Wettstein, H.R., Leuenberger, H., Kreuzer, M., (2007). Effect of supplementation of fresh and ensiled clovers to ryegrass on nitrogen loss and methane emissions in dairy cows. *Livest. Sci.*, **111**, 57-69.
- Van Soest, P.J. Robertson, J.B.; Lewis, B.A., (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J.Dai.Sci*, **74**, .3583-3597.
- Van Soest, P.J., (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Van Soest, P.J., Wine, R.H., Moore, L.A., (1966). Estimation of the true Digestibility of forages by the *in vitro* digestion of cell walls. Proceedings of, The Xth International Grassland Congress, Helsinki. Finish Grassland Association., pp 438-441.
- Vermorel , M., (1995). « Emissions annuelles de méthane d'origine digestive par les bovins en France. Variations selon le type d'animal et le niveau de production », *INRA Prod Anim.*, **8**, .265-272.
- Vermorel, M., Jouany, J.P., Eugène, M., Sauvant, D., Noblet, J., Dourmad J.Y., (2008). Evaluation quantitative des émissions de méthane entérique par les animaux d'élevage en 2007 en France. *INRA Prod. Anim.*,**21**, 403-418.
- Villalba, J. J., and Provenza, F. D., (2001). *Preference for polyethylene glycol by sheep fed a quebracho tannin diet*. *J. Anim. Sci.* **79**:2066–2074.
- Vitti, D.M.S.S., Abdalla, A.L., Bueno, I.C.S., Silva Filho, J.C., Costa, C., Bueno, M.S., Nozella, E.F., Longo, C., Vieira, E.Q., Cabral Filho, S.L.S., Godoy, P.B.; Mueller-Harvey, I., (2005). Do all tannins have similar nutritional effects? a comparison of three brazilian fodder legumes. *Anim. Feed Sci. Technol.***119**, 345-361.
- Waghorn, G. et Mc Nabb, W.C. (2003). Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proc. Nutr. Soc.* **62**, 383-392.
- Waghorn, G., (2008). Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, **147**, 116-139.
- Waghorn, G.C., Clark, D.A., (2006). "Greenhouse gas mitigation opportunities with immediate application to pastoral grazing for ruminants", Soliva C.R., Takahashi J., Kreuzer M. eds., *Greenhouse Gases and Animal Agriculture*, Elsevier Science B.V.
- Wallace, R.J., (1986). Ecology of Rumen Microorganisms : Protein Use. *In* : Dobson A, Dobson MJ (eds). *Aspect of digestive physiology of ruminants*. Ithaca, New York (USA) : Comstock Publishing Associates, 99-116. 311 p.
- Wallace, R.J., Cotta, M.A., (1988). Metabolism of nitrogen-containing compound. *In* : Hobson PN, editors. *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Science Publishing, New York, 217-249. 527 p.
- Wallnofer, P., Baldwin, R.L., (1966). Pathway of propionate formation in *Bacteroides ruminicola*. *J. Bacteriol.*, **93**, 504-505.
- Wanderley, W.L. Ferreira, M.A. Andrade, D.K.B., (2002). Palma forrageira (*Opuntia ficus indica*, Mipp) em substituição à silagem de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.)) na alimentação de vacas leiteiras. *Revi. Brasil. Zoot.*, **31**, n.1, p.273-281.
- Waterman, P.G., (1999). The tannins - An overview. *In: Tannins in Livestock and Human Nutrition. Proceedings of an International Workshop*, BROOKER (Ed.), Adelaide, Australia, pp. 10-13.
- Wattiaux, M.A., Mertens, D.R., Satter, L.D., (1992). Kinetics of hydration and effect of liquid uptake on specific gravity of small hay and silage particles. *J. Anim. Sci.*, **70**, 3597-3606.
- Weimer, P.J., (1993). Microbial and molecular mechanisms of cell wall degradation – Session synopsis. *In* : Forage cell wall structure and digestibility, eds Jung H.G., Buxton D.R., Hatfield R.D., Ralph J., Madison, USA, 485- 498.

- Weimer, P.J., (1998). Manipulating Ruminant Fermentation: A Microbial Ecological Perspective. *J. Anim. Sci.*, **76**, 3114–3122.
- Weimer, P.J., Waghorn, G.C., Odt, C.L., Mertens, D.R., (1999). Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating cows. *J Dairy Sci.*, **82**, 122-134.
- Weisshaar, B., and Jenkins, G.I., (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, **1**(3), 251-257.
- Weston R.H., (1982). In Nutritional limits to animal production from pasture. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, I 83-1 98.
- Whitford, M.F., Teather, R., Forster, R.J., (2001). Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microb.*, **1**, 5.
- Williams, A. G., Coleman, G. S., (1992). The Rumen Protozoa. Springer-Verlag, New York.
- Williams, A. P., and J. E. Cockburn., (1991). Effect of slowly and rapidly degraded protein sources on the concentrations of amino acids and peptides in the rumen of steers. *J. Sci. Food Agric.***56**:303–314.
- Williams, A.G., Coleman, G.S., (1985). Hemicellulose degrading enzymes in rumen ciliates protozoa. *Curr. Microbiol.*, **12** : 85-99.
- Wolin, M.J., (1960). A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sci.* **43**, 1452–1459.
- Woodward, A and Coppock, D.L., (1995). Role of plant defense in the utilization of native browse in southern Ethiopia. *Agroforestry Systems* **32** (2), 147-161.
- Woodward, A., and J.D. Reed., (1997). Nitrogen metabolism of sheep and goats consuming *Acacia brevispica* and *Sesbania sesban*. *J. Anim. Sci.* **75**:1130-1139.
- Wozny, M.A., Bryant, M.P., Holdeman, L.V., Moore, W.E.C., (1977). Urease assay and ureaseproducing species of anaerobes in the bovine rumen and human feces. *Appl. Environ. Microb.*, **33**(5), 1097-1104.
- Yamaguchi, T., Nishifuji, K., Sasaki, M., Fudaba, Y., Aepfelbacher, M., Takata, T., Ohara, M., Komatsuzawa, H., Amagai, M. and Sugai, M., (2002). Identification of the *Staphylococcus aureus* etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infection and Immunity* **70**:5835-5845.
- Yanagita, K., Kamagata, Y., Kawaharasaki, M., Suzuki, T., Nakamura, Y., Minato, H., (2000). Phylogenetic analysis of methanogens in sheep rumen ecosystem and detection of *Methanomicrobium mobile* by Fluorescence *In Situ* Hybridization. *Biosc. Biotechnol. Biochem.*, **64**,1737-1742.
- Zhu, J., Filippich, L.J., Alsalamy, M.T., (1992). Tannic acid intoxication in sheep and mice. *Res Vet Sci.*,**53**, 280-292.
- Zimmer and Cordesse, (1996). Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA.Prod.Anim.* **9**(3), 167-179.

ANNEXE

PROTOCOL 1

Méthode de purification du quebracho pour le dosage des tanins condensés

Premier Jour :

- Dans un tube à essai, 1 g de tanins de quebracho est dissout dans 10 ml d'éthanol à 80% (v/v).
- Le tube est agité avec une tige afin d'obtenir une solution homogène puis il est laissé dans un réfrigérateur pour son utilisation le jour suivant.
- Un gel Séphadex LH-20 est préparé. 25 g de Séphadex sont introduits dans une fiole jaugée de 250 ml munie d'un bouchon avec 100 ml d'une solution éthanol à 80% pendant 15 minutes afin que l'absorption puisse se faire.
- La fiole est agitée légèrement puis elle est laissée au repos pendant 5 minutes. Le surnageant est jeté et ce processus est répété trois fois.
- La fiole jaugée est fermée et gardée dans un réfrigérateur. Avant d'être réutilisé, plusieurs lavages avec une solution d'éthanol à 80% sont nécessaires comme il a été précédemment décrit, afin d'éliminer des particules et des substances résiduelles adsorbées.

Deuxième Jour :

- A l'aide d'une pompe à vide, la solution est filtré dans un entonnoir de céramique avec un filtre Wattman N°2.
- 100 ml de la solution de Sephadex LH-20 (préparée la veille) sont ajoutés au filtrat.
- La solution est agitée pendant 3 minutes et filtrée au moyen d'un entonnoir pourvu de plaque filtrante.
- Le gel est lavé lentement avec de l'éthanol à 95% jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm de la solution commence à s'approcher à zéro (l'éthanol utilisé dans les lavages doit être jeté). A la fin, la solution doit être incolore et celle du LH-20 doit être de couleur marron.
- Le gel est lavé avec une solution d'acétone à 50% (acétone : eau, 1:1, v/v).
- Le gel est lavé plusieurs fois jusqu'à ce qu'il soit blanc et les solutions de lavage sont presque incolores.
- Le gel est gardé dans un réfrigérateur.

Troisième Jour :

- Afin de réduire le volume de l'échantillon aqueux, l'acétone est complètement éliminé à l'aide d'un rotavapor, à une température de 30 °C.
- L'échantillon est soumis à une extraction avec un volume égal d'acétate d'éthyle.
- La phase organique supérieure est écartée et cette opération est répétée trois fois.
- Les restes de l'acétate d'éthyle sont éliminés à l'aide d'un rotavapor à moins de 30 °C.
- La solution restante est gardée dans un congélateur ou, le cas échéant, dans un dessiccateur.

PROTOCOL 2

Analyse des phénols totaux (Méthode de Folin-Ciocalteu)

Ces tests sont basés sur le principe de l'oxydoréduction et l'utilisation du réactif Folin-Ciocalteu ou Folin-Denis réactifs. Une autre méthode utilisant le réactif chlorure ferrique est basée sur la propriété de métal complexant des composés phénoliques. La méthode de Folin-Ciocalteu selon le procédé de Julkunen-Tiitto (1985) est largement utilisée pour les phénols totaux en raison de sa haute sensibilité et de sa reproductibilité, cependant, la présence d'agents réducteurs interfère dans le dosage des molécules phénoliques.

Cette méthode suppose que les composés phénoliques qui se lient à des protéines sont les mêmes que ceux qui se lient au vinyle polypyrrolidone (PVPP). Les phénols totaux sont mesurés dans un extrait de plante par la méthode de Folin-Ciocalteu avant et après traitement avec PVPP. Cependant, la présence d'agents réducteurs interfère dans le dosage.

❖ Réactifs

- Folin-Ciocalteu réactif 2N (Sigma).
- Carbonate sodique $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Biochem).
- Standard: Acide tannique.

❖ Préparation des Solutions

- Solutions FN (1) (réactif Folin 1N): le réactif Folin-Ciocalteu commercial (2N) est dilué à la moitié en ajoutant le même volume d'eau distillée (100 g réactif commercial + 100 ml eau). La solution est conservée dans une bouteille de verre foncé dans le réfrigérateur à 4°C. Quand il est frais, il présente une couleur dorée. Dans le cas où sa couleur vire au vert, il ne faut pas l'utiliser.

1- Etalonnage

- **Préparation de la solution mère**

- Solutions (2) à 20% de carbonate sodique: 40g de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ sont pesés et dissouts dans approximativement 150 ml d'eau distillée dans une fiole jaugée de 200 ml puis la solution est complétée au trait de jauge avec l'eau distillée.

Une solution mère initiale d'acide tannique est préparée en dissolvant 25 mg d'acide tannique dans 25 ml d'eau distillée. Une solution fille (solution T) est préparée en diluant 1 ml de la solution mère avec 9 ml d'eau.

Tableau : Préparation de la gamme standard

Tube	μL de solution T	μL eau	μL Réactif folin	ml Solution carbonate
Blanc	0	500	250	1,25
T1	20	480	250	1,25
T2	40	460	250	1,25
T3	60	440	250	1,25
T4	80	420	250	1,25
T5	100	400	250	1,25
T6	150	350	250	1,25
T7	200	300	250	1,25
T8	250	250	250	1,25

- Préparation de la gamme standard

A partir de la solution fille T, une gamme étalon est préparée selon le tableau ci-dessus.

2-Essai

- 50 μL d'EXT (extrait original) sont extraits dans des tubes à essais puis 0,45 ml d'eau distillée sont ajoutés. Il faut noter que trois répétitions sont réalisées pour chaque substrat.

- 250 μL du réactif Folin sont introduits à tous les tubes. Après 3 min, 1,25 ml de la solution de carbonate sodique sont ajoutés. Les tubes sont ensuite agités énergiquement dans un vortex.

- Les tubes sont laissés à l'abri de la lumière et à température ambiante.
- Après 40 min, la densité optique est lue à 725 nm.

Remarque: la lecture doit être effectuée entre 40 et 60 min.

PROTOCOL 3

Analyse des tanins totaux (Méthode de Makkar 2003a)

Les tanins sont distingués des non tanins par une matrice solide (PVPP). Une partie de l'extrait de plante est traitée avec le vinyle polypyrrolidone (PVPP) qui possède une haute affinité pour les tanins et sa suppression à l'aide de la centrifugation, après le traitement (PVPP), les tanins sont éliminés de l'extrait. La différence entre la valeur totale du phénol avant et après le traitement (PVPP) est une mesure des tanins totaux.

Tanins Totaux = Phénols totaux - Phénols qu'ils ne précipitent pas avec PVPP.

❖ Réactifs

- Polyvinyle Pyrrolidone insoluble (Sigma).
- HCl (Biochem).

❖ Préparation des solutions

- Préparation de la solution acide: 120 ml d'eau distillée sont ajoutés à 0,3 ml du réactif HCl concentré .L'idéal est que le pH soit voisin de 3.
- Préparation de la solution PVPP: 13,2 g de PVPP sont pesés et 120 ml de la solution acide sont ajoutés dans un bécher de 200ml. Cette solution doit être fraîche et doit être préparée juste avant son utilisation. Le PVPP est insoluble, c'est pourquoi, il ne se forme pas une véritable solution, elle est plutôt une suspension. Avec un agitateur, la suspension est bien mélangée pendant au moins 15 min avant d'être utilisée. La suspension est maintenue en agitation continue pendant toutes les opérations.

❖ Précipitation de tanins.

- Deux tubes d'essais sont identifiés et libellés pour chaque échantillon.
- En maintenant en agitation continue et pour chaque tube, 1 ml la solution (PVPP) est pipetée avec 1 ml de l'extrait (**EXT**).
- Les tubes sont couverts au papier d'aluminium et ils sont agités énergiquement. Ils sont ensuite laissés dans un réfrigérateur à 4°C pendant 15 min.

- Les tubes sont centrifugés à 3000 g pendant 10 min à 4°C.
 - Le surnageant est repris dans des tubes ependorff correctement libellés (noté : **EXT2**).
 - Après précipitation et à partir du surnageant, 100 μ L de la solution (**EXT2**) sont pipetés et 0,4 ml d'eau distillée sont ajoutés dans des tubes ependorff préalablement libellés.
 - 250 μ L du réactif FN sont ajoutés à tous les tubes. Après 3 min, 1,25 ml de la solution de carbonate sodique sont introduits.
 - Les tubes sont agités énergiquement à l'aide d'un vortex.
 - Les tubes sont conservés à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 40 min.
 - L'absorbance est mesurée à 725 nm.
- Il est à noter que c'est la même droite d'étalonnage utilisée pour l'analyse des Polyphénols (Protocole 2) pour la détermination de la concentration.

PROTOCOL 4

Analyse des tanins condensés libre

❖ Réactifs

- n- butanol (Biochem).
- Acide chlorhydrique concentré (37-38%) HCl (Biochem).
- Sulfate ferrique ammoniacal $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4) \cdot 2.12\text{H}_2\text{O}$ (Sigma).
- Standard: quebracho purifié.

❖ Préparation de Solutions

- Solutions Butanol-HCl (95:5 v/v) : 950 ml du n -butanol sont mélangés avec 50 ml de HCl concentré (37-38%).
- Réactif Fer (2% de sulfate ferrique Ammoniacal en HCl 2N) : une solution HCl (2N) est d'abord préparée avec 16,6 ml de HCl concentré dans une fiole jaugée de 100 ml, puis elle est ajustée au trait de jauge. La solution est maintenue dans un flacon de verre foncé.

1- Etalonnage:

Préparation de la gamme standard (Hagerman 1991)

- ❖ Réactif: Le solvant utilisé est une solution d'acétone à 70% (v/v).
- ❖ Préparation de la solution mère: 25 mg du quebracho purifié sont pesés dans une fiole jaugée de 25 ml (on note le poids précis) et complétés au trait de jauge avec le solvant. Afin de préparer la gamme étalon, des dilutions sont reprises à partir de cette solution mère selon le tableau ci-dessous.

2-Essai

- Dans des tubes libellés et pourvus de bouchon, 250 μ l sont pipetés de l'extrait EXT et 250 μ l du solvant acétone, 70% sont ajoutés. Trois répétitions pour chaque tube sont réalisées.
- 3 ml du réactifs butanol-HCl et 0,1 ml de la solution Fer réactive sont ajoutés pour chaque tube. Les tubes sont ensuite fermés à l'aide des bouchons et ils sont agités vigoureusement.
- Les tubes sont réchauffés dans un bain d'eau en ébullition à 100°C pendant 60 min puis ils sont refroidis à l'abri de la lumière.
- Les absorbances de ces solutions sont déterminées à 550 nm.

Tableau : Préparation de la gamme standard Hagerman (1991)

Tube	μL de la solution fille	μL de solvant	Qté de tanin (μg)
Blanc	0	500	0
T1	50	450	50
T2	100	400	100
T3	125	375	125
T4	150	350	150
T5	200	300	200
T6	250	250	250

Abstract

This thesis is focused on the study of the effect of condensed tannin-rich fodder, Acacias collected from several regions of Algeria, on sheep ruminal microbiota.

Foliage chemical composition of nine plants, including five Acacias (*A.nilotica* , *A.horrida* , *A.albida* , *A.julibrissin* , *A.cyanophylla* , *A.halimus* , *Vicia faba* , *A. herba alba* and *P.granatum*) are performed according to standard methods. The results of these analysis showed significant differences ($p < 0,05$) between these species . Shrub legumes have the advantage of being rich in PB with values ranging from 156,6 to 252,0 (g / kg DM) , and the disadvantage for some , to be rich in ADL (anti-nutritional factor) with values recorded in *A.nilotica* , *A.albida* and *A.cyanophylla*; 126 , 139.7 and 147,5 (g / kg DM) , respectively.

Acacias have the highest rate in polyphenols, mainly tannins condensed. Our results are similar to those reported by several authors. The study of the biological activity of these tannins , using PEG coupled to the gas production technique , shows that only condensed tannins of *A.cyanophylla* and *A.nilotica* are significantly active ($p < 0,05$) . This confirms the results of other studies showing the antagonistic effects of TC.

The digestibility was performed using two methods, *in vivo* (*in Sacco*) and *in vitro* (according to Tilley and Terry), is tested by providing acceptable levels for these plants. *A. Albida*, despite its low TC, and ADL shows relatively low levels of digestibility. The effect of these substrates on the ruminal microbiota of two different breeds, Merino Shurra and gives significantly different results ($p < 0,05$) with *A.cyanophylla* and *A.nilotica*, only.

The side impact des Acacias studied compounds in reducing methane production is tangible. The analysis of the amount of methane produced in the presence and absence of PEG, showed significant differences ($p < 0.05$) for all used Acacias. Condensed Tannins contained in these Fabaceae have a negative effect on ruminal methanogenesis. Which recommend the use of Acacias to reduce nitrogen losses and in turn curb the harmful effects on the environment of CH₄ belching.

Key words: Acacia, Ovin, Gas production, Condensed Tanin, PEG, Methane.

ملخص

تركز هذه الأطروحة على دراسة تأثير العلف الغنية بمكثف التانين ، أوراق الأكاسيا تم جمعها من عدة مناطق من الجزائر ، على مجهرات الكرش للأغنام .

التركيب الكيميائي لأوراق تسع نباتات ، بما في ذلك خمسة أكاسيا (*A.nilotica*, *A.horrída*, *A.albida*, *A.julibrissin*, *A.cyanophylla*, *A.halimus*, *Vicia faba* et *A. herba alba* et *P.granatum*) وتجرى وفقا للأساليب القياسية. وأظهرت نتائج هذه التحليلات فروق ذات دلالة إحصائية (ع > 0.05) بين هذه الأنواع. البقوليات شجيرة لديها ميزة كونها غنية في PB مع قيم تتراوح 252,0-156,6 (غ / كغ DM) ، و من الممسائى ، بالنسبة للبعض، أن تكون غنية من ADL (عامل غير قابل للهضم) مع القيم المسجلة 126-139.7 و 147.5 عند *A. A.nilotica*, *A.albida* و *A.cyanophylla* (g/kg DM) ، على التوالي .

أشجار السنط لديها أعلى معدل في مادة البوليفينول ، وذلك أساسا العفص مكثف . نتائجنا مماثلة لتلك التي ذكرت من قبل العديد من الكتاب . دراسة النشاط البيولوجي لهذه العفص ، وذلك باستخدام جانب PEG إلى تقنية إنتاج الغاز ، وتبين أن فقط عفص مكثف *A.cyanophylla* نشطة بشكل ملحوظ (ع > 0.05) . تمت دراسة الهضم ، وفقا لنهجين، في الجسم الحي (*in sacco*) و (*in vitro*) ، وفرت اللاتختبارات افضت الي مستويات مقبولة لهذه الأنواع الخشبية نسبيا. *A. Albida* رغم نسبة ADL و TC لها منخفضة، لها مستويات منخفضة نسبيا من الهضم . تأثير هذه ركائز على مجهرات البقعة الكرش اثنين من سلالات مختلفة ، *Shurra* و *Merinos* و يعطي

نتائج مختلفة إلى حد كبير (ع > 0.05) لدي *A.cyanophylla* و *A.nilotica* فقط. تأثير المركبات الثانوية الأكاسيا في الحد من إنتاج غاز الميثان هو ملموس . تحليل كمية من غاز الميثان تنتج في وجود و غياب PEG ، أظهرت فروق ذات دلالة إحصائية (ع > 0.05) لجميع الأكاسيا المستخدمة. العفص المكثف (TC) لدى هذه الفصيلة البقولية يكون لها تأثير سلبي على توليد الميثان الكرش . لدي نوصي باستخدام الأكاسيا للحد من خسائر النيتروجين و بدوره لحد من الآثار الضارة لل التحشؤ CH4 على البيئة.

الكلمات الرئيسية: أكاسيا، الخراف، إنتاج الغاز ، المكثف التانين، PEG، الميثان

Nom: BOUAZZA Prénom: LYAS	Date de soutenance: 17 Juin 2014 e-mail: ilbouazza@Yahoo.fr																		
Titre : Etude de la valeur nutritive de légumineuses arbustives du genre <i>Acacia</i>. Effets spécifiques de leurs hautes teneurs en tannins condensés sur la méthanogénèse ruminale d'ovins.																			
<p style="text-align: center;">Résumé</p> <p>Cette thèse est focalisée sur l'étude de l'effet de fourrages riches en tanin condensés, des Acacias collectés de plusieurs régions d'Algérie, sur le microbiote ruminal des ovins.</p> <p>La composition chimique des feuilles de neuf plantes, dont cinq Acacias (<i>A.nilotica</i>, <i>A.horrída</i>, <i>A.albida</i>, <i>A.julibrissin</i>, <i>A.cyanophylla</i>, <i>A.halimus</i>, <i>Vicia faba</i>, <i>A. herba alba</i> et <i>P.granatum</i>), sont effectuées selon les procédés standards. Les résultats de ces analyses montrent des différences significatives ($p < 0,05$) entre ces espèces. Les légumineuses arbustives présentent l'avantage d'être riches en PB avec des valeurs variant de 156,6 à 252,0 (g/kg MS), et l'inconvénient, pour certaines, d'être riches en ADL (facteur antinutritionnel) avec des valeurs enregistrées chez <i>A.nilotica</i>, <i>A.albida</i> et <i>A.cyanophylla</i> de 126, 139,7 et 147,5 (g/kg MS), respectivement.</p> <p>Les Acacias présentent les taux les plus élevés en Polyphénols, essentiellement en tanins condensés. Nos résultats sont comparables à ceux publiés par plusieurs auteurs. L'étude de l'activité biologique de ces tannins, en utilisant le PEG couplé à la technique de production de gaz, montre que seuls les tannins condensés de <i>A.cyanophylla</i> et <i>A.nilotica</i> sont significativement actifs ($p < 0,05$). Ceci conforte les résultats d'autres études montrant les effets antagonistes des TC.</p> <p>La digestibilité, selon deux approches, <i>in vivo</i> (<i>in sacco</i>) et <i>in vitro</i> (selon Tilley et Terry), est testée en donnant des taux relativement acceptables pour ces ligneux. <i>A. Albida</i>, malgré sa faible teneur en TC, et en ADL montre des taux de digestibilité relativement faibles.</p> <p>L'effet de ces substrats sur le microbiote ruminale de deux races différentes, Shurra et Merinos, donne des résultats significativement différents ($p < 0,05$) pour <i>A.cyanophylla</i> et <i>A.nilotica</i>, seulement.</p> <p>L'impact des composés secondaires des Acacias étudiés sur la réduction de la production de méthane est tangible. L'analyse de la quantité de méthane produite, en présence et en absence de PEG, montre des différences significatives ($p < 0,05$) pour toutes les Acacias utilisés. Les Tanins Condensés de ces fabacées ont un effet négatif sur la méthanogénèse ruminale. Ce qui recommanderait l'utilisation des Acacias pour réduire les pertes en azote et par ricochet juguler les effets néfastes des éructations de CH₄ sur l'environnement.</p>																			
Mots clés : Acacia, Ovin, Production de gaz, Tannin Condensé, PEG, Méthane.																			
Laboratoires de recherche: Laboratoire de Génie Microbiologique et Application. Université Constantine 1- Algérie. Laboratoire de nutrition animale. Université de Léon – Espagne.																			
Devant le Jury : <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 30%;">Présidente :</td> <td style="width: 30%;">Mme.MERAIHI Z.</td> <td style="width: 40%;">Professeur à l'université Constantine1</td> </tr> <tr> <td>Rapporteur :</td> <td>M.BOUSSEBOUA H.</td> <td>Professeur à l'université Constantine1</td> </tr> <tr> <td>Examineurs :</td> <td>M.NIAR A.</td> <td>Professeur à l'université de Tiaret</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Mme.AOUN L.</td> <td>Professeur à l'université d'El Tarf</td> </tr> <tr> <td></td> <td>M.NANCIB N.</td> <td>Professeur à l'université Ferhat Abbès/Sétif</td> </tr> <tr> <td></td> <td>M.HAMIDECHI M.A.</td> <td>Professeur à l'université Constantine1</td> </tr> </table>		Présidente :	Mme.MERAIHI Z.	Professeur à l'université Constantine1	Rapporteur :	M.BOUSSEBOUA H.	Professeur à l'université Constantine1	Examineurs :	M.NIAR A.	Professeur à l'université de Tiaret		Mme.AOUN L.	Professeur à l'université d'El Tarf		M.NANCIB N.	Professeur à l'université Ferhat Abbès/Sétif		M.HAMIDECHI M.A.	Professeur à l'université Constantine1
Présidente :	Mme.MERAIHI Z.	Professeur à l'université Constantine1																	
Rapporteur :	M.BOUSSEBOUA H.	Professeur à l'université Constantine1																	
Examineurs :	M.NIAR A.	Professeur à l'université de Tiaret																	
	Mme.AOUN L.	Professeur à l'université d'El Tarf																	
	M.NANCIB N.	Professeur à l'université Ferhat Abbès/Sétif																	
	M.HAMIDECHI M.A.	Professeur à l'université Constantine1																	