



République Algérienne Démocratique et Populaire

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**UNIVERSITÉ DES FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**

DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N° d'ordre : 114/DS/2015
N° de série :06/Bioch/2015

THESE

Présentée à l'Université des Frères Mentouri pour l'obtention du grade de

Doctorat en Sciences

Option: Biochimie et Microbiologie Appliquées

Soutenu le 09 Décembre 2015

par

RIRA Moufida

**Impact de plantes riches en métabolites secondaires sur la
méthanogénèse ruminale et les activités fermentaires du
microbiome ruminal chez des ovins**

Jury composé de:

Président: MERAIHI Zahia, Pr., Université des Frères Mentouri. Constantine

Directeurs de thèse: BOUSSEBOUA Hacène, Pr., Ecole Nationale Supérieure de
Biotechnologie. Constantine

DOREAU Michel, Dr., INRA Clermont-Ferrand. France

Examineurs: MORGAVI Diego, Dr., INRA Clermont-Ferrand. France

KHELIFI Douadi, Pr., Université des Frères Mentouri. Constantine

GHOUL Mustapha Pr., Université Sétif 1

Remerciements

Dans cet avant-propos, je souhaite en premier lieu exprimer ma gratitude envers les personnes et les organismes qui ont rendu possible l'accomplissement de ce travail de thèse. Celui-ci a été réalisé à l'Institut National de la Recherche Agronomique à Clermont-Ferrand, France.

Je remercie très particulièrement mon directeur de thèse, Monsieur **Hacène BOUSSEBOUA**, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie, Constantine, pour son aide précieuse, ses conseils et ses encouragements pendant ce long parcours ensemble.

Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance à Monsieur **Michel DOREAU** et Monsieur **Diego MORGAVI** Directeurs de recherche à l'INRA, Clermont-Ferrand, France. Je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre équipe et d'accepter de m'accompagner tout au long de ce travail. Bénéficier de vos compétences, de votre dynamisme et de votre disponibilité fut un réel privilège.

Je remercie les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail : la présidente, Madame **Zahia MERAIHI**, Professeur à l'université des Frères Mentouri, Constantine, pour avoir accepté de présider le jury. Monsieur **Douadi KHELIFI**, Professeur à l'université des Frères Mentouri, Constantine ; et Monsieur **Mustapha GHOUL**, Professeur à l'université Sétif 1; pour avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail, de le lire et de faire son analyse critique.

Je voudrai aussi remercier tous les membres de l'équipe **DIMA** de l'UMRH de l'INRA de Clermont-Ferrand, sans oublier Monsieur **Harry ARCHIMEDE**,

Directeur de recherche à l'INRA de Guadeloupe. Ce fut un plaisir de travailler avec vous.

Merci à toutes les personnes qui ont participé de près comme de loin aux résultats présentés dans cette thèse.

Les derniers mots sont pour ma famille, à qui je dis un grand merci pour avoir toujours été présente durant toutes ces années d'études.

ARTICLE AU COURS DE LA THESE

- ❖ **Rira, M., Morgavi, D. P., Archimède, H., Marie-Magdeleine, C., Popova, M., Bousseboua, H., & Doreau, M. 2015.** Potential of tannin-rich plants for modulating ruminal microbes and ruminal fermentation in sheep. *Journal of animal science*, 93, 334-347.
- ❖ **Rira, M., Chentli, A., Boufenera, S., & Bousseboua, H. 2015.** Effects of Plants Containing Secondary Metabolites on Ruminal Methanogenesis of Sheep *in vitro*. *Energy Procedia*, 74, 15-24.
- ❖ **Archimède, M. Rira, D. J. Barde, F. Labirin, C. Marie-Magdeleine, B. Calif, F. Periacarpin, J. Fleury, Y. Rochette, D. P. Morgavi & M. Doreau.** Potential of tannin-rich plants, *Leucaena leucocephala*, *Glyricidia sepium* and *Manihot esculenta*, to reduce enteric methane emissions in sheep. Accepted à *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*.

COMMUNICATIONS EN CONGRES SCIENTIFIQUES

- ❖ **Rira M., Morgavi D.P., Archimède H., Marie-Magdeleine C., Genestoux L., Bousseboua H., Doreau M., 2014.** Tropical plants containing condensed tannins inhibit ruminal methanogenesis *in vitro*. *Proceedings Joint ISNH/ISRP International Conference ISNH-ISRP Symposium, Canberra, Australia, 8-12 September, published in Animal Production in Australia.*
- ❖ **Rira M., Morgavi D., Archimède H., Marie-Magdeleine C., Genestoux L., Bousseboua H., Doreau M., 2014.** Effect of tropical plants containing condensed tannins on fermentation, digestibility and methane production in sheep. *Abstract Book, Livestock, climate change and food security conference, Madrid, Spain, 19-20 May, p63.*
- ❖ **Rira M., Marie-Magdeleine C., Archimède H., Morgavi D.P., Doreau M., 2013.** Effect of condensed tannins on methane emission and ruminal microbial populations. *Proc. 4th ISEP Meeting, Sacramento, Ca., in Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production (ed. J.W. Oltjen, E. Kebreab, H. Lapierre), Wageningen Acad. Publ., the Netherlands, p. 501-502.*
- ❖ **Rira M., Morgavi D., Bousseboua H. 2012.** Effect of essential oils of *Juniperus phoenicea* and *Mentha pulegium* on rumen fermentation and methanogenesis *in vitro*. *INRA-Rowett Symposium on Gut Microbiology Gut microbiota: friend or foe? Clermont-Ferrand, France, p 209.*

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES, COMMUNICATIONS HORS TRAVAUX DE THÈSE

- ❖ **Silberberg, M., Boissy, A., Rira, M., Delval, E., Chandèze, H., & Doreau, M. 2015.** Impact of rumen emptying on rumen fermentation and animal welfare in cannulated sheep. *Animal Production Science*, 55, 213-218.
- ❖ **Archimède H., Rira M., Eugène M., Morgavi D.P., Anaïs C., Periacarpin F., Calif B., Martin C., Marie-Magdeleine C., Doreau M., 2013.** Intake, total-tract digestibility and methane emission of Texel and Blackbelly sheep fed C4 and C3 grasses tested simultaneously in a temperate and a tropical area. Proceedings of the Greenhouse Gases and Animal Agriculture (GGAA) Conference, Dublin, in *Advances in Animal Biosciences*, 4, 285.
- ❖ **Rira M., Morgavi D.P., Popova M., Marie-Magdeleine C., Silou T., Archimède H., Doreau M. 2013.** Ruminal methanogens population is enhanced by tropical environment. Proceedings of the Greenhouse Gases and Animal Agriculture (GGAA) Conference, Dublin, in *Advances in Animal Biosciences*, 4, 341.

RAPPORTS DE PROJETS EUROPEENS

- ❖ Doreau M., **Rira M.**, Archimède H., 2013. Projet ANR EPAD. Tâche 2. Emissions de gaz à effet de serre et puits de carbone. Interaction animal – prairie. Sous-tâche 2.1. Emissions de méthane entérique par les animaux. Livrable 2.1.4. Analyse de l'interaction entre plante, animal et environnement sur les émissions de méthane, 6 p.
- ❖ Doreau M., M. Eugène, D. Morgavi, C. Martin, **M. Rira**, H. Archimède, C. Marie-Magdeleine, S. Giger-Reverdiin, D. Sauvart, A. Ickowicz, P. Lecomte, A.T. Diop, A. Bannink, A. Van den Pol - Van Dasselaar, A. Hassen, B.S. Gameda, I.M. Cezimbra, J.V. Savian, O.J.F. Bonnet, P.C.F. Carvalho, M.R. Tischler, A.B. Nato, R.D.S. Schons, J. de Lima, P. Menezes Santos, L. Barioni, A. Berndt, T.C.M. Genro, 2014. EU Project AnimalChange FP7-266018. Report on enteric methane emissions by ruminants fed forages. Deliverable 3.6., 63p.
- ❖ Morgavi D., Doreau M., **Rira M.**, Archimède H., Marie-Magdeleine C., Ickowicz A., Lecomte P., Diop A.T., Hassen A., Theart J.J.F., Gameda B.T., 2015. EU Project AnimalChange FP7-266018. Identification of saponins- and tannin-rich plant material from Africa and South America. Deliverable 6.9., 68 p.

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|-------------------|---|
| INTRODUCTION..... | 1 |
|-------------------|---|

| | |
|--|----------|
| PREMIERE PARTIE: METHANOGENESE ENTERIQUE ET STRATEGIES DE MITIGATION..... | 5 |
|--|----------|

| | |
|--|----------|
| I/ PRODUCTION DE METHANE ET SON IMPLICATION DANS LE RECHAUFFEMENT CLIMATIQUE..... | 5 |
|--|----------|

| | |
|--|----|
| I.1/ Gaz à effet de serre..... | 5 |
| I.2/ Méthane et effet de serre..... | 7 |
| I.3/ Méthane et agriculture..... | 8 |
| I.4/ Méthane et ruminants..... | 9 |
| I.5/ Méthano-génèse entérique chez les ruminants..... | 10 |
| I.5.1/ Rappel sur les particularités digestives chez les ruminants..... | 10 |
| I.5.2/ Mécanisme de la méthano-génèse dans l'écosystème digestif des ruminants.... | 12 |
| I.6/ Microbiologie de la méthano-génèse entérique..... | 14 |
| I.6.1/ Bactéries..... | 14 |
| I.6.2/ Protozoaires..... | 17 |
| I.6.3/ Archées méthanogènes..... | 18 |
| I.6.4/ Champignons..... | 21 |
| I.6.5/ Bactériophages..... | 22 |

| | |
|--|-----------|
| II/ STRATEGIES DE REDUCTION DU METHANE ENTERIQUE..... | 22 |
|--|-----------|

| | |
|--|----|
| II.1/ Situation actuelle et projection..... | 22 |
| II.2/ Métabolites secondaires de plantes..... | 27 |
| II.2.1/ Saponine..... | 28 |
| a / Chimie des saponines..... | 28 |
| b / Effets des saponines sur la fermentation ruminale..... | 29 |
| c / Effets des saponines sur la méthano-génèse..... | 29 |
| d / Effets des saponines sur le microbiote ruminal..... | 32 |
| II.2.2/ Huiles essentielles..... | 33 |
| a / Chimie des huiles essentielles..... | 33 |
| b / Effets des huiles essentielles sur la fermentation ruminale..... | 34 |
| c / Effets des huiles essentielles sur la méthano-génèse..... | 35 |
| d / Effets des huiles essentielles sur le microbiote ruminal..... | 38 |

| | |
|---|-----------|
| DEUXIEME PARTIE : UTILISATION DES PLANTES RICHES EN TANINS DANS LA LUTTE CONTRE LA METHANOGENESE RUMINALE..... | 41 |
|---|-----------|

| | |
|--|-----------|
| I/.TANINS..... | 41 |
| I.1/ Définition et généralités..... | 41 |
| I.2/ Propriétés physico-chimiques et biologiques des tanins..... | 41 |
| I.3/ Classification biochimique..... | 41 |
| I.3.1/ Tanins hydrolysables..... | 42 |
| I.3.2/ Tanins condensés..... | 43 |
| I.4/ Sources de tanins, localisation et variation de leur teneur dans la plante..... | 43 |
| I.5. Rôle des tanins chez les végétaux..... | 44 |
| I.6/ Méthodes d'analyse et de dosage des tanins..... | 45 |

| | |
|---|----|
| I.6.1/ Méthode de Folin-Denis | 45 |
| I.6.2/ Méthode au bleu de Prusse | 46 |
| I.6.3/ Méthode à la vanilline-HCl | 46 |
| I.6.4/ Méthode n-butanol-HCl..... | 47 |
| I.7/ Effets des tanins chez les ruminants | 48 |
| I.7.1/ Effets des tanins hydrolysables | 48 |
| I.7.2/ Effets des tanins condensés | 48 |

| | |
|--|-----------|
| II/TANINS ET METHANE | 50 |
| II.1/ Effets des tanins sur la fermentation ruminale | 50 |
| II.2/ Effets des tanins sur la méthanogénèse | 51 |
| II.3/ Effets des tanins sur le microbiote du rumen | 53 |

| | |
|---|-----------|
| III/ UTILISATION DES PLANTES RICHES EN TANINS EN ALIMENTATION DES RUMINANTS : CAS DE L'ALGERIE | 56 |
|---|-----------|

MATERIEL ET METHODES

| | |
|---|-----------|
| PREMIERE PARTIE EXPERIMENTALE: FERMENTATIONS <i>IN VITRO</i> | 60 |
|---|-----------|

| | |
|--|-----------|
| I/ ESSAI 1: HUILES ESSENTIELLES | 62 |
| I.1/ Matériel végétal | 63 |
| I.2/ Analyse chimique des plantes..... | 63 |
| I.3/ Extraction des huiles essentielles..... | 63 |
| I.4/ Matériel animal..... | 64 |
| I.5/ Fermentation <i>in vitro</i> | 64 |
| I.5.1/Préparation et inoculation..... | 64 |
| I.5.2/ Détermination de la production de gaz..... | 65 |
| I.5.3/ Détermination des paramètres fermentaires | 65 |
| I.6 / Analyse statistique..... | 66 |

| | |
|---|-----------|
| II/ ESSAI 2: TANINS CONDENSÉS | 67 |
| II.1/ Matériel végétal..... | 67 |
| II.2/ Matériel animal..... | 68 |
| II.3/ Analyse chimique des plantes | 69 |
| II.4/ Dosage des tanins condensés..... | 69 |
| II.5/ Fermentation <i>in vitro</i> | 69 |
| II.5.1/Préparation et inoculation..... | 69 |
| II.5.2/ Détermination de la production de gaz | 70 |
| II.5.3/ Détermination des paramètres fermentaires | 70 |
| II.6/ Analyse statistique..... | 70 |

| | |
|---|-----------|
| DEUXIEME PARTIE EXPERIMENTALE: FERMENTATIONS <i>IN VIVO</i>..... | 72 |
|---|-----------|

| | |
|--|----|
| I.1/ Animaux et logement..... | 72 |
| I.2/ Aliments..... | 73 |
| I.3/ Plan expérimental | 74 |
| I.4/ Mode d'alimentation | 74 |
| I.5/ Mesures et prélèvements en cours d'expérimentation..... | 74 |

| | |
|---|----|
| I.6/ Méthane | 75 |
| I.7/ Fermentations ruminales et écosystème microbien | 78 |
| I.7.1/ Paramètres fermentaires et protozoaires | 78 |
| I.7.2/ Paramètres microbiens et biologie moléculaire | 78 |
| I.8/Analyses microbiologiques..... | 79 |
| I.8.1/Choix du bon marqueur | 79 |
| I.8.2/Extraction d'ADN bactérien..... | 82 |
| I.8.3/Amplification d'ADN | 84 |
| I.8.4/ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) | 84 |
| a/ Principe | 85 |
| b/ Protocole | 87 |
| c/ Analyse des gels | 87 |
| I.8.5/ PCR en temps réel (qPCR) | 88 |
| a/ Principe | 88 |
| b/ Aspect mathématique de la qPCR..... | 90 |
| c/ Protocole et conditions d'amplification | 93 |
| I.9/ Analyse statistique..... | 93 |

RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|----------------------------|----|
| Rappel des objectifs | 94 |
|----------------------------|----|

CHAPITRE I: Effets d'huiles essentielles de *Mentha pulegium* et *Junepirus phoenicea* sur la production de méthane *in vitro*

| | |
|--|-----|
| Matériel et méthodes..... | 96 |
| 1/ Matériel végétal | 96 |
| 2/ Matériel animal..... | 97 |
| 3/ Fermentation <i>in vitro</i> | 97 |
| 4/ Analyse statistique | 97 |
| Résultats et discussion | 97 |
| 1/Rendement en huiles essentielles..... | 97 |
| 2/ Production de méthane..... | 98 |
| 3/ Production d'ammoniac | 101 |
| 4/ Production d'acides gras volatiles totaux | 103 |
| 5/ Protozoaires..... | 104 |
| 6/ Digestibilité..... | 105 |
| Conclusion | 106 |

CHAPITRE II: Potentiel anti-méthanogène de trois plantes riche en tanins, *Leucaena leucocephala*, *Glyricidia sepium* et *Manihot esculenta*, pour réduire les émissions de méthane entérique chez des ovins

| | |
|---|-----|
| Article 1: Potential of tannin-rich plants, <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Glyricidia sepium</i> and <i>Manihot esculenta</i> , to reduce enteric methane emissions in sheep..... | 109 |
|---|-----|

CHAPITRE III: Potentiel des plantes riches en tanins à module r le microbiote et la fermentation ruminal chez les moutons

| | |
|-------|-----|
| | 132 |
|-------|-----|

| | |
|---|-----|
| Article 2: Potential of tannin-rich plants for modulating ruminal microbes and ruminal fermentation in sheep | 133 |
| Discussion générale | 147 |
| 1/ Huiles essentielles | 148 |
| 2/ Tanins condensés | 150 |
| Conclusions et perspectives | 156 |
| Bibliographie | 159 |
| Annexes | 186 |
| Résumés | 199 |

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1. Principe de l'effet de serre (P 4)

Figure 2. Evolution de la concentration moyenne de gaz à effet de serre entre 1750 et 2010 (P 7)

Figure 3. Emissions annuelles de gaz à effet de serre par secteur (P 9)

Figure 4. Compartiments digestifs de l'estomac des ruminants (P 11)

Figure 5. Schéma de la méthanogénèse et de ses différentes étapes dans le rumen (P 13)

Figure 6. Représentation des principaux taxons microbiens observés dans les systèmes digestifs (P 15)

Figure 7. Schéma résumant les stratégies de réduction de méthane entérique chez les ruminants (P 26)

Figure 8. Structure chimique des saponines (P 28)

Figure 9. Structure chimique de quelques molécules aromatiques d'huiles essentielles (P 34)

Figure 10. Structure chimique des tanins (P 42)

Tableau 1. Les principaux gaz à effet de serre (P 6)

Tableau 2. Bactéries du rumen avec leurs sources d'énergie et produits de fermentation obtenus dans des études *in vitro* (P16)

Tableau 3. Caractéristiques des champignons anaérobies du rumen d'herbivores (P 21)

Tableau 4. Stratégies de réduction de méthane, mécanisme de réduction et considérations à prendre avant utilisation (P 23)

Tableau 5. Effets des saponines sur la production de méthane et les populations d'archées méthanogènes et de protozoaires du rumen (P 31)

Tableau 6. Effets des huiles essentielles sur la production de méthane et les populations d'archées méthanogènes et de protozoaires du rumen (P 36)

Tableau 7. Contenu en tanins condensés de différentes plantes fourragères (P 44)

Tableau 8. Effets des tanins condensés sur la nutrition et les performances zootechniques des petits ruminants en fonction de leur teneur dans la ration (P 49)

Tableau 9. Effets des tanins sur la production de méthane et les populations d'archées méthanogènes et de protozoaires du rumen (P 52)

Tableau 10. Plantes riches en tanins condensés d'origine algérienne (P 58)

MATERIEL ET METHODES

Figure 11. Les plantes utilisées pour l'extraction des huiles essentielles (P 62)

Figure 12. Montage d'hydrodistillation utilisé pour l'extraction des huiles essentielles (P 64)

Figure. 13. Plantes riches en tanins condensés (P 68)

Figure 14. Génotypes utilisés pour l'expérience *in vivo* (P 73)

Figure 15. Bovin équipé du dispositif de collecte des gaz (P 75)

Figure 16. Les différents composants du système de collecte des gaz (P 76)

Figure 17. Constituant en ARN d'un ribosome procaryote (P 79)

Figure 18. Schéma illustrant l'ARNr 16S (P 80)

Figure 19. Voie de la méthanogenèse basée sur la réduction du CO₂ dépendant du H₂ (P 82)

Figure 20. Schéma illustrant le principe de la DGGE (P 85)

Figure 21. Présentation d'une analyse par DGGE (P 86)

Figure 22. Illustration de la PCR SYBR®Green (P 89)

Figure 23. Le suivi en temps réel d'une réaction PCR (P 92)

Tableau 11. Les oligonucleotides utilisées comme amorces pour la PCR-DGGE et la qPCR (P 83)

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1

Figure 1. Relation entre les huiles essentielles, le méthane, les acides gras volatils, le ratio acétate/propionate et la digestibilité *in vitro* (P 100)

Figure 2. Effets des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* (a) et de *Mentha pulegium* (b) sur le profil des acides gras volatils *in vitro* (P103)

Tableau 1. Les caractéristiques fermentaires *in vitro*, en présence d'huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et *Mentha pulegium* (P 99)

Chapitre 2

Figure 1. Relationship between methane emission and archaea population (P 130)

Figure 2. Relationship between methane emission and condensed tannins content in Texel and Blackbelly sheep (P 130)

Tableau 1. Chemical composition [g/kg dry matter (DM)] of control and tannin-rich plants (P 126)

Tableau 2. Effect of tropical tannin-rich plants on intake and total tract digestibility in Texel and Blackbelly sheep (P 127)

Tableau 3. Effect of tropical tannin-rich plants on nitrogen balance in Texel and Blackbelly sheep (P 128)

Tableau 4. Effect of tropical tannin-rich plants on methane production in Texel and Blackbelly sheep (P 129)

Chapitre 3

Figure 1. Correlation between methane production and VFA concentration and amount of condensed tannins *in vitro* (P 138)

Tableau 1. Oligonucleotides used as primers for PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and quantitative PCR (qPCR) analysis (P 136)

Tableau 2. Chemical composition in grams per kilogram DM of control and tannin-rich plants (P137)

Tableau 3. Ruminal fermentation characteristics of 24-h *in vitro* incubations of tannin-rich plants (TRP) (P 137)

Tableau 4. Dry matter intake, total tract OM digestibility, and ruminal fermentation characteristics before and after feeding in Texel and Blackbelly sheep fed control or tannin- rich diets (P 139)

Tableau 5. Abundance of total and fibrolytic bacteria and total methanogens determined by quantitative PCR in the rumen of Texel and Blackbelly sheep fed control or tannin-rich diets (P 140)

Tableau 6. Diversity indices calculated from denaturing gradient gel electrophoresis profiles of total bacteria and methanogens in the rumen of Texel or Blackbelly sheep fed control or tannin- rich diets (P 140)

Tableau 7. Abundance of ruminal protozoa (\log_{10} cells/mL) in the rumen of Texel or Blackbelly sheep fed control or tannin-rich diets (P 141)

LISTE DES ABREVIATIONS

ADF: Acid Detergent Fiber
ADN (DNA): Acide DésoxyriboNucléique
ADNr (DNAr): Acide DésoxyriboNucléique ribosomal
AGV (VFA): Acides Gras Volatils
ARN (RNA): Acide RiboNucléique
ARNr (rRNA): Acide RiboNucléique ribosomique
ATP Adénosine Triphosphate
CH₄: Méthane
CO₂: Dioxyde de Carbone
CP : Crude Protein
DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
dNTP : Désoxynucléotide Triphosphate
GES: Gaz à Effet de Serre
H₂: Dihydrogène
IsoAGV(Branched-chain VFA): Iso Acides Gras Volatils
MCR: Méthyl Coenzyme-M Réductase
MM : Matière Minérale
MO (OM): Matière Organique
MS (DM) : Matière Sèche
NDF: Neutral Detergent Fiber
NH₃: Ammoniac
O₃ : Ozone
PCR: Polymerase Chain Reaction
PRG : Potentiel de Réchauffement Global
qPCR: Quantitative PCR
SF6: Hexafluorure de Soufre
TC (CT): Tanins Condensés
TH: Tanins Hydrolysable

INTRODUCTION

Longtemps marginaux, les problèmes environnementaux ont dépassé les seuls cercles écologistes à la fin les années 1970. L'environnement est alors devenu une préoccupation mondiale, perçue comme une menace majeure et nécessitant une action planétaire concertée. Dans cette problématique, le changement climatique s'est imposé comme un élément majeur, avec pour corollaire l'effet de serre lié à l'augmentation de la concentration atmosphérique des gaz à effet de serre. A la différence des multiples problèmes écologiques, localisés le plus souvent dans une région ou un pays, l'effet de serre est planétaire.

Les gaz à effet de serre absorbent une partie des rayons solaires réfléchis par la Terre, les empêchant ainsi de rayonner à perte dans l'espace. Ils sont alors redistribués en radiations sur terre, ce phénomène est appelé effet de serre. La température moyenne de notre planète résulte de l'équilibre du flux de rayonnement solaire et du flux de rayonnement infrarouge renvoyé vers l'espace. En conséquence, la répartition de la température au niveau du sol dépend donc en partie de l'action des gaz à effet de serre présents dans l'atmosphère. Sans eux, la température moyenne de la terre serait de - 18°C, alors qu'elle est de 15°C.

Plus d'une quarantaine de gaz à effet de serre ont été recensés, ils ont une concentration atmosphérique différente et une capacité d'absorption du rayonnement infrarouge spécifique, avec donc une capacité d'effet de serre différente. Afin de limiter la hausse considérée continue de l'effet de serre, des stratégies de réduction ou de limitation des émissions de certains gaz à effet de serre ont été mises en place par de nombreux pays et font l'objet de multiples recherches.

L'Algérie, qui se penche depuis des années sur les problèmes environnementaux, est signataire de nombreuses conventions, tel que le protocole de Kyoto qu'elle a intégré le 17 mai 2005. À l'instar de ce protocole, un décret a été récemment publié, réglementant l'émission dans l'atmosphère de gaz, de fumées, de vapeurs, de particules liquides ou solides, ainsi que les conditions dans lesquels s'exercent leur contrôle. Ce décret exhaustif N° 06-138 du 16 Rabie el-Aouel 1427 correspondant au 15 avril 2006 décrète 19 articles, dans lesquels il réglemente les rejets atmosphériques en décrivant des prescriptions techniques relatives aux émissions. Des valeurs limites ainsi que des tolérances des valeurs anciennes ont été établies pour des installations telle que : le raffinage et la transformation des produits dérivés du pétrole, les cimenteries, la fabrication d'engrais azotés ou la sidérurgie. Par conséquent, notre pays est astreint à diminuer les pollutions émises par ces activités économiques et particulièrement agricoles compte tenu de l'importance du secteur dans notre pays, mais tout effort national d'atténuation ne doit pas être économiquement contraignant ni menaçant notre droit au développement. Le protocole de Kyoto venant à expiration en 2012, l'enjeu est

désormais de prolonger et de renouveler une concertation internationale pour la lutte contre le changement climatique.

Parmi le pool des gaz à effet de serre, le dioxyde de carbone représente 69% et le méthane 13%. Mais le méthane exerce, à même concentration, un effet de serre 25 fois supérieur au dioxyde de carbone. (GIEC, 2013) Parallèlement, la rémanence atmosphérique du dioxyde de carbone (>100 ans), largement supérieure à celle du méthane (≈ 12 ans), indique un impact plus décisif d'action sur le méthane que sur le dioxyde de carbone. Il a ainsi été estimé qu'il suffirait de réduire de 10% les émissions de méthane pour stabiliser sa concentration atmosphérique, alors qu'il faudrait réduire de 60% celle du dioxyde de carbone pour le même effet.

Les émissions de méthane d'origine agricole résultent en grande partie de l'élevage de bétail, de la digestion anaérobie de la biomasse, de la production de riz, des cultures sur brûlis et des feux de Savane. Chez les ruminants, le rôle du microbiote digestif dans la fonction de nutrition est singulier et capital, puisque tous les aliments ingérés sont soumis à une digestion microbienne préalable dans le rumen qui constitue leur premier compartiment digestif. L'absorption en aval par l'animal des produits fermentaires microbiens constitue alors la source d'énergie principale, sous la forme d'acides gras volatiles qui couvrent jusqu'à 90% de ses besoins d'énergie métabolisable. Le microbiote ruminal est aussi une source majeure de vitamines et de protéines, fournies par la lyse des cellules microbiennes. Cependant, les fermentations ruminales engendrent également des produits métaboliques non valorisables par l'animal. Principalement, le méthane, rejeté par éructation, exhalaison ou flatulence et qui constitue une perte en énergie pour le ruminant, estimée de 6 à 10% de l'énergie brute ingérée pour des rations riches en fourrages (Martin et al, 2006). Dans le cadre des recherches menées pour limiter les émissions de gaz à effet de serre de toutes natures, plusieurs stratégies ont été expérimentées pour limiter les émissions de méthane par les ruminants : utilisation d'antibiotiques (Monensine, Lasalocide, Salinomycine, Avoparcine), défaunation, ajout de probiotiques divers, vaccination vis-à-vis des bactéries méthanogènes du rumen... Mais toutes ces voies répondent peu ou pas aux objectifs assignés, en particulier par les aspects suivants : efficacité à long terme, sécurité pour l'animal et l'homme, coût. Cette situation a intensifié la recherche d'alternatives reposant essentiellement sur des produits d'origine naturelle, possédant la capacité de moduler positivement la fermentation ruminale, en diminuant la production de méthane. Sans pour autant nuire à la fois au métabolisme du microbiote ruminal et au bilan énergétique global de la ration alimentaire. Parmi ces produits naturels, les extraits de plantes ont montré des effets significatifs en ce domaine, d'où leur intérêt croissant. En

effet, les végétaux synthétisent une gamme étendue de composés secondaires de nature chimique très diverse, parmi lesquels on peut citer : les tanins, les saponines et les huiles essentielles. L'utilisation de plantes riches en ces métabolites semble être actuellement une approche très appréciable car l'origine naturelle de ces composés permet une meilleure acceptation vis à vis des consommateurs, accentuée par leur action positive sur l'environnement. L'activité anti-méthanogène de végétaux riches en métabolites secondaires a été rapportée par plusieurs auteurs, avec des résultats divers mais globalement encourageants. Certaines plantes ou extraits de plantes peuvent en effet modifier l'orientation des fermentations ruminales, parfois avec des effets voisins de ceux des antibiotiques (Busquet et al., 2005). Mais leur mécanisme d'action demeure encore largement méconnu. Il reste notamment à établir leur lien avec le métabolisme microbien et l'équilibre et la dynamique de croissance et d'activité des diverses populations microbiennes du rumen. En particulier des protozoaires et des archées méthanogènes qui leurs sont majoritairement liées. De même que l'incidence intrinsèque de ces composés additifs sur l'animal reste à déterminer, ainsi que leur profil fermentaire spécifique, leur rémanence éventuelle et la nature et l'étendue de leur action.

C'est dans le cadre de cette problématique que s'inscrit notre travail. L'objectif principalement recherché est le contrôle orienté des émissions de méthane chez les ruminants par l'utilisation de divers additifs alimentaires extraits de plantes riches en métabolites secondaires, susceptibles de modifier favorablement l'activité du microbiote ruminal. Une première étude réalisée *in vitro* a eu pour but d'étudier et de spécifier l'action de plusieurs extraits végétaux riches en huiles essentielles et en tanins condensés, testés à différentes doses. Dans une seconde phase, une étude *in vivo* a été engagée pour une validation des résultats obtenus *in vitro* et pour une meilleure connaissance de la méthanogenèse ruminale. Cette étude a été réalisée par une double approche, quantitative (méthane) et cognitive, portant sur les aspects microbiologiques et biochimiques des phénomènes fermentaires induits, de manière à comprendre le mode d'action de ces extraits de plantes, en relation avec la préservation du potentiel nutritionnel des substrats alimentaires.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

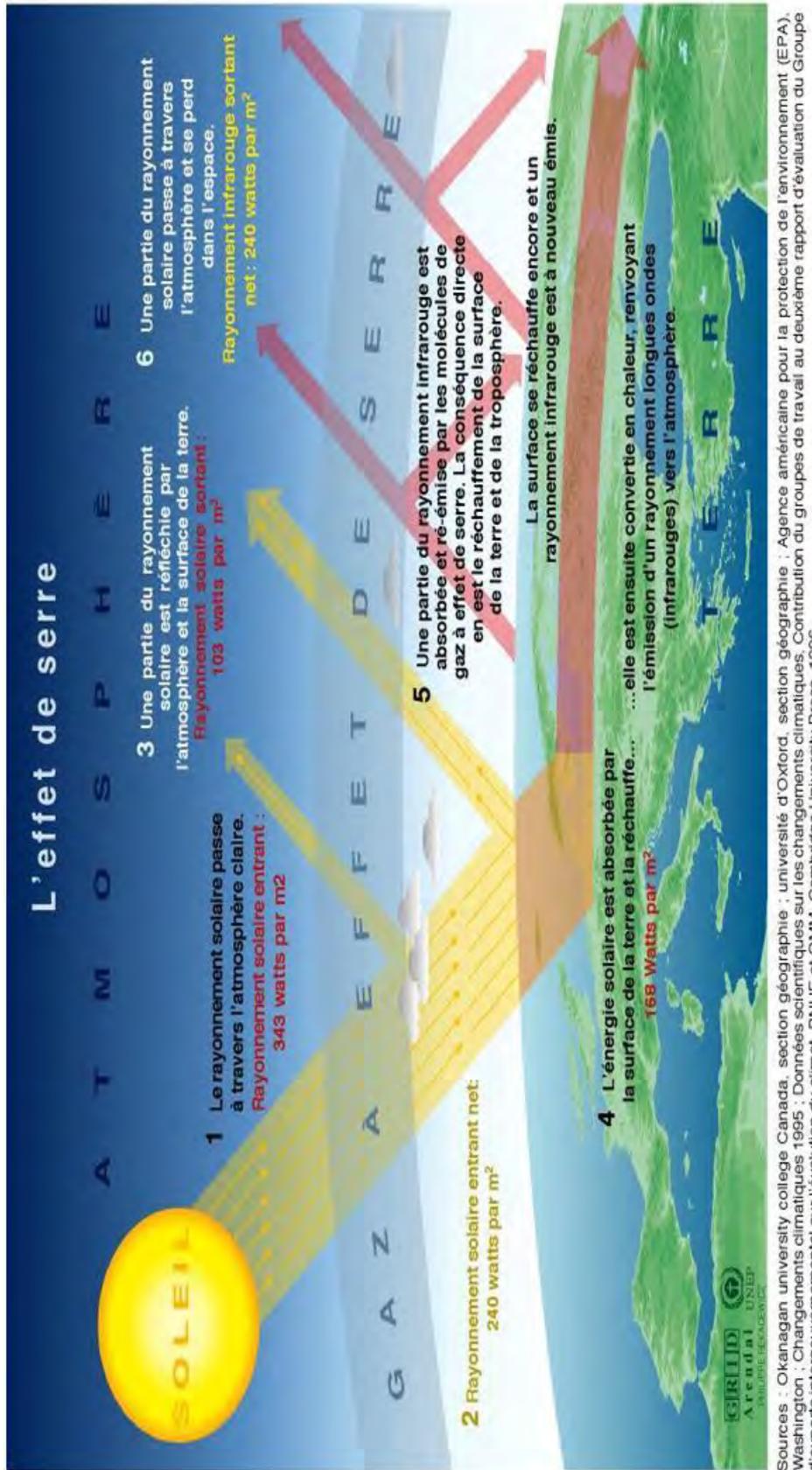


Figure 1. Principe de l'effet de serre

PREMIERE PARTIE: METHANOGENESE ENTERIQUE ET STRATEGIES DE MITIGATION

I/ PRODUCTION DE METHANE ET SON IMPLICATION DANS LE RECHAUFFEMENT CLIMATIQUE

I.1/ Gaz à effet de serre

L'effet de serre désigne un phénomène d'échauffement de la surface de la terre et des couches basses de l'atmosphère, dû au fait que certains gaz de l'atmosphère absorbent et renvoient une partie du rayonnement infrarouge émis par la terre, ce dernier compensant le rayonnement solaire qu'elle absorbe elle-même (Figure 1). Les gaz qui provoquent ce phénomène, tels que le dioxyde de carbone ou le méthane, sont appelés « **gaz à effet de serre**» (GES). On estime que sans GES, la température à la surface du globe serait de -18°C . L'expression « **effet de serre** » est employée usuellement dans le sens d'« **effet de serre anthropique**», qui désigne le réchauffement global du climat attribué à l'augmentation de la concentration des GES, résultant de l'accroissement de leurs émissions dues aux activités humaines et aux combustibles fossiles. Cependant, l'effet de serre existait indépendamment des activités humaines, et était dû essentiellement à la vapeur d'eau et au gaz carbonique et à un degré moindre au méthane. Néanmoins les activités humaines ont fortement accru l'effet de serre, dès le début de l'époque industrielle ; cet accroissement n'est toutefois devenu très important que depuis une trentaine d'années.

Plus d'une quarantaine de GES ont été recensés parmi lesquels figurent : la vapeur d'eau (H_2O), le dioxyde de carbone ou gaz carbonique (CO_2), le méthane (CH_4), l'ozone (O_3), l'oxyde nitreux ou protoxyde d'azote (N_2O), les hydrofluorocarbures (HFC), les perfluorocarbures (PFC) et l'hexafluorure de soufre (SF_6) (Tableau 1) :

- ❖ Le CO_2 représente près de 69% des émissions de GES d'origine anthropique. Il est principalement issu de la combustion des énergies fossiles (pétrole, charbon) et de la biomasse.
- ❖ Le N_2O représente 16% des émissions. Il provient des activités agricoles, de la combustion de la biomasse et des produits chimiques comme l'acide nitrique.
- ❖ Le CH_4 représente 13% des émissions. Il est essentiellement généré par l'agriculture (rizières, élevage). Une partie mineure des émissions provient de la production et de la

distribution de gaz et de pétrole, de l'extraction du charbon, de leur combustion et des décharges.

- ❖ Les gaz fluorés (HFC, PFC, SF6) représentent 2% des émissions. Ces gaz sont utilisés dans les systèmes de réfrigération et employés dans les aérosols et les mousses isolantes. Les PFC et le SF6 sont utilisés dans l'industrie des semi-conducteurs.

Tableau 1. Les principaux gaz à effet de serre

| Gaz à effet de serre | Concentra-tions pré-industrielles* | Concentra-tions 2008 | Source humaine | PRG 100 ans |
|---|------------------------------------|----------------------|--|-------------|
| Dioxyde de carbone (CO ₂) | 278 ppm | 365 ppm | Combustion combustibles fossiles, modification de l'affectation des terres, production de ciment | 1 |
| Méthane (CH ₄) | 700 ppb | 1745 ppb | Combustibles fossiles; rizières; décharges de déchets; bétail | 25 |
| Oxyde nitreux (N ₂ O) | 270 ppb | 314 ppb | Fertilisants; processus industriels; combustion des combustibles fossiles | 298 |
| Chlorofluoro-carbones (CFC-23) | 0 | 14 ppt | Réfrigérants liquides | 14.800** |
| Perfluorocarbones (CF ₄) | 0 | 80 ppt | Réfrigérant; industrie électronique et industrie de l'aluminium | 6.500 |
| Hexafluorure de soufre (SF ₆) | 0 | 4,2 ppt | Isolant utilisé dans l'industrie électronique et l'industrie de magnésium | 22.800 |
| * ppm, parts par million par volume; ppb, parts par billion par volume; ppt, parts par trillion par volume. | | | | |
| ** Ce chiffre a changé en 2007: il est passé de 11.700 à 14.800. ²⁵ | | | | |

Les concentrations des GES continuent d'augmenter dans l'atmosphère (Figure 2). Sans grande surprise, 2014 a donc été une nouvelle année record, selon le bulletin annuel de l'Organisation Météorologique Mondiale. Les trois acteurs principaux de cette problématique restent inchangés : **CO₂, CH₄ et N₂O**.

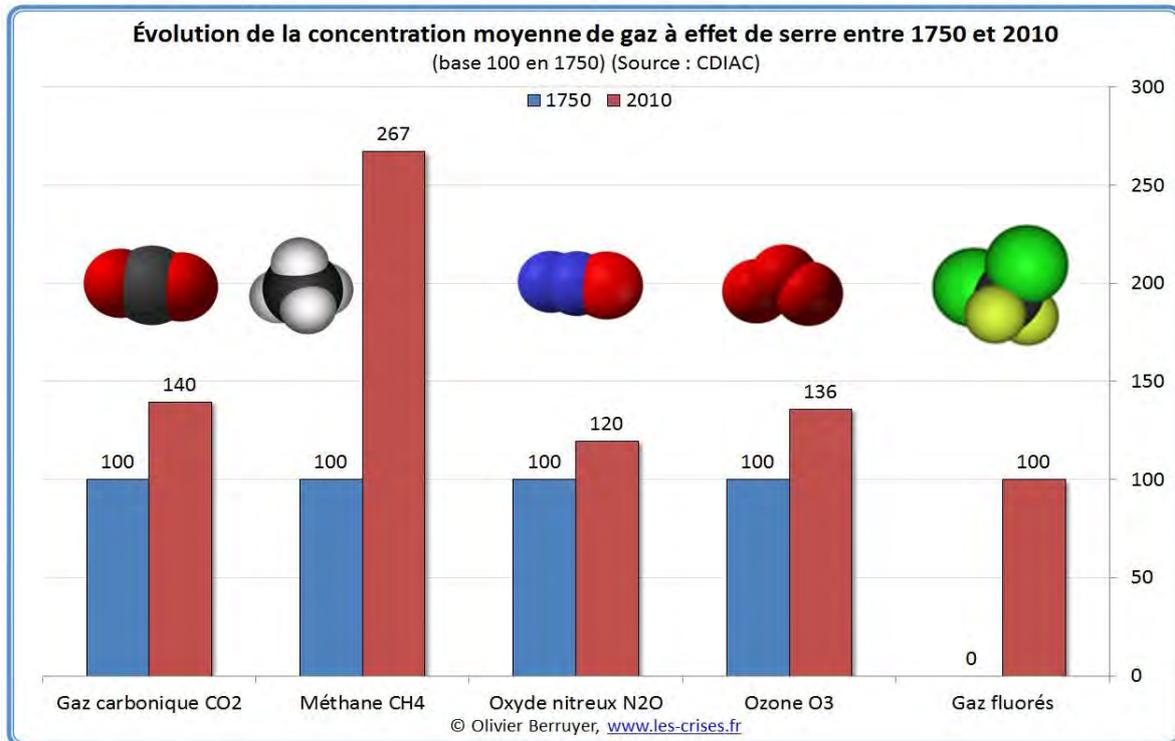


Figure 2. Evolution de la concentration moyenne des gaz à effet de serre entre 1750 et 2010 (base 100 en 1750)

I.2/ Méthane et effet de serre

Le CH₄ a été découvert par Alessandro Volta entre 1776 et 1778. Dans sa célèbre expérience, Volta montra que le gaz libéré par les sédiments littoraux du Lac Majeur (Italie) était inflammable et avait donc une nature différente de celle de l'air (Wolfe, 1993). Le CH₄, gaz inodore et incolore, est le plus simple des hydrocarbures et le principal constituant du gaz naturel. Il contribue au processus de réchauffement climatique. Le forçage radiatif (*équilibre entre le rayonnement solaire entrant et les émissions de rayonnements infrarouges sortant de l'atmosphère*) associé au CH₄ (+0,48 W/m²) est le deuxième plus important après le CO₂ et contribuerait à ~30 % du forçage radiatif total, estimé à +1,6 [-1,0 ; + 0,8] W/m² (Forster et al., 2007). Le CH₄ occupe une place à part parmi les GES. C'est le gaz dont la concentration atmosphérique a le plus augmenté depuis l'ère pré-industrielle (Tableau 1). Sa concentration dans l'atmosphère a quasiment doublé depuis le début du vingtième siècle, les émissions anthropogéniques étant la cause principale.

La contribution d'un GES est habituellement caractérisée par un indice appelé le **potentiel de réchauffement global (PRG)**. Il est calculé par rapport à une référence qui est le

CO₂. Certes, les émissions de CO₂ sont bien plus importantes en quantité que celles du CH₄ mais eu égard au potentiel de réchauffement, le CH₄ contribue fortement à l'effet de serre. **Sur une période de 100 ans, il est estimé qu'une molécule de CH₄ a un potentiel de réchauffement global 25 fois supérieur à celui du CO₂** (Solomon et al., 2007). Malgré l'énorme potentiel de réchauffement du NO₂, la quantité émise étant très faible par rapport au CO₂, son impact n'a pas la même importance que celui du CH₄. Le CH₄ n'agit pas seulement par absorption du rayonnement infra-rouge, il est aussi responsable de la formation photochimique d'autres gaz à effet de serre, comme l'O₃ troposphérique qui résulte de la dégradation du CH₄.

Une autre importance du CH₄ tient au fait que l'on pourrait stabiliser sa concentration dans l'atmosphère en réduisant les émissions anthropogéniques de 10% seulement, alors qu'il faudrait réduire de 60% les émissions de CO₂ pour un même résultat. En effet, les molécules de CH₄ persistent environ 12 ans dans l'atmosphère avant leur récupération dans les **puits de carbone** tels que les océans, le sol et les plantes. Alors que les molécules de CO₂ y séjournent 10 fois plus longtemps, c'est pourquoi une stratégie de réduction des émissions de CH₄ aurait un impact beaucoup plus immédiat sur l'effet de serre qu'une action sur le CO₂, qui ne se ferait sentir qu'à bien plus long terme et impliquerait des efforts autrement plus importants.

I.3/ Méthane et agriculture

Les émissions de CH₄ proviennent surtout de la décomposition de la biomasse (en milieu humide anaérobie), c'est pourquoi l'agriculture y joue un rôle important. Elle contribue à environ 39% (Gerber et al., 2013), dont la majorité étant couverts par les activités liées à la riziculture et à l'élevage. La part relative de l'agriculture dans les émissions de CH₄ a tendance à augmenter au cours de ces dernières années, notamment parce que les émissions provenant des autres secteurs ont diminué. Si à l'échelle mondiale les rizières sont une source importante de CH₄ d'origine agricole, les activités d'élevage y contribuent fortement (Figure. 3). L'émission globale de CH₄ est évaluée à 689 tétragrammes (Tg) par an, comprenant 270 Tg provenant d'origine naturelle (surtout les marécages) et 419 Tg d'émissions anthropogéniques (l'activité humaine). Cette dernière inclut 205-245 Tg/an issues de l'agriculture, générée par la fermentation entérique, la production de riz, la combustion de biomasse et des déchets animaux (Moss et al., 2000). Il s'ensuit que 50-60 % de toutes les émissions anthropogéniques de CH₄ sont attribuables à l'agriculture, (Ellis et al., 2007).

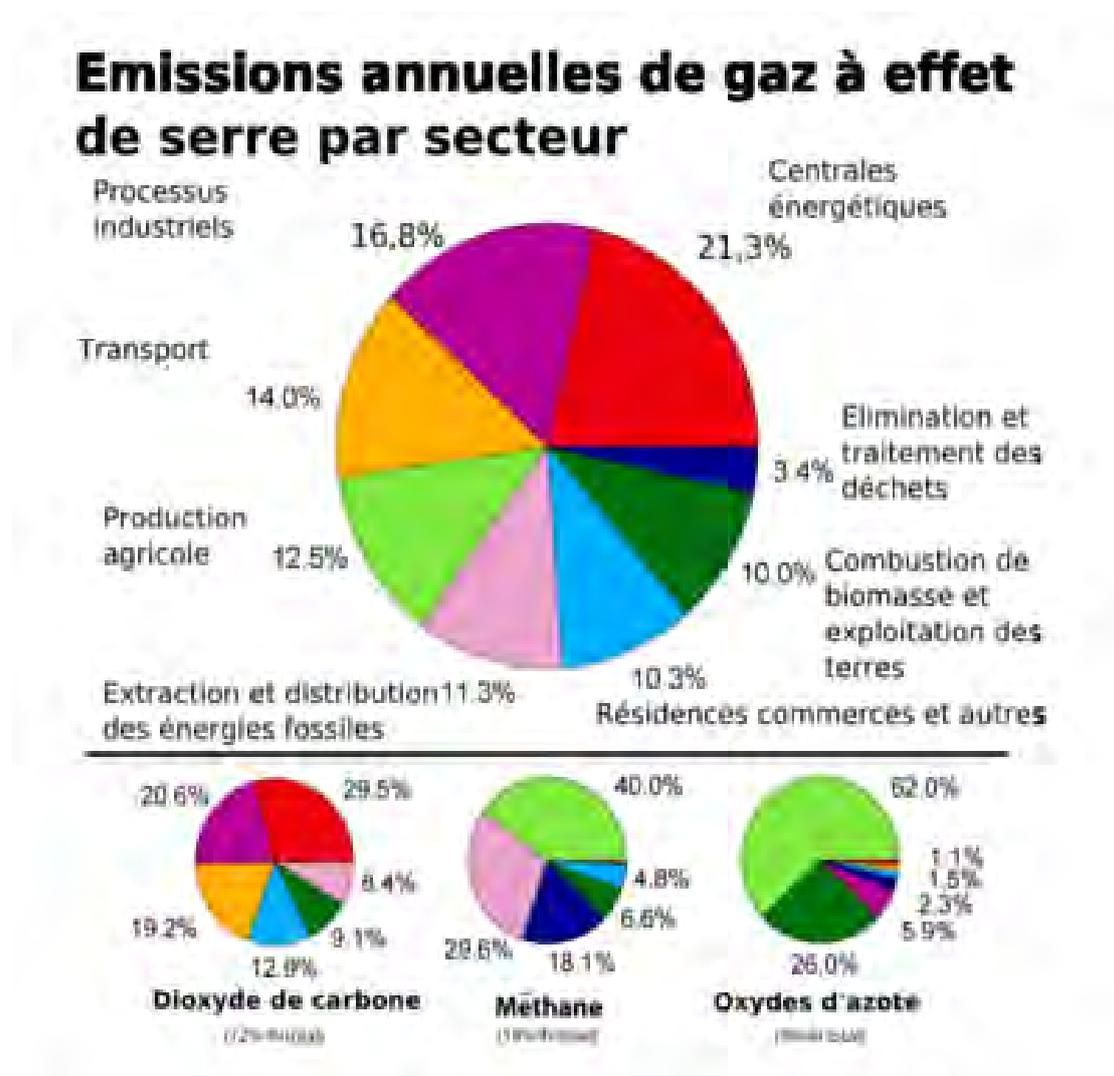


Figure 3. Emissions annuelles de gaz à effet de serre par secteur

I.4/ Méthane et ruminants

Une grande partie du CH₄ d'origine agricole provient d'élevage où il est produit essentiellement par les ruminants (bovins, ovins, caprins...). Leur système digestif comporte un rumen, situé à l'amont du tube digestif, qui permet la digestion microbienne des fourrages et conduit à la production de CH₄, par la suite érucé par l'animal. La production mondiale de CH₄ par les ruminants (bétail et mouton) est annuellement estimée à 76-92 Tg (Lassey et al., 2008) . Ces émissions de CH₄ sont extrêmement variables selon le type d'animal et son alimentation. Les ruminants domestiques comme les vaches, les moutons et les chèvres produisent environ 86 millions Tg de CH₄ par année (McMichael et al., 2007). Environ 18,9 Tg sont dus aux vaches laitières, 55,9 Tg aux bœufs de boucherie et 9,5 Tg aux moutons et

chèvres (McMichael et al., 2007). Johnson et Ward (1996), estiment la contribution annuelle mondiale des buffles entre 6,2 et 8,1 Tg et celle des camélidés entre 0,9 et 1,1 Tg. Chez les ruminants, 89 % du CH₄ produit au cours des fermentations digestives sont rejetés par éructation dans l'atmosphère, ce qui représente à la fois une perte sur la quantité d'énergie fixée par les animaux d'élevage (2–12%, en fonction du régime alimentaire) (Johnson et Johnson, 1995) et une contribution à l'effet de serre. La production de CH₄ par les ruminants varie en fonction de la zone géographique, de la qualité et de la composition du régime alimentaire et du niveau d'ingestion (Johnson et Ward, 1996).

I.5/ Méthanogénèse entérique chez les ruminants

I.5.1/ Rappel sur les particularités digestives chez les ruminants

Les ruminants sont entièrement tributaires de leur microbiote ruminal pour leur digestion et nutrition. En effet, aucun mammifère ne sécrète d'enzymes capables d'hydrolyser les polyholosides structuraux végétaux (cellulose, hémicellulose et pectine). C'est la symbiose entre l'animal et sa communauté microbienne ruminale qui permet aux ruminants d'utiliser l'énergie fixée par les écosystèmes herbacés.

En réponse à leur abondance vis-à-vis des microorganismes pour la digestion des végétaux, les ruminants ont développé au cours de l'évolution des adaptations anatomiques et physiologiques au niveau de leur tube digestif. Différentes poches disposées le long du tractus gastro-intestinal allongent la durée du transit des aliments et favorisent leur attaque par les microorganismes ainsi que l'absorption des métabolites fermentaires.

Les ruminants possèdent un appareil digestif complexe. L'estomac est divisé en 4 compartiments, ce qui les fait qualifier de **polygastriques**. La forme, le volume et la fonction de ces 4 poches diffèrent. On distingue **le rumen** (ou panse), **le réseau** (bonnet ou réticulum), **le feuillet** (omasum) et **la caillette** (abomasum) (Figure 4). Seule la caillette est un véritable estomac glandulaire, riche en glandes gastriques. Elle est pourvue d'une muqueuse identique à celle des autres mammifères. Le rumen est toujours le compartiment le plus volumineux. Rumen, réseau et feuillet sont qualifiés de pré-estomacs.

Chez les bovins, le volume du rumen varie de 120 à 200 L alors qu'il contient 10 à 20 L chez le mouton. Chez la chèvre, il peut atteindre jusqu'à 30 L (Barone, 1984).

Le lieu essentiel de la digestion chez les ruminants est le rumen, où grâce à la symbiose animal-microorganismes, sont digérés 50 à 80% des polyosides végétaux, 40 à 70%

des constituants azotés, la quasi-totalité de l'amidon et la totalité des glucides solubles qui sont fermentés dans le réticulo-rumen.

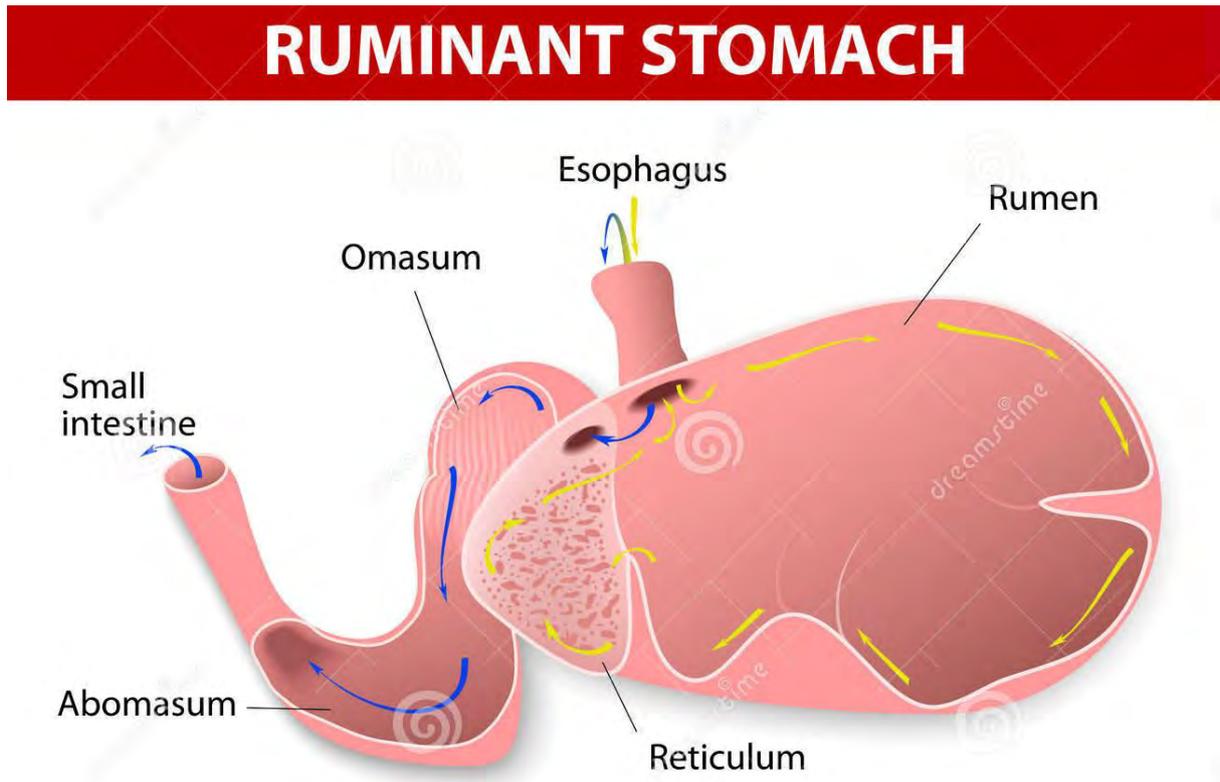


Figure 4. Compartiments digestifs de l'estomac des ruminants

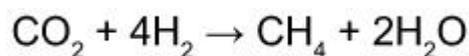
Les ruminants régurgitent leur nourriture pour la broyer à nouveau. La rumination qui est une mastication différée est un avantage digestif et une parfaite illustration des relations symbiotiques hôte-microorganismes. En effet, les végétaux partiellement mâchés arrivent dans le rumen et le réseau où ils subissent une attaque bactérienne puisque ces organes sont dépourvus de sécrétions enzymatiques. Le contenu est ensuite ramené à la bouche où il est à nouveau mastiqué et insalivé. Il passe dans le feuillet où il est en partie déshydraté puis dans la caillette où la digestion se poursuit grâce aux enzymes gastriques. Les métabolites issus des fermentations ruminales sont des acides gras à chaîne courte, encore appelés acides gras volatils (AGV) (acide acétique, propionique, butyrique), de l'ammoniac (NH_3), du CO_2 et du CH_4 . Les AGV sont absorbés à travers la paroi ruminale et véhiculés jusqu'au foie alors que les gaz sont essentiellement éructés dans l'atmosphère. Les AGV constituent la source énergétique essentielle des ruminants. Une grande partie du NH_3 est réutilisé par les

microorganismes comme source d'azote. Après leur passage dans la caillette, les digesta et les bactéries sont évacués dans les compartiments postérieurs du tube digestif où la digestion se poursuit. Lors du transit dans l'intestin grêle, une partie de la communauté bactérienne est lysée, les acides aminés et les vitamines libérés sont absorbés dans le sang et couvre plus de la moitié des besoins en acides aminés et la totalité des besoins en vitamine B de l'hôte.

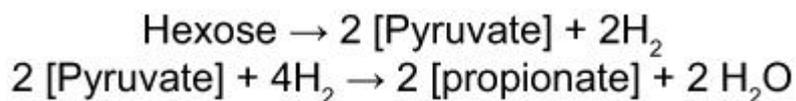
I.5.2/ Mécanisme de la méthanogénèse dans l'écosystème digestif des ruminants

La production d'énergie au cours des processus fermentaires est le résultat de réactions d'oxydation qui, en milieu anaérobie (absence d'oxygène), se traduisent par la libération d'hydrogène (H₂) métabolique produit dans la cellule sous différentes formes de cofacteurs réduits comme le NADH, NADPH, FADH. La forme oxydée de ces cofacteurs (NAD⁺, NADP⁺, FAD⁺) est ensuite régénérée pour permettre la poursuite des fermentations. Cette dernière étape conduit à la formation de H₂ libre, résultant de la fermentation des glucides sous forme d'acétate et de butyrate, dans le pool gazeux du milieu fermentaire (Figure 5) (Morgavi et al., 2012). Or, le H₂ formé doit être éliminé au fur et à mesure de sa production puisqu'une élévation de sa pression partielle inhiberait l'action des déshydrogénases impliquées dans le processus de réoxydation des cofacteurs réduits (Miller, 1995).

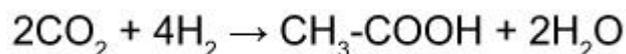
Cette fonction vitale est assurée de manière continue et majoritairement dans le rumen par une population microbienne spécifique, les **archées méthanogènes**, afin de réduire une partie du CO₂ en CH₄, selon la réaction suivante :



Des voies métaboliques concurrentes pour l'utilisation du H₂ existent mais leur efficacité est moindre. Ainsi, la synthèse de propionate mobilise 2 H₂ par mole de propionate formée contre 4H₂ par mole de CH₄ synthétisée.



Comme la méthanogénèse, la production d'acétate par la voie de l'acétogénèse réductrice correspond à une réduction du CO₂ par le H₂, mais elle ne mobilise que 2 H₂ par mole de CO₂.



Dans les écosystèmes digestifs des ruminants, la méthanogénèse est essentiellement un métabolisme hydrogénotrophe, la méthanogénèse acétotrophe est négligeable. La voie de

l'acétogénèse, mise en évidence dans le gros intestin des ruminants, n'intervient qu'à un niveau faible dans le rumen (Jouany et al., 1995).

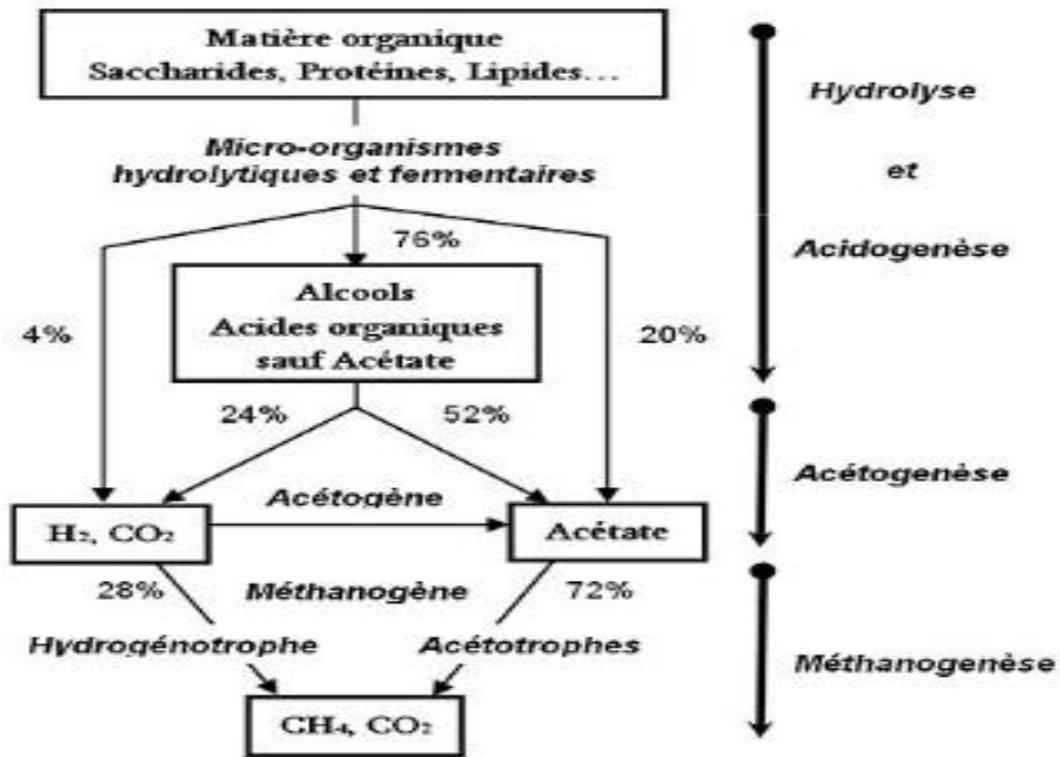


Figure 5. Schéma de la méthanogénèse et de ses différentes étapes dans le rumen

La méthanogénèse implique la consommation du H_2 et la réduction par paliers du CO_2 . Un certain nombre de substrats peuvent être utilisés pour la réaction : acétate, formate, alcools de petite taille issus de la dégradation des pectines... Mais le CO_2 et le H_2 sont néanmoins les principaux substrats impliqués. Ainsi, la majorité du H_2 provenant de la dégradation des glucides aboutit au CH_4 chez les ruminants. **On peut donc considérer que la production de CH_4 est une voie métabolique essentielle dans l'élimination absolument nécessaire du H_2 métabolique ruminal.** Il est admis qu'une réduction de 20% du CH_4 digestif ne perturbe pas les fonctions digestives ou fermentaires essentielles du rumen (Martin et al., 2006). Au-delà de ce seuil, une réduction de la méthanogénèse ne peut être envisagée que si le H_2 peut être métabolisé par d'autres voies, conduisant par exemple à la synthèse de propionate pour éviter son accumulation dans les gaz de fermentation.

I.6/ Microbiologie de la méthanogénèse entérique

Les aliments ingérés par l'animal restent entre 20 et 70 heures dans le rumen, où ils sont en grande partie dégradés par un assortiment de microorganismes. Deux groupes de cet assortiment microbien sont les principaux producteurs de H₂, il s'agit des bactéries et des protozoaires. Un autre groupe se charge d'utiliser le H₂ pour produire le CH₄, il s'agit des archées méthanogènes.

I.6.1/ Bactéries

Les bactéries représentent le plus grand nombre de microorganismes colonisant le rumen. Leur nombre varie entre 10¹⁰ et 10¹¹ bactéries / g de contenu ruminal (Stewart et al., 1997). La majorité des bactéries du rumen sont strictement anaérobies et plus de 200 espèces ont été isolées à ce jour. Leur classification a évolué en fonction de l'avancée des techniques. Les bactéries peuvent être classées phénotypiquement selon des critères morphologiques (forme et groupement des bactéries, présence ou absence de flagelle, nature de la paroi, type de mobilité...) ou selon des critères physiologiques (voies métaboliques, types de substrats utilisés...). Cette dernière classification conduit aux groupes fonctionnels suivants : bactéries cellulolytiques, bactéries hémicellulolytiques, bactéries pectinolytiques, bactéries amylolytiques, bactéries protéolytiques, bactéries utilisatrices de lactate (Tableau 2) (Fonty et al., 1995).

Deux types de bactéries cellulolytiques sont trouvés dans le rumen : des bacilles (parmi lesquels sont majoritairement isolés : *Fibrobacter succinogenes* et *Butyrivibrio fibrisolvens*) et des coques (représentés par *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus*) (Figure 6). ***F. succinogenes*, *R. albus* et *R. flavefaciens* sont connues pour être les principales espèces cellulolytiques du rumen** (Forsberg et al., 1997). La population cellulolytique représente, selon les études, entre 4 et 9% de la population bactérienne du rumen (Michalet-Doreau et al., 2001), elle peut même représenter jusqu'à 17% de cette population (Martin et al., 2001).

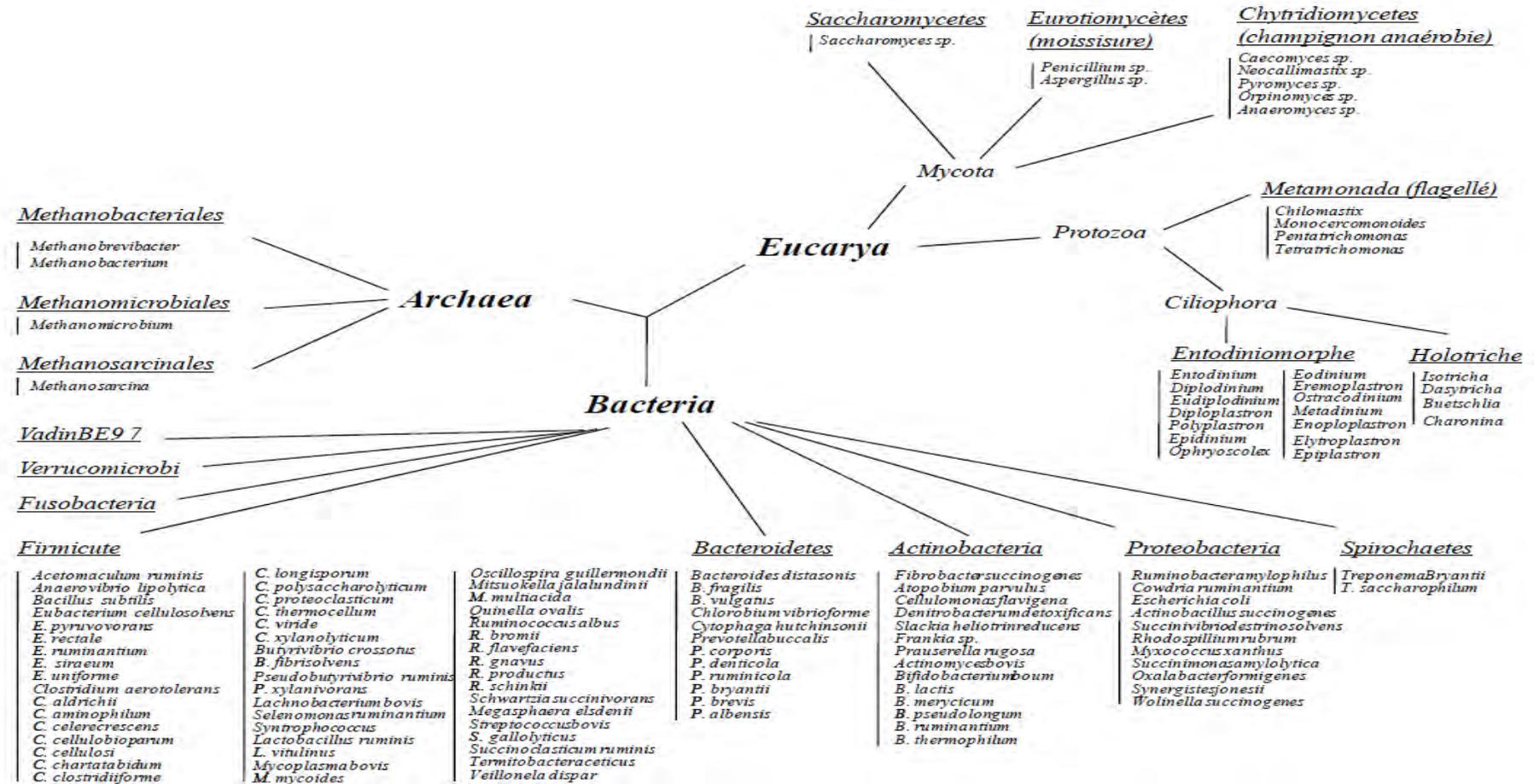


Figure 6. Représentation des principaux taxons microbiens observés dans les systèmes digestifs (d'après Michelland, thèse 2009)

Tableau 2. Bactéries du rumen avec leurs sources d'énergie et produits de fermentation obtenus dans des études *in vitro*

| Espèce bactérienne | Description | Source d'énergie typique | Produits fermentaires typiques (sans gaz) | | | | | | Source d'énergie alternative | |
|----------------------------------|---|--------------------------|---|---|---|---|---|---|------------------------------|-------------------|
| | | | A | P | B | L | S | F | | |
| <i>Fibrobacter succinogenes</i> | Bacille Gram négatif | Cellulose | + | | | | | + | + | Glucose (Amidon) |
| <i>Ruminococcus flavefaciens</i> | Gram positif, Catalase négative streptococci avec des colonies jaunes | Cellulose | + | | | | + | + | + | Xylène |
| <i>Ruminococcus albus</i> | Cocci Gram positif seul ou en paire | Cellobiose | + | | | | | | + | Xylène |
| <i>Streptococcus bovis</i> | Gram positif, Cocci en courte chaînette, capsulées | Amidon | | | | | + | | | Glucose |
| <i>Prevotella ruminicola</i> | Bacille Gram négatif | Glucose | + | | | | | + | + | Xylène, amidon |
| <i>Megasphaera elsdenii</i> | Gram positif, cocci large en paire ou en chaînette | Lactate | + | + | + | | | | | Glucose, glycérol |
| <i>Lachnospira multipara</i> | Bacille courbé, Gram positif | Pectine | + | | | | + | | | Glucose, fructose |

1) A = acétate ; P = propionate ; B = butyrate ; L = lactate ; S = succinate ; F= formate

(Source : McDonald et al., 2002 ; Dehority, 2003)

Les principales bactéries hémicellulolytiques sont *B. fibrisolvans*, *Prevotella ruminicola*, ainsi que les *Ruminococci* (Tiret, 2001). Les espèces non cellulolytiques comme *Ruminobacter amylophilus*, *Succinimonas amylolytica* et *Selenomonas ruminantium* comprennent de nombreuses souches qui dégradent l'amidon.

Une grande proportion de bactéries ruminales possède une activité protéolytique et près de la moitié (entre 30 et 50 %) des bactéries totales viables isolées du rumen peut être protéolytique (Wallace, 1986).

Les bactéries présentent trois grandes localisations dans le biotope ruminal : la plupart colonisent la surface des particules alimentaires (fibres végétales, grains d'amidon) dès leur arrivée dans le rumen ; d'autres vivent à l'état planctonique dans le liquide ruminal, certaines, enfin, sont attachées à l'épithélium interne (Fonty et al., 1995).

1.6.2/ Protozoaires

Le rumen abrite une population complexe de protozoaires, comprenant les **flagellés** et les **ciliés** (Figure 6) (Jouany et al., 1995). La diversité et l'activité des flagellés ne sont pas encore bien connues. Les ciliés représentent le groupe majoritaire dans le rumen, leur concentration peut atteindre 10^5 à 10^6 cellules/mL de liquide ruminal. La densité des protozoaires est faible au regard de celle des bactéries mais ils représentent entre 20 et 50% de la biomasse microbienne (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007). Les ciliés du rumen appartiennent à deux groupes : les **Entodiniomorphes** et les **Holotriches**. Au sein des Entodiniomorphes, on retrouve un nombre important de genres : *Entodinium*, *Eudiplodinium*, *Eodinium*, *Diplodinium*, *Polyplastron*, *Diploplastron* et *Metadinium*. Concernant les Holotriches, les genres rencontrés dans le rumen sont majoritairement *Isotricha* et *Dasytricha* (Williams et Coleman, 1997).

Les protozoaires ciliés colonisent le rumen en dernier, après 2 semaines de cycle de vie selon une séquence bien définie : les *Entodinium* entre 15 et 20 jours, les *Polyplastron* et les *Entodiplodinium* entre 20 et 25 jours et les *Isotricha* à partir de 50 jours (Fonty et al., 1987). Le développement des protozoaires dépend du contact avec d'autres ruminants par la salive, l'air et la nourriture. Leur établissement permanent est retardé par l'acidité liée à la fermentation d'une partie du lait passant dans le rumen. Cet établissement est considéré complet à l'âge de 9 semaines.

Les protozoaires ciliés participent aussi au métabolisme glucidique dans le rumen car ils ingèrent les particules alimentaires et les digèrent à l'intérieur de leurs vacuoles (Ushida et Jouany, 1994). Les parois végétales sont fortement dégradées par les Entodiniomorphes alors que les Holotriches fermentent plutôt les sucres solubles, excepté le mannose et la glucosamine (Jouany et Ushida, 1998). *Isotricha* possède une forte activité amylolytique (Gouet et al., 1986) et la dégradation de l'amidon conduit à la formation d'acide butyrique, du H_2 , et du CO_2 majoritairement et à un peu d'acides propionique et lactique.

Les interactions avec d'autres microorganismes sont nombreuses : les protozoaires ingèrent les bactéries endogènes ou exogènes comme source de protéines pour leur synthèse cellulaire. Une partie des protozoaires est également liée aux archées méthanogènes. En effet, Tokura et al., (1999a) ont montré que *Isotricha* spp., *Polyplastron multivesiculatum*, *Ophryoscolex caudatus*, et *Entodinium* spp., isolés de rumen, sont associés à des archées méthanogènes (mis en évidence par autofluorescence) ; *O. caudatus* et *Isotricha* montrent l'association la plus importante. Dans une autre étude, Tokura et al. (1997) ont conclu que les

archées méthanogènes ruminales associées aux ciliés sont phylogénétiquement distinctes des archées méthanogènes vivant seules. D'autres études indiquent que les archées méthanogènes appartenant à la famille des *Methanobacteriaceae* s'associent fréquemment aux protozoaires ruminiaux. Selon Tokura et al. (1999b) le groupe d'archées méthanogènes phylogénétiquement proche de *Methanobrevibacter smithii* semble former le groupe dominant des archées méthanogènes associées aux ciliés issus de rumen de moutons.

La présence quantitative des protozoaires varie rapidement avec le repas. La nourriture influence leur population quantitativement et qualitativement. Le changement alimentaire doit être progressif au risque d'entraîner la mort des ciliés, sensibles aux pH acides.

Les protozoaires sont de forts producteurs de H₂, quand leur nombre diminue, il y a forcément moins de H₂ et donc moins de substrat pour former du CH₄ (Guyader et al., 2014). Le rôle et la nécessité des protozoaires restent controversés : ils améliorent la digestion des glucides, diminuent l'efficacité d'utilisation de l'azote mais ils ne sont pas indispensables au fonctionnement du rumen.

1.6.3/ Archées méthanogènes

Les conditions environnementales du tube digestif sont particulièrement favorables aux archées méthanogènes, et la méthanogénèse ruminale résulte de l'activité exclusive des ces bactéries qui font partie du domaine des **Archaea** et du règne des **Euryarchaeota** (Shin et al., 2004). Il s'agit d'organismes procaryotes anaérobies strictes, représentant environ 4% des microorganismes du rumen (Yanagita et al., 2000). Ces organismes complètent les fermentations des bactéries anaérobies en utilisant le H₂ (produit lors de la fermentation des glucides par les bactéries) présent dans le rumen pour synthétiser et produire du CH₄ (Wolin et al., 1997) comme principal produit de fermentation. En raison du rôle du CH₄ dans le réchauffement de la planète et de la perte d'énergie qui en résulte pour les ruminants, un intérêt important est porté à ces organismes.

La population d'archées méthanogènes au niveau du rumen est évaluée entre 10⁸ et 10⁹ archées / g de contenu ruminal par des méthodes culturales. Des études, basées sur la culture ou sur l'analyse moléculaire, montrent que les archées méthanogènes ruminales les plus communément isolées appartiennent à la famille des *Methanobacteriaceae* et il s'agit fréquemment d'espèces appartenant au genre *Methanobrevibacter* (Janssen et Kirs, 2008). Des études phylogéniques, basées sur l'ADNr 16S, révèlent l'existence de nouveaux groupes d'archées méthanogènes appartenant au phylum *Euryarchaeota* (Tajima et al., 2001 ;

Whitford et al., 2001). D'autres archées méthanogènes appartenant à la famille des *Methanomicrobiaceae* ont été découvertes chez des bovins et des ovins; tandis que des archées méthanogènes de la famille des *Methanosarcinaceae* ont été trouvées chez les caprins et les bovins (Skillman et al., 2006).

Methanobrevibacter spp. est la principale espèce d'archées méthanogènes dans le rumen, ce qui est montré que ce soit par des méthodes de culture (Stewart et al., 1988), ou par des analyses génomiques (Sharp et al., 1998). La souche type est *Methanobrevibacter ruminantium*. Décrite pour la première fois par Smith et Hungate (1958) comme *Methanobacterium*, *M. ruminantium* est un coccobacille Gram positif, non motile, d'environ 0,7 µm de large, sur 1,8 µm de long. Ses principaux substrats sont le H₂ et le CO₂ mais le formate peut également être utilisé lorsqu'il est présent en grande concentration dans le rumen. D'autres souches de *Methanobrevibacter* spp. sont isolées du rumen : des souches de *M. smithii* et de *Methanobrevibacter thaueri* (Skillman et al., 2006). Selon Skillman et al. (2006), *M. thaueri* serait même l'archée méthanogène prédominante chez le veau laitier au pré, bien que d'autres études insistent sur l'importance de *M. ruminantium* et de *M. smithii*, associées aux protozoaires ciliés du rumen (Tokura et al., 1999a).

Parmi les espèces d'archées méthanogènes, on note également la place importante de *Methanomicrobium mobile*. Ainsi, selon Yanagita et al. (2000), près de 54% des archées méthanogènes ruminales chez les ovins seraient des souches de *M. mobile*. Cette espèce appartient à la famille des *Methanomicrobiaceae*. C'est un bacille Gram négatif, faiblement motile, ne sporulant pas, d'une taille de 0,7 µm sur 1,5 à 2 µm (Paynter et al., 1968). Une troisième espèce d'archées méthanogènes est fréquemment impliquée dans le rumen : *Methanosarcina* spp. (Yanagita et al., 2000), qui appartient à la famille des *Methanosarcinaceae*. Il s'agit de bactéries à Gram positif, non motiles, d'un diamètre de 1,5 – 2 µm, qui se présentent en paquet ou en large groupes.

Outre ces trois familles d'archées méthanogènes, dont les différentes espèces précédemment citées sont considérées comme les principales archées méthanogènes du rumen, on peut rajouter *Methanobacterium formicicum*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanoculleus olentagyi*, ainsi que d'autres espèces nouvellement découvertes grâce aux outils de biologie moléculaire.

Contrairement aux bactéries, la paroi cellulaire des archées méthanogènes est dépourvue de peptidoglycane, celui-ci est remplacé par des pseudomureines chez certaines espèces telles que *Methanobrevibacter* et *Methanobacterium*, par un hétéropolysaccharide

chez d'autres espèces comme *Methanosarcina*, ou par des protéines chez les espèces appartenant au genre *Methanomicrobium* (Balch et al., 1979). Toutes les archées méthanogènes possèdent le coenzyme F420, qui est un cofacteur enzymatique nécessaire à l'activité de l'hydrogénase et de la formate déshydrogénase. Ce dernier a reçu son nom en raison de son absorbance à 420 nm qui le fait paraître fluorescent en bleu-vert à 470 nm (Ashby et al., 2001). Un autre coenzyme est caractéristique des archées méthanogènes, il s'agit du **coenzyme M**, ou l'acide 2-mercaptoethanesulfonique qui intervient dans la réaction de transfert, à l'avant-dernière étape de la méthanogénèse (Hobson and Stewart, 1997)

Les archées méthanogènes dans le rumen sont généralement attachées aux particules et à l'épithélium du rumen ainsi qu'aux protozoaires (Ohene-Adjei et al., 2007). La densité en archées méthanogènes varie en fonction de la phase du rumen étudiée : respectivement 3.10^8 , 2.10^9 et 9.10^9 copies de gène de l'ARNr 16S pour les phases liquides, solides et de l'épithélium du rumen (Pei et al., 2010). Cette étude montre aussi la prédominance du genre *Methanobrevibacter* au sein des trois phases du rumen étudiées, avec respectivement 84, 78 et 77% d'abondance pour les phases liquides, solides et de l'épithélium du rumen (Pei et al., 2010). Tymensen et al. (2012) ont d'autre part montré que les archées méthanogènes libres au niveau du rumen appartiennent aux groupes RCC (aussi appelé groupe C, apparenté de loin aux *Thermoplasma*) et *Methanomicrobium*, alors que les archées méthanogènes associées aux protozoaires appartiennent plutôt au groupe *Methanobrevibacter*. En effet, une relation étroite entre les archées méthanogènes et les protozoaires ciliés ruminiaux est évidente. Néanmoins, l'association ciliés-méthanogènes est encore mal comprise, même si certains auteurs ont apportés la preuve de l'existence d'adhésion. L'abondance relative des archées méthanogènes observée au niveau du rumen varie en fonction de la nature des rations et des protozoaires présents. Mais les résultats obtenus dépendent aussi de la méthodologie, en particulier des amorces utilisées pour leurs identifications (Tymensen et al., 2012).

Les substrats utilisés pour la production de CH₄ par les archées méthanogènes incluent le H₂ et le CO₂, le méthanol, les méthylamines (formés dans le rumen lors de la dégradation de la choline) et l'acétate (Stewart et al., 1988). Les archées méthanogènes dans le rumen sont essentiellement des hydrogénotrophes. Cependant, des séquences appartenant au genre *Methanosarcina*, caractérisé par le métabolisme versatile de ses membres, ont été identifiées (Denman et al., 2007). Les représentants de ce groupe minoritaire utilisent principalement les méthylamines et l'acétate comme substrats et sont des hydrogénotrophes occasionnels (Balch et al., 1979 ; Garcia et al., 2000). Enfin, les archées méthanogènes

présentent une grande sensibilité à des pH inférieurs à 6 (Tiret, 2001) et leur nombre diminue donc à des pH inférieurs à cette valeur.

I.6.4/ Champignons

Les champignons du rumen sont anaérobies stricts, ce qui est tout à fait exceptionnel dans leur groupe, ils assurent uniquement la fermentation de tissus cellulotiques. Cinq principaux genres différents de champignons du rumen ont pu être isolés et identifiés, ils appartiennent à la famille des *Neocallimastigomycetes* comprenant les genres suivants : *Anaeromyces*, *Caecomyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces* et *Piromyces* (Tableau 3, Figure 6) (Orpin et Joblin, 1997 ; Kittelmann et al., 2012). Une étude récente a montré que chez les ruminants, *Piromyces* et *Neocallimastix* spp. sont les champignons les plus abondants chez tous les ruminants (Kittelmann et al., 2012). Les champignons du rumen sont souvent liés aux fibres composant la phase solide et représentent environ 5 à 10% de la biomasse microbienne totale du rumen (Orpin, 1981).

Tableau 3. Caractéristiques des champignons anaérobies du rumen d'herbivores

| Genre | Type de thalle | Flagellation | Espèce |
|----------------------------------|--------------------------------|--------------|------------------------------|
| <i>Neocallimastix</i> | Monocentrique | Multi | <i>frontalis</i> |
| | | Multi | <i>patriciarum</i> |
| | | Multi | <i>hurleyensis</i> |
| | | Multi | <i>variabilis</i> |
| <i>Piromyces</i> | Monocentrique | Uni | <i>communis</i> ¹ |
| | | Uni | <i>mare (cheval)</i> |
| | | Uni | <i>dumbonica (elephant)</i> |
| | | Uni | <i>rhizinflata</i> |
| | | Uni | <i>spiralis</i> |
| <i>Caecomyces</i> | Monocentrique ou polycentrique | Uni | <i>communis</i> |
| | | Uni | <i>equi</i> |
| <i>Orpinomyces</i> | Polycentrique | Multi | <i>bovis</i> |
| | | Multi | <i>joyonii</i> ² |
| <i>Anaeromyces (Ruminomyces)</i> | Polycentrique | Uni | <i>elegans</i> ³ |
| | | Uni | <i>mucronatus</i> |

1) Quelques zoospores multiflagellés observées

2) Nom original *Neocallimastix joyonii*

3) Nom original *Ruminomyces elegans*

(Source : Hespell et al., 1997)

Les champignons du rumen ont un fort potentiel fibrolytique grâce à une forte production de polysidases, qui permettent de dépolymériser la cellulose et les hémicelluloses et d'hydrolyser les oligosaccharides libérés mais ils ne dégradent pas la pectine. Les

champignons produisent une importante quantité de H₂ et sont donc associés, dans les réactions métaboliques, aux archées méthanogènes consommatrices du H₂ (Stewart et al., 1988). Les champignons ne sont pas indispensables, ils sont parfois absents et prennent toute leur importance avec les fourrages de mauvaise qualité.

I.6.5/ Bactériophages

La mise en évidence de bactériophages au sein du rumen a été réalisée depuis longtemps (Brailsford et Hartman, 1968; Tarakanov, 1971; Orpin et Munn, 1974). Cependant et jusqu'à présent, peu d'études leur ont été consacrées. Vingt six types morphologiques différents ont été observés (Klieve et Bauchop, 1988). Leur concentration est estimée à 10⁹-10¹⁰ phages/mL de contenu ruminal (Klieve et Swain, 1993). Les bactériophages sont capables de lyser les bactéries, notamment les bactéries cellulolytiques du rumen (Klieve et al., 2004). De ce fait, cette lyse peut altérer la dégradation des fibres et conduire donc à une diminution de l'efficacité de la dégradation des aliments.

II/ STRATEGIES DE REDUCTION DU METHANE ENTERIQUE

Cette partie vise à présenter la situation actuelle sur les leviers d'action contre la méthanogénèse ruminale au niveau mondial pour ensuite cibler, de manière plus précise, l'option des métabolites secondaires de plantes.

II.1/ Situation actuelle et projection

Toute orientation fermentaire qui augmente l'utilisation du H₂ métabolique ou qui en diminue la production est utile pour réduire la méthanogénèse. Cette évolution peut être obtenue par une action globale, au niveau de la ration et de l'animal, ou spécifique par le contrôle des populations microbiennes (spécialement les archées méthanogènes) à l'aide d'additifs (Tableau 4, Figure 7).

Tableau 4. Stratégies de réduction de méthane, mécanisme de réduction et considérations à prendre avant utilisation

| Stratégie de réduction de méthane | Mécanisme | Considération à prendre |
|---|--|--|
| Composition de l'aliment Augmentation hemicellulose/amidon Diminution des parois végétales Broyage | Augmentation du taux de passage; forte proportion de propionate versus acétate; réduction de pH ruminal | Risque d'acidose ruminale |
| Lipides Acides gras Huile Graines Suif | Inhibition de méthanogènes et de protozoaires; forte proportion de propionate versus acétate; biohydrogénation | Effet sur la palatabilité, l'ingestion, les performances, et la composition du lait; varie avec le régime et l'espèce animale; études à long-terme nécessaires |
| Defaunation Chimique Additifs alimentaires | Inhibition des archées méthanogènes associées, moins d'hydrogène pour la méthanogénèse | Eventuelle adaptation du microbiote; varie avec le régime; maintenance d'animaux defaunés |
| Vaccin contre les archées méthanogènes | Réponse immunitaire de l'hôte | Cibles de vaccins; régime et différences géographiques de l'hôte |
| Monensin | Inhibition des protozoaires et des bactéries Gram-positif; manque de substrat pour la méthanogénèse | Eventuelle adaptation du microbiote; varie avec le régime et l'animal, interdit dans l'union européenne |
| Acides organiques Fumarate Malate | Voie d'hydrogène, forte proportion de propionate versus acétate | Varie avec le régime; recherches <i>in vivo</i> nécessaires; étude à long terme nécessaires; peut affecter la digestibilité |
| Métabolites secondaires de plantes Tanins condensés Saponines Huiles essentielles | Activité antimicrobienne; réduction d'hydrogène | Dosage optimum inconnu, des recherches <i>in vivo et à long terme</i> nécessaires, peut affecter la digestibilité; résidus inconnus |

Ainsi, les stratégies de réduction se basant sur la ration s'articulent autour de :

- ❖ **L'accroissement de la proportion de concentré dans la ration** qui entraîne une diminution de la production de CH₄. Les aliments concentrés et les grains riches en amidon ont fait l'objet de plusieurs études (Lovett et al., 2003; Sauvart et Giger-Reverdin, 2007; Doreau et al., 2011). En général, elles ont conclu que, chez l'animal, l'ajout d'aliments concentrés riches en amidon (maïs, orge) permet de réduire la production de CH₄ dans le rumen. Les rations riches en amidon sont plus facilement digérées dans le rumen, la concentration totale des fibres y étant plus faible. La digestion de ces concentrés résulte en une diminution de la proportion d'acétate et une augmentation du propionate dans le liquide ruminal, ce qui engendre une réduction de la production de CH₄ dans le rumen (Beauchemin et al., 2008). De plus, l'amidon, étant plus rapidement digéré que les fibres de celluloses, les rations riches en amidon

transitent alors plus rapidement dans le rumen, ce qui contribue aussi à diminuer le CH₄ émis.

- ❖ **La qualité des fourrages** donnés aux animaux peut également influencer la production de CH₄ entérique. Améliorer la qualité des fourrages est une méthode simple de réduction journalière du CH₄. En sélectionnant des espèces végétales digestibles, répondant aux besoins alimentaires des animaux et en les récoltant au bon stade de croissance, il est possible d'améliorer la qualité de l'alimentation (Archimède et al., 2011). La qualité des fourrages dépend de plusieurs facteurs: concentration en fibres, énergie disponible, matières grasses, protéines, etc.
- ❖ **L'enrichissement en lipides de la ration** est une voie nutritionnelle prometteuse pour réduire les émissions de CH₄. La raison la plus évidente est que les lipides, quels qu'ils soient, ne fournissent pas de substrat pour la production de CH₄ dans le rumen, contrairement à la fermentation des glucides auxquels ils se substituent (Doreau et al., 2011). Les sources de gras sont diverses : huile de noix de coco, canola, soya, tournesol, lin, palme (et ses dérivés raffinés). Ils agissent en inhibant les protozoaires et en limitant la concentration du H₂.

La réduction de la méthanogénèse entérique par les manipulations biotechnologiques a fait l'objet de plusieurs essais par différentes approches comme :

- ❖ **La défaunation** a été aussi employée comme option de mitigation. Elle consiste à éliminer les protozoaires du rumen car une partie des archées méthanogènes vit attachée à la surface extérieure des protozoaires ciliés du rumen. Cette symbiose participe au transfert du H₂ nécessaire à la réduction du CO₂ en CH₄ par les archées méthanogènes (Machmüller et al., 2003). Les archées méthanogènes associées aux protozoaires ciliés sont responsable de 9 à 37 % de la production de CH₄ dans le rumen (Newbold et al., 1995 ; Machmüller et al., 2003). De ce fait, la défaunation permet de réduire la production de CH₄ sans effets remarquables sur la digestion ruminale.

- ❖ **La vaccination** constitue une autre stratégie de réduction de CH₄ dont le but est de stimuler le système immunitaire des ruminants pour produire des anticorps contre les archées méthanogènes, sans affecter les autres importants microbes du rumen (Wright et al., 2004).
- ❖ **L'utilisation de bactériocines** comme celle produite par les espèces de *Streptococcus* du rumen et la Nisine, produite par *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis*, qui ont pu atténuer jusqu'à 50 % la production de CH₄ *in vitro*.

Des additifs chimiques ont été utilisés pour réduire la production de CH₄, ils regroupent :

- ❖ **Les antibiotiques ionophores**, principalement monensin et lasalocide, sont une catégorie d'antibiotiques dotés de propriétés spécifiques (action sur le transport actif du calcium) qui se traduisent par une toxicité vis-à-vis des bactéries à Gram positif (Jouany, 1994). Ces derniers agissent comme échangeurs d'ions (sodium, potassium, calcium et H₂) entre la bactérie et son milieu environnant. Les déséquilibres ioniques créés finissent par épuiser et tuer les bactéries. Leur emploi chez le ruminant entraîne à court terme une diminution de la production de CH₄ de 0 à 30% (Moran et al., 2011).
- ❖ **Les acides organiques** de synthèse principalement le malate, le fumarate et l'acrylate ont été étudiés *in vitro* pour leur pouvoir anti-méthanogène. Ils orientent la fermentation ruminale vers la production de propionate qui résulte de leur conversion par les bactéries en succinate avec consommation du H₂ venant du formate ; le succinate est à son tour converti en propionate.
- ❖ Les voies métaboliques alternatives de la méthanogénèse telles que la réduction des **nitrates et des sulfates** ont été employées pour réduire le CH₄ (Morgavi et al., 2010a). Brièvement, certaines bactéries spécifiques sont capables d'oxyder le H₂ en utilisant des sulfates, des nitrates ou d'autres composés azotés ; le nombre de ces bactéries, normalement faible, augmente en présence de leur substrat de prédilection.

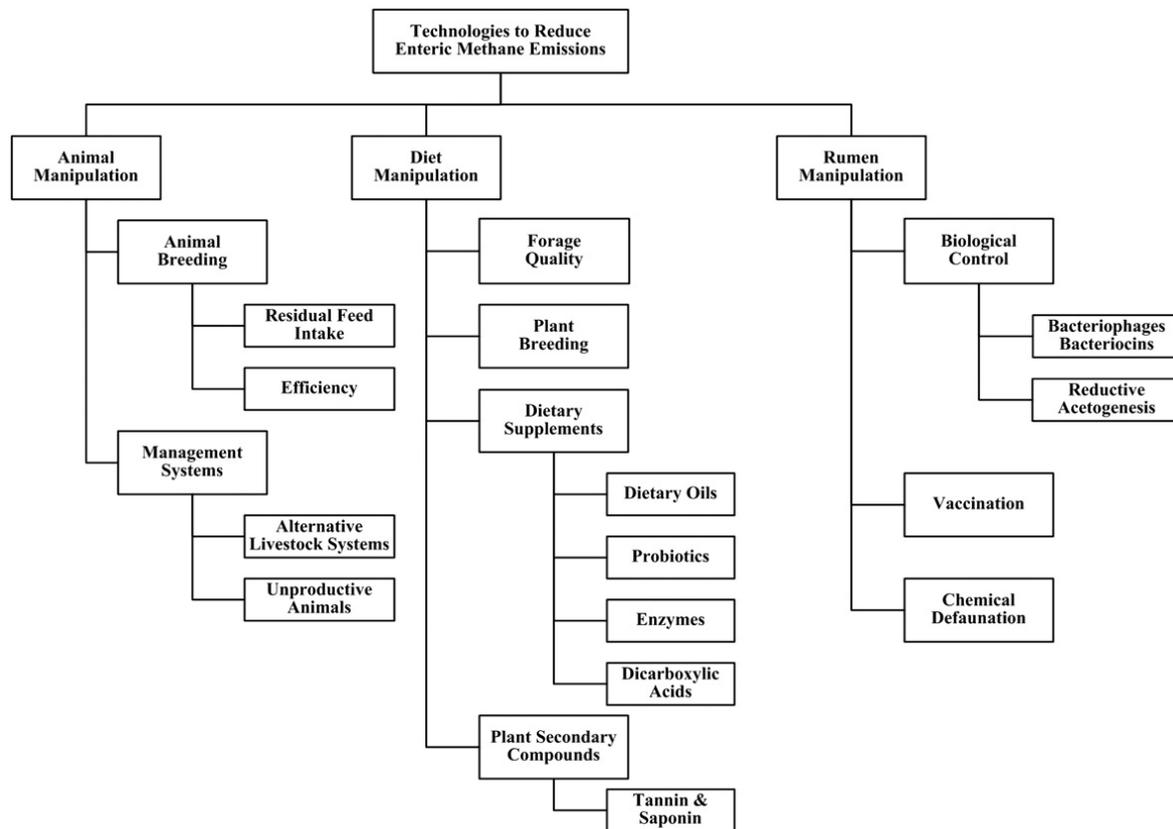


Figure 7. Schéma résumant les stratégies de réduction de méthane entérique chez les ruminants

Les pistes évoquées ci-dessus, pour réduire la production de CH_4 sont encourageantes à des degrés divers. Cependant leur application est souvent confrontée aux problèmes de coût et d'acceptabilité par le consommateur ; certaines stratégies efficaces font appel à des additifs non autorisés, ou peuvent présenter un risque d'effets délétères sur la santé de l'animal ou du consommateur qui voit d'un mauvais œil l'ajout d'additifs chimiques dans l'alimentation des animaux d'élevage. Par ailleurs, les stratégies de réduction du CH_4 peuvent être efficaces uniquement à court terme, en raison des possibilités d'adaptation de l'écosystème microbien du rumen, et donc un effet transitoire, ce qui fait que la réduction de la production de CH_4 n'est pas permanente. En effet, la plupart des mesures de production de CH_4 est réalisée en premier *in vitro* et est souvent concluante, mais les conclusions tirées sont parfois hâtives. Les essais *in vivo*, beaucoup plus limités, ne confirment pas souvent l'effet observé *in vitro* surtout après 3 à 4 semaines d'application du traitement étudié; alors que les essais à long terme sont très rares et nécessitent plusieurs mois d'application du traitement afin que son efficacité soit prouvée.

Il existe actuellement une voie prometteuse, soit qu'elle ait dans certains cas montré son efficacité soit qu'elle laisse supposer un potentiel de réduction. Cette voie, bénéficie d'une image plus naturelle, il s'agit des métabolites secondaires de plantes. Plus acceptables, ils ont certainement plus d'avenir dans les exploitations visant à réduire le CH₄ entérique.

II.2/ Métabolites secondaires de plantes

Les métabolites secondaires de plantes supérieures sont classés en composés azotés (dont les alcaloïdes), terpénoïdes et composés phénoliques. A la différence des métabolites primaires qui interviennent directement dans la nutrition et la croissance (acides aminés, lipides et sucres), les métabolites secondaires eux participent à la vie de la plante. Leur synthèse est ainsi un des mécanismes de défense contre les agressions des phytopathogènes (bactéries, champignons, virus) et des prédateurs (insectes, mammifères herbivores).

De nombreux essais sont actuellement conduits dans le monde sur les métabolites secondaires extraits de plantes, utilisés comme moyen de manipuler la fonction digestive des ruminants (Patra et Saxena, 2010). Certaines plantes brutes ou leurs extraits peuvent en effet modifier l'orientation des fermentations ruminales par leurs propriétés bactéricides et avoir des effets voisins de ceux obtenus avec les antibiotiques (Busquet et al., 2005a,b). Contrairement aux antibiotiques et aux additifs chimiques, ce type de produit bénéficie d'une bonne image en raison d'une origine naturelle, supposée inoffensive.

Un nombre considérable de mesures de production de CH₄ a été réalisé *in vitro* avec des plantes très diverses, choisies parfois pour leur richesse connue en métabolites secondaires, parfois au hasard. L'essai le plus emblématique est celui de Bodas et al. (2008) avec 450 plantes testées, Garcia-Gonzalez et al. (2008) de la même équipe ont réalisé un essai similaire sur 158 plantes, certaines étant communes avec l'essai précédent. Au total, moins de 10 plantes ou extraits ont réduit significativement la production de CH₄, sans effet négatif sur les fermentations. Pour l'instant, il n'y a pas eu de confirmation *in vivo*, et certaines de ces plantes sont présentes dans la nature en très faible quantité, ce qui limite leur intérêt pratique. Les métabolites secondaires les plus prometteurs sont : **les saponines, les huiles essentielles et les tanins ; ces derniers seront abordés dans une section à part car l'ensemble des travaux de thèse a porté sur ces métabolites secondaires.**

II.2.1/ Saponines

a/ Chimie des saponines

Les saponines ou saponosides constituent une classe spécifique de métabolites secondaires, produits naturels abondamment retrouvés dans le règne végétal (Sparg et al., 2004). Leur masse moléculaire est comprise entre 600 à 2000 Daltons. Structuralement, les saponines sont constituées d'un squelette porteur d'une (monodesmoside) ou de plusieurs (bidesmoside, tridesmoside) sections glucidiques (Figure 8).

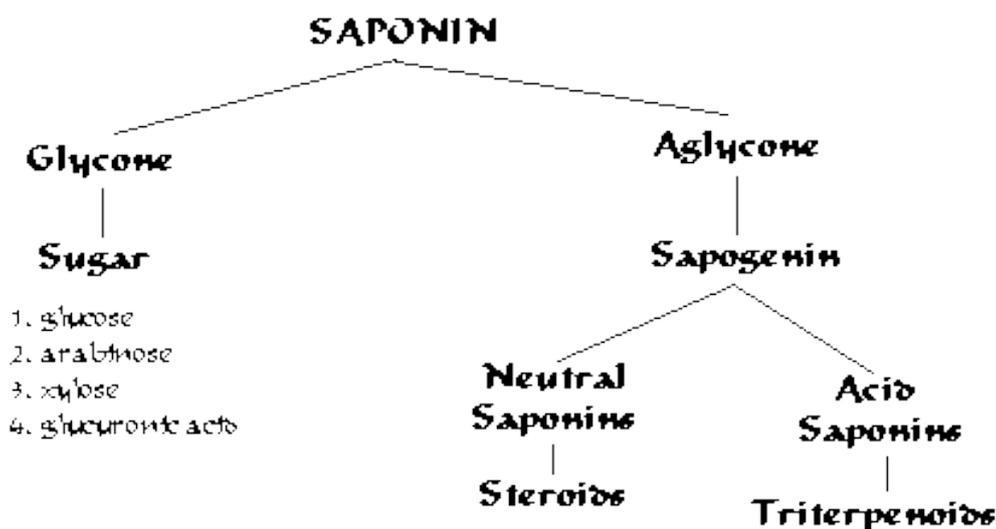


Figure 8. Structure chimique des saponines

La nature des sections osidiques retrouvées à l'intérieur des saponines est très variée mais elles sont habituellement constituées de D-glucose, D-galactose, L-rhamnose, D-xylose, D-fucose et acide D-glucuronique (Bruneton, 1995). Leur nom provient du latin *sapo* signifiant "savon" en raison de leurs propriétés à former des solutions moussantes en présence d'eau. Les saponines peuvent être classées en deux groupes, en se basant sur la nature de leur squelette aglycone. Le premier groupe est constitué par des saponines stéroïdiennes, qui se rencontrent presque exclusivement dans les monocotylédones angiospermes. Le deuxième groupe est représenté par les saponines triterpénoïdes, qui sont les plus communes et on les rencontre chez les dicotylédones angiospermes (Sparg et al., 2004).

b/ Effets des saponines sur la fermentation ruminale

L'inclusion de saponines dans le régime alimentaire des ruminants affecte généralement tous les aspects de la fermentation dans le rumen. Elles sont souvent associées à une baisse du niveau d'ingestion (Wu et al., 1994; Lovett et al., 2006), certaines études ont rapporté l'absence d'effets indésirables sur l'ingestion en présence de saponines (Klita et al., 1996; Hess et al., 2004; Pen et al., 2007 ; Singer et al., 2008; Mao et al., 2010). Cependant, quelques études ont mentionné une augmentation du niveau d'ingestion, en réponse à l'addition de saponines chez des vaches laitières (Holtshausen et al., 2009) et chez des moutons (Abreu et al., 2004). En général, l'effet des saponines sur la digestibilité est dose-dépendant. Ainsi, la réduction de la production de CH₄ est associée à celle de la digestibilité lorsque les saponines sont incorporées à des doses élevées (Hu et al., 2005, Holtshausen et al., 2009).

La production d'AGV est également influencée par l'addition de saponines, entre un effet positif, négatif ou absent, les résultats sont très divergents. Certains auteurs ont rapporté une baisse de CH₄ sans aucune influence sur les AGV (Hess et al., 2003a avec les fruits d'*Enterolobium cyclocarpum*; Patra et al., 2006a avec l'extrait de méthanol d'*Acacia concinna* et Guo et al., 2008 avec les saponines de thé). Pen et al. (2007) ont noté une diminution des AGV accompagnée d'une baisse quantitative de la production de CH₄ (-11,7%). Cependant, Lila et al. (2003) ont rapporté une augmentation de la concentration des AGV avec l'addition de saponines. La plupart de ces études ont également montré une augmentation de la proportion de propionate, aboutissant à la diminution du ratio acétate/propionate (Lila et al., 2003; Hu et al., 2005; Patra et al., 2006a; Agarwal et al., 2006; Pen et al., 2008, Guo et al., 2008; Holtshausen et al., 2009). Les saponines peuvent également diminuer la dégradation des protéines dans le rumen favorisant ainsi la synthèse de protéines microbiennes, ce qui limite la quantité du H₂ disponible pour la méthanogénèse.

c/ Effets des saponines sur la méthanogénèse

De nombreuses études ont montré que les plantes riches en saponines diminuent la production de CH₄ dans le rumen (Tableau 5). Les saponines extraites de *Yucca schidigera* (saponine stéroïde) et *Quillaja saponaria* (saponine triterpénoïde) ou leurs plantes entières, étudiées dans différents laboratoires, ont montré un pouvoir réducteur de la méthanogénèse ruminale aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Santoso et al. (2004) et Wang et al. (2009) ont noté une réduction de 7,1% et 15,5% de CH₄, respectivement chez des moutons recevant des

saponines pendant 25 jours (35% de saponines). A l'inverse, Pen et al. (2007) ont testé l'extrait de *Y. schidigera* (contenant 8-10 % de saponines) à des doses relativement élevées chez des moutons mais ces derniers ne rapportent pas une réduction significative de CH₄. Cependant, Sliwinski et al. (2002) n'ont observé aucun effet sur la méthanogénèse, probablement à cause de l'inclusion de faibles doses de saponines dans le régime alimentaire de moutons. En plus de *Y. schidigera* et de *Q. saponaria*, plusieurs autres plantes riches en saponines ou leurs extraits, comme *A. concinna* (saponines triterpénoïdes), (Patra et al., 2006a), les feuilles de *Knautia arvensis* (Goel et al., 2008a), la pulpe de *Sapindus mukorossi* (saponines triterpénoïdes) (Agarwal et al., 2006), les fruits de *Sapindus saponaria* (Hess et al., 2003a, b), les feuilles de *Sesbania sesban* (Goel et al., 2008a, b) et les graines de *Trigonella foenum-graecum* (Goel et al., 2008a, b) ont montré leur pouvoir anti-méthanogène. La plupart des résultats obtenus sur ces plantes sont basés sur des études *in vitro*. Concernant les études *in vivo*, peu nombreuses par rapport aux études *in vitro*, Hess et al. (2004) ont rapporté une baisse de 6,5% de CH₄ chez des moutons recevant les fruits de *S. saponaria* (5 g/kg poids vif). L'addition de feuilles de *S. saponaria* (à 44 %), contenant 15,7% de saponines, aboutit à une diminution significative de la production de CH₄ (Poungchompu et al., 2009). Dans l'étude de Mao et al. (2010), les saponines de thé ont bien fonctionné et la méthanogénèse a baissé de 27 %.

L'effet réducteur des saponines sur la production de CH₄ peut s'expliquer via la diminution de l'activité des gènes responsables de la méthanogénèse, sans aucun impact sur la population d'archées méthanogènes (Guo et al., 2008). D'autre part, les saponines peuvent indirectement affecter la méthanogénèse via l'inhibition des protozoaires (défaunation). Leur capacité à se complexer aux stérols (Hostettmann et Marston, 1995) est à l'origine de la lyse des membranes cellulaires des protozoaires (Patra et Saxena, 2009b).

Tableau 5. Effets des saponines sur la production de méthane et sur les populations d'archées méthanogènes et de protozoaires du rumen

| Reference | Saponin sources | Diet/substrate | Test system/dosage | Methane | Methanogens | Protozoa | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|--|--|-------------------|---------------------|
| Narvaez et al. (2013) | Yucca schidigera extract (153 mg smlagenin equivalent per g DM of steroidal sapogenins) | Total mixed ration (forage/concentrate total mixed ration barley silage–barley grain) 65 : 35 | Serum bottle/650 mg per ml | 215% | 252% | NA | | | |
| Li and Powers (2012) | Yucca saponin (8.5% saponin) (YS) | Total mixed ration (C) (concentrate/forage) 54 : 46 | Exp1/ C10.64% YS | 215% | NA | NA | | | |
| | | | | | | | C11.5% QS | 29% | |
| | Tea saponin (21.6% saponin) (TS) | Exp2/ C10.25 TS | | NE | | | | | |
| | | | | | | | Exp3/ C11.5 QS | 15% | |
| | | | | | 218% | | | | |
| | | | | | | | | C10.5 TS | 218% |
| | | | | | | | | C11.5% YS | NE |
| | | | | | | | | | |
| | Zhou et al. (2011) | Tea saponin (60% triterpenoid saponins) | Chinese wild rye/concentrate 60 : 40 | Refaunated or defaunated sheep/ 3 g per day | 211% refaunated, 218% defaunated | NE refaunated, NE defaunated | 243% refaunated, 2100% defaunated | | |
| | Wang et al. (2011) | Gynosaponins powder (98% gynosaponins) | Rice straw 100 | Batch culture/100 and 200 mg/l | 273%, 289% | 242%, 273% | NA | | |
| Guo et al. (2008) | Tea saponin (60% triterpenoid saponin) | Grass meal/corn meal 50 : 50 | Serum bottle/0.4 mg per ml | 28% | NE | 250% | | | |
| Pen et al. (2008) | Quillaja saponaria extract (QSE) (5% to 7% saponins) Yucca schidigera extract (YSE) (8% to 10% saponins) | Oat hay/concentrate 50 : 50 | Continuous culture fermentation vessels/ 2 and 4 ml(QSE)/l Continuous culture fermentation vessels/ QSE : YSE, 2 : 0 ml/l, 2 : 2 ml/l, and 2 : 4 ml/l | NE | NA | 262%, 275% | | | |
| | | | | | | | | 214%, 216%, NE | 250%, 275%, 275% |
| Goel et al. (2008) | Sesbania sesban leaves extract (63.5% saponins) Knautia arvensis leaves extract (82.4% saponins) Trigonella foenum-graecum seeds extract (34.5% saponins) | Hay/concentrate 50 : 50 | HGT/10.9 and 21.2 mg HGT/3.88 and 7.76 mg HGT/5.62 and 11.54 mg | NE | 278% | 214%, 236% | | | |
| | | | | | | | | 221% | 214%, 225% |
| | | | | | | | | 222% | 215%, 239% |
| Pen et al. (2007) | Yucca schidigera extract Quillaja saponaria | Italian ryegrass hay/concentrate 60 : 40 | Sheep/1.31 to 1.64 g saponin/day Sheep/0.8 to 1.3 g saponin/day | NE | NA | NE | | | |
| | | | | | | | | | |
| Pen et al. (2006) | Yucca schidigera Extract (80–100 g/kg saponins) Quillaja saponaria (50–70 g/kg saponins) | Oat hay/concentrate 50 : 50 | Serum bottle/2, 4 and 6 ml/l | 217%, 229%, 242% NE | NA | 229%, 255%, 256% 234%, 241%, 240% | | | |
| | | | | | | | | | |
| Hu et al. (2005) | Tea saponins (60% saponins) | Grass meal/corn meal 50 : 50 | HGT/0.2 and 0.4 mg/ml | 213%, 216% | NA | 213%, 216% | | | |

DM= dry matter; HGT= hohenheim gas test system; NE= no effect; NA= not analyzed; –decrease; Iincrease.

D'après Cieslak et al., (2013)

Les saponines favorisent également la production de propionate qui engendre une faible production de CH₄. Les saponines ont également la capacité d'orienter la digestion des nutriments du rumen vers l'intestin, diminuant ainsi la production de CH₄ (Hess et al., 2003a; Patra et Saxena, 2009b).

d/ Effets des saponines sur le microbiote ruminal

Le microbiote ruminal est sensible aux saponines, en fonction de leur nature, les fractions de saponines n'agissent pas avec la même intensité sur les communautés microbiennes. Ainsi, les saponines contenues dans le fenugrec (*T. foenum-graecum*) ont montré un grand effet inhibiteur sur la population de champignons alors que celles contenues dans le sesban (*S. sesban*) inhibent fortement les archées méthanogènes (Goel et al., 2008b). Ces auteurs ont montré que des fractions de certaines plantes riches en saponines, telles le chardon (*Carduus pycnocephalus*), la knautie des champs (*K. arvensis*), le fenugrec et le sesban favorisent le développement des bactéries fibrolytiques (+ 20 à + 45%), (*F. succinogenes* et *R. flavefaciens*), au dépend des populations de champignons (- 20 à - 60%) et des archées méthanogènes (- 20 à - 78%). Les protozoaires sont également très sensibles aux saponines, contrairement aux archées méthanogènes qui ne le sont qu'à des doses élevées (Bodas et al., 2012). L'effet promoteur sur les bactéries fibrolytiques serait la conséquence d'une stimulation de l'absorption des nutriments par les bactéries et/ou du pouvoir défaunant des saponines (Wina et al., 2006 ; Zhou et al., 2011) en raison de leur interaction avec les stérols présents dans la paroi des protozoaires ciliés. Toutefois, l'effet promoteur des saponines sur la communauté de bactéries fibrolytiques n'est pas une règle générale. Ainsi, Wina et al. (2006) ont montré que les saponines de *Sapindus rarak*, de nature stéroïdienne, n'affectent pas la croissance de *F. succinogenes*. Cette résistance pourrait s'expliquer par leur capacité à déglycosyler et donc à inactiver les saponines, comme cela a été démontré pour le yucca par Wang et al. (2000). En revanche, les concentrations des bactéries ruminocoques (*R. flavefaciens* et *R. albus*) ont fortement et rapidement diminué dès l'apport de saponines, restant à un niveau très faible même après retrait des saponines ; ceci démontrant ainsi un effet inhibiteur spécifique de ces extraits de plante sur ces bactéries. Cet effet inhibiteur n'est plus observé lorsque le traitement est plus long, suggérant que ces bactéries seraient capables de s'adapter, probablement par augmentation de l'épaisseur de leur paroi (Wang et al., 2000).

Bien que les saponines aient réduit la production de CH₄ entérique jusqu'à 50 % (Szumacher-Strabel et Cieslak, 2010; Patra et Saxena, 2010; Bodas et al., 2012), il y a une

ambiguïté dans la littérature concernant leur mécanisme d'action sur les archées méthanogènes. Les études portant sur l'effet des saponines sur des cultures pures d'archées méthanogènes sont rares. Guo et al. (2008) ont rapporté que les saponines de thé (0,4 mg/mL) n'affectent pas la croissance de *M. ruminantium* en culture et que la baisse de CH₄ résulte de l'inhibition de l'activité du gène *mcrA* (indicateur de l'activité méthanogène chez la population d'archées méthanogènes), et non de la diminution de la concentration des archées méthanogènes. Un nombre limité d'études a montré un effet inhibiteur des saponines sur les archées méthanogènes du rumen (Tableau 5). Cette population diminue de 78% *in vitro* en présence de *S. sesban*, de 22% en présence de *T. foenum-graecum* et de 21% avec *K. arvensis* (Goel et al., 2008b). Inversement, une alimentation contenant un mélange de concentré et de *S. saponaria* (5,0 g fruits/kg poids vif, l'équivalent de 0,6 g de saponines brute/kg poids vif) augmente le nombre d'archées méthanogènes ($4,84 \times 10^9$ vs $6,31 \times 10^9$ /mL) chez les moutons (Hess et al., 2004). Les saponines peuvent diminuer la population d'archées méthanogènes par une diminution du nombre de protozoaires qui vivent en symbiose avec elles (Finlay et al., 1994). Par conséquent, les archées méthanogènes associées aux protozoaires diminuent considérablement en présence de saponines, induisant ainsi une réduction de 9-25 % de CH₄ (Newbold et al., 1995) et qui peut atteindre 37 % (Finlay et al., 1994).

En conclusion, la divergence des résultats obtenus concernant la réduction de la production de CH₄ par les saponines peut s'expliquer par le type, la dose de saponines testées, le régime alimentaire et l'éventuelle adaptation microbienne aux saponines. De plus, un certain nombre de saponines pourrait être toxiques pour l'animal, elles peuvent provoquer la photosensibilisation, des lésions du foie et des reins, l'hémolyse et la gastro-entérite ce qui nécessite l'évaluation à long terme des effets de saponines dans les systèmes animaux.

II.2.2/ Huiles essentielles

a/ Chimie des huiles essentielles

Le terme huiles essentielles (HE) dérive de « Quinta essentia », un nom donné par le médecin suisse Paracelsus aux extraits de plantes obtenus par distillation, il signifie la fragrance et la quintessence de la plante. Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les HE ne contiennent pas de corps gras (lipides) et ne sont pas « essentielles » dans le

sens qu'elles sont nécessaires à la croissance ou au métabolisme. Ce sont des composés aromatiques volatils avec un aspect huileux. Elles sont obtenues à partir de plantes aromatiques par plusieurs procédés d'extraction. Elles sont solubles dans les lipides et les solvants organiques et possèdent une densité inférieure à celle de l'eau. Les HE ont une composition chimique et des propriétés biologiques diverses. Elles sont généralement incluses dans deux groupes chimiques (Figure 9): les terpenoïdes (monoterpenoïdes et sesquiterpenoïdes) et les phenylpropanoïdes, qui sont synthétisés par les voie métaboliques du mevalonate et du shikimate, respectivement (Gershenson et Croteau, 1991; Calsamiglia et al., 2007). Parmi ces deux classes, les terpenoïdes sont le groupe plus diversifié des molécules bioactives végétales.

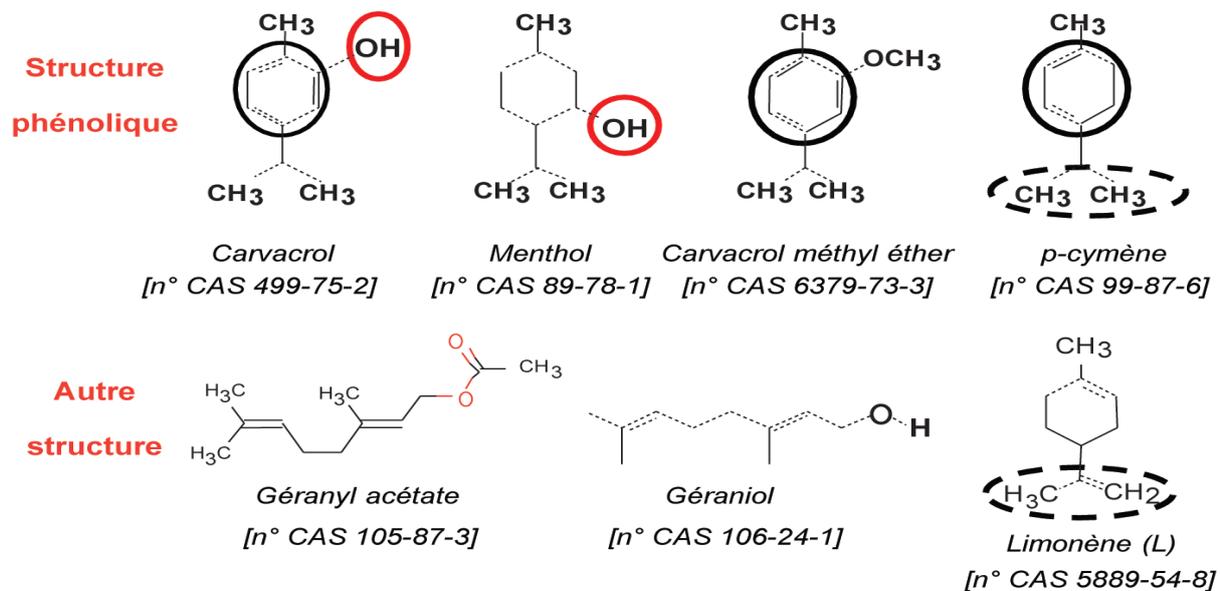


Figure 9. Structure chimique de quelques molécules aromatiques d'huiles essentielles (d'après Dorman et Deans 2000, Ultee et al., 2002)

b/ Effets des huiles essentielles sur la fermentation ruminale

L'impact des HE sur la fermentation ruminale dépend du type d'HE et de la dose testée. L'addition de 250 mg/j d'HE d'origan à des moutons (Wang et al., 2009), de 2 g d'HE de baie de genévrier (contenant de 35 % α -pinène) à des vaches (Yang et al., 2007) et de 750 mg à 2 g d'un mélange d'HE aux vaches laitières (Benchaar et al., 2007) n'a aucune influence sur l'ingestion. Cependant, un mélange d'HE de cinnamaldehyde (180 mg/j) et d'eugénol (90 mg/j) a défavorablement affecté l'ingestion (Busquet et al., 2003; Cardozo et al., 2006; Calsamiglia et al., 2007). Les faibles taux d'ingestion peuvent être reliés aux problèmes de

palatabilité, suggérant que les HE doivent être administrées à l'animal sous forme de capsules pour contourner ce problème (Calsamiglia et al., 2007). Cependant, l'addition d'HE de piment doux (1 g/j d'extrait de piment doux contenant 15 % capsaïcine) à des bœufs de boucherie stimule l'ingestion et la fermentation (Cardozo et al., 2006). La digestibilité est également affectée par les HE, les résultats sont très hétérogènes, entre l'absence d'effet (Sallam et al., 2009; Wang et al., 2009) et la diminution (Busquet et al., 2005; Patra et al., 2006b; Agarwal et al., 2009), selon les doses testées.

Plusieurs études ont également montré l'effet des HE sur la production d'AGV (Busquet et al., 2005b; Kamel et al., 2008; Tatsuoka al., 2008; Chaves et al., 2008; Kumar et al., 2009; Patra et al., 2010). Les effets des HE peuvent dépendre du pH du liquide ruminal. Cardozo et al. (2005) ont constaté que certaines HE pures ont un impact plus prononcé sur le profil d'AGV au pH bas. La même tendance est observée par Spanghero et al. (2008) qui ont rapporté une réduction de la proportion d'acétate et du ration acétate:propionate, mais seulement aux pH bas. Les HE ont aussi d'autres effets positifs, elles sont capables de moduler la fermentation ruminale, comme la réduction de la dégradation des protéines et de l'amidon et une inhibition de la dégradation des acides aminés en raison d'une action sélective sur certains microorganismes du rumen (Hart et al., 2008; Patra et Saxena, 2009a).

c/ Effets des huiles essentielles sur la méthanogénèse

Plusieurs travaux sont menés sur des composés purs d'HE seuls ou en mélange. Ces essais sont quasiment tous réalisés dans des conditions *in vitro* (Tableau 6). Busquet et al., (2005b) sont les premiers à rapporter les effets de l'HE d'ail et d'un de ses composés, le diallyl disulfide, *in vitro* sur la production de CH₄. Ajoutés à la dose de 300 mg/L, l'HE d'ail et le diallyl disulfide réduisent la production de CH₄ avec la même intensité, suggérant dès lors que ce composé soufré est en partie responsable de l'effet observé. Probablement par action directe sur les archées méthanogènes via l'inhibition de la 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A réductase, enzyme clé de la synthèse des éthers isoprénoïdes, principaux composants de la membrane cellulaire des archées méthanogènes. Toutefois, ces effets ne sont pas rapportés *in vivo* (Doreau et al., 2011). L'HE de cannelle (79% de cinnamaldéhyde) a presque complètement inhibé la méthanogénèse (- 98%) à une concentration de 500 mg/L alors que le cinnamaldéhyde pur, utilisé à la même dose, ne l'a réduit que de 19%.

Tableau 6. Effets des huiles essentielles sur la production de méthane et sur les populations d'archées méthanogènes et de protozoaires du rumen

| Reference | Essential oil sources | Diet/substrate | Test system/dosage | Methane | Methanogens | Protozoa |
|-------------------------------|--|--|---|---------------------------------------|------------------------------|------------------------|
| Lin et al. (2012a) | Combination of essential oil (809 g/kg eugenol in thyme oil; 837 g/kg carvacrol in oregano oil; 855 g/kg cinnamaldehyde in cinnamon oil; 801 g/kg limonene in lemon oil) plus monosodium fumarate | Ground maize/ground Leymus | Serum bottles/500 mg/l of essential oil plus 0, | 251%, 263%, 280%, 256% | 238%, 248%, 241%, | 295%, 295%, 294%, |
| | | chinensis hay 50 : 50 | 5, 10 and 15 mM monosodium fumarate | | 248% | 294% |
| Lin et al. (2012b) | Combination of essential oil (eugenol, carvacrol, citral, cinnamaldehyde; purity .99%) plus monosodium fumarate | Ground com kernels/ ground Leymus | IVGPS (24 h)/200 mg/l essential oil plus 0, 5, | 231%, 276%, 284%, 265% | 223%, 216%, 234%, 216% | 288%, 285%, 288%, |
| | | chinensis hay 50 : 50 | 10 and 15 mM of monosodium fumarate | | NA | 282% |
| Manh et al. (2012) | Eucalyptus leaf meal powder | Concentrate 0.5% of BW/rice straw ad libitum | Dairy cows/100 and 200 g/day) | 216%, 226% | NA | NE, 222% |
| Chaves et al. (2012) | Cinnamon leaf (eugenol; 0.76 v/v) Oregano (carvacrol, thymol; 0.6 v/v) Sweet orange (limonene; 0.95 v/v) | Barley silage | Serum vials (6, 12 and 24 h)/37.5, 75 and 120 mg/kg silage DM | 6h:247%, 229%, NE; 12 h: NE; 24 h: NE | NA | NA |
| | | | | 6h: NE, 224%, 224%; 12 h: NE 24 h: NE | | |
| Patra and Yu (2012) | Clove oil Eucalyptus oil Garlic oil Origanum oil Peppermint oil | Ground alfalfa hay/concentrate 50 : 50 | Serum bottles/0.25, 0.50 and 1.0 g/l | 211%, 217%, 234% | 26%, 23%, 212% | 12%, 26%, 227% |
| | | | Fermentation medium | 226%, 28%, 217% | 21%, 20.4%, 26% | 11%, 22%, 27% |
| | | | | 222%, 228%, 242% | 28%, 214%, 216% | 20.2%, 13%, 27% |
| | | | | 212%, 238%, 286% | 215%, 220%, 211%, 232%, 235% | 238% |
| | | | | 28%, 220%, 225% | 215%, 220%, 21%, 211%, 233% | 220% |
| Sallam et al. (2011) | Achillea santolina (16-dimethyl 15-cyclooctadiene; 60.5%) Artemisia judaica (piperitone and camphor; 49.1% and 34.5%) Mentha microphylla (piperitone oxide and cis-piperitone oxide; 46.7% and 28%) Schinus terebinthifolius (g-murolene and a-thujene; 45.3% and 16.0%) | Concentrate/forage 50 : 50 | IVGPS (24h)/25, 50 and 75ml/75 ml rumen fluid | 137%, 156%, 230% | NA | 29%, 25%, 245% |
| | | | | 146%, 143%, 24% | | NE |
| | | | | 292%, 2100%, 2100% | | 212%, 221%, 249% |
| | | | | NE | | NE, 221%, 241% |
| Araujo et al. (2011) | Carvacrol (2-methyl-5-isopropyl-1-phenol) Eugenol (2-methoxy-4-(2-propenyl)-phenol) 1,8-cineol (1,3,3-trimethyl-2- oxabicyclo[2.2.2]octane) | Concentrate/forage 80 : 20 | Serum bottles/50 mg/l | 295%, 267%, 213% | NA | NA |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| Patra et al. (2010) | Foeniculum vulgare seed extracts (ethanol and methanol) Syzygium aromaticum flower bud extracts (ethanol and methanol) | Wheat straw/concentrate 50 : 50 | HGT (24 h)/ethanol and methanol extracts of 0.5 ml/30 ml | 239%, 271% | NA | 241%, 224% |
| | | | | 247%, 286% | | 243%, 248% |
| Sallam and Abdelgaleil (2010) | Citrus essential oil (DL-limonene and g-terpinene; 83.9% and 10.75%) Limonene (100%) | Roughage/concentrate 50 : 50 | SAGPT (24 h)/25, 50 and 75ml/75 ml rumen fluid | NE, 216%, 233% | NA | NE, 235%, 235% |
| | | | | 114%, 220%, 210% | NA | 247%, 248%, 240% |
| Wang et al. (2009) | Oregano extract Ropadiar | Hay/concentrate 75 : 25 | Sheep/250 mg per day | 212% | NA | NA |
| Sallam et al. (2009) | Eucalyptus oil eucalyptol (1,8-cineole) | Roughage/concentrate 50 : 50 | IVGPS (24 h)/25, 50, 100 and 150 ml/75 ml | 226.5%, 247%, 277%, 285% | NA | 223%, 236%, 259%, 264% |
| Agarwal et al. (2009) | Peppermint oils-Mentha piperita | Wheat straw/concentrate mixture 50 : 50 | HGT (24 h)/0.33, 1.0 and 2.0 ml/ml | NA | 1105%, 282%, 280% | 230%, 278%, 288% |
| Soliva et al. (2008) | Pine oil-Pinus mugo (monoterpene hydrocarbons a-pinen, b-pinen, limonellen, v3-carene, b-phellandren with proportions of 22%, 13%, 12%, 25% and 14%) Carvacrol (2-methyl-5-isopropyl-1-phenol; > 980 g/kg) | Mixed forage/concentrate 50 : 50 | Rusitec(10 days)/0.008 g DM/day | NE | NA | 28% |
| Macheboeuf et al.(2008) | Cinnamaldehyde ((E)-3-phenyl-2-propenal; Cinnamaldehyde ((E)-3-phenyl-2-propenal; > 980 g/kg) Thymol (5-methyl-2-isopropyl-phenol; > 980 g/kg) nethum graveolens (400 g/kg carvone, 320 g/kg limonene) Cinnamomum verum (790 g/kg cinnamaldehyde) Thymus vulgaris (470 g/kg thymol, 200 g/kg terpinene, 200 g/kg p-cymene) Origanum vulgare (890 g/kg carvacrol, 50 g/kg thymol) Origanum vulgare thymol chemotype (210 g/kg carvacrol, 350 g/kg thymol) | Corn/soybean/hay 45 : 30 : 25 | Batch (16 h)/1.5, 2, 3 and 5 mM | 213%, 232%, 285%, 298% | NA | NA |
| | | | Batch (16 h)/1, 2, 3 and 5 mM | NE, 213%, 219%, 294% | | |
| | | | Batch (16 h)/1, 2, 3 and 6 mM | NE, 232%, 284%, 299% | | |
| | | | Batch (16 h)/2.5, 5, 10 and 25 mM | NE, NE, 247%, 276% | | |
| | | | Batch (16 h)/1, 3, 5 and 10 mM | NE, 226%, 298%, 298% | | |
| | | | Batch (16 h)/0.5, 1, 2 and 3 mM | NE, NE, 262%, 294% | | |
| | | | Batch (16 h)/1, 2, 3 and 5 mM | NE, NE, 263%, 297% | | |
| | | | Batch (16 h)/0.5, 1, 2 and 3 mM | NE, NE, 260%, 295% | | |
| | | | | | | |

HGT= hohenheim gas test, IVGPS= in vitro gas production system; DM= dry matter; SAGPT= semi-automatic gas production technique; NE= no effect; NA= not analyzed; 2decrease; 1increase.

D'après Cieslak et al., (2013)

L'activité anti-méthanogène prononcée de l'HE par rapport à son principal composant, pourrait être expliquée par une interaction entre le cinnamaldéhyde et d'autres composés aromatiques présents en faible concentration comme l'eugénol, par exemple. L'intérêt des HE dans la réduction de la méthanogénèse a fait l'objet de la revue de Benchaar et Greathead (2011). Ces auteurs ont mentionné tout d'abord la très grande variabilité de la composition en HE d'une même plante, en fonction, entre autres, de leur région d'origine mais aussi de leur mode d'extraction. Ceci rend l'interprétation des résultats expérimentaux difficile lorsque des extraits de plantes sont analysés pour leurs effets sur les fermentations ruminales. Parmi les composés dont l'action négative sur la production de CH₄ a été montrée *in vitro*, on peut citer le carvacrol, le thymol, l'eugénol et le cinnamaldéhyde (Macheboeuf et al., 2008 ; Benchaar et Greathead, 2011). Macheboeuf et al. (2008) ont montré que les HE ont des effets plus marqués que les molécules qui les composent, suggérant ainsi des effets additifs ou même synergiques. L'HE d'eucalyptus inhibe la production de CH₄, jusqu'à 58 % à une dose de 1,66 mL /L (Kumar et al., 2009), à 90,3% à une dose de 2 mL /L (Sallam et al., 2009) et à 70% à une dose de 0,33 g du complexe α -cyclodextrine-eucalyptus (Tatsuoka et al., 2008). Les divers composants d'HE d'eucalyptus comme le cinéole, le terpinénol, le α -pinène, le *p*-cymène, le α -phellandrene sont identifiés (Bhatti et al., 2007). A une concentration de 20 mg/L, le composant de cette HE (le *p*-cymène), diminue la production de CH₄ de 29 % (Chaves et al., 2008). Cependant, le α -cyclodextrine et le cinéole n'influencent pas la production de CH₄ jusqu'à une concentration de 0,33 g /L (Tatsuoka et al., 2008). L'HE de *Pinus mugos*, qui contient le pinène, le limonellène, le δ -carene et le β -phellandren avec des proportions de 35, 12, 25 et 14 %, respectivement, ne montre aucune activité anti-méthanogène (Soliva et al., 2008), probablement en raison de la faible dose testée (0,008 g/L). L'HE de baies de genévrier, de cannelle (Chaves et al., 2008) et de menthe poivrée (Tatsuoka et al., 2008 ; Agarwal et al., 2009) ont montré un puissant effet inhibiteur sur la méthanogénèse. Mohammed et al. (2004) ont montré que l'HE de raifort peut réduire la production de CH₄ d'environ 20% chez les bouvillons. Cet essai de courte durée n'a toutefois pas été confirmé. En effet, il existe très peu d'essai *in vivo* testant l'efficacité de ces molécules pour réduire les émissions de CH₄. Par ailleurs, Beauchemin et Mc Ginn (2006) ont montré l'inefficacité d'un mélange commercial d'HE et d'épices. L'extrait d'ail est souvent montré comme très efficace pour réduire la production de CH₄ *in vitro*, en raison de la présence de composés organosulfurés. *In vivo*, les résultats sont décevants. Klevenhusen et al. (2011) et van Zijderveld et al. (2011) n'ont pas observé une diminution de la production de CH₄ avec

l'extrait d'ail ou son composé qui semble plus efficace, le diallyl disulfide, qui inhiberait spécifiquement les archées méthanogènes. Toutefois le diallyl disulfide aurait un effet positif sur la digestibilité. L'absence d'effet d'une supplémentation avec des bulbes d'ail sur la production de CH₄ a aussi été observée par Patra et al. (2011) et par Staerfl et al. (2012). Si l'effet de l'extrait d'ail s'avère significatif dans le futur, son usage pourra être limité à la production de viande, en raison de l'apparition d'odeurs dans le lait. Mais dans l'état actuel des connaissances, on peut dire que les HE d'ail sont efficaces pour réduire la méthanogénèse dans tous les essais *in vitro*, et inefficaces dans tous les essais *in vivo*.

d/ Effets des huiles essentielles sur le microbiote ruminal

Le pouvoir bactéricide des HE est lié à la structure chimique des molécules aromatiques qui les composent (Dorman et Deans 2000, Ultee et al., 2002). Ainsi, l'activité antimicrobienne particulièrement importante des phénols est due à la présence d'un cycle phénolique et/ou d'un groupement hydroxyle. De ce fait, en fonction du rôle clé de la structure chimique dans le pouvoir antimicrobien des HE, il est possible qu'elles aient une activité bactéricide ou bactériostatique vis-à-vis de bactéries. L'effet d'un mélange de composés aromatiques sur des cultures pures de bactéries du rumen a été étudié par la mesure de la concentration inhibitrice (McIntosh et al., 2003). Ajouté au milieu de culture, ce mélange contenant 15 à 33,5% de phénols (5-10% de crésol et résorcinol ; 5-10% thymol ; 2-4,5% guaïacol ; 1-3% eugénol ; 2-6% vanilline) inhibe la croissance de la plupart des cultures pures bactériennes à des concentrations inférieures à 100 ppm. Les résultats ont montré que *Streptococcus bovis* est l'espèce la plus résistante, et que *P. ruminicola*, *Clostridium sticklandii*, et *Peptostreptococcus anaerobius* sont les plus sensibles. Quelques espèces, incluant *P. ruminicola* et *Prevotella bryantii*, s'adaptent et sont capables de croître à des concentrations plus élevées en HE, alors que d'autres, incluant *C. sticklandii* et *P. anaerobius*, restent sensibles. Ces deux dernières espèces font partie de celles identifiées comme des bactéries « hyper productrices de NH₃ ». Cette adaptation aux HE pourrait expliquer la diminution, voire l'absence d'effet souvent observée *in vivo*. Plus récemment, Patra et Yu (2014) ont montré que les HE d'origan, d'ail et de menthe, utilisées à la dose de 0,50 g/L de milieu de fermentation, affectent les communautés bactériennes *in vitro*. Si les trois HE ont stimulé le développement des *Prevotellaceae*, elles ont eu des effets différents sur les *Lachnospiraceae* et les *Ruminococcaceae* : l'HE d'origan a favorisé l'occurrence des

Lachnospiraceae et a diminué celle des *Ruminococcaceae*, contrairement à l'HE d'ail et l'HE de menthe qui ont diminué l'occurrence de ces deux familles bactériennes. Dans de nombreuses études conduites *in vivo*, il ne ressort aucun effet marqué d'un mélange d'HE (Crina®) (Newbold et al., 2004 ; Benchaar et al., 2006 ; Benchaar et al., 2007) ou d'un mélange cinnalaldéhyde/eugénol (Cardozo et al., 2006) sur le nombre et/ou l'activité des protozoaires ciliés (McIntosh et al., 2003). Les résultats de Benchaar et al. (2008) ont aussi montré que l'aldéhyde cinnamique reste sans effet sur le nombre total de protozoaires, mais aussi sur le nombre de *Dasytricha*, *Diplodinium*, *Entodinium* et *Polyplastron*. Cardozo et al. (2006) ont tout de même observé qu'un mélange d'aldéhyde cinnamique et d'eugénol (2:1) augmente le nombre de protozoaires Holotriches sans influencer les protozoaires Entodiniomorphes alors que l'extrait d'anis diminue ces deux populations.

Les données sur les archées méthanogènes sont très limitées. On peut citer les travaux d'Ohene-Adjei et al. (2008) qui ont observé que l'HE d'ail absorbée par des agneaux à la dose de 200 mg/kg de MS ingérée n'affecte pas significativement le nombre total d'archées méthanogènes, mais augmente leur diversité et notamment l'occurrence de deux clusters : *Methanosphaera stadtmanae* et *M. smithii*. Les mêmes auteurs ont également noté que l'addition de cinnamaldehyde à un régime à base d'orge (0,02 g/kg) n'a pas d'effets sur le nombre total d'archées méthanogènes chez les moutons. L'analyse phylogénétique a indiqué que l'addition du cinnamaldehyde inhibe *M. ruminantium*. Inversement, le nombre de *M. stadtmanae*, de *M. smithii* augmente. Dans une étude basée sur les propriétés culturales bactériennes, la croissance de *M. smithii* n'est pas inhibée jusqu'à une concentration de 160 ppm, mais est inhibée à une concentration de 1000 ppm par un mélange d'HE (McIntosh et al., 2003). Il est suggéré que les HE augmentent la distribution phylogénétique des archées méthanogènes résultant du changement des espèces de protozoaires associées (Ohene-Adjei et al., 2008). L'HE de baie de genévrier (*Juniperous communis*) consommée à 0,02 g/kg de MS ingérée n'affecte pas le nombre d'archées méthanogènes mais diminue le nombre de clones liés à *M. ruminantium* (70 % contre 0 %) (Ohene-Adjei et al., 2008). Les clones rapportés à *M. smithii* augmentent (0 contre 62 %) par la même HE (Ohene-Adjei et al., 2008). Ces changements dans la population d'archées méthanogènes sont probablement dus à des changements dans la populations de protozoaires (Ohene-Adjei et al., 2008). Agarwal et al. (2009) ont rapporté que l'inclusion d'HE de la menthe poivrée à une concentration de 0,33 mL/L induit un dédoublement de la population d'archées méthanogènes bien qu'il ait eu une diminution de 20 % de la production de CH₄ *in vitro* sans affecter la production d'AGV. Dans

cette même étude, les fortes doses (1 et 2 mL/L d'HE de menthe poivrée) diminuent la production de CH₄ ainsi que la population d'archées méthanogènes. Les auteurs ont expliqué la baisse de CH₄ par un changement de la vitesse de la méthanogénèse du à l'inhibition de la communauté d'archées méthanogènes ou des gènes impliqués dans la production de CH₄ (Ohene-Adjei et al., 2008). L'augmentation de la diversité des archées méthanogènes pourrait être le reflet de la capacité de ces microorganismes à s'adapter aux composés aromatiques.

En conclusion, il est difficile d'extrapoler des résultats paraissant prometteurs *in vitro* aux conditions *in vivo*. La majorité des travaux *in vitro* ont montré que les HE (mélange ou composé principal) sont efficaces pour diminuer la quantité de CH₄ entérique. Cependant, avant de recommander l'utilisation des HE comme stratégie pour réduire la production de CH₄ chez les ruminants, d'autres travaux de recherche sont nécessaires pour valider *in vivo* les résultats observés *in vitro*, dans un premier temps sur le court terme, ensuite sur le long terme. Il faut aussi signaler la difficulté de produire commercialement un additif à base d'HE de composition constante, car la composition en HE d'une même plante varie avec l'année, la saison et le site de récolte.

DEUXIEME PARTIE : UTILISATION DES PLANTES RICHES EN TANINS DANS LA LUTTE CONTRE LA METHANOGENESE RUMINALE

I./TANINS

I.1/ Définition et généralités

Le terme " tanin " (ou tannin) vient du mot tannage, un procédé datant du Moyen Âge et permettant la formation de cuir imputrescible par la création de liaisons entre les fibres de collagène de la peau fraîche et les molécules de tanins alors extraits d'écorces de chêne ou de châtaignier (Bruneton, 2009). Les tanins font partie des métabolites secondaires des plantes. Ils peuvent être actuellement définis comme des composés polyphénoliques de masse moléculaire allant jusqu'à 20 000 Daltons (Haslam, 1989). Ces derniers forment une vaste famille de molécules caractérisées par la présence d'au moins un noyau aromatique associé à un ou plusieurs groupements hydroxyles phénoliques.

I.2/ Propriétés physico-chimiques et biologiques des tanins

La solubilité des tanins dans l'eau dépend de leur poids moléculaire et de leur degré de polymérisation. Ils sont également solubles dans l'acétone et les alcools, c'est pourquoi l'optimum de rendement de leur extraction est généralement obtenu par des solutions acétone-eau ou méthanol-eau. La structure chimique des tanins présente de nombreux groupements hydroxyles et phénoliques, ce qui leur confère la propriété particulière de former des complexes avec de nombreuses macromolécules : les acides nucléiques, les ions métalliques ferriques et cuivriques, ainsi que la quasi-totalité des protéines (surtout celles riches en acides aminés hydrophobes comme la proline et l'hydroxyproline). En conséquence ils possèdent les capacités et propriétés biologiques suivantes : fixation et inhibition enzymatique, piégeage des radicaux libres, activité anti-oxydante et effet antiseptique (antibactérien, antifongique, antiviral)

I.3/ Classification biochimique

Sur le plan chimique, les tanins sont des polyphénols classés en deux catégories : les **tanins hydrolysables (TH)** et les **tanins condensés (TC)**, qui diffèrent par leur structure chimique et leur activité biologique.

I.3.1 / Tanins hydrolysables

Les TH, comme leur nom l'indique, sont particulièrement sensibles à l'hydrolyse acide et sont répartis en:

- ❖ *Gallotanins*, constitués d'un sucre (en général le glucose) estérifié par un ou plusieurs acides galliques ou dérivés (appelés également unités galloyles) (Figure 10)
- ❖ *Ellagitannins*, obtenus à partir des précédents par couplage oxydatif d'au moins deux unités galloyles,
- ❖ *Tanins complexes* (ou tanins partiellement hydrolysables), formés par une unité gallo- ou ellagitanin comportant une liaison glycosidique avec un flavanol.

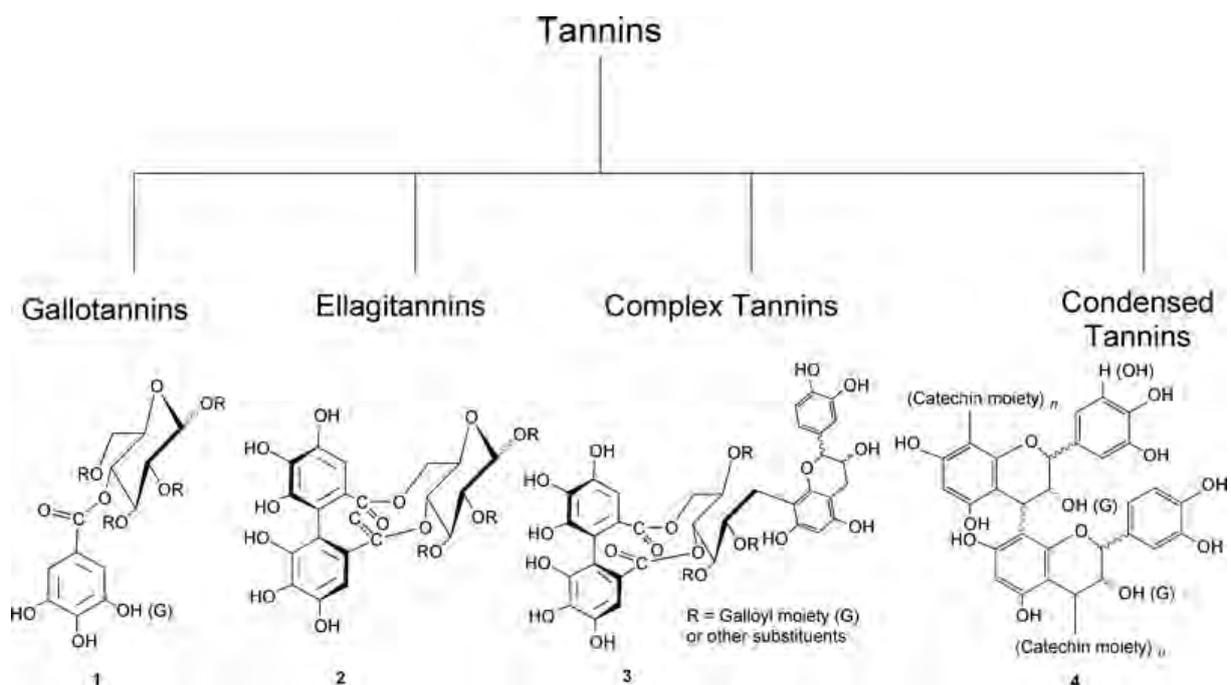


Figure 10. Structure chimique des tanins

En fait, l'acide ellagique provient de la condensation de deux molécules d'acides galliques. Il est important de préciser que seuls les triesters de l'acide gallique et du glucose ont la propriété de précipiter les protéines. Cela veut dire que ne sont considérés comme des tanins seuls les composés qui renferment au minimum trois unités d'acide gallique. En dessous de trois molécules d'acide gallique il ne s'agit pas d'un tanin.

I.3.2 / Tanins condensés

Les TC ou proanthocyanidines ont en général un poids moléculaire plus élevé et sont des oligomères (2-10 monomères) ou polymères (>10 monomères) de flavan-3-ols, également appelés catéchine ou épicatechine (Figure 10). Ils sont majoritairement liés par des liaisons de type carbone-carbone ou des liaisons carbone-oxygène. On distingue quatre groupes principaux, les deux majoritaires étant les procyanidines et les prodéphinidines. Ces derniers se différencient par un groupement OH supplémentaire en position R3 et ont en conséquence une capacité accrue de fixation aux protéines.

I.4/ Sources de tanins, localisation et variation de leur teneur dans la plante

Les tanins sont rencontrés de manière extrêmement courante dans le règne végétal, les TC étant en général plus répandus et abondants dans les plantes que les TH. En effet, à la différence de ces derniers, les TC se rencontrent non seulement chez les Angiospermes (et plus communément chez les Dicotylédones que chez les Monocotylédones) mais également chez les Gymnospermes. Certaines espèces de *Pinaceae* (pin), de *Fagaceae* (chêne et châtaignier), de *Rosidae* (acacia) et de *Rosaceae* (pommier, fraisier) contiennent de fortes quantités de TC (>5% de la MS). Parmi les légumineuses (*Fabaceae*), certaines espèces fourragères tempérées telles que le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), le sulla (*Hedysarium coronarium*) et les lotiers pédonculé et corniculé (*Lotus pedunculatus* et *L. corniculatus*) contiennent des TC en quantité non négligeable (2 à 5% de la MS) (Jean-Blain, 1998). On retrouve également des légumineuses fourragères riches en TC dans les régions tropicales, comme le chukum (*Havardia albicans*), le huaxin (*Leucaena leucocephala*), le tzalam (*Lysiloma latisiliquum*) et certaines espèces du genre *Acacia* spp. En revanche, les plantes herbacées de la famille des graminées (*Poaceae*) (telles que le ray-grass *Lolium perenne* L.) ou d'autres représentants de la famille des légumineuses comme la luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.) présentent des quantités très faibles ou non détectables de TC (Tableau 7).

Les différents organes de la plante présentent des teneurs en tanins variables. De manière générale, les plus fortes concentrations sont mesurées dans les fruits, les fleurs, les feuilles et faiblement dans les tiges (Jean-Blain, 1998). 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 et al., 2005). Pour une espèce végétale donnée, le stade végétatif influence aussi la concentration en tanins (Jean-Blain, 1998). De manière générale, lors de la

croissance de l'appareil végétatif, on note une dilution des tanins. Dans les feuilles, la quantité et la qualité des tanins varient lors de la maturation. Enfin, la teneur en tanins diminue en général lors du murissement des fruits.

Tableau 7. Contenu en tanins condensés de différentes plantes fourragères. (Akkari et al., 2008 ; Alonso-Díaz et al., 2008a,b,c ; Barry et McNabb, 1999 ; Orduño et al., 2008 ; Hoste et al., 2006 ; Martínez-Ortíz-de-Montellano et al., 2010).

| Plante | TC (% MS)* |
|--|------------|
| Légumineuses tempérées | |
| <i>Lotus pedunculatus</i> (Lotier pédonculé) | 7,7 |
| <i>Lotus corniculatus</i> (Lotier corniculé) | 4,8 |
| <i>Onobrychis viciifolia</i> (Sainfoin) | 2,5-4,1 |
| <i>Hedysarium coronarium</i> (Sulla) | 4,5-8,4 |
| <i>Dorycnium rectum</i> (Dorycnie) | 8,7 |
| <i>Lepedeza cuneata</i> (Sericea lespedeza) | 4,6-15,2 |
| <i>Medicago sativa</i> L. (Luzerne cultivée) | 0,05 |
| Légumineuses tropicales | |
| <i>Lysiloma latisiliquum</i> (Tzalam) | 1,2 |
| <i>Havardia albicans</i> (Chukum) | 1,7-7,3 |
| <i>Leucaena leucocephala</i> (Huaxin) | 0,8 |
| <i>Piscidia piscipula</i> | 0,9 |
| <i>Acacia pennatula</i> | 1,6 |
| <i>Acacia gaumeri</i> | 1,2-5,4 |
| <i>Acacia cyanophylla</i> | 8,2-13,2 |
| Graminées et autres herbacées | |
| <i>Lolium perenne</i> L. (Ray-grass anglais) | 0,2 |
| <i>Chicorium intybus</i> (Chicorée) | 0,3 |

* plusieurs méthodes et standards ont été utilisés afin de doser les tanins condensés ; les chiffres sont donc donnés à titre indicatif et ne sont pas directement comparables

I.5. Rôle des tanins chez les végétaux

Les tanins, comme métabolites secondaires des végétaux, ne sont pas impliqués dans la croissance ou la reproduction des plantes, mais ils jouent un rôle important dans leur défense face aux agressions par divers phyto-pathogènes (Bruneton, 1999). Les tanins sont aussi une défense contre les agressions dues à des prédateurs comme les insectes mais aussi

des herbivores (Mueller-Harvey, 2006). Pour les insectes, les mécanismes d'action des tanins sont : la réduction de la disponibilité de l'azote nutritionnelle (Feeny 1970), la réduction de la nourriture consommée (Bernays et Chamberlain, 1980 ; Lawson et al., 1982) et un effet direct toxique pour certaines espèces (Berenbaum, 1983). La présence excessive de tanins réduit l'appétence des plantes en raison de la sensation d'astringence liée à leur consommation, ce qui conduit ainsi à un arrêt de la consommation et protège les végétaux d'un excès de prédation (Jean-Blain, 1998).

1.6/ Méthodes d'analyse et de dosage des tanins

Le dosage des tanins s'avère indispensable si l'on veut connaître leur teneur dans une espèce végétale. Parmi les différentes techniques existantes, certaines permettent de mesurer simultanément les taux de tanins totaux (c'est-à-dire les taux de TH et TC). Parmi les méthodes les plus utilisées, on peut citer les méthodes pondérales par précipitation. Le principe est de précipiter le tanin par le bleu de méthylène ou différentes protéines comme l'hémoglobine ou l'albumine bovine. Ainsi, on peut évaluer la teneur en tanins du végétal en pesant le poids du précipité (Jean-Blain, 1998). D'autres méthodes de dosage permettent d'évaluer séparément les taux de TH et de TC. On peut citer les méthodes colorimétriques utilisant les propriétés réductrices des groupements phénols des tanins. Pour mesurer le taux de phénols totaux, c'est généralement une des deux méthodes suivantes: la méthode de Folin-Ciocalteu/ Folin-Denis ou la méthode au bleu de Prusse. Pour mesurer les taux de TC, c'est classiquement la vanilline ou le butanol associés à l'acide chlorhydrique, qui sont réduits par les groupements phénols des tanins, ce qui permet d'obtenir un composé coloré. Il faut toutefois souligner que ces différentes méthodes font preuve d'une variabilité beaucoup trop importante, et qu'il n'existe pas véritablement de valeurs de référence (Reed, 1995).

1.6.1/ Méthode de Folin-Denis

La méthode de Folin-Denis mesure les phénols totaux sur la base d'une réaction d'oxydoréduction (Hagerman et Butler, 1994). Le réactif de Folin-Denis oxyde les composés phénoliques en présence d'un composé alcalin, le carbonate de sodium (Na_2CO_3) tandis que le complexe phosphotungstique-phosphomolybdique dans le réactif de Folin-Denis est réduit. Cette réaction produit un complexe de couleur bleue qui peut être mesuré par spectrophotométrie à 725 nm (Swain et Hillis, 1959 ; Waterman et Mole, 1994). Cette méthode peut être influencée par un certain nombre de facteurs, tels que la précipitation des

protéines par le réactif de Folin-Denis et le degré de saturation du Na_2CO_3 , ce qui modifie le pH de l'essai (Hagerman et Butler, 1989; Waterman et Mole, 1994). Pour réduire cette variation, la méthode de Folin-Denis a été modifiée sous le nom de la méthode de Folin-Ciocalteu (Waterman et Mole, 1994). La modification a consisté en l'addition du sulfate de lithium et du brome au réactif phosphotungstique-phosphomolybdique. La méthode de Folin-Denis a également été modifiée pour mesurer les protéines (Lowry et al., 1951). En conséquence, cette méthode n'est pas spécifique pour mesurer les phénols totaux (Bae et al., 1993).

1.6.2. Méthode au bleu de Prusse

Price et Butler (1977) ont développé la méthode au bleu de Prusse pour mesurer la teneur en tanins des grains de sorgho. Le principe de base de cette méthode est également une réaction d'oxydoréduction. Les ions ferriques sont réduits par les tanins ainsi que les autres composés polyphénoliques en ions ferreux; cette opération est suivie par la formation de complexes d'ions ferricyanure ferreux. Ces complexes ont une couleur bleue spécifique (Bleu de Prusse) qui peut être analysée par spectrophotométrie à 725 nm (Price et Butler, 1977). Les méthodes de Folin-Denis et de bleu de Prusse sont pas spécifiquement employées pour différencier entre les deux types de tanins (Price et Butler, 1977; Hagerman et Butler, 1989). Cependant, la méthode au bleu de Prusse est mieux adaptée à la détermination des phénols totaux, car elle est plus simple et moins sensible à la présence des protéines (Hagerman et Butler, 1989; Hagerman et Butler, 1994; Waterman et Mole, 1994).

1.6.3/ Méthode à la vanilline-HCl

La méthode à la vanilline-HCl détermine les TC ainsi que leurs formes monomériques et a été spécifiquement utilisée pour mesurer les composés flavonoïdes (Hagerman et Butler, 1989 ; Leinmuller et al., 1991). Cette méthode implique la réaction de la vanilline dans une solution acide avec le noyau A des flavan-3-ols ou des flavan-3,4-diols pour former un produit de condensation rouge qui peut être mesuré par spectrophotomètre à 500 nm (Swain et Hillis, 1959). Swain et Hillis (1959) ont initialement développé la méthode à la vanilline en utilisant l'acide sulfurique à 70%. Burns (1971) a modifié la méthode en remplaçant l'acide sulfurique à 70% par l'acide chlorhydrique pour mesurer la teneur en tanins des grains de sorgho. Ce qui a rendu cette méthode plus simple et plus rapide. Elle a toutefois été limitée par plusieurs facteurs, y compris la sensibilité, la reproductibilité et le temps nécessaire pour

l'extraction des tanins. Des modifications ont été apportées pour remédier à ces problèmes. Maxon et Rooney (1972) ont modifié la méthode à la vanilline en ajoutant 1% de HCl au méthanol utilisé pour l'extraction afin d'augmenter le rendement en tanins, et en secouant les échantillons pour accroître le développement de la couleur. Cependant, cette modification induit toujours une variabilité dans les résultats obtenus. Cette méthode a également été améliorée par Laurent et al. (1975) en testant plusieurs solvants organiques et optimisant les concentrations des réactifs et contrôlant les facteurs externes tels que la température, la sensibilité de la méthode à la vanilline-HCl a pu être augmentée. Cette méthode est la plus utilisée notamment pour déterminer la teneur en tanins des feuilles fourragères. Quand elle est couplée à une technique de dosage des composés phénoliques, la méthode à la vanilline-HCl peut apporter de précieux renseignements sur le degré de condensation des flavanols.

1.6.4/ Méthode n-butanol-HCl

Swain et Hillis (1959) ont développé la méthode acide-butanol. Cette méthode mesure la teneur en tanins sur la base de la transformation des proanthocyanidines en anthocyanidines lorsque les échantillons sont chauffés dans une solution acide. La réaction se produit suite à l'auto-oxydation après clivage, par catalyse acide, des unités interflavanoïdes (Swain et Hillis, 1959; Porter et al., 1986). Porter et al. (1986) ont augmenté la reproductibilité de cette méthode en optimisant les facteurs suivants: la proportion du butanol et d'acide, le temps de la réaction, l'addition d'ions ferreux et la sensibilité de la méthode en présence d'eau. Depuis ces améliorations, cette méthode a été recommandée pour déterminer les TC (Hagerman et Butler, 1989; Hagerman et Butler, 1994; Waterman et Mole, 1994). Terrill et al. (1992) ont apporté des modifications à la méthode acide-butanol par l'utilisation d'extraits végétaux aqueux, le développement de courbes standards pour les tanins extractibles et les tanins liés, l'extension du temps d'ébullition à 75 min et la suppression des ions ferreux. Ces modifications ont permis l'utilisation de cette méthode pour mesurer la concentration de tanins dans trois fractions différentes: tanins libres ou extractibles, tanins, liés aux protéines et tanins liés aux fibres. En comparaison à la méthode vanilline-HCl, cette dernière ne peut mesurer que les tanins libres. Cependant, Terrill et al. (1992) ont constaté que cette méthode est incapable d'analyser les très faibles concentrations de TC, lorsque les plantes contiennent moins de 1% de tanins par MS.

Pour résumer, la méthode de Folin-Ciocalteu est basée sur le pouvoir de réduction des groupes hydroxyles phénoliques. Elle n'est pas très spécifique et détecte

tous les phénols avec une sensibilité très variable. La méthode de dépolymérisation avec le n-butanol-HCl est basée sur la transformation des TC en anthocyanidines dans des solutions acides minérales chaudes (Porter et al., 1986). Les anthocyanidines formées prennent une couleur rouge avec un maximum d'absorbance autour de 550 nm. Cette méthode est très spécifique pour le dosage des TC, mais a beaucoup de défauts. Premièrement, la transformation des TC en anthocyanidines n'est pas complète ; deuxièmement, les rendements en anthocyanidines colorées dépendent tant de la structure que du degré de polymérisation des TC (Scalbert, 1992) ; troisièmement, les réactions sont communes pendant la transformation et aboutissent à la formation de polymères rouge-bruns qui absorbent autour de 550 nm (Scalbert, 1992). Ce qui mène sans aucun doute à une erreur d'estimation et rend l'application de cette méthode pour l'analyse quantitative des TC très limitée. Compte tenu des inconvénients majeurs des méthodes précédentes, la méthode à vanilline-HCl (ou ses variantes) apparaît plus attractive et mieux adaptée au dosage des TC, à cause de sa sensibilité, sa spécificité et de sa simplicité (Deshpande et al., 1986). Elle est tout à fait spécifique à une gamme étroite de flavanols (monomères et polymères) (Sarkar et Howarth, 1976).

1.7/ Effets des tanins chez les ruminants

Les ruminants sont sensibles aux deux types de tanins. Suivant leur teneur dans la plante, leur structure et leur mode de consommation, ils vont avoir un effet bénéfique ou délétère sur la valeur alimentaire du fourrage et sur les performances et la santé animales.

1.7.1/ Effets des tanins hydrolysables

Les TH, de par leur sensibilité à l'hydrolyse acide, vont être hydrolysés dans le tractus digestif des ruminants. Leurs produits de dégradation vont alors être rapidement absorbés par la suite et passer dans la circulation sanguine. Or ces métabolites, en plus d'être à l'origine d'ulcérations et de nécroses de l'épithélium digestif, sont hépato- et néphro-toxiques et peuvent être ainsi responsables d'intoxications sévères allant parfois jusqu'à la mort des animaux ingérant des quantités massives de plantes riches en TH (Mueller-Harvey, 2006).

1.7.2/ Effets des tanins condensés

Par le passé, les tanins étaient considérés communément et sans distinction comme des facteurs antinutritionnels ayant un impact négatif sur la santé animale. Désormais, il a été

montré qu'un apport faible à modéré produit des effets positifs, alors que leur ingestion massive aboutit à des effets néfastes sur les paramètres zootechniques, la physiologie digestive et la santé des animaux (Tableau 8). Les effets observés proviennent surtout d'études réalisées sur les espèces *L. corniculatus*, *L. pedunculatus*, *H. coronarium*, *O. viciifolia*, *Lespedeza cuneata* et *L. leucocephala* (légumineuses fourragères) (Waghorn et Mc Nabb, 2003; Ramírez-Restrepo and Barry, 2005; Mueller-Harvey, 2006).

Au pH ruminal (6-7), les complexes insolubles TC/protéines végétales sont stables, ce qui protège ces dernières des fermentations bactériennes et s'oppose par ailleurs à la production et à l'accumulation de gaz ; leur dissociation ultérieure induit par le pH acide de la caillette permet ainsi une absorption plus élevée d'acides aminés au niveau de l'intestin grêle : c'est le phénomène d'échappement ou *by-pass* ruminal. En revanche, consommés en excès, les TC peuvent réduire l'activité enzymatique de la flore ruminale et interagir avec les protéines membranaires des cellules intestinales, entraînant ainsi une perturbation de la physiologie digestive. Ainsi les équilibres de complexation-dissociation des TC avec les protéines conditionnent largement leurs effets bénéfiques ou néfastes sur la physiologie digestive ; les effets sur la santé et les performances de production découlent alors des modifications engendrées sur la digestion.

Tableau 8. Effets des tanins condensés sur la nutrition et les performances zootechniques des petits ruminants en fonction de leur teneur dans la ration. (Brunet, 2008)

| Teneur en TC (% MS) | Conséquences | Effets observés |
|---------------------|-------------------|---|
| < 2 | nulles ou faibles | Prévention du tympanisme Aucun effet sur l'ingestion volontaire |
| 3-6 | bénéfiques | ↗ absorption de nutriments ↗ taux d'ovulation ↗ production et qualité du lait ↗ production de laine ↗ taux de croissance et gain de poids |
| > 7 | néfastes | ↘ niveau d'ingestion ↘ absorption de nutriments ↘ production de lait ↘ production de laine ↘ taux de croissance et gain de poids |

II/TANINS ET METHANE**II.1/ Effets des tanins sur la fermentation ruminale**

Les TC ont un effet généralement dépressif sur la fermentation entérique. Au delà de 5% dans le régime, les TC peuvent négativement affecter l'ingestion tandis que les concentrations inférieures à 5% n'ont pas d'influence sur l'ingestion (Aerts et al., 1999). Dans l'étude de Carulla et al. (2005), l'ingestion a augmenté quand l'extrait d'*A. mearnsii* est inclus dans le régime. Un certain nombre d'études a rapporté que les extraits de tanins et les plantes riches en tanins réduisent la digestibilité *in vitro* (Patra et al., 2006a; Bhatta et al., 2009) et *in vivo* (Animut et al., 2008a, b; Grainger et al., 2009) et que la réponse est dépendante du type de tanins (Waghorn, 2008). De nombreuses études ont montré que les TC n'affectent pas la digestibilité (Carulla et al., 2005; Patra et al., 2006a; Bhatta et al., 2009). Cependant, les résultats rapportés par d'Al-Dobaib (2009) ont montré que l'inclusion de quebracho (contenant 750 g TC/kg) à une dose de 22,5 g/kg au foin de luzerne était à l'origine d'une baisse de la digestibilité chez les ovins. Les TC peuvent se lier aux fibres et former des complexes indigestibles par les microorganismes cellulolytiques. Les résultats rapportés pour les AGV sont très variables, c'est-à-dire aucun effet (Carulla et al., 2005; Puchala et al., 2005; Tavendale et al., 2005; Patra et al., 2006a; Animut et al., 2008a,b), un effet négatif (Min et al., 2006; Beauchemin et al., 2007; Grainger et al., 2009) selon la dose et la source (Bhatta et al., 2009; Hariadi et Santoso, 2010) et un effet positif (Rira et al., 2013). Il est prouvé qu'une diminution significative de la méthanogénèse sans une réduction appréciable de la concentration d'AGV et de la digestibilité pourrait être possible (Carulla et al., 2005; Bhatta et al., 2009; Hariadi et Santoso, 2010 ; Cieslak et al., 2012) Ces résultats sont intéressants pour une exploitation pratique des TC sur terrain

Des travaux conduits *in vitro* (Tavendale et al., 2005; Getachew et al., 2008) et *in vivo* (Puchala et al., 2005; Beauchemin et al., 2007; Animut et al., 2008a) ont généralement montré que les TC conduisent à une diminution de la concentration du NH₃ dans le milieu ruminal mais n'affectent pas la concentration des AGV. Ceci peut s'expliquer par la capacité des TC *i*) à se lier aux protéines alimentaires, les protégeant ainsi de l'attaque microbienne et *ii*) à inhiber la croissance des bactéries. Il semblerait qu'à dose élevée, l'effet soit plus marqué *in vitro* qu'*in vivo* et qu'à dose identique, l'amplitude de la réponse est différente selon la source de TC. L'essai de Cortes et al. (2009), conduit *in vitro*, confirme ces résultats. En effet, l'incubation de tourteau de soja en présence de doses croissantes de TC (300, 600 et 900 mg/g

de protéines de substrat), extraits de *Flemingia macrophylla*, de *Calliandra calothyrsus* ou encore de *L. leucocephala*, a conduit à une baisse de la production de NH₃ (de 40 à 90%) et de la dégradation des protéines (de 25 à 65%) dans le milieu. Cette moindre dégradation des protéines dans le rumen ne s'accompagne pas d'une meilleure digestion post-rumen et, ce, quelle que soit la teneur en TC de la plante. Ceci confirme le rôle important de la composition chimique et de la structure des TC dans leur capacité à former des complexes plus ou moins stables dans les compartiments digestifs. La diminution de la dégradation des protéines dans le rumen conduit à une augmentation de la quantité d'azote non ammoniacal atteignant le duodénum. Cette augmentation est essentiellement due à une augmentation du flux d'azote d'origine alimentaire, le flux d'azote microbien étant peu modifié. Ce qui montre aussi que, dans la gamme de teneurs en TC des plantes testées dans ces essais, les TC ne limitent pas la synthèse microbienne.

II.2/ Effets des tanins sur la méthanogénèse

Les tanins s'avèrent très efficaces dans la réduction de la production de CH₄ aussi bien dans les conditions *in vivo* qu'*in vitro* (Tableau 9). Plusieurs études l'ont confirmé dans la méta-analyse de Jayanegara et al. (2012) qui récapitule 15 essais *in vitro* et 15 essais *in vivo*. Les TC peuvent être consommés dans certains fourrages à plus ou moins grande échelle, ou sous forme d'extraits ajoutés à la ration. La réduction de la méthanogénèse par l'inclusion directe de fourrages riches en tanins dans les régimes alimentaires de ruminants a également été montrée à la fois, *in vitro* et *in vivo*. C'est le cas de *L. leucocephala* qui s'est montré efficace pour baisser le CH₄ entérique *in vitro* et *in vivo* (Jayanegara et al., 2012, Soltan et al., 2013). Woodward et al. (2002) ont étudié l'effet de l'inclusion du sulla (*H. coronarium*) sur les émissions de CH₄ *in vivo* chez des vaches laitières et ont trouvé une diminution de la production de CH₄ (19,5 vs 24,6 g / kg MS ingérée). Des tendances similaires pour les émissions de CH₄ ont été observées chez les vaches laitières nourries par *L. pedunculatus* en ensilage (Woodward et al., 2001) ainsi que chez les agneaux (Waghorn et al., 2002). Plusieurs autres plantes ont été étudiées pour leurs propriétés anti-méthanogènes comme les feuilles de *Rheum undulatum*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Bergenia crassifolia*, *Rhus typhina* et *Peltiphyllum peltatum* (Jayanegara et al., 2009), *Lespedeza striata* (Animut et al., 2008a), *Phyllanthus discoidenous*, *Magnifera indica* et *Agelaea obliqua* (Hayler et al., 1998). Les tanins du *Quebracho* ont également inhibé la production de CH₄ *in vitro* de façon linéaire (13-45%) avec des doses croissantes allant de 5 à 25% du substrat (Bhatta et al., 2009).

Tableau 9. Effets des tanins sur la production de méthane et sur les populations d'archées méthanogènes et de protozoaires du rumen

| Reference | Tannin sources | Diet/substrate | Test system/dosage | Methane | Methanogens | Protozoa |
|---------------------------------------|--|--|--|--|--|--|
| Hassanat and Benchaar (2013) | Acacia mearnsii | Total mixed ration (forage/concentrate) 65 : 35 | Serum bottle/4, 10, 20, 30 and 40 mg | NE, 212%, 221%, 232%, 238% | NA | NA |
| | Schinopsis balansae extract (90.4% CT) Castanea sativa extract (5.7% CT and 75.5% HT) Quercus aegilops extract 8.0% CT and 71.2% HT) | | | NE, NE, 223%, 234%, 240% NE, 213%, 223%, 231%, 240% NE, 211%, 219%, 226%, 236% | | |
| Soltan et al. (2012) | Acasia saligna leaves (6.3% CT) Laucaena leucocephala leaves (4.6% CT) Prosopis juliflora leaves (0.04% CT) Atriplex halimus leaves (0.02% CT) | Acasia saligna 100 Laucaena leucocephala 100 Prosopis juliflora 100 Atriplex halimus 100 | Serum bottle/500 mg | 238% 236% NE NE | NA | 29% 223% 34% 10% |
| | Onobrychis viciifolia sainfoin (1.52% CT) Cocksfoot/sainfoin 50 : 50 Ryegrass/sainfoin 50 : 50 Onobrychis viciifolia sainfoin (1.52% CT) Cocksfoot/sainfoin 50 : 50 Ryegrass/sainfoin 50 : 50 | Onobrychis viciifolia/600 mg Cocksfoot plus sainfoin/600 mg Ryegrass plus sainfoin/600 mg Onobrychis viciifolia/600 mg Cocksfoot plus sainfoin/600 mg Ryegrass plus sainfoin/600 mg | Serum bottle/600 mg/3.5 h Serum bottle/600 mg/24 h | NE NE NE NE 18% NE | NA | NA |
| Ta n et al. (2011) | Leucaena leucocephala extracts (100% CT) | Guinea grass 100 | HGT/10, 15, 20, 25 and 30 mg | 233%, 247%, 257%, 259%, 263% | 225%, NE, 299%, 294%, 295% | 286%, 283%, 262%, 255%, 255% |
| Hariadi and Santoso (2010) | Acacia mangium (5.4% tannins) | Elephant grass/ Accacia mangium 80:20 | Glass syringes/60 mg | 229% | NA | NE |
| | Biophytum petersianum (4.3% tannins) Psidium guajava (3.5% tannins) Phaleria papuana (3.1% tannins) Persea americana (2.4% tannins) Sesbania grandiflora (1.9% tannins) | Elephant grass/Biophytum petersianum 80 : 20 Elephant grass/Psidium guajava 80: 20 Elephant grass/Phaleria papuana 80:20 Elephant grass/Persea americana 80 : 20 Elephant grass/Sesbania grandiflora 80 : 20 | | 225% 218% NE NE NE | | NE NE 231% NE 255% |
| Grainger et al. (2009) | Acacia mearnsii extracts (603 g CT/kg DM) | Grazing ryegrass/cracked triticale grain 89 : 11 | Dairy cows/0.9 or 1.8% DMI | 214%, 229% | NA | NA |
| Bhatta et al. (2009) | Mimosa tannins (7.78% HT plus 1.5% CT) | Timothy hay/concentrate 65 : 35 | HGT/5, 10, 15, 20 and 25% tannin-containing samples of the basal diet DMI | 211%, 214%, 227%, 232%, 241% | NE | NE, 227%, 126%, 215%, 29% |
| | Quebracho tannin (7.62% HT plus 3.67% CT) Quebracho tannin (3.94% HT plus 1.33% CT) | | | NE, 231%, 237%, 245%, 245% 213%, 223%, 226%, 231%, 238% | 220%, 227%, 227%, 227%, 235% NE, 234%, 226%, 222%, 230% | 24%, 216%, 232%, 228%, 255% 28%, 220%, 234%, 233%, 234% |
| Ramirez-Restrepo et al. (2010) | Salix spp. (34% CT) | Ryegrass/white clover | Sheep (5th or 11th weeks)/grazed | 219% (5th week) | NA | NA |
| Animut et al. (2008a) | Lespedeza striata forage (151 g CT/kg DM) | Lespedeza striata/ Sorghum bicolor (33 : 67, 67 : 33, 100) | willow (Salix spp.) fodder blocks 12 g CT/kg DMI Goats/200, 447 and 613 g/day | NE (11th week) 233%, 247%, 258% | NA | 242%, 256%, 269% |
| | Lespedeza striata forage (140 g CT/kg DM) | Lespedeza striata/Lespedeza cuneata 100 : 0, 50 : 50, 0 : 100 | Goats/720, 719 and 745 g/day | 249%, 254%, 251% | NA | 234%, 222%, 251% |
| Beauchemin et al. (2007) | Lespedeza cuneata forage (151 g CT/kg DM) Quebracho tannins (91% CT) | Barley silage/concentrate 70 : 30 | Beef cattle/1 or 2% of DMI | NE | NA | NA |
| Zelege et al. (2006) | Acacia angustissima 459 | Brachiaria humidicola grass/Acacia angustissima 20 : 80 | Rusitec/2.8 g DM/day | 212% | NA | NA |
| | Sesbania sesban 10865 | Brachiaria humidicola grass/Sesbania sesban 20 : 80 | | 237% | | |

CT= condensed tannins; HT= hydrolysable tannins; DM= dry matter; DMI= dry matter intake; HGT= hohenheim gas test system; NE= no effect; NA= not analyzed; –decrease; 1increase.

D'après Cieslak et al., (2013)

Une tendance similaire est constatée pour *L. leucocephala* dont les doses croissantes entraînent une baisse linéaire de la production de CH₄ *in vitro* (Hess et al., 2006; Huang et al., 2010; Tan et al., 2011). Min et al. (2005) ont constaté que les tanins du *Quebracho* (75% TC) inclus à des concentrations de 1-2 g/L diminuent la production de CH₄ *in vitro* (de 12,3 à 32,6%). De même, les tanins du *Quebracho* ont réduit le CH₄ de 25 à 51% chez les vaches recevant ces tanins pendant 63 jours à des doses allant de 10 à 20 g/kg de MS (Min et al., 2006).

Les extraits de tanins ont également montré leur efficacité sur la production de CH₄, c'est le cas des extraits de *Terminalia chebula* (Patra et al., 2006a) qui ont fortement inhibé la production de CH₄ *in vitro*. D'autres extraits de tanins comme ceux du *Mimosa* ou du châtaignier (1-10%) ont induit une baisse de la production de CH₄ de 30,8 et 33,3%, respectivement (Roth et al., 2002). De même, l'ajout de l'extrait de tanins d'*A. mearnsii* a diminué la méthanogénèse *in vivo* aussi bien chez les ovins que chez les bovins (Carulla et al., 2005 ; Grainger et al., 2009).

La divergence observée entre les études pourrait s'expliquer par plusieurs éléments : la dose, le type et la source de tanins ainsi que la nature du régime alimentaire. L'étude de Min et al. (2006) a bien montré que les tanins de *Quebracho* n'agissent pas de la même manière selon le stade végétatif de la plante, bien qu'ils fussent inclus à la même dose. Autrement dit, l'amplitude de la réponse est variable et dépend de la structure des TC et surtout du poids moléculaire des TC (Patra and Saxena, 2009a; Huang et al., 2010). Dans l'étude de Grainger et al. (2009), l'effet dose a bien été montré, ces auteurs ont trouvé une relation linéaire entre les TC de *A. mearnsii* et la production de CH₄ *in vivo*. L'inclusion des TC dans les régimes alimentaires pourrait également affecter la digestibilité des fibres, pouvant entraîner une diminution de la production de CH₄.

II.3/ Effets des tanins sur le microbiote ruminal

L'action des TC sur le microbiote ruminal est variable en fonction de leur structure physicochimique (composition et degré de polymérisation) et/ou de la dose utilisée. Ainsi, à dose identique, les TC de *Dorycnium rectum* (50% de gallocatéchines et 42% de catéchines) réduisent de 25% la croissance spécifique de *R. albus* contre 75% pour les TC de *L. corniculatus* (65% d'épicatéchine et 30% pour l'épigallocatéchine) (Sivakumaran et al., 2004 ; Min et al., 2005). L'effet inhibiteur des TC de *D. rectum* semble plus important pour des fractions de faible (3300 Da) et moyen (12200 Da) poids moléculaire que pour une fraction de

haut poids moléculaire (35600 Da) (Sivakumaran et al., 2004). De façon générale, la croissance bactérienne est d'autant plus inhibée que la concentration en TC dans le milieu est élevée. Toutefois, certaines espèces bactériennes seraient tanins-tolérantes, en raison de leur capacité à modifier ou dégrader les tanins (Smith et al., 2005; Anantasook et al., 2013). A titre d'exemple, la croissance de *S. bovis* est maintenue pour des concentrations en TC extraits du *L. corniculatus* allant jusqu'à 400 µg/mL alors que *P. ruminicola* ne se développe pas au-delà de la dose de 100 µg/mL. De nombreuses études ont montré l'existence de bactéries qui tolèrent les TC mais ceci est dépendant des propriétés des espèces bactériennes concernées ainsi que du tanin lui-même (Frutos et al., 2004; Patra et Saxena, 2011). Dans le même sens, Sivakumaran et al. (2004) ont montré que les concentrations inhibitrices en TC de *D. rectum* étaient supérieures à 300 µg/mL pour *C. amilophilus*, comprises entre 100 et 200 µg/mL pour *C. proteoplasticum*, *R. albus* et *B. fibrisolvens*, et inférieures à 100 µg/mL pour *P. anaerobius*. Min et al. (2002) ont reporté que lorsque le régime alimentaire de moutons comprend *L. corniculatus* (32 g TC kg/ MS), la population de bactéries protéolytiques (*C. proteoclasticum*, *Eubacterium* spp., *S. bovis* et *B. fibrisolvens*) diminue. Les CT contenus dans *L. leucocephala* ont montré une activité inhibitrice *in vitro* vis-à-vis de *F. succinogenes* (Longo et al., 2013). Une étude *in vitro* sur l'effet des TC de *L. corniculatus* sur la croissance et l'activité de onze isolats du rumen a rapporté que certaines souches, telles que *C. proteoclasticum* et *R. albus*, ont montré une augmentation transitoire de la croissance à faibles concentrations de TC (50 à 100 µg/mL) mais pas à fortes concentrations (> 200 µg/ mL). Tandis que neuf souches se sont avérées sensibles aux TC même à faibles doses (Min et al., 2005). Des essais *in vivo* ont également démontré que *S. gallolyticus* était tolérante à une gamme de tanins (à la fois TH et TC) avec une plus forte résistance vis à vis des TH de petit poids moléculaire (acide tannique). Un exopolysaccharide est supposé être produit par *S. gallolyticus* en réponse aux tanins et peut former une couche protectrice autour des cellules (Krause et al., 2005). Ce qui permet aux ruminants de digérer des espèces végétales qui contiennent des concentrations de tanins supérieures à 5%.

L'effet des TC sur la population d'archées méthanogènes a été étudié à la fois *in vitro* et *in vivo* ; toutefois, les résultats étaient toujours variables (Tavendale et al., 2005; Animut et al., 2008a; Bhatta et al. , 2009 ; Szumacher-Strabel et al. , 2011; Cieslak et al., 2012). Ainsi, Min et al., (2014) ont observé un effet négatif des TC d'écorce de pin sur certaines populations d'archées comme *Methanobrevibacter* et *Methanobacteriaceae* et au contraire, positif sur d'autres telles qu'*Akkermansia* et *Methanosphaera* et, ce, quelle que soit la dose

(0,17, 1,6 et 3,3% de la MS de la ration) utilisée. Tavendale et al. (2005) ont suggéré que l'inhibition de la croissance de la population d'archées méthanogènes est due à l'effet bactériostatique ou bactéricide des TC. L'étude a démontré l'inhibition de *M. ruminantium*, accompagnée d'une réduction de CH₄. Des conclusions similaires ont été tirées par Pellikaan et al. (2011). D'autres chercheurs ont analysé six sources commerciales de tanins contenant des TH et des TC, et ont montré un plus grand potentiel anti-méthanogène après l'utilisation d'un mélange de TH et de TC que d'une seule catégorie de tanins (Bhatta et al., 2009). Le mélange de TH et de TC réprime la méthanogenèse en réduisant la population d'archées méthanogènes dans le rumen soit directement, soit par la réduction de la population de protozoaires qui vivent en symbiose avec la population d'archées méthanogènes (Bhatta et al., 2009). D'autres auteurs ont noté, non seulement, un effet direct des TC sur les archées méthanogènes mais aussi une influence directe sur les protozoaires qui leur sont associés (Patra et Saxena, 2009a). Dans une étude réalisée *in vitro*, l'extrait de *L. leucocephala* a causé une réduction linéaire des archées méthanogènes (jusqu'à 99%) et des protozoaires totaux (Jusqu'à 83%) en réponse à des doses croissantes (de 20 à 60 mg / g MS de substrat) de TC (Tan et al., 2011). Une autre étude a également confirmé que les effets des TC sur la population de protozoaires étaient variables, probablement parce que certains TC agissent directement sur les archées méthanogènes libres et non pas celles attachées aux protozoaires (Bhatta et al., 2012). D'autres chercheurs ont bien montré qu'après l'inhibition des protozoaires, une baisse de la population d'archées méthanogènes associées aux protozoaires, (comme les espèces appartenant à la famille des *Methanobacteriaceae*) est simultanément accompagnée d'une augmentation du nombre d'archées méthanogènes libres (cas des *Methanobacteriales*) (Goel et Makkar, 2012). Ces résultats prouvent qu'une réduction du nombre de protozoaires n'est pas obligatoirement accompagnée de celle d'archées méthanogènes. L'inhibition de certaines espèces d'archées méthanogènes peut être à l'origine de l'émergence d'autres espèces qui étaient sous-dominantes, résultant en un changement dans les équilibres microbiens. C'est pour cette raison que ce type d'étude devrait également inclure l'analyse qualitative et quantitative des autres composants du microbiote ruminal (Zmora et al., 2012).

L'interprétation des résultats de l'utilisation des TC comme réducteur de la méthanogenèse ruminale est difficile en raison de la complexité des structures chimiques de ces molécules, ainsi que de la possibilité d'interactions entre ces molécules bioactifs et les autres constituants de la plante (Soltan et al., 2012). En cas d'absence d'effet des

additifs à base de TC, la raison invoquée est généralement la faible concentration mais il ne faut pas négliger aussi la structure du TC qui dépend de l'espèce végétale et des conditions environnementales. En effet, l'impact des TC va être modulé par différents facteurs tels que leur teneur dans la plante et les paramètres de leur structure : le degré de polymérisation, le rapport prodelphinidine/procyanidine, la conformation dans l'espace (forme *cis* ou *trans*), la capacité des tanins à se lier aux protéines et le rapport tanins/protéines (Spencer et al., 1988; Silber et al., 1998; McAllister et al., 2005; Frazier et al., 2010). Il y a aussi le mode d'administration des tanins qui conditionne l'ingestion et par conséquent agit indirectement sur la fermentation entérique.

III/ UTILISATION DES PLANTES RICHES EN TANINS EN ALIMENTATION DES RUMINANTS : CAS DE L'ALGERIE

Aujourd'hui, l'agriculture doit produire différemment en respectant davantage l'environnement. Les récentes crises alimentaires mondiales conduisent à une augmentation du prix des intrants qui fragilise les élevages et incite à utiliser plus de fourrages dans l'alimentation des ruminants. Maximiser la valeur alimentaire des fourrages est un élément clé pour limiter le recours aux aliments complémentaires dans l'alimentation des ruminants et ainsi accroître l'autonomie alimentaire des systèmes d'élevages.

Dans un pays méditerranéen à potentiel hydrique assez médiocre comme l'Algérie, l'essentiel du cheptel national n'a à sa disposition que des ressources fourragères limitées, soumises aux aléas d'un climat rude et irrégulier, malgré les vastes superficies qu'elles couvrent (Le Houérou, 1971 ; Bourbouze et Donadieu, 1987). Le déficit fourrager reste encore très accentué malgré les efforts récents dans l'augmentation de la surface irriguée à environ 600 000 ha. La paille est encore très utilisée par les éleveurs d'ovins céréaliers car elle permet d'équilibrer avantageusement le bilan fourrager ; l'ensilage est peu développé en élevage ovin en Algérie, en raison des coûts de réalisation du chantier. Un effort appréciable a été consenti, mais reste insuffisant. Les arbres et arbustes méditerranéens sont généralement riches en protéines mais aussi en métabolites secondaires, notamment en TC (Cabiddu et al., 2000) ; ces derniers sont très mal exploités à cause de leur toxicité potentielle. En effet, l'utilisation de ces plantes est souvent confrontée au problème de facteurs antinutritionnels (tanins et saponines en quantité excessive, composés cyanogéniques, etc.). Ainsi, l'utilisation rationnelle de ces ressources doit passer par une absence de leur toxicité, leur bonne appétibilité, leur facilité d'emploi, leur disponibilité en quantités suffisantes et régulières et leur intégration dans les rations équilibrées suivant leur composition en éléments nutritifs. Plusieurs travaux visant à exploiter les plantes riches en tanins

provenant de zones arides d'Algérie ont été entrepris dans une tentative de pallier les problèmes de désertification et de nutrition des ruminants car ces plantes sont souvent riches en protéines. Peu d'attention est portée sur leur potentiel à réduire les GES et de ce fait, remédier en même temps aux problèmes écologiques et environnementaux. Toutefois l'effet biologique des tanins de diverses plantes méditerranéennes sur la production de CH₄ et les aptitudes fermentaires d'ovins a été mesuré *in vitro* dans un but de valorisation. Les plantes testées incluent des graminées et des légumineuses de diverses origines et collectées de zones arides et semi-arides, en plus de quelques espèces végétales appartenant à d'autres familles botaniques (Tableau 10). Les résultats obtenus ont montré que les plantes testées sont effectivement riches en TC avec des teneurs nettement marquées pour les légumineuses et qu'elles sont capables de réduire la production de CH₄ *in vitro* (Bouazza et al., 2012; Boufennara et al., 2013; Chentli et al., 2014). A notre connaissance, aucune étude *in vivo* n'a été menée sur place afin d'investiguer la valeur nutritionnelle et anti-méthanogène de ce type de plante et beaucoup reste encore à faire dans ce domaine, la littérature scientifique étant en effet loin d'être aussi abondante sur le sujet qu'en ce qui concerne les plantes fourragères riche en TC dans les autres régions du monde.

Les légumineuses fourragères contenant des TC ont des propriétés intéressantes pour la nutrition et la santé des ruminants et offrent des perspectives pour limiter les rejets de CH₄ entérique. Cela explique le regain d'intérêt pour ces plantes dont la valeur alimentaire a été peu étudiée. Parmi ces légumineuses : *L. leucocephala* et *G. sepium*. Ces deux arbustes ont été introduits en Afrique à la fin du 19^{ème} siècle (1850), aujourd'hui elles présentent une composante importante de la flore arborée locale qui mérite d'être étudiée et valorisée. En effet, en période de sécheresse elles constituent parfois la principale ressource fourragère disponible.

Plus récemment, des études se sont également intéressées aux propriétés anti-méthanogènes de certains sous-produits agro-industriels riches en TC, entre autre les feuilles de manioc (*Manihot esculenta*), un arbuste largement cultivé dans les régions tropicales pour la consommation de ses racines tubérisées. L'utilisation de la partie aérienne du manioc comme fourrage est pratiquée dans certaines régions tropicales (Supriyadi et al., 2014). L'initiative de l'introduction du manioc en Algérie est très ancienne et date de 1897 (Riviere, 1897). Le développement d'espèces végétales comme le manioc qui se prête à un grand nombre d'applications est une piste d'étude.

Tableau 10. Plantes riches en tanins condensés d'origine algérienne

| Plante | Matériel utilisé | TC (g/kg MS) | Commentaires | Références |
|--------------------------------|------------------|-------------------|---|---|
| <i>Artemisia herba-alba</i> | Partie aérienne | 118,8 -72,8 118,8 | Faible production de gaz (après 24 h d'incubation), <i>réduction de CH₄</i> | Bouffenaar et al. (2012); Bouffenaar et al. (2013); Bouazza et al. (2012) |
| <i>Atriplex halimus</i> | Feuilles | 69,1 - 44,4 | Faible production de gaz (après 24 h d'incubation), <i>forte digestibilité</i> in vitro | Bouffenaar et al. (2012); Bouazza et al. (2012) |
| <i>Acacia nilotica</i> | Feuilles | 726,3 | <i>Faible taux de dégradation ruminale, réduction de CH₄</i> | Bouazza et al. (2012) ; Chentli et al. (2014) |
| <i>Acacia horrida</i> | Feuilles | 475,7 | <i>Moyenne digestibilité</i> in vitro | Bouazza et al. (2012) |
| <i>Acacia saligna</i> | | 631, 2 | <i>Faible digestibilité</i> in vitro, <i>réduction de CH₄</i> | Bouazza et al. (2012) ; Chentli et al. (2014) |
| <i>Faidherbia albida</i> | Feuilles | 59,7 | Faible production de gaz | Bouffenaar et al. (2012) |
| <i>Vicia faba</i> | Feuilles | 59,4 | <i>Forte digestibilité</i> in vitro | Bouazza et al. (2012) |
| <i>Punica granatum</i> | Feuilles | 87,2 | <i>Moyenne digestibilité</i> in vitro | Bouazza et al. (2012) |
| <i>Artemisia campestris L,</i> | Feuilles | 114,3 | Faible production de gaz (après 24 h d'incubation) | Bouffenaar et al. (2012) |
| <i>Stipagrostis pungens</i> | Feuilles | 78,7 78,7 | <i>Faible digestibilité</i> in vitro <i>et in situ</i> | Bouffenaar et al. (2012) ; Bouazza et al. (2012) |
| <i>Lygeum spartum</i> | Feuilles | 102,4 102,4 | <i>Faible digestibilité</i> in vitro <i>et in situ</i> | Bouffenaar et al. (2012) ; Bouazza et al. (2012) |
| <i>Stipa tenacissima</i> | Feuilles | 213,9 213,9 | <i>Faible digestibilité</i> in vitro <i>et in situ</i> , <i>réduction de CH₄</i> | Bouffenaar et al. (2012) ; Bouffenaar et al. (2013) |
| <i>Retama raetam</i> | Feuilles | 77,9 | Faible production de gaz (après 24 h d'incubation) | Bouffenaar et al. (2012) |
| <i>Astragalus gombiformis</i> | Feuilles | 78,3 | Faible production de gaz (après 24 h d'incubation) | Bouffenaar et al. (2012) |
| <i>Albizia julibrissin</i> | Feuilles | 587,1 | Faible production de gaz (après 24 h d'incubation) | Bouffenaar et al. (2012) |
| <i>Calobota saharae</i> | | 109,7 | Faible production de gaz (après 24 h d'incubation) | Bouffenaar et al. (2012) |

Ce sont bien sûr des exemples, choisis car les trois plantes citées peuvent être disponibles en quantité suffisante, par culture ou plantation. Si l'effet des TC pour réduire le CH₄ se confirme, il sera nécessaire de réaliser une prospection des ressources fourragères disponibles en Algérie en quantité suffisante pour une utilisation à grande échelle de plantes riches en TC.

MATERIEL ET METHODES

PREMIERE PARTIE EXPERIMENTALE: FERMENTATIONS *IN VITRO*

Avant propos

La fermentation des substrats est étudiée par la technique de production de gaz *in vitro*. Cette technique est une simulation de la digestion des aliments dans le rumen. Elle permet d'étudier la stœchiométrie et la cinétique des fermentations ruminales dans un système batch. C'est une méthode rapide, simple, fiable et peu coûteuse, elle permet aussi la prédiction des apports énergétiques liés à la fermentation ruminale. De ce fait, cette technique est préconisée comme un outil fiable pour la prédiction des performances métaboliques des ruminants par la détermination de la digestibilité et de la dégradation des fourrages.

La tendance actuelle à introduire de nouvelles espèces végétales dans l'alimentation des ruminants a élargi le domaine d'application de cette technique, on l'utilise maintenant pour évaluer le potentiel anti-méthanogène de plantes riches en métabolites secondaires dans le but de faire un screening avant de passer aux essais *in vivo*.

Les incubations sont réalisées à une température de 39°C (température du rumen) dans des conditions anaérobies (utilisant une solution réductrice avec du CO₂) avec le liquide ruminal prélevé de 3 animaux donneurs. La solution tampon a pour objectif de maintenir le pH au-dessus de 6, et de fournir les substances nutritives nécessaires pour l'activité microbienne (minéraux, oligoéléments et une source d'azote). À la fin de l'incubation, le pH, la production et la composition des gaz sont mesurés. La production et la composition des AGV, la concentration du NH₃ sont également déterminées. Les protozoaires peuvent éventuellement être comptés.

Les animaux donneurs (de préférence 3 moutons adultes) possèdent une canule au niveau du rumen, et reçoivent un régime généralement semblable aux fourrages testés, dans une quantité constante et limitée correspondant aux exigences de besoins d'entretien des animaux.

Les plantes testées doivent toujours être séchées à moins de 60°C pour empêcher certaines modifications qui peuvent être causées par la chaleur. Ils peuvent également être lyophilisés. Les fourrages sont moulus en particules de 1 mm (si possible). En tous cas, tous les substrats utilisés dans une même expérience doivent avoir la même taille.

Dans les grandes expériences ou quand les résultats seront à comparer avec des résultats obtenus dans d'autres laboratoires, il est suggéré d'inclure dans chaque série un

fourrage contrôle (témoin). Ceci permet de contrôler la reproductibilité des résultats et peut être utilisé comme covariable dans l'analyse statistique au lieu d'un effet de série.

Dans cette partie seront abordées les modalités générales des méthodes expérimentales et des protocoles réalisés, ainsi que les méthodes analytiques utilisées. Cette partie comprend **2 essais** :

L'essai 1 : porte sur l'étude du pouvoir anti-méthanogène de 2 HE extraites à partir de 2 plantes (*Mentha pulegium* et *Juniperus phoenicea*) sur la production de CH₄ chez des moutons, en corrélation avec les paramètres fermentaires (pH, AGV, ammoniac, digestibilité et protozoaires).

L'essai 2 : porte sur l'étude de l'impact de l'apport de TC, via 3 ressources (*Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium* et *Manihot esculenta*), sur la production de CH₄ chez des moutons et de corréler les différences de production de CH₄ *in vitro* à la digestibilité et aux fermentations ruminales.

I/ ESSAI 1: HUILES ESSENTIELLES

I.1/ Matériel végétal

Les HE utilisées dans cette étude ont été extraites à partir de : *Mentha pulegium* et *Juniperus phoenicea*. Elles ont des provenances variées (Constantine pour *Mentha pulegium* et Biskra pour *Juniperus phoenicea*) et leurs parties aériennes ont été collectées au mois de mai 2011. Elles ont été séchées à l'air libre et à l'ombre. Les échantillons destinés à l'extraction des HE ont été coupés en petits morceaux d'environ 1 cm, alors que ceux destinés au reste de l'étude (l'essai *in vitro*) ont été broyés et tamisés à travers un tamis de 1 mm. Les caractéristiques de ces plantes sont décrites ci-dessous :



Figure 11. Les plantes utilisées pour l'extraction des huiles essentielles. 1: *Mentha pulegium*, 2 : *Juniperus phoenicea*

- ❖ *Mentha pulegium* est une plante herbacée de la famille des *Lamiacées* (*Labiées*), vivace par ses rhizomes, basse, de 10 à 55 cm de haut, fréquente dans les milieux humides, qui exhalent une forte odeur aromatique (Figure 11). Les tiges feuillées, quadrangulaires, étalées ou couchées émettent très facilement des racines adventives à la face inférieure des nœuds. Les tiges florifères sont plus ou moins dressées. Les feuilles, opposées, petites, sont ovales presque entières (légèrement dentelées) et munies d'un court pétiole. Très utilisée, c'est une espèce spontanée dans l'ensemble de l'Europe, l'ouest de l'Asie et le nord de l'Afrique. Elle est quelquefois cultivée pour sa richesse en HE qui ont des propriétés médicinales.
- ❖ *Juniperus phoenicea* est un arbrisseau vivace (max 7-8m) de la famille des *Cupressaceae* à feuillage persistant et commun dans les rocailles calcaires en région méditerranéenne (Figure 11). Appelé également genévrier de Phénicie, il se reconnaît à ses feuilles très courtes qui ressemblent à des écailles (plaquées sur la tige), dont il est recouvert. Les cônes sont arrondis, d'environ 1cm, virant du noir (au début) au vert-rougeâtre (en deuxième année). Les rameaux, les feuilles et les fruits du genévrier de Phénicie sont utilisés en médecine traditionnelle et leurs composés chimiques sont incorporés dans des préparations pharmaceutiques d'usage particulièrement antiseptique attribué à la présence d'HE.

1.2/ Analyse chimique des plantes

La composition chimique des plantes a été réalisée selon la méthode AOAC (1990). La MS a été déterminée par dessiccation d'1 g d'échantillon dans une étuve à 103 °C pendant 24 heures. La matière minérale (MM) a été déterminée par incinération d'1 g d'échantillon dans un four à moufle à 550°C pendant 5 heures.

1.3/ Extraction des huiles essentielles

Les HE ont été extraites par hydrodistillation. L'extraction a été faite par un montage d'hydrodistillation (Figure 12), elle a été réalisée par ébullition pendant 3 heures d'un mélange de 100 g de matériel végétal et 1400 mL d'eau distillée. Les HE obtenues ont été conservées à 4°C dans des tubes bien fermés, en verre ombré. Le rendement en HE a été exprimé en pourcentage par rapport à la MS.



Figure 12. Montage d'hydrodistillation utilisé pour l'extraction des huiles essentielles

I.4/ Matériel animal

Les animaux donneurs étaient 3 moutons adultes (Texel) possédant une canule au niveau du rumen, et recevant un régime à base de foin en quantité constante et limitée correspondant aux exigences de l'entretien.

I.5/ Fermentation *in vitro*

I.5.1/ Préparation et inoculation

La veille de la manipulation, 400 mg de foin moulu ont été introduits dans des flacons de 100 mL. La teneur en MS doit préalablement être déterminée sur un autre échantillon (à peu près 500 mg séchés à 103°C pendant 24 h). Vingt cinq mL de milieu de culture (Annexe

1) ont été ajoutés dans chaque flacon. Ces derniers ont été incubés à 39°C pendant toute la nuit. Le lendemain, environ 500 mL de contenu ruminal ont été récupérés de 3 animaux donneurs avant repas. Au laboratoire, le contenu ruminal a été filtré à travers un polyester (ou Dacron) qui est un tissu de monofilament (250 à 400 µm de maille). L'inoculum a été constitué d'un mélange de 3 parties égales de liquide ruminal issu de chaque animal donneur. Les HE ont été ajoutées aux doses suivantes : 0,85, 1,67, 3,3 et 5 l dmL de contenu ruminal pour *J. phoenicea* et 0,37, 0,75 et 1,5 µL/mL de contenu ruminal pour *M. pulegium*. Chaque flacon a été inoculé avec 15 mL de liquide ruminal sous CO₂ et étanchement scellé. Les flacons ont été incubés sous agitation à 39°C et les blancs ont été immédiatement enlevés après l'addition du liquide ruminal car ils ont servi à l'échantillonnage des paramètres fermentaires.

I.5.2/ Détermination de la production de gaz

Après 24 h d'incubation, le pH a été mesuré. La production de gaz a également été mesurée grâce à la pression atmosphérique en utilisant un capteur de pression absolue. Les échantillons de gaz ont été prélevés avec une seringue et analysés immédiatement. La composition en gaz a été déterminée 2 h après l'échantillonnage par chromatographie liquide à gaz (Micro GC 3000A, Agilent Technologies, Les Ulis, France).

I.5.3/ Détermination des paramètres fermentaires

Après le prélèvement des gaz, 2 mL de contenu de chaque flacon ont été transféré dans des tubes contenant 2 mL d'une solution de conservation methylgreen formalin solution (MFS 1L : 35% formaldéhyde, 0,9 eau distillée, 0,6g vert de méthyl, 8,0g NaCl). Les tubes ont été conservés au noir et à température ambiante pour le comptage ultérieur des protozoaires. Le reste du contenu a été transféré dans des tubes Falcon de 50 mL pré-pesés afin d'être centrifugé à 4000 g pendant 10 minutes. Le surnageant a été utilisé pour le dosage des AGV et du NH₃.

- ❖ **Pour les AGV:** 0,8 mL de surnageant a été ajouté à 0,5 mL de solution déprotéinisante (1g acide crotonique + 5g acide métaphosphorique qsp 250 mL HCl 0,5N) et congelé à -20°C. Les AGV ont été ensuite analysés par chromatographie phase gazeuse en utilisant l'acide crotonique comme standard interne dans un CP 9002

Gas Chromatograph (CP 9002 Chrompack, Middelburg, l'Allemagne (Morgavi et al., 2013).

- ❖ **Pour le NH₃**: 1mL de surnageant a été ajouté à 0,1mL d'H₃PO₄ 5% (v/v) et congelé à -20°C. L'ammoniac ruminal est déterminé par colorimétrie en utilisant la méthode automatisée de d'hypochlorite de phénol de Weatherburn (1967) (Annexe 2).
- ❖ **Pour la digestibilité apparente** : les culots de la centrifugation ont été séchés à 103°C pendant 24 h. Cette dernière a été déduite par soustraction de la MS introduite.
- ❖ **Pour les protozoaires**: ils ont été comptés selon Ogimoto and Imai (1981) (Annexe 3).

I.6/ Analyse statistique

Une analyse de la variance a inclus les effets de l'espèce végétale, la dose du mélange contrôle/HE et la série. Le modèle Mixte de SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) a été utilisé. On a considéré l'espèce et la dose comme des effets fixes, la série comme effet aléatoire. Le modèle est $Y = \mu + \text{Espèce}_i + \text{Dose}_j + \text{Espèce} \times \text{Dose}_{ij} + \text{Séries}_k + e$

Où Y est la variable dépendante, μ la moyenne globale et e l'erreur. Les différences statistiques ont été significatives à $P = 0,05$.

II/ ESSAI 2: TANINS CONDENSES

II.1/ Matériel végétal

Les TC ont été apportés par l'intermédiaire de feuilles de trois plantes riches en tanins: *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium* et *Manihot esculenta*. Ces plantes ont été introduites à différentes proportions. Les caractéristiques de ces plantes sont décrites ci-dessous :

- ❖ *Leucaena leucocephala* est un petit arbre de la famille *Fabaceae*, originaire du Mexique, l'espèce a été introduite dans de nombreuses régions comme plante fourragère ainsi que pour ses qualités fixatrices d'azote et d'amélioration de la composition du sol. Aujourd'hui *L. leucocephala* est une espèce devenue pantropicale, souvent naturalisée, elle est reconnue dans plus de 20 pays sur tous les continents hors Europe et Antarctique. C'est un arbuste au port étalé pouvant atteindre environ 4 mètres de hauteur (Figure 13). Il supporte tout type de sol, apprécie le soleil et est parfaitement adapté à la sécheresse. Son écorce est lisse, brun grisâtre, avec de nombreuses petites taches. Les jeunes tiges vertes sont en général densément couvertes de poils de couleur grisâtre. Le feuillage est persistant, de couleur vert. Les feuilles sont alternes pétiolées et bipennées. Elles sont composées de paires de folioles (5-10) ayant une quinzaine de paires de foliolules linéaires. Cet arbuste est utilisé à des fins diverses, telles que le bois de chauffage ou de clôture, et ses feuilles pour l'alimentation du bétail.

- ❖ *Gliricidia sepium* est un arbre de taille moyenne de la famille des *Fabaceae*, originaire d'Amérique du Sud et d'Amérique centrale. Cet arbre a été introduit dans de nombreuses zones du monde pour faire des haies, produire du fourrage ou de l'ombrage aux cultures. Cet arbre pouvant atteindre 10-15 m de hauteur possède de jeunes rameaux pubescents et une écorce lisse, grise à rouge brun (Figure 13). Les longues feuilles imparipennées, caduques, sont composées de 3-7 paires de folioles, elliptiques ou lancéolées. Cet arbre pousse rapidement (jusqu'à 3 m la première année) et se multiplie facilement par bouturage ou par semis des graines. Il peut être régulièrement taillé pour fournir du bois de chauffage ou de l'engrais vert. A la saison sèche, les éleveurs peuvent couper les branches pour donner à manger à leur bétail.

❖ *Manihot esculenta* est un arbuste vivace de la famille des *Euphorbiacées*, originaire d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud. Il est aujourd'hui largement cultivé et récolté en Afrique et en Asie pour ses racines tubérisées qui entrent pour une grande part dans l'alimentation quotidienne de nombreuses populations. C'est une plante riche en amidon. Elle est consommée soit directement sous forme de " manioc vert ", soit sous forme de farine. Les tubercules ont de 20 à 80 cm de long et de 5 à 15 cm de diamètre se situent à quelques centimètres de la surface du sol. Les feuilles sont caduques, car elles tombent durant la phase de repos du manioc, et sont alternes et palmilobées: 3 à 11 lobes (Figure 13). Elles mesurent de 10 à 20 cm de long et sont portées par un pétiole qui peut être réduit à quelques millimètres ou qui peut atteindre 6 cm de long, et dont la couleur va du jaune clair au rouge en passant par le vert.



Figure. 13. Plantes riches en tanins condensés

1 : *Leucaena leucocephala*, 2: *Gliricidia sepium*, 3 : *Manihot esculenta*

II.2/ Matériel animal

Les animaux donneurs étaient 3 moutons Texel adultes recevant 900 g de foin quotidiennement. Il s'agissait d'une prairie permanente à base de *Dichanthium* spp. récolté en

octobre 2011 à 36 jours de repousse. Les moutons ont reçu ce foin 2 semaines avant les prélèvements.

II.3/ Analyse chimique des plantes

Les plantes testées provenaient de sols ferrallitiques sans fertilisation. *L. leucocephala* et *G. sepium* provenaient de terres agricoles et étaient âgées de 9-12 mois. Les feuilles de *M. esculenta* ont été collectées d'une vieille plantation de 12 mois. Les branches les plus jeunes (pétioles et feuilles) de moins de 6 mois de *L. leucocephala*, de *G. sepium* et de *M. esculenta* ont été récoltées et séchées au soleil pendant 2 jours. Par la suite, elles ont été broyées et tamisées à travers un tamis de 1 mm

La matière organique a été déterminée par incinération des échantillons à 550°C pendant 6 h (AOAC Méthode *923.03) et les protéines brutes ont été déterminées par la méthode de Dumas (CP, $N \times 6,25$; AOAC la Méthode #992.15). La fraction pariétale (NDF et ADF) a été déterminée en excluant les cendres résiduelles (AOAC des Méthodes #200.04 et 973.18).

II.4/ Dosage des tanins condensés

Les TC ont été extraits par ultra-sons dans l'acétone aqueuse 70% (vol/vol) et isolés avec du Sephadex LH-20 (Giner-Chavez et al., 1997). Les TC ont été déterminés avec la méthode à la vanilline- H_2SO_4 de Laurent et al. (1975) (Annexe 4). La concentration des TC a été exprimée par 2 standards:

- ❖ Un extrait de tanins commercial (quebracho) dans le but de classer les plantes en fonction de leur concentration en TC.
- ❖ Les TC extraits de chaque plante pour une meilleure exactitude de la détermination de la concentration. Ainsi, une courbe étalon individuelle a été préparée pour chacune des 3 plantes et la concentration des TC a été estimée en utilisant les TC internes comme standard (Annexe 4).

II.5/ Fermentation *in vitro*

II.5.1/ Préparation et inoculation

La veille de la manipulation, 400 mg de substrat moulu ont été introduits dans des flacons de 100 mL. Ce substrat est un mélange de foin (contrôle) et de *L. leucocephala*, *G.*

sepium et *M. esculenta* à différents ratio: 0, 25:75, 50:50, 75:25, 100. La teneur en MS doit préalablement être déterminée sur un autre échantillon (à peu près 500 mg séchés à 103°C pendant 24 h). Vingt cinq mL de milieu de culture (Annexe 1) ont été ajoutés dans chaque flacon. Ces derniers ont été incubés à 39°C pendant toute la nuit. Le lendemain, environ 500 mL de contenu ruminal ont été récupérés de 3 animaux donneurs avant repas. Au laboratoire, le contenu ruminal a été filtré à travers un polyester (ou Dacron) qui est un tissu de monofilament (250 à 400 µm de maille). L'inoculum était constitué d'un mélange de 3 parties égales de liquide ruminal issu de chaque animal donneur. Chaque flacon a été inoculé avec 15 mL de liquide ruminal sous CO₂ et étanchement scellé. Les flacons ont été incubés sous agitation à 39°C et les blancs ont été immédiatement enlevés après l'addition du liquide ruminal car ils ont servi à l'échantillonnage des paramètres fermentaires.

II-5.2/ Détermination de la production de gaz

La production de gaz a été exactement mesurée de la même manière que l'essai 1.

II.5.3/ Détermination des paramètres fermentaires

Tous les paramètres fermentaires à savoir : AGV et NH₃ ont été déterminés selon les méthodes décrites plus haut pour l'essai 1.

- ❖ **Pour la matière organique fermentescible (MOF) :** elle a été calculée à partir de la production des AGV selon l'équation stœchiométrique. $MOF (\%) = 162 (0,5 \text{ acétate} + 0,5 \text{ propionate} + \text{butyrate} + \text{valérate}) \times 40 / MO \text{ introduite dans le fermenteur}$, où les AGV ont été exprimés en mole et 40 correspond au volume (mL) du liquide dans le fermenteur.

II.6/ Analyse statistique

Une analyse de la variance a inclus les effets de l'espèce végétale, la dose de tanins (0, 25, 50, 75 ou 100 % du mélange foin de contrôle et l'espèce végétale) et la série. Le modèle Mixte de SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) a été utilisé. On a considéré l'espèce et la dose comme des effets fixes, la série comme effet aléatoire. Le modèle était $Y = \mu + \text{Espèce}_i + \text{Dose}_j + \text{Espèce} \times \text{Dose}_{ij} + \text{Séries}_k + e$

Où Y est la variable dépendante, μ la moyenne globale et e l'erreur. Les différences statistiques étaient significatives à $P = 0,05$. Des contrastes linéaire, quadratique et cubique ont

été calculés pour caractériser la courbe dose-réponse. Quand l'interaction dose x espèce était significative, les contrastes ont été déterminés pour chaque espèce en utilisant le modèle : $Y = \mu + \text{Dose}_j + \text{Séries}_k + e$.

DEUXIEME PARTIE EXPERIMENTALE: FERMENTATIONS *IN VIVO*

Avant propos

Les plantes riches en TC ayant donné de bons résultats dans la réduction de la production de CH₄ *in vitro* sans effets délétères sur le processus de fermentation, en général mieux que les HE. Elles ont été testées *in vivo* pour cerner de plus près leur potentiel anti-méthanogène chez l'animal avec des mesures réelles et directes de CH₄ sur l'animal. Afin d'envisager l'utilisation des plantes riches en TC dans la formulation des régimes alimentaires à grande échelle et pour une éventuelle standardisation de l'application des TC dans la réduction du CH₄, deux génotypes d'animaux ont été étudiés. Contenu des effets négatifs des TC sur l'appétence, les additifs ont été ajoutés sous forme, de **pellets**. De ce fait, notre approche expérimentale a consisté à:

- 1/ Granuler les 3 plantes riches en TC, utilisées pour la précédente étude *in vitro* (*L. leucocephala*, *G. sepium* et *M. esculenta*). La solution pellet a été privilégiée car plus pratique (gestion de l'essai, produit de composition identique) et a été valorisée comme une «**innovation**». Elle permet également de **contourner l'astringence des TC**.**
- 2/ Etudier l'effet de l'incorporation de ces plantes granulées (environ 50% du régime alimentaire) chez 2 génotypes d'ovins afin de déterminer leur effet sur l'émission de CH₄ *in vivo*.**
- 3/ Etudier le devenir de ces TC chez les animaux, par la mesure des paramètres de digestibilité, fermentaires et microbiens.**

I.1/ Animaux et logement.

Le modèle animal utilisé pour cette étude est le mouton. Quatre moutons Texel et 4 moutons Blackbelly ont été utilisés pour les mesures (Figure 14). Les moutons, âgés de 1 à 2 ans, pesaient en moyenne 45 kg. Les moutons mâles non castrés étaient pourvus de canules ruminales. Les moutons avaient séjournés dans des cages au sol pendant les périodes d'adaptation et en cages à digestibilité pendant les périodes de mesure.



Texel



Blackbelly

Figure 14. Génotypes utilisés dans l'expérience *in vivo*

I.2/ Aliments

L'essai a porté sur l'étude d'un foin (*Dichanthium* spp.) et de 3 suppléments qui comprenaient :

- ❖ Les feuilles de *L. leucocephala*
- ❖ Les feuilles de *G. sepium*
- ❖ Les feuilles de *M. esculenta*

Les feuilles et pétioles ont été isolés de la tige et moulus à 3 mm pour être ensuite granulés (GR150E, Oliotechnology). La taille moyenne des pellets était 12 mm de long et 3 mm de diamètre. Avant qu'il ne soit donné aux animaux, le foin a été grossièrement coupé, en particules dont la longueur approximative était de 20-50 mm

Tous ces suppléments ont déjà été testés, et ont été bien appréciés quand ils ont été distribués verts ou fanés.

Dans un essai préalable il a été étudié la possibilité de transformer les feuillages riches en tanins en granulé et vérifier que les TC n'ont pas été détruits. L'objectif est que les suppléments représentent une part importante de la ration pour mettre en évidence l'effet des

tanins.

I.3/ Plan expérimental.

Le schéma expérimental était un double carré latin 4x4. Ce dernier évite de répéter une même succession de rations. L'adaptation au régime était de 3 semaines lors de la première période et de 2 pour les périodes suivantes. Chaque période a duré 4 semaines dont 13 jours d'adaptation et 9 jours de mesures.

I.4/ Mode d'alimentation.

A part le témoin composé de 100% de foin, les 3 autres rations ont été composées de 56% de foin et 44% de supplément. Cinq cent grammes de pellets ont été offerts aux animaux lors du repas du matin. Quand les pellets ont été consommés, les moutons ont reçu le foin à volonté. Il n'y a pas de complément azoté. Les fourrages ont été distribués 2 fois par jour, en quantités égales, à 7 h et 19 h. Les animaux ont été abreuvés *ad libitum* et avaient une pierre à sel à disposition.

I.5/ Mesures et prélèvements en cours d'expérimentation

Les quantités distribuées et refusées ont été pesées chaque jour. La teneur en MS du foin a été réalisée au début de l'expérimentation puis tous les jours de mesure et pour chaque période expérimentale.

- ❖ **Les mesures de digestibilité et de bilan azoté** : elles ont été réalisées en semaine 3 de chaque période expérimentale sur 5 jours de collecte.
- ❖ **Récolte des Fèces** : 10% de la récolte de fèces ont été transférés dans des sachets de 5 kg maintenus hermétiquement au congélateur (1 sachet/animal/période), puis lyophilisés pour analyse de l'azote. Dix pourcent de la récolte de fèces ont été séchés à poids constant dans une étuve ventilée, puis conservés à température ambiante (1 bidon/animal/période) pour analyses de la MO et des parois.
- ❖ **Récolte d'urines** : un échantillon de 2,5% de la récolte d'urine a été dilué au $\frac{1}{4}$ avec de l'eau (1 vol urine + 3 vol eau), transféré dans un bidon de 30 L et gardé à +4°C pour l'analyse de l'azote total.

Les dosages de l'azote et des fractions pariétales ont été réalisés selon les méthodes de Dumas et Van Soest, respectivement (Annexe 5, 6).

I.6/ Méthane

Pour la mesure des émissions de CH₄, la méthode de l'hexafluorure de soufre (SF₆) a été utilisée. Cette technique mise au point par Johnson et Huyler (1994) permet de quantifier *in vivo* le CH₄ produit par les ruminants. Elle repose sur le principe de dilution d'un gaz traceur inerte introduit dans le rumen, capable de se mélanger aux autres gaz issus des fermentations (CH₄, CO₂...). Ce gaz traceur, SF₆, est introduit dans le rumen à l'aide d'une capsule perméable, dont la vitesse de diffusion est préalablement déterminée *in vitro*.

La collecte des gaz est réalisée grâce à un système d'aspiration fixé sur un licol adapté à la tête de l'animal, et relié à une boîte dans laquelle l'échantillon gazeux vient s'accumuler (Figure 15).

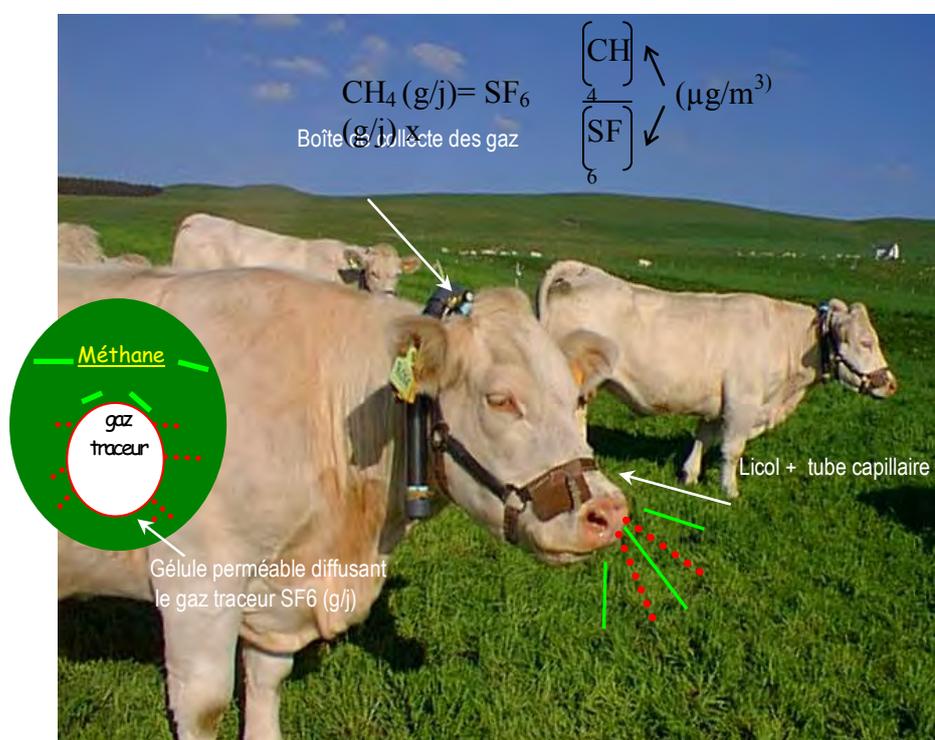


Figure 15. Bovin équipé du dispositif de collecte des gaz

Les concentrations en SF₆ et CH₄ de cet échantillon ont été ensuite déterminées par analyses chromatographiques. A partir de ces concentrations, et connaissant la vitesse de diffusion du SF₆ de la capsule, on en déduit la vitesse de production du CH₄.

Le principe de fabrication consiste à introduire une quantité précise de gaz SF₆ dans une capsule en laiton et d'en mesurer la vitesse de diffusion (flux de SF₆ en ng/j) à travers une membrane en téflon, dont l'épaisseur conditionne la vitesse de sortie du gaz (Figure 16).

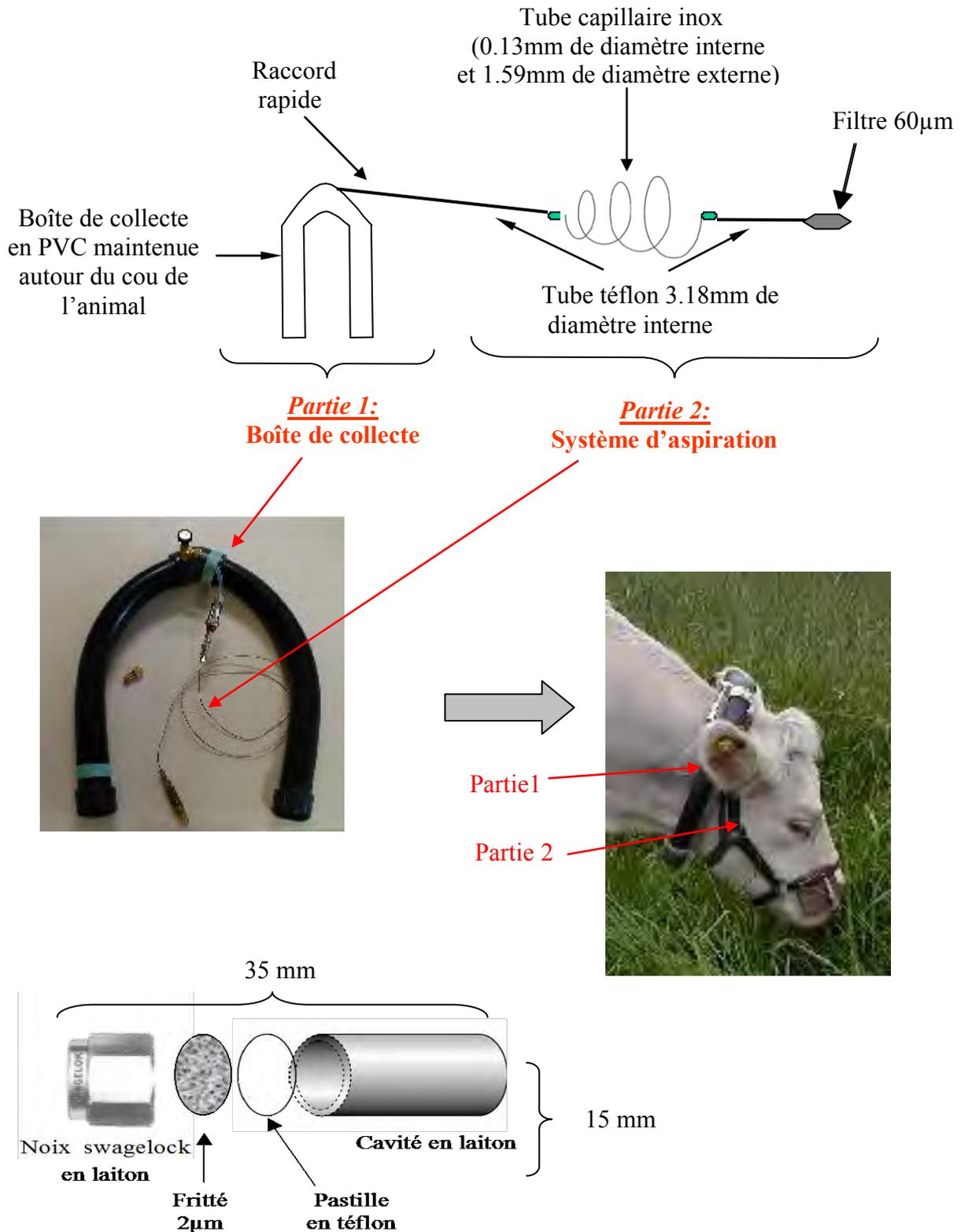


Figure 16. Les différents composants du système de collecte des gaz

❖ **Remplissage:** l'introduction du gaz SF₆ a été réalisée par immersion du corps de la capsule dans un bain d'azote liquide. Lorsque la capsule a atteint une température cryogénique maximale (-196°C), elle a été retirée du bain d'azote liquide puis remplie à l'aide de seringues contenant du gaz SF₆ pur. Au contact du froid interne de la capsule, le gaz se solidifie ce qui permet de visualiser son niveau de remplissage. Après fermeture, la capsule a été disposée dans un erlenmeyer balayé par un flux d'azote gazeux et maintenue à la température d'utilisation future (ex : 39°C pour le milieu ruminal).

❖ **Calibration:** l'estimation de la vitesse de diffusion du gaz SF₆ est primordiale pour le calcul de la production de CH₄. La détermination de la vitesse de diffusion du gaz à travers la membrane s'effectue par gravimétrie (précision au 1/100ème de mg) (Annexe 7). Six à huit semaines de pesées sont généralement nécessaires pour obtenir une valeur de diffusion du gaz correcte et stable (variation < 8%). D'autre part, on estime la durée de vie de la capsule à partir de sa vitesse de diffusion et de la quantité de gaz présente.

❖ **Adaptation au licol et distribution du gaz traceur**

Le gaz traceur, (SF₆), a été donné à l'animal deux semaines avant le début des mesures de façon à ce que la diffusion du gaz dans le rumen soit stabilisée au moment des premières mesures de production de gaz. Les bolus SF₆ (capsule) sont déjà présents dans le rumen. Cette capsule est perméable au SF₆ qui se diffuse en continu et à vitesse constante dans le rumen. La vitesse de diffusion du SF₆ a été préalablement déterminée *in vitro*. Les capsules fabriquées de telle sorte que leur durée de vie couvre la durée totale de l'expérience (> 3 mois). Au début de l'expérience, on a équipé l'animal d'un licol pour qu'il s'habitue à ce dernier. A la fin de l'essai, la totalité des capsules ont été récupérées. Un licol équipé d'un capillaire a été placé sur l'animal au début de l'essai. Ce capillaire, positionné près des naseaux, a été relié lors des mesures à une boîte de collecte des gaz, placée en hauteur sur la partie métallique de la mangeoire. Dans cette boîte a été recueilli un échantillon représentatif des gaz du rumen (éructation) et des poumons (expiration).

❖ **Prélèvements de gaz**

Ils ont été réalisés pendant 5 jours consécutifs. Le changement de boîtes se faisait

avant le repas du matin. Chaque jour une boîte a été installée pour prélèvement de l'air ambiant. Les boîtes ont été acheminées immédiatement au laboratoire pour analyser les différents gaz nécessaires à l'estimation de la production de CH₄ :

$$QCH_4 \text{ (g/j)} = \boxed{\text{vitesse diffusion SF6} \times ([CH_4]/[SF6])}$$

I.7/ Fermentations ruminales et écosystème microbien

Un échantillon d'environ 150 mL de contenu ruminal a immédiatement été prélevé à travers la canule, à l'aide d'une canne avant le repas, puis 3 h après le repas.

I.7.1/ Paramètres fermentaires et protozoaires

Environ 75 mL ont été filtrés à travers des mailles de 250 µm pour récupérer la phase liquide dans un flacon de 100 mL. Le pH a été mesuré le plus rapidement possible. La phase liquide a servi à l'échantillonnage des AGV, du NH₃ et des protozoaires selon les méthodes décrites dans la première partie pour les essais *in vitro*.

I.7.2/ Paramètres microbiens et biologie moléculaire

Un premier échantillon de contenu ruminal d'environ 30 g a été prélevé, auquel 15 mL de PBS (7,65 g de NaCl, 0,724 g de Na₂PO₄ et 0,210 g de NaPO₄, qsp 1L d'eau distillée) autoclavé ont été rajoutés. L'ensemble a été homogénéisé au Polytron 3 x 1 min, séparé par 1 min de repos dans la glace. Sur cet échantillon on a prélevé :

- ❖ Un sous-échantillon pour l'extraction d'ADN : 2 échantillons de 1,5 mL de contenu ont été prélevés. Ils ont immédiatement été conservés dans la glace, puis transférés à -80°C.
- ❖ Un second échantillon de 5 g de contenu a été déposé dans une microplaque 6 puits, conservé dans la glace, puis transféré dès que possible à -20°C avant lyophilisation. Les échantillons lyophilisés ont servi de réserve. Le reste du contenu a servi à la réalisation d'une MS à 103°C pendant 24 h. Les prélèvements ont été traités aussi rapidement que possible.

I.8/Analyses microbiologiques

La stratégie qui a été adoptée pour cette étude reposait sur l'utilisation d'outils de biologie moléculaire (Polymerase Chain Reaction, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) pour aborder la structure des communautés associées à l'écosystème ruminal et leur relation avec la méthanogénèse.

I.8.I/Choix du bon marqueur

Dans toutes les études phylogénétiques ou d'identification microbienne, il faudra disposer d'un gène marqueur qui est présent dans toutes les populations et qui possède des régions conservées et variables.

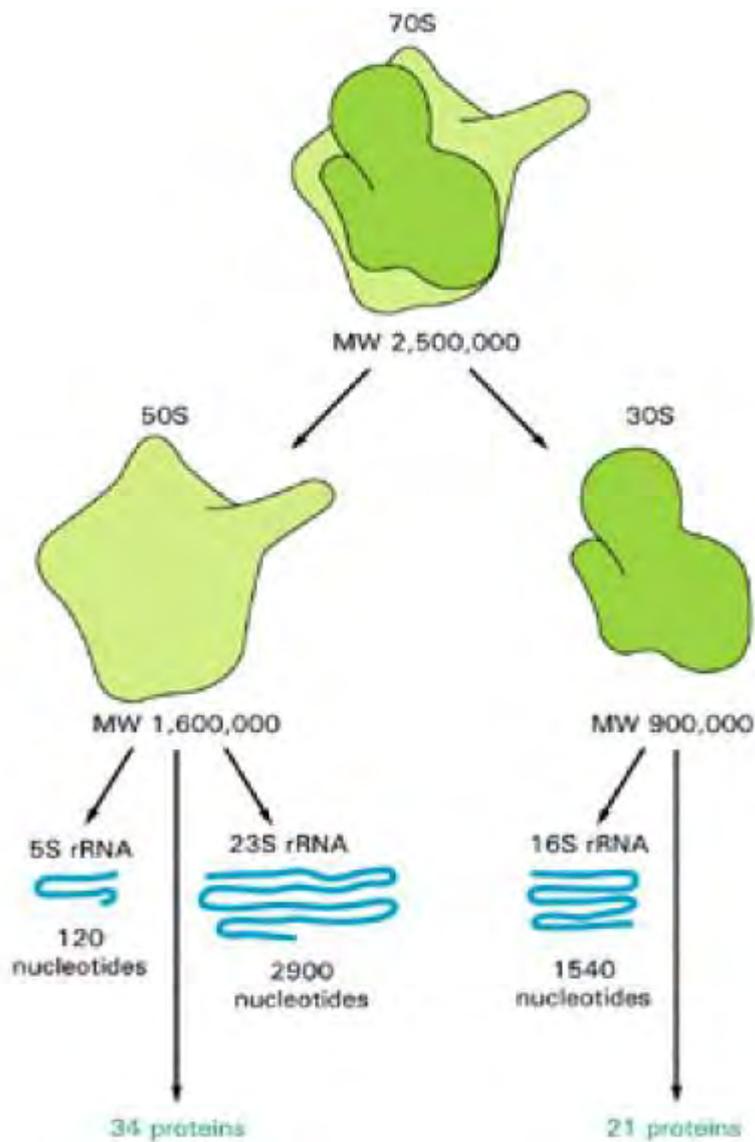


Figure 17. Constituant en ARN d'un ribosome procaryote

a. Bactéries totales

L'ARN 16S est un constituant de la petite sous-unité ribosomique (Figure17). De ce fait, la survie de la cellule dépend de sa conformation. Or sa conformation dépend de sa séquence et par conséquent la séquence du gène de l'ADNr 16S est indispensable à la survie de la cellule. Il existe donc des zones conservées du gène qui sont indispensables à la structure tertiaire de l'ARNr. Ces régions conservées sont au nombre de 10 et sont représentées en bleu sur la figure 18. De ces régions peuvent être extraits des amorces ou sondes dites « universelles ». Entre ces régions conservées existent des régions dites « hypervariables » dont la séquence n'est pas « indispensable » à la conformation ribosomique. Ces régions hypervariables sont nommées séquences signatures (espèce, genre, famille) et sont au nombre de neuf et sont représentées et annotées de V1 à V9 sur la figure 18.

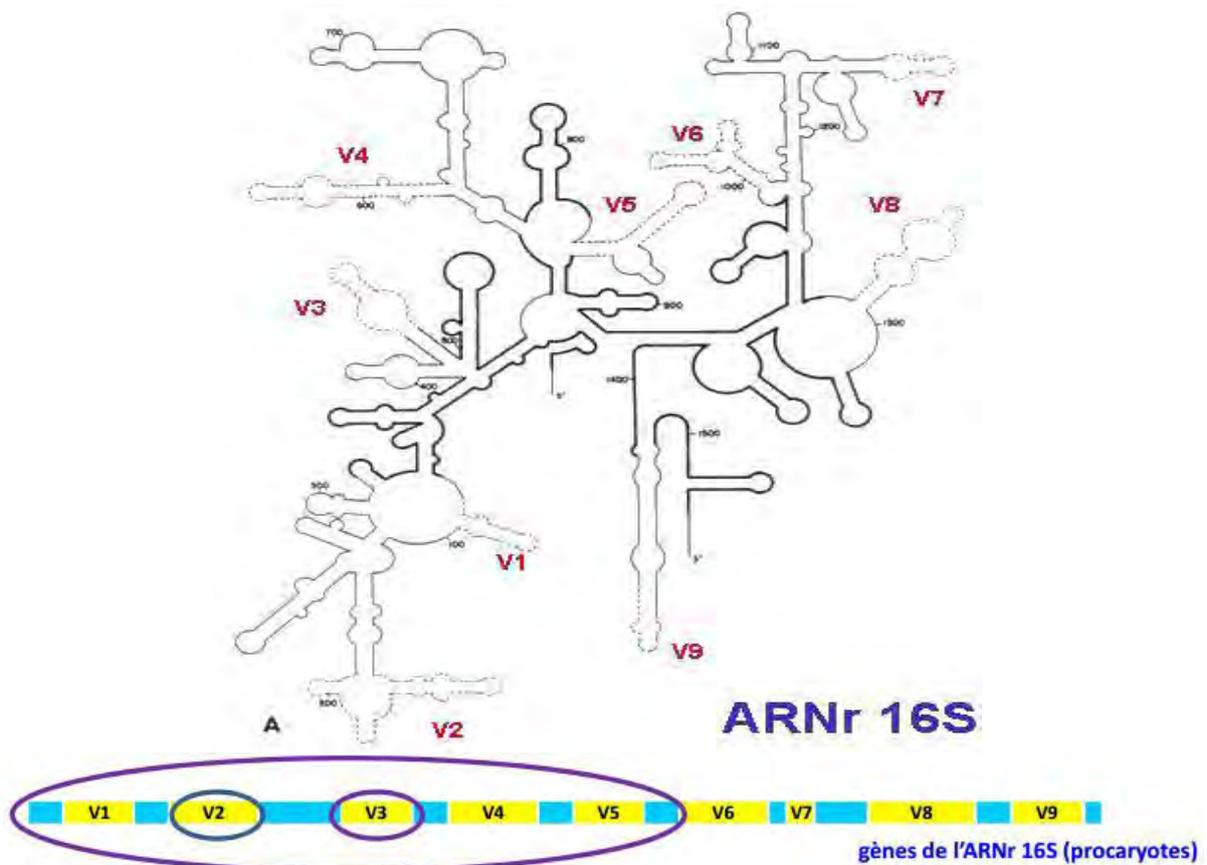


Figure 18. Schéma illustrant l'ARNr 16S

Régions V « variables » en pointillés permettant de cibler un groupe phylogénétique,
 Régions en trait noir épais continu « hypervariables » permettant de cibler une espèce bactérienne,

Les régions restantes sont des régions conservées.

Pour le schéma simplifié : les régions bleues sont les régions conservées et les régions jaunes sont les régions variables.

Ces régions hypervariables offrent des possibilités d'amorçages spécifiques d'un taxon donné ou, couplé avec deux régions conservées et une amplification, permettent une identification phylogénétique de la bactérie. L'ensemble de ces régions et la taille relativement restreinte du gène de l'ARNr 16S (1541 bases chez *E. coli*) assurent de nombreuses possibilités de travail en microbiologie. Le choix de l'ARN 16S plutôt que 23S ou 5S est d'ordre technique (taille du gène, nombre d'informations) et, surtout, les banques de données de séquences du gène 16S sont aujourd'hui très développées. Enfin, l'identification est fiable : les résultats obtenus par séquençage du gène 16S sont similaires à ceux obtenus avec le génome entier. Cependant, l'utilisation de l'ADNr 16S présente certains inconvénients. En effet, au sein d'une même espèce bactérienne, il peut y avoir plusieurs copies de cet ADN. Ces copies peuvent être hétérogènes entre elles (Klappenbach et al., 2001; Shimizu et al., 2001), compliquant ainsi l'analyse de la diversité dans des banques de clones ou des profils de fingerprint. Il a également été montré, que dans certains cas, les séquences d'ADNr 16S n'étaient pas assez divergentes, pour permettre la distinction d'espèces bactériennes proches, appartenant au même genre (Normand et al., 1996; Qi et al., 2001).

b. Archées méthanogènes

Comme pour les bactéries, l'identification des archées méthanogènes est basée sur l'étude de l'ADNr 16S. Dans le cas particulier des archées méthanogènes du rumen, un autre marqueur peut être utilisé, il s'agit d'un **gène marqueur fonctionnel spécifique** qui code pour la **méthyl-coenzyme M réductase (MCR)**, une enzyme clé du processus catalysant la dernière étape de la méthanogenèse, (Figure 19). Cette enzyme possède trois sous-unités codées par les gènes *mcrA*, *mcrB* et *mcrG*. Ces trois gènes sont situés dans l'opéron *mcrBDCGA*. L'enzyme MCR semble être unique et présente chez tous les archées méthanogènes (Thauer, 1998). En raison des contraintes fonctionnelles, la sous-unité catalytique α de la MCR, codée par le gène *mcrA*, possède des domaines très conservés, et détectés chez toutes les archées méthanogènes. Ainsi, les gènes *mcrA* sont hautement conservés ce qui en fait de bons candidats comme marqueurs moléculaires pour des études en écologie microbienne. Le gène *mcrA* qui code pour la MCR semble donc être un marqueur spécifique approprié pour l'identification phylogénétique des archées méthanogènes dans des échantillons d'écosystèmes digestifs.

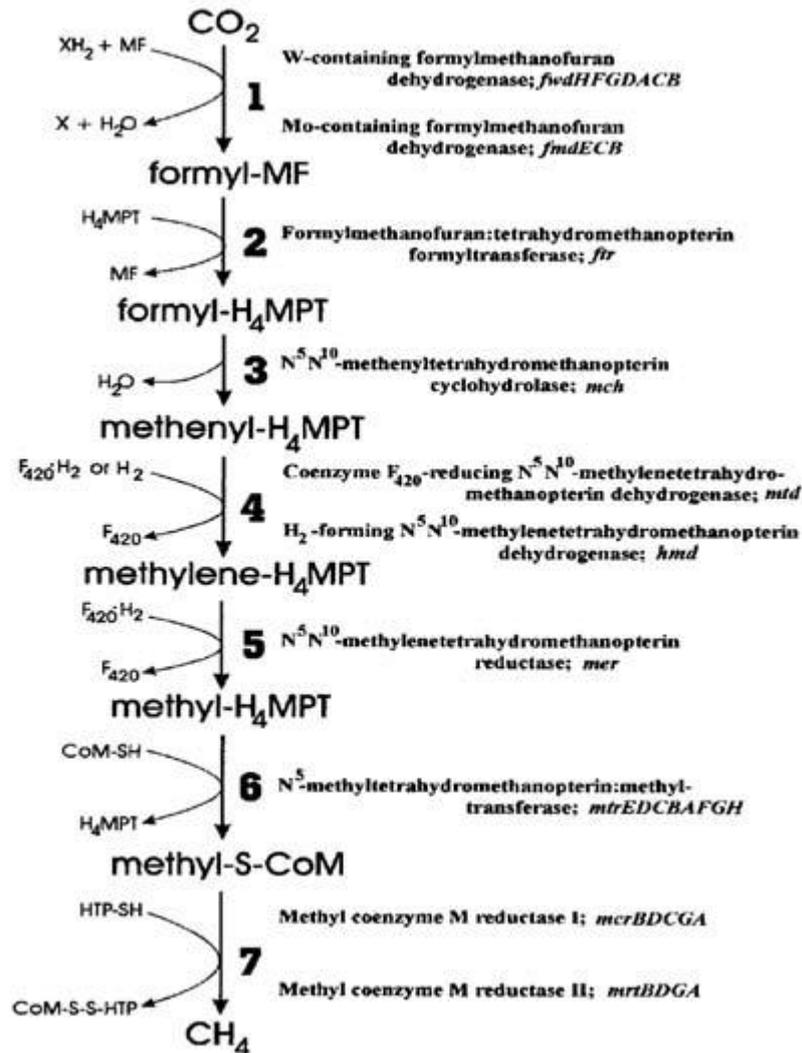


Figure 19. Voie de laméthanogène basée sur la réduction de CO₂ dépendant du H₂ (Reeve et al., 1997)

I.8.2/Extraction de l'ADN bactérien

Les échantillons de contenu ruminal ont été soumis à une extraction d'ADN bactérien selon la méthode de Yu et Morisson (2004) en employant le QIAamp DNA Stool mini kit (Qiagen, Valencia, Californie, EUA), selon les instructions du fabricant. Néanmoins, afin de perfectionner la lyse bactérienne, une étape initiale a été ajoutée où les échantillons ont été traités avec une solution tampon de Tris (0,1 mM, pH 8) et d'acétate d'ammonium (10M). Les extraits d'ADN ont été finalement vérifiés, le ratio d'absorbance A260 : A280 a été mesuré avec un NanoQuant Plate dans un spectrophotomètre (Infinity; Tecan, Männedorf, Switzerland). Ils ont été congelés à -20°C dans l'attente de leur futur usage.

Tableau 11. Les oligonucléotides utilisées comme amorces pour la PCR-DGGE et la qPCR

| Oligonucléotides | Séquences d'oligonucléotide | Cible | Taille d'amplicon (bp) | Utilisées en | Références des amorces | Condition PCR références |
|------------------------------------|--|-------------------------|------------------------|--------------|------------------------|--------------------------|
| 534R – 341f-GC | 5_-ATT ACC GCG GCT GCT GG 5_-(GC)-CC TAC GGG AGG CAG CAG | <i>rrs</i> Bacteria | 193 | PCR-DGGE | Muyzer et al. (1993) | Sadet et al, 2007 |
| <i>mcrA</i> r <i>mcrA</i> f-GC | 5_-TTC ATT GCR TAG TTW GGR TAG TT 5_-(GC)-GGT GGT GTM GGA TTC ACA CAR TAY GCW ACA GC | <i>mcrA</i> Methanogens | 460–490 | PCR-DGGE | Luton et al. (2002) | Popova et al., 2011 |
| <i>qmcrA</i> -R <i>qmcrA</i> -F | 5_-GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC 5_-TTCGGTGGATCDCARAGRGC | <i>mcrA</i> Methanogens | 140 | qPCR | Denman et al. (2007) | Popova et al., 2011 |
| 799R2 | 5_-AACAGGATTAGATACCCTG | <i>rrs</i> Bacteria | 280 | qPCR | Edwards et al. (2007) | Popova et al., 2011 |

I.8.3/Amplification de l'ADN

Les extraits d'ADN ont été soumis à une PCR ciblant le gène de l'ADNr 16S bactérien (la région V3) pour les bactéries totales et le gène *mcrA* pour les archées méthanogènes. Les PCR ont été réalisées avec les amorces et selon les conditions décrites dans le tableau 11.

Pour l'ADNr 16S, l'amorce sens possède une queue GC à son extrémité 5' (Muyzer et al., 1993). Le mix PCR (50 µL) contenait 1× de tampon PCR, 200 µmol/L de dNTP, 0,25 µmol/L de chaque amorce et 2,5 Unités de HotStartTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany). Les amplifications ont été exécutés dans un thermocycler programmable MyCycler (Bio-Rad, USA). Le programme PCR était le suivant: une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 min, suivit de 10 cycles « touchdown » à 94°C pendant 30 s, 61°C (-0,5°C/cycle) pendant 30 s, et 72°C pendant 1 min; 25 cycles à 94°C pendant 30 s, 56°C pendant 30 s, et 72°C pendant 1 min; et une étape d'élongation finale à 72°C pendant 30 min afin d'éliminer les potentiels artefacts dus aux doubles bandes (Janse et al., 2004).

Pour *mcrA*, l'amorce sens possède une queue GC à son extrémité 5' (Muyzer et al., 1993). Le mix PCR (50 µL) contenait 1× de tampon PCR, 200 µmol/L de dNTP, 0,25 µmol/L de chaque amorce, 2,5 Unités de HotStartTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) et 4,5 mM de MgCl₂. Les amplifications ont été exécutés dans un thermocycler programmable MyCycler (Bio-Rad, USA). Le programme PCR était le suivant: une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 min; suivit de 5 cycles « touchdown » à 94°C pendant 30 s, 55°C (-0,5°C/cycle) pendant 30 s, et 72°C pendant 1 min; 35 cycles à 94°C pendant 1 min, 55°C pendant 1 min, et 72°C pendant 1 min; et une étape d'élongation finale à 72°C pendant 30 min afin d'éliminer les potentiels artefacts dus aux doubles bandes (Janse et al., 2004)

Tous les produits PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% contenant du bromure d'éthidium, afin de contrôler leur taille et d'estimer leur concentration, en utilisant le marqueur de taille Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA). La migration a été réalisée dans le tampon TAE 1 x (40mmol/L Tris base, 40 mmol/L acide acétique glacial, 1 mmol/L EDTA; pH8) pendant 30 min à 100 V.

I.8.4/ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

L'électrophorèse en gradient de gel dénaturant fait partie des technique d'empreinte moléculaire et a pour objectif l'évaluation de la diversité dans une communauté complexe de microorganismes sur la base de leur génotype. Cette technique repose en premier lieu sur une réaction PCR qui permet d'amplifier une région cible du génome. A l'échelle d'une

communauté contenant un assemblage de microorganismes procaryotes, la spécificité de l'amplification par PCR permet ainsi d'évaluer la diversité génétique sur des critères taxonomiques ou fonctionnels. Parmi les objectifs de cette thèse, l'identification des acteurs microbiens liés à la production de CH₄, dont principalement les archées méthanogènes porteurs du gène *mcrA* et les bactéries totales pour avoir une vision d'ensemble de la structure des communautés bactériennes.

a. Principe

Le principe de séparation de fragments d'acides nucléiques sur un gel d'électrophorèse avec un gradient dénaturant est basé sur une perte différentielle de leurs vitesses de migration dépendante de leur **température de fusion (Tm)** (Figure 20). En effet, la dénaturation progressive des fragments au fur et à mesure de leur progression dans le gel entraîne une nouvelle conformation ouverte des molécules qui ralentit leur migration. Cette dénaturation dépend des **Tm** des fragments et de leur séquence qui, tous les deux, déterminent leur position dans le gel. Pour favoriser la résolution, l'emploi d'une queue GC, a été proposé par Myers et al. (1985) avec une taille de 300 paires de bases puis par Sheffield et al. (1989) avec cette fois-ci une taille plus faible de 40 paires de bases. Aujourd'hui, c'est cette dernière taille de 40 paires de bases qui est toujours utilisée. Cette queue GC est ajoutée à l'une des amorces pour être ainsi présente sur tous les fragments après amplification. Compte tenu de la composition de cette séquence GC, son **Tm**, très élevé, prévient toutes possibilités de dénaturation complète du fragment amplifié. Il en résulte que la conformation la plus dénaturé d'un fragment amplifié est une sorte de « Y » qui freine considérablement sa progression dans le maillage du gel ; ouvrant alors les « bras » dans le maillage du gel, la vitesse de migration du fragment devient alors quasi-nulle.

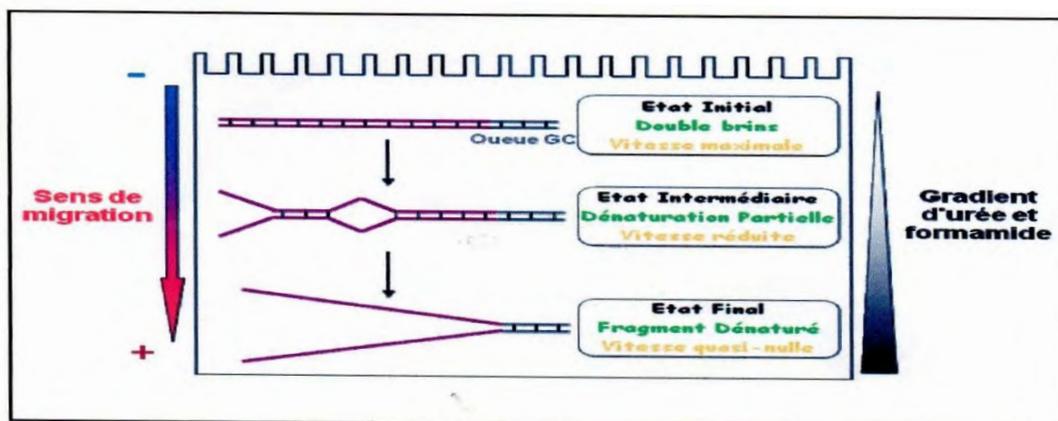


Figure 20. Schéma illustrant le principe de la DGGE

A la fin de la migration, la révélation du gel fait apparaître des bandes horizontales sur chacun des profils (Figure 21). Une bande symbolise en théorie un génotype (une séquence du gène étudié). L'avantage principal de la PCR-DGGE sur d'autres techniques, c'est qu'elle permet d'étudier un grand nombre d'échantillon contrairement au clonage-séquençage qui coûte plus cher. Le fait que les bandes présentes sur le gel peuvent être excisées et séquencées est un autre avantage de cette technique. Par contre, les principales limites de cette technique résident *i/ dans la difficulté de comparer les échantillons de gels différents, ce qui implique de faire de multiples gels, avec de multiples combinaisons ; ii/ des fragments d'ADN, avec des séquences différentes peuvent migrer ensemble, ce qui limite la sensibilité de la méthode* (van Elsas et al., 1997; Ranjard et al., 2000; Dorigo et al., 2005) *iii/ une espèce peut être représentée par plusieurs bandes car une espèce peut avoir plusieurs séquences différentes du gène codant pour l'ARN16S* (Ranjard et al., 2000). D'autres problèmes liés à la fois à la PCR et à la DGGE peuvent apparaître (Volatier, 2004): une espèce présente qui ne serait pas représentée (limite de détection), une espèce représentée par plusieurs bandes (microhétérogénéité des copies des gènes amplifiés) (van Elsas et al., 1997), une bande qui ne correspond pas à un authentique produit PCR (par exemple un hétéroduplexe), une bande dont l'intensité n'est pas représentative de l'abondance relative de l'espèce. Pour finir, étant donné que la séparation de produits PCR dont la taille est supérieure à 500 paires de bases est difficile, l'information obtenue par DGGE sur la séquence est limitée (van Elsas et al., 1997; Ranjard et al., 2000). Toutefois, la PCR-DGGE est un bon outil pour comparer des échantillons entre eux dans le but d'évaluer l'impact d'un traitement par exemple, c'est le cas pour cette étude.

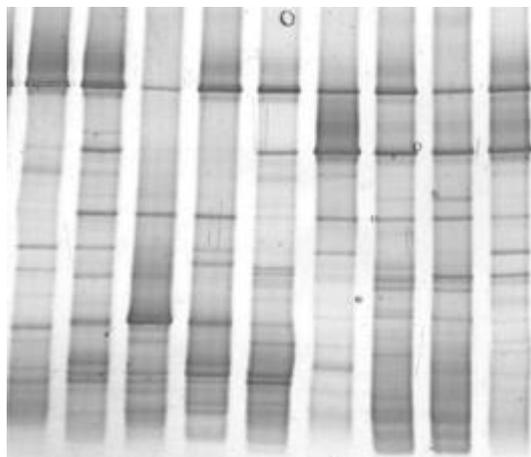


Figure 21. Présentation d'une analyse par DGGE

b. Protocole

Dans notre étude, des gels de polyacrylamide à 8% et à 6% ont été préparés avec un gradient en agent dénaturant (urée formamide) compris entre 30% et 55%, pour le gène *rrs* et entre 10% et 30% pour le gène *mcrA* (Annexe 8). Une solution d'acrylamide à 100% de dénaturation est définie par 7 mol/L d'urée et 40% (v/v) de formamide (Muyzer et al., 1993). Environ 100 ng de produit PCR (gène *rrs* et *mcrA*) ont été déposés dans chaque puit. Le gel a ensuite été plongé dans une cuve DGGE-2001 (CBS Scientific Co, Solana Beach, USA) contenant du tampon 0,5 × Tris-acide acétique-EDTA (tampon TAE 1x, 40 mmol/L Tris base, 40 mmol/L acide acétique glacial, 1 mmol/L EDTA). La migration a été effectuée pendant 5 h à 60°C en utilisant un voltage fixé à 200 mV. Les gels ont ensuite été colorés en utilisant un kit commercial au nitrate d'argent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

c. Analyse des gels de DGGE

Préalablement à la présentation du mode d'interprétation des gels, il est important de rappeler qu'en théorie, une espèce bactérienne présente un génome spécifique; à ce titre, une bande sur un gel DGGE peut être associée à une population, c'est-à-dire à un ensemble d'organismes appartenant à la même espèce. En pratique, le lien entre l'affiliation phylogénétique et les variations de séquences n'est pas toujours évident dans le cas d'organismes génétiquement proches. D'autre part, la notion d'espèce chez les procaryotes reste relativement obscure et repose principalement sur un pourcentage d'homologie entre leurs ADN (Torsvik et al., 1998). L'association d'une bande DGGE à une espèce est toutefois très communément appliquée. Cela dit, en toute rigueur et plus particulièrement en l'absence d'une vérification par séquençage, il est plus juste de considérer la DGGE comme une méthode de séparation des individus selon le polymorphisme génétique de la région du génome amplifié. Enfin, plus l'intensité de la bande est forte, plus l'abondance relative de l'espèce représentée est importante.

Dans cette étude, les images représentatives des différents gels de DGGE ont été acquises en utilisant un scanner calibré en densité optique (ImageScanner, GE Healthcare, Piscataway, USA) avec une résolution de 400 dpi. L'analyse des gels de DGGE a été réalisée par le logiciel GelCompar II version 4.0 package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Pour chaque profil, le nombre total de bandes (S), la surface du pic relative à chaque bande (n_i) et la somme de toutes les surfaces des pics de toutes les bandes (N) ont été prises en compte (Fromin et al., 2002).

A partir de ces informations, trois **indices de biodiversité** ont été calculés : i/ l'indice de **Shannon's (H)** dont la formule est $H = - \sum (n_i/N) \cdot \ln (n_i/N)$; ii/ **dominance (c)** dont la formule est $c = \sum (n_i/N)^2$; et iii/ **Evenness (e)** dont la formule est $e = H/\ln S$ (Odum, 1971).

I.8.5/ PCR en temps réel (qPCR)

La PCR en temps réel (qPCR pour quantitative) utilise le principe de base de la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymologique) avec pour différence une amplification mesurée non pas en final mais tout au long de la réaction, donc en temps réel. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN, alors que la PCR classique ne donne que la mesure finale. Cette technique offre d'autres avantages par rapport à une PCR classique :

- ❖ Elle est plus rapide car l'amplification peut être visualisée pendant la réaction et le résultat est donné dès la fin de la PCR,
- ❖ Elle est plus spécifique,
- ❖ Elle donne des résultats qualitatifs et quantitatifs,
- ❖ La réalisation de PCR multiplex est possible. En effet, elle permet d'amplifier plusieurs fragments différents et ainsi, de mettre plusieurs organismes ou mutations différentes en évidence simultanément dans l'échantillon.

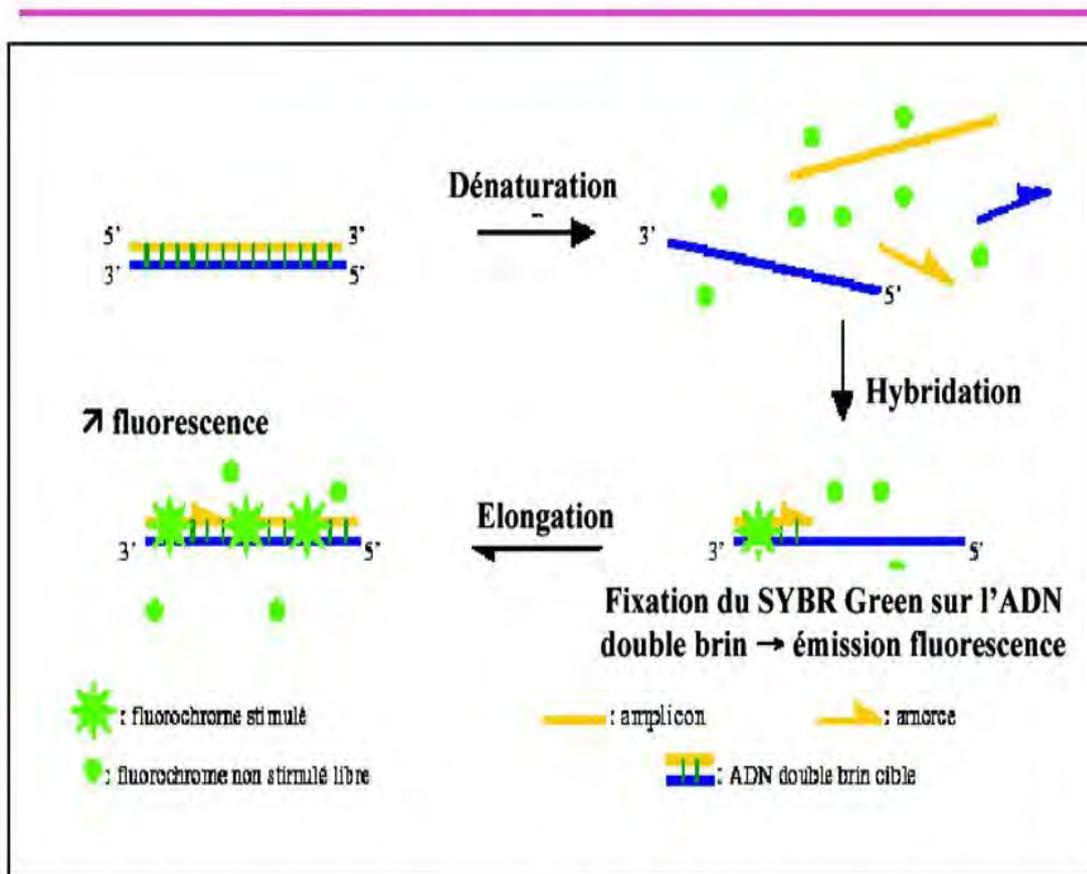
a. Principe

Le principe de l'analyse quantitative par qPCR se base sur le phénomène d'amplification de la molécule d'ADN matrice, où à chaque cycle d'élongation s'incorpore un fluorochrome. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons: les agents se liant à l'ADN double brin (ex. SYBR-Green) et les sondes fluorescentes qui vont s'hybrider de manière spécifique sur le fragment cible amplifié. Seule la technique SYBR-Green, utilisée pour ces travaux, sera décrite ici.

Le colorant SYBR-Green se lie au petit sillon de l'ADN double brin, mais pas à l'ADN simple brin (Figure 22). Suite à cette liaison, la fluorescence (excitation env. 488 nm et 254 nm ; émission env. 560 nm) augmente considérablement (de 800 à 1000 fois env.). Au début de la PCR, la quantité croissante d'ADN nouvellement synthétisée génère un signal fluorescent croissant. Une limitation du système de détection de séquence à base de SYBR-

Green est représentée par son mode de reconnaissance d'ADN non spécifique. En fait, chaque molécule d'ADN double brin présente dans une PCR est quantifiée, y compris donc les produits PCR non spécifiques et les dimères d'amorce. Afin de surmonter le problème et de soustraire l'élément de quantification dû aux ADN non spécifiques et aux dimères d'amorce sur certains dispositifs, il est possible d'effectuer une analyse de la **courbe de fusion**. Après l'étape finale de la PCR, les produits sont dissociés lentement et les données relatives à la fluorescence sont recueillies. Toutes ces informations sont générées au sein d'un même appareil qui est en fin de compte une combinaison d'un thermocycleur et d'un spectromètre. L'ensemble des données est collecté en temps réel par un logiciel et peut être consulté à tout moment de l'analyse.

Principe du SYBR Green I



L'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle d'élongation (l'émission de fluorescence décroît lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante)

Figure 22. Illustration de la qPCR SYBR®Green

b. Aspect mathématique de la qPCR

❖ *Nature exponentielle de la réaction PCR*

La PCR est par définition une réaction en chaîne au cours de laquelle les produits issus d'un cycle d'amplification servent de matrice pour le cycle suivant. Ainsi, la réaction en chaîne qui s'établit par la répétition des cycles de dénaturation-hybridation-élongation aboutit à une accumulation exponentielle théorique de 2^n fois par molécule d'ADN. Autrement dit, la quantité des produits PCR double à chaque cycle d'amplification suivant la relation mathématique suivante :

$$N = N_0 \cdot 2^n$$

(où : N est le nombre de molécules amplifiées au final, N_0 est le nombre initial de molécules et n est le nombre de cycles d'amplification).

❖ *Efficacité d'amplification*

Au niveau expérimental, la quantité de produit formé dépend d'un facteur primordial qui est **l'efficacité d'amplification (E)** définie comme étant la proportion moyenne des molécules d'ADN cible se dupliquant à chaque cycle d'amplification. L'efficacité d'amplification est comprise entre 0 (aucune amplification ne s'est produite) et 1 (après chaque cycle PCR, chaque molécule d'ADN cible a généré deux amplicons). Dans les conditions expérimentales habituelles, E est inférieure à 1 et varie entre 0,78 et 0,97 selon le gène amplifié (Köhler et al., 1992). L'introduction de ce facteur essentiel, qu'est l'efficacité d'amplification, dans le calcul du nombre de molécules amplifiées après n cycles d'amplification conduit à l'équation suivante :

$$N = N_0 \cdot (1 + E)^n$$

Convertie sous forme logarithmique, cette équation a pour expression :

$$\text{Log } N = \text{Log } N_0 + n \cdot \text{Log } (1 + E)$$

La représentation graphique des variations du logarithme du nombre N de molécules amplifiées ($\text{Log } N$) en fonction du nombre de cycles d'amplification (n) est une droite dont la pente est $\text{Log } (1 + E)$ et l'ordonnée à l'origine du nombre initial de molécules (N_0). Il est alors possible de calculer E :

$$E = 10^{-1/\text{pente}}$$

puis d'en déduire le nombre initial de molécules N_0 . De nombreux facteurs expérimentaux (concentrations en dNTP, en $MgCl_2$ et en ADN polymérase, température, contenu en bases G/C de la séquence cible, longueur du fragment à amplifier, présence d'inhibiteurs de l'ADN polymérase) peuvent affecter l'efficacité d'amplification.

❖ *Phase plateau de la réaction PCR*

L'accumulation exponentielle de la quantité de produits au cours de la réaction PCR n'est, en réalité, observée que pendant les 20 à 35 premiers cycles. Au cours des derniers cycles d'amplification, l'accumulation se ralentit et la quantité de produits formés tend vers une limite. C'est l'effet plateau (ou saturation). La phase plateau reflète une baisse de l'efficacité d'amplification qui résulte en partie de l'inactivation thermique partielle de l'ADN polymérase au cours des derniers cycles et du fait que les produits nécessaires à l'amplification (notamment dNTP et amorces) deviennent limitants. D'autres phénomènes sont également impliqués : réhybridation préférentielle de la cible avec elle-même plutôt qu'avec les amorces, activation de l'activité 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase et probablement l'accumulation de pyrophosphates résultant de la dénaturation thermique des dNTP et les inhibiteurs de l'activité polymérase (Morrison et al., 1994).

❖ *Le cycle seuil*

Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis dans la réaction. Par ce suivi, il est alors possible de tracer une courbe, de caractériser les différentes phases de la cinétique PCR et de mesurer la quantité de produit d'amplification généré en un point de la phase exponentielle (Figure 23). C'est uniquement au cours de cette phase qu'il sera possible d'extrapoler la quantité de matrice cible initialement présente avant l'amplification. Au cours des premiers cycles d'amplification, l'intensité de la fluorescence émise est très faible et va permettre de définir la ligne de base de la courbe. Après un certain nombre de cycles, l'accumulation des produits PCR entraîne une variation mesurable de l'intensité de la fluorescence émise. Le point de départ de la phase exponentielle, phase au cours de laquelle l'efficacité d'amplification est supposée rester constante, est appelé cycle seuil optique (Figure 23). Plus précisément, le cycle seuil optique est le nombre fractionnaire de cycles pour lequel l'intensité de la fluorescence émise a dépassé une valeur seuil (ou seuil de détection optique) significativement différente du bruit de fond. Plus il y a de matrices à amplifier au départ de la

réaction PCR, moins élevé sera le nombre de cycle requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond. Selon l'algorithme utilisé pour son calcul, il est symbolisé par les lettres Ct (*threshold cycle*) ou Cp (*crossing point*). Le cycle seuil est un point remarquable de la cinétique d'amplification car il se trouve inversement proportionnel au logarithme du nombre N_0 de molécules d'acide nucléique cibles initialement présentes avant amplification par PCR (Heid et al., 1996). Par conséquent, la quantification n'est pas affectée par l'épuisement d'un des réactifs comme lors de la phase plateau ce qui explique pourquoi le système en temps réel est si reproductible. La valeur du Ct peut être traduite en un résultat quantitatif en la comparant avec les valeurs du Ct générées avec des matrices de quantification connues.

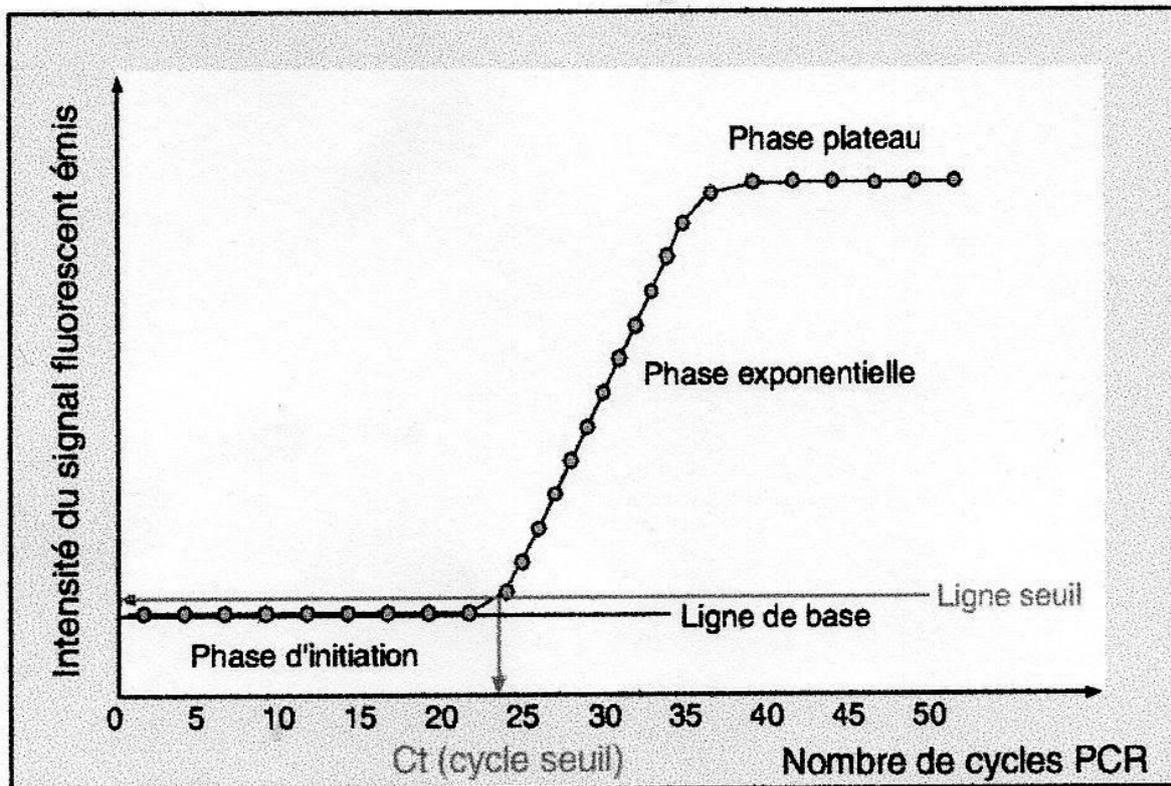


Figure 23. Le suivi en temps réel d'une réaction PCR.

La cinétique de la réaction PCR met en jeu en trois phases : une phase d'initiation, une phase exponentielle et une phase plateau. Elle est construite à partir de plusieurs points d'amplification. Un point d'amplification est un point présentant pour coordonnées le nombre de cycles PCR *versus* l'intensité de fluorescence émise. La ligne de base reflète l'intensité du bruit de fond de fluorescence. La ligne seuil correspond au seuil de détection optique au-delà duquel la variation en intensité de fluorescence suit une loi exponentielle. Le point d'intersection de la courbe cinétique PCR avec la ligne seuil définit le cycle seuil Ct qui est le point de départ de la phase exponentielle et qui se trouve directement lié à la quantité de cible initialement présente dans l'échantillon

c. Protocole et conditions d'amplification

Dans notre étude, les qPCR ont été réalisées dans le but d'avoir une estimation quantitative des bactéries totales (gène *rrs*), des archées méthanogènes (gène *mcrA*) et des principales espèces cellulololytiques (*rrs* gène) à savoir : *F. succinogenes*, *R. albus* et *R. flavofaciens*.

Les qPCR sont réalisées selon Morgavi et al. (2013). Les essais ont été réalisés dans un volume réactionnel de 20µL contenant 7,5µl de tampon «SYBR Green Master Mix » (Lonza). Les paramètres d'amplification utilisés pour le gène *rrs* sont : i/ une étape de d'activation de la polymérase (hot start) et de dénaturation de 15 minutes à 95°C, ii/) 40 cycles de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes suivis de 60 secondes à 60°C pour l'hybridation et l'extension des amorces. Une analyse de fusion entre 60 à 95°C (40 minutes) a été réalisée en post-amplification. Les paramètres d'amplification utilisés pour le gène *mcrA* étaient : i/ une étape de d'activation de la polymérase (hot start) et de dénaturation de 15 minutes à 95°C, ii/ 40 cycles de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes suivis de 60 secondes à 60°C pour l'hybridation et l'extension des amorces. Une analyse de fusion entre 60 à 95°C (40 minutes) a été réalisée en post-amplification. L'acquisition et l'analyse des données de fluorescence ont été réalisées avec le logiciel StepOne™ système (Applied Biosystem, France).

La pente et l'efficacité des amorces *rrs* and *mcrA* ont été: -3,45 et 95,59% et -3,43 et 95,09%, respectivement, avec un R² supérieur à 0,99 dans les deux cas. L'efficacité de la qPCR avec les échantillons d'ADN a été confirmée similaire avec celle obtenue avec les courbes standards. Pour chaque échantillon de contenu ruminal, les résultats ont été exprimés comme étant la moyenne des 3 réplifications de copies *rrs* ou *mcrA*/g de contenu ruminal.

I.9/ Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée suivant le modèle mixte du SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) avec régime, race, l'interaction régime x race et période comme effets fixes et animal comme variable aléatoire. Les différences statistiques ont été significatives quand $P \leq 0.05$. Les contrastes orthogonaux ont été déterminés entre le contrôle et les 3 plantes riches en tanins (*G. sepium*, *L. leucocephala*, *M. esculenta*), deuxièmement entre le contrôle et *L. leucocephala* et *M. esculenta*. Ce dernier contraste a été calculé parce que la teneur en tanins de *G. sepium* est faible comparativement à *L. leucocephala*, et *M. esculenta*.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Rappel des objectifs

Au regard de la synthèse bibliographique présentée dans le premier chapitre, plusieurs pistes de recherche peuvent être explorées dans l'objectif de réduire et/ou de contrôler la production de CH₄ entérique, comme l'utilisation des antibiotiques, la défaunation, l'ajout de différents types de bactéries, la vaccination contre les archées méthanogènes du rumen qui produisent du CH₄..., mais pour l'instant, toutes ces voies ne répondent pas au triple objectif d'efficacité à long terme, de sécurité pour l'animal et l'homme, et du coût. Par conséquent, cette situation met en avance les plantes riches en métabolites secondaires qui montrent jour après jour des résultats significatifs en ce domaine, d'où leur intérêt croissant. Leur utilisation comme agents modulateurs de la fermentation ruminale semble être la meilleure approche car ce sont des produits naturels ayant une bonne acceptation vis à vis du consommateur et sans aucun effet négatif sur l'environnement ; de plus leur utilisation permet de valoriser et d'exploiter les ressources végétales locales à travers le monde.

Les travaux de recherche présents dans la littérature, qui concernent les métabolites secondaires de plantes visant à réduire les émissions de CH₄ entérique se scindent en deux axes de recherche. Le premier axe est focalisé sur l'utilisation d'extraits de plantes dans les régimes alimentaires des animaux sous forme d'additifs. Le second axe se situe plus en amont et s'appuie sur la formulation des régimes alimentaires des animaux où les plantes riches en métabolites secondaires sont incorporées.

A ce jour, peu d'études scientifiques, bien qu'elles soient nombreuses dans ce domaine, rapportent des données concluantes reliant l'incidence des métabolites secondaires des plantes et la production de CH₄ car elles se sont généralement focalisées sur des tests *in vitro*, réalisés soit sur la plante ou sur son extrait brut et testés sur un seul génotype animal.

Malgré la complexité de cette stratégie, nécessitant de prendre en compte non seulement l'impact sur la production de CH₄ mais aussi d'autres aspects comme les effets secondaires sur les animaux, le coût et surtout la réalisabilité ; l'optimisation environnementale des stratégies alimentaires par l'utilisation de plantes riches en métabolites secondaires présente une piste de recherche intéressante.

C'est pourquoi le travail de cette thèse, qui se décompose en différentes étapes complémentaires, a visé premièrement à tester deux familles de métabolites secondaires : les HE et les TC sur la production de CH₄ et sur la fermentation ruminale *in vitro*.

La seconde partie du travail a porté sur le métabolite secondaire le plus agissant avec le minimum d'effets secondaires sur la fermentation ruminale. Une étude *in vivo* a été

réalisée, au cours de laquelle les plantes retenues (riches en TC) ont fait l'objet d'essais réalisés sur deux génotype d'ovins avec caractérisation des populations microbiennes du rumen et mesure des paramètres de la fermentation et de la production de CH₄ en rapport avec la concentration des TC.

Ce document est structuré en trois parties principales constituées de manuscrits dont deux ont été soumis à des journaux scientifiques à comité de lecture international, et d'une discussion et conclusion générales.

Le Chapitre I présente une analyse de l'effet de l'incorporation d'extraits bruts d'HE de *J. phoenicea* et *M. pulegium* sur la production de CH₄, le profil fermentaire et la digestion *in vitro* dans un système batch. Une partie de ces résultats est reprise dans un article publié à ***Energy Procedia***.

Le Chapitre II présente l'effet des TC contenus dans trois plantes : *Leucaena leucocephala*, *Glyricidia sepium* et *Manihot esculenta* sur l'ingestion, la production de CH₄, la digestibilité et le transit chez deux génotypes d'ovins *in vivo*. Le travail expérimental est repris dans un article accepté dans la revue ***Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition***.

Le Chapitre III présente une étude de la linéarité de la réponse à des doses croissantes d'incorporation de ces mêmes plantes dans l'alimentation. Avec une analyse de l'abondance et de la diversité des microorganismes impliqués et/ou associés à la méthanogénèse ruminale, ainsi qu'aux paramètres fermentaires résultant de l'incorporation des mêmes plantes à la ration alimentaire de deux génotypes d'ovins. Les travaux de recherche sont présentés sous la forme d'un article publié dans la revue ***Journal of Animal Science***.

Chapitre I: Effets des huiles essentielles de *M. pulegium* et *J. phoenicea* sur la production de méthane *in vitro*

Avant-propos

La nutrition animale renouvelle son jargon depuis l'utilisation de plus en plus fréquente des extraits végétaux dans la formulation des rations alimentaires des ruminants. Endormie depuis le début des années 70, la recherche sur les effets de ces produits a mis les bouchées doubles depuis l'annonce de l'interdiction des antibiotiques, facteurs de croissance à la fin des années 90. A cette contrainte, s'ajoutent les problèmes environnementaux qui concernent les changements climatiques actuels et à venir dus à la production de GES. Le CH₄ est le principal GES, dont la contribution à la production globale des GES avoisine les 39 % (Gerber et al., 2013). Les émissions de CH₄ proviennent essentiellement des fermentations entériques et des fumiers. La presque totalité (97 %) du CH₄ est produit par les ruminants.

D'un point de vue nutritionnel, le CH₄ est un sous-produit des fermentations ruminales, sa production constitue une perte d'énergie pour le ruminant. On estime qu'entre 2 et 12 % de l'énergie contenue dans les aliments et consommée par le ruminant est perdue sous forme de CH₄. Par conséquent, la réduction de la production de CH₄ par les ruminants représente non seulement un intérêt environnemental à long terme, mais également un intérêt économique à court terme.

Les HE représentent un groupe très important d'extraits végétaux. Elles sont dotées de propriétés antimicrobiennes les rendant intéressantes comme produits de remplacement des antibiotiques pour la manipulation de la fermentation dans le rumen et la réduction de la production de CH₄.

Cette étude avait pour but de caractériser les effets de deux extraits bruts d'HE issus de deux plantes aromatiques : *M. pulegium* et *J. phoenicea*, sur la fermentation ruminale et spécialement sur la production de CH₄. Ces extraits ont été testés à des doses croissantes afin de déterminer leur efficacité anti-méthanogène *in vitro*.

Matériel et méthodes

1/ Matériel végétal

Les HE utilisées dans cette étude ont été extraites à partir de : *M.pulegium* et *J. phoenicea*. Elles ont des provenances variées (Constantine pour *M. pulegium* et Biskra pour *J.*

phoenicea) et les leurs parties aériennes ont été collectées au mois de mai 2011. Ces plantes ont été choisies en raison de leur abondance, leurs propriétés antimicrobiennes et leur possibilité d'incorporation des les régimes des ruminants. Elles ont été séchées à l'air libre et à l'ombre. Les échantillons destinés à l'extraction des HE ont été coupés en petits morceaux d'environ 1 cm, alors que ceux destinés au reste de l'étude (l'essai *in vitro*) ont été broyés et tamisés à travers un tamis de 1 mm. Les HE ont été extraites par hydrodistillation. Les caractéristiques de ces plantes et leur analyse chimique ont été bien détaillées dans le chapitre matériel et méthode.

2/ Matériel animal

Les animaux donneurs étaient 3 moutons adultes (Texel) possédant une canule au niveau du rumen, et recevant un régime, à base de foin en quantité constante et limitée correspondant aux exigences de l'entretien.

3/ Fermentation *in vitro*

Le procédé de fermentation *in vitro* a été décrit dans la partie matériel et méthode.

4/ Analyse statistique

Une analyse de la variance a inclus les effets de l'espèce végétale, la dose HE et la série. Le modèle Mixte de SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) a été utilisé. On a considéré l'espèce et la dose comme des effets fixes, la série comme effet aléatoire. Le modèle est $Y = \mu + \text{Espèce}_i + \text{Dose}_j + \text{Espèce} \times \text{Dose}_{ij} + \text{Séries}_k + e$

Où Y est la variable dépendante, μ la moyenne globale et e l'erreur. Les différences statistiques ont été significatives à $P = 0,05$.

Résultats et discussion

1/Rendement en huiles essentielles

Les rendements en HE ont été significativement différents entre les deux plantes étudiées ($P < 0,001\%$), le faible rendement est enregistré pour *J. phoenicea* (1,20%), alors que *M. pulegium* présente un rendement plus élevé de 1,72%.

En comparaison avec d'autres études sur les mêmes plantes, le rendement en HE de *J. phoenicea* est supérieur à celui obtenu pour la même espèce poussant en Tunisie (0,5 à 0,75

%) (Akrouit et al., 2004; Bouzouita et al., 2008). Par ailleurs, l'hydrodistillation des rameaux de cet arbre collectés en Algérie fournit un rendement très élevé de 2,75% en HE (Menaceur et al., 2015). De même, un rendement supérieur de 1,62% est enregistré pour la même espèce collectée au Maroc (Derwich et al., 2009). La concentration en HE de *M. pulegium* enregistrée par Derwich et al. (2009) est proche de la notre (1,66%).

Le rendement de ces métabolites secondaires est différent d'une famille botanique à une autre, d'une espèce à une autre et même entre les plantes de la même espèce. De plus, cette différence de teneur en HE peut être liée à plusieurs facteurs tels que la zone géographique de collecte, le climat, le stade de développement et la saison (Ennajar et al., 2009; Medini et al., 2009). Pour cette raison, le rendement élevé noté pour *M. pulegium* peut s'expliquer par son stade de prélèvement (début de floraison). Par contre, la faible concentration en HE de *J. phoenicea* est probablement due au fait qu'elle soit collectée au stade de maturation.

2/ Production de méthane

Les résultats de la production de gaz et de CH₄ sont présentés dans le tableau 1. La production de gaz est négativement affectée par l'addition d'HE de *J. phoenicea*, et de *M. pulegium* (P < 0,001). Après 24 h de fermentation, les HE de *J. phoenicea* et de *M. pulegium* réduisent significativement la production de CH₄ (P < 0,001). Cet effet est dose dépendant (Figure 1). A 1,5µL/mL, les HE de *M. pulegium* ont engendré une diminution de 30% de la production de CH₄. Par contre, la forte dose des HE de *J. phoenicea* (5µL/mL) ne la baisse que par 9%. Plusieurs études ont rapporté la capacité des HE à diminuer la méthanogénèse ruminale. Les résultats concernant les HE de la menthe sur la fermentation ruminale et la méthanogénèse sont très controversés. Tatsuoka et al. (2008) n'ont observé aucune activité anti-méthanogène des cyclodextrines (α ou β) des HE de la menthe poivrée (espèce très proche de la menthe pouliot testée à 83, 167 et 250 mg/L de milieux de culture) sur la méthanogénèse ruminale *in vitro*.

Tableau 1. Les caractéristiques fermentaires *in vitro*, en présence des extraits d'huiles essentielles de *J. phoenicea* et *M. pulegium*

| Dose (µL/mL) | Témoin | <i>Juniperus phoenicea</i> | | | | <i>Mentha pulegium</i> | | | SE | P |
|--|--------|----------------------------|------|------|------|------------------------|------|------|------|-------|
| | 0 | 0,85 | 1,67 | 3,3 | 5 | 0,37 | 0,75 | 1,5 | | |
| Gaz, mL/24 h | 48,2 | 46,6 | 48,1 | 42,6 | 37,2 | 46,0 | 42,5 | 34,8 | 1,87 | <,001 |
| CH ₄ mL/24 h | 14,0 | 13,9 | 13,3 | 12,8 | 12,7 | 14,4 | 13,7 | 9,8 | 0,41 | <,001 |
| AGV totaux, mM | 84,8 | 79,5 | 79,3 | 77,1 | 73,7 | 80,7 | 80,7 | 60,7 | 2,99 | <,001 |
| Acétate, % | 53,3 | 51,5 | 50,9 | 49,8 | 47,2 | 52,3 | 51,7 | 40,5 | 1,90 | <,001 |
| Propionate, % | 17,2 | 15,0 | 15,1 | 14,7 | 13,2 | 14,7 | 13,7 | 9,6 | 0,83 | <,001 |
| Butyrate, % | 11,3 | 10,7 | 10,9 | 10,6 | 11,7 | 12,3 | 12,4 | 9,4 | 0,99 | 0,002 |
| Acétate:Propionate | 3,1 | 3,5 | 3,4 | 3,4 | 3,6 | 3,6 | 3,8 | 4,2 | 0,19 | 0,003 |
| N-NH ₃ , mg/L | 15,6 | 16,5 | 16,9 | 17,7 | 16,9 | 18,0 | 17,9 | 9,2 | 1,84 | <,001 |
| DMS, % | 23,3 | 20,5 | 21,4 | 18,0 | 18,2 | 23,0 | 19,4 | 16,6 | 1,25 | <,001 |
| Protozoaires totaux log ₁₀ cellules / mL | 3,9 | 4,4 | 4,4 | 4,3 | 4,6 | 4,4 | 4,5 | 4,6 | 0,22 | 0,001 |

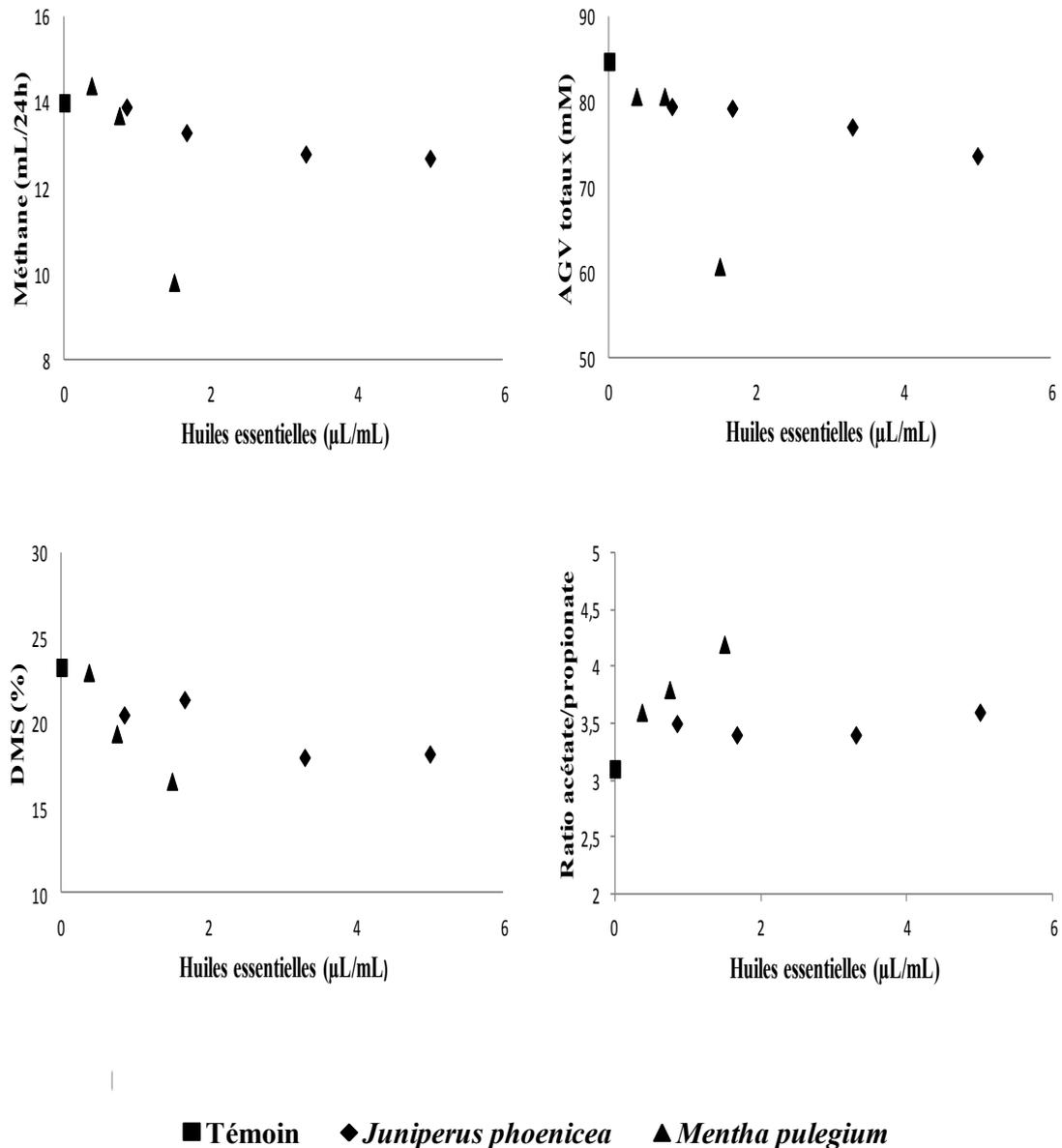


Figure 1. Relation entre les huiles essentielles, le CH₄, les acides gras volatils, le ratio acétate/propionate et la digestibilité de la matière sèche

Agarwal et al. (2009) ont testé l'effet de 3 doses d'HE de menthe poivrée (0,33, 1,0 et 2,0 mL/L de milieu de culture) sur la méthanogénèse ruminale *in vitro* et ont rapporté une diminution linéaire de la production de CH₄ (mL/g MS digestible) qui a atteint les 61%. Cette dernière est accompagnée d'une baisse du nombre d'archées méthanogènes par environ 82%. Par ailleurs, l'effet de l'apport de niveaux croissants (0, 25, 50 et 75 µL/75mL du liquide ruminal tamponné) d'HE de *Mentha microphylla* à un substrat de base

(50% fibres : 50% de concentré) sur les caractéristiques de la fermentation ruminale est évalué *in vitro* et tous les niveaux de *M. microphylla* baissent la production de gaz et inhibent parallèlement la production de CH₄ (Sallam et al., 2011). Les HE de la menthe poivrée sont également testées en association avec l'ail et les résultats indiquent que le mélange ail/HE de menthe poivrée a le potentiel d'inhiber la production de CH₄ (Verma et al., 2012). Quand aux effets relatifs des HE de *J. phoenicea* sur la production de CH₄, le nombre d'études qui existe est très réduit. Ainsi, les HE des baies de *Juniperus* spp., introduite à une concentration de 20 mg/L, diminuent la production de CH₄ de 50,2% (Chaves et al., 2008). Contrairement à nos résultats, les travaux d'Ohene-Adjei et al. (2008) sur les HE de *Juniperus communis* ne rapportent aucun effet sur la production de CH₄ ainsi que sur le nombre d'archées méthanogènes mais les auteurs ont tout de même signalé une augmentation de la diversité de la communauté d'archées méthanogènes.

Les HE sont généralement connues pour leur activité antimicrobienne et sont fréquemment utilisées pour le traitement de certaines infections microbiennes (Imai et al., 2001). Ces métabolites secondaires sont constitués d'un mélange de molécules chimiques qui exercent une activité antimicrobienne par plusieurs mécanismes d'action. Selon la littérature, les HE de *J. phoenicea* sont majoritairement composées de α -Pinène, alors que les HE de *M. pulegium* contiennent principalement du menthol et du menthone. Ces composés sont dotés d'une activité antimicrobienne vis-à-vis des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Marotti et al., 1994; Imai et al., 2001) Les HE de *M. pulegium* sont plus efficaces que celle de *J. phoenicea* en raison de leur richesse en menthone qui est plus bactéricide que le α -Pinène. Selon le classement de Bayourthe et al. (2014), la famille des cétones à laquelle appartient le menthone est plus bactéricide que celle des terpènes dont fait partie le α -Pinène.

3/ Production d'ammoniac

La production du NH₃ en présence d'HE de *J. phoenicea*, et de *M. pulegium* est également mentionnée dans le tableau 1. Cette dernière augmente au fur et à mesure que la dose d'HE *J. phoenicea* augmente. L'accroissement de la dose de l'extrait de *M. pulegium* augmente en premier temps la concentration de NH₃, ensuite une réduction brutale est observée avec la plus forte dose (-41%).

L'addition des HE est généralement associée à une diminution de la production de NH₃ due à une réduction de la dégradabilité des protéines. Néanmoins, comparativement à

d'autres études sur des plantes similaires, l'addition d'HE de *Juniperus oxycedrus*, à 30 et 300 mg/L, n'affecte pas la concentration du NH₃ après 24 h de fermentation (Busquet et al., 2006). Dans une étude *in vitro* d'Agrawal et al. (2009), l'HE de *Mentha piperita* augmente la production de NH₃ avec les doses de 0,33 et 1 µL/mL. Par contre, la dose de 2 µL/mL entraîne une diminution de la concentration du NH₃ mais les auteurs ne l'ont pas expliqué. Busquet et al. (2006) ont rapporté la même tendance avec l'HE d'*Origanum vulgare* et de *Zingiber officinale* qui ont pareillement augmenté le NH₃ à la dose de 300 mg/mL et l'ont diminué à la dose de 3 g/mL.

Les HE ont une action largement variable selon leur composition et selon la dose utilisée. L'augmentation de la concentration du NH₃ peut être expliquée par la résistance des principales bactéries protéolytiques aux HE comme le rapporte l'étude de McIntosh et al. (2003) qui ont montré que quelques espèces, incluant *P. ruminicola* (bactérie protéolytique la plus abondante dans le rumen) et *P. bryantii*, s'adaptent et qu'elles sont capables de croître à des concentrations élevées en HE.

L'augmentation de la production du NH₃ peut être aussi attribuée à l'accroissement de la population de protozoaires, considérés comme les premiers producteurs de NH₃, accompagnée d'une forte lyse bactérienne résultant de la prédation des bactéries par les protozoaires. Elle peut aussi être argumentée par une inhibition sélective des microorganismes utilisateurs du NH₃ dans le rumen.

La diminution de la production du NH₃ observée avec les HE de *M. pulegium* à la concentration 1,5 µL/mL ne sont pas due à une augmentation de la synthèse microbienne compte tenu des propriétés antibactériennes des HE. La diminution de la production du NH₃ pourrait être due à l'inhibition de l'activité protéolytique ou peptidolytique des différents microorganismes, comme elle pourrait être la conséquence de l'inhibition spécifique de la désamination, assurée principalement par les bactéries hyper-productrice de NH₃ comme *C. sticklandii* et *P. anaerobius* (Bayourte et al., 2014). La diminution du NH₃ est avantageuse, si la ration contient des protéines dégradables en grande quantité (comme les tourteaux de soja) mais désavantageuse si la ration est pauvre en azote, dans ce cas la synthèse de protéines microbiennes est limitée. En bref, c'est valable pour des rations riches d'élevages productifs, et pas pour des rations pauvres de petits éleveurs.

4/ Production d'acides gras volatils totaux

La production d'AGV est représentée dans le tableau 1. L'addition des HE diminue la production d'AGV. Tous les AGV chutent avec les doses employées. Cet effet est très prononcé avec *M. pulegium* et est dose dépendant (Figure 2). L'acétate et le propionate diminuent en présence des HE. Quant au butyrate, celui-ci augmente en présence des deux premières doses de *M. pulegium* et diminue avec la plus forte dose. Indépendamment de la dose, le ratio acétate : propionate augmente avec les HE.

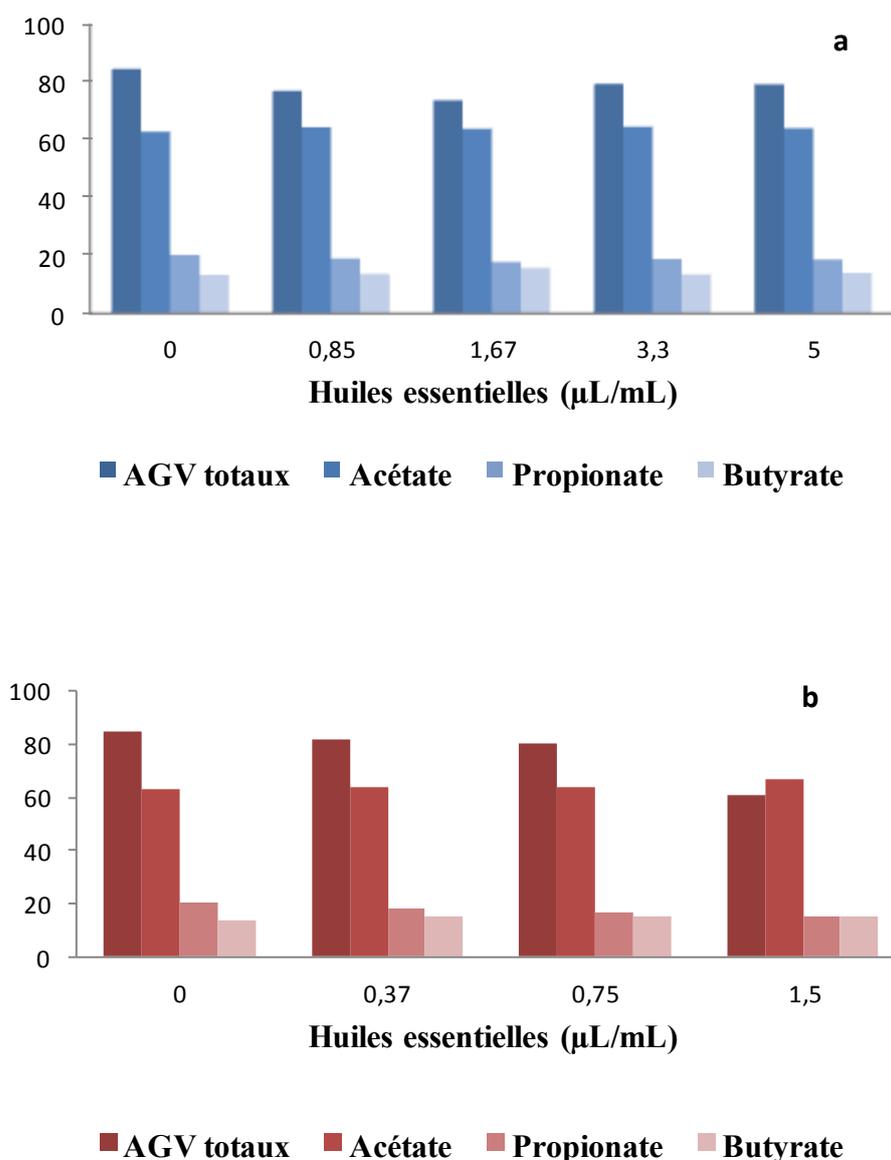


Figure 2. Effets des HE de *Junepirus phoenicea* (a) et de *Mentha pulegium* (b) sur le profil des acides gras volatils *in vitro*

Certaines HE et leurs composants actifs sont capables de modifier le profil des AGV du liquide ruminal de façon variable *in vitro*, en fonction de nombreux facteurs dont principalement la dose d'HE administrée et l'adaptation de la flore microbienne. Tatsuoka et al. (2008) n'ont observé aucun effet sur la concentration des AGV ainsi que sur les proportions molaires d'acétate et de propionate, en testant les HE de la menthe poivrée *in vitro*. Agarwal et al. (2009) ont testé l'effet de 3 doses d'HE de menthe poivrée (0,33, 1,0 et 2,0 mL/L de milieux de culture) sur la méthanogénèse ruminale *in vitro* et ont constaté une diminution de la concentration des AGV aux deux niveaux d'inclusion les plus hauts, accompagnée d'une augmentation du ratio acétate : propionate. Dans l'étude *in vitro* de Chaves et al. (2008) sur les HE de *Juniperus* spp. , les AGV ainsi que le ratio acétate : propionate restent constants malgré une baisse de la production de CH₄ qui a atteint les 50%. Tandis que Busquet et al. (2006) ont rapporté un accroissement de la concentration des AGV et de l'acétate en présence d'HE de *Juniperus oxycedrus* sauf pour la plus forte dose (3g/mL) pour laquelle ces derniers baissent. Quant aux concentrations du propionate, elles restent inchangées.

Dans notre cas, le profil des AGV n'est pas typique d'une inhibition de la production de CH₄, c'est-à-dire un faible ratio acétate : propionate. Ainsi le ratio acétate : propionate a augmenté en présence des HE. Ceci est une indication que l'excès de H₂ résultant de l'inhibition de l'activité des archées méthanogènes et/ou de leur nombre n'est pas dirigé vers les voies alternatives de la consommation du H₂ comme la production du propionate. Les résultats d'Agarwal et al. (2009) ont suggéré que l'activité anti-méthanogène des HE est principalement due à leur effet direct sur l'activité et/ou le nombre d'archées méthanogènes et de protozoaires.

5/ Protozoaires

La variation quantitative des protozoaires entre les différents types et doses d'HE est également mentionnée dans le tableau 1. Indépendamment de la dose, le nombre de protozoaires augmente. Il atteint son maximum avec les fortes doses d'HE.

La plus part des travaux réalisés sur les HE en général et sur des HE d'espèces très proches ont rapporté tous une diminution de la population de protozoaires. En effet Agarwal et al. (2009) ont rapporté une réduction de la production de CH₄ accompagnée d'une diminution du nombre et de l'activité des protozoaires en réponse à l'addition de 3 doses croissantes d'HE de menthe poivrée. La réduction est de 30%, 78% et 88%, pour

0,33, 1,0 et 2,0 mL HE/L de milieux de culture ; respectivement. Similairement, dans l'étude de Sallam et al. (2011) sur des niveaux croissants (0, 25, 50 et 75 μ L/75mL du liquide ruminale tamponné) d'HE de *M. microphylla*, l'inhibition de la production de CH₄ est également associée à une réduction de la population de protozoaires (12%, 21% et 49% ; respectivement). Des résultats semblables sont observés par Ando et al. (2003) qui ont rapporté une diminution dans le nombre de protozoaires totaux chez des moutons recevant 200 g/j (54 g/kg MS ingérée) de menthe poivrée séchée au soleil

L'inhibition de la méthanogénèse par l'apport d'HE est souvent liée à la diminution du nombre et/ou l'activité des protozoaires. Environ 25 % d'archées méthanogènes sont associées aux protozoaires (Newbold et al., 1995) et, donc, une partie de l'effet anti-méthanogène des HE pourrait être attribuée principalement à une activité anti-protozoaire. Dans cette étude, le nombre de protozoaires a augmenté et l'activité anti-méthanogène de ces HE serait plutôt, le résultat d'un effet antibactérien, en particulier pour *M. pulegium* (jusqu'à 82%) (Agarwal et al., 2009) ; ou à un changement de la diversité des archées méthanogènes, comme l'ont déjà rapporté Ohene-Adjei et al. (2008) dans une étude sur les HE de *J. communis* (espèce proche de *J. phoenicea*). En effet, l'hypothèse d'un effet inhibiteur de l'activité métabolique, obtenu avec les HE, ne peut toutefois être écartée. Un changement de la diversité implique sûrement un changement de l'activité des archées méthanogènes qui pourrait être limitée par l'apport d'HE.

6/ Digestibilité

La digestibilité *in vitro* de la MS varie significativement ($p < 0,001$) entre les HE et les doses testées. L'addition d'HE est responsable d'une baisse importante de la DMS (Tableau 1). Ceci est cohérent avec leur effet inhibiteur sur la production des AGV. *M. pulegium* est toujours plus nocive que *J. phoenicea*. Des résultats semblables sont observés par Agarwal et al. (2009) qui rapportent le même effet drastique de la menthe poivrée sur la digestibilité *in vitro*. Sallam et al. (2011) ont également constaté une inhibition de la digestibilité sous l'effet de dose croissante d'HE de *M. microphylla*.

La baisse de la digestibilité observée dans cette étude résulte de l'inhibition de la fermentation à cause des HE ajoutées, qui exercent leur action anti-microbienne sur le microbiote ruminal, perturbant ainsi les performances métaboliques de ces composantes.

Conclusion

Les HE de *M. pulegium* et de *J. phoenicea* se sont montrées efficaces dans la réduction de la méthanogénèse. Cependant toutes les deux perturbent la fermentation et l'environnement ruminal. *M. pulegium* semble avoir un pouvoir anti-méthanogène plus fort, accompagné d'effets néfastes de la même ampleur.

Les HE doivent donc être utilisées avec une très grande précaution pour ne pas compromettre les activités fermentaires et la digestibilité. De nouvelles études sont nécessaires avec des doses variables afin de définir la dose optimale de ces additifs qui assure une réduction de la production de CH₄ avec un minimum de perturbation des fermentations ruminales. Dans l'état actuel des études, il semble difficile de recommander l'utilisation de ces HE, en raison de leur effet négatif sur la digestibilité et la production d'AGV.

Chapitre II: Potentiel anti-méthanogène de trois plantes riche en tanins, *Leucaena leucocephala*, *Glyricidia sepium* et *Manihot esculenta*, pour réduire les émissions de méthane entérique chez des ovins

Avant-propos

L'agro-écologie est un moyen d'améliorer la durabilité des systèmes d'élevage de ruminants qui mobilise des processus biologiques pour combiner la production de lait ou de viande et la réduction de l'impact environnemental. Les ruminants sont d'importants contributeurs au réchauffement de la planète. En cause, leurs émissions de CH₄ qui est un puissant GES, produit notamment dans le rumen de l'animal pendant le processus normal de la digestion des aliments. Il représente également une importante perte d'énergie alimentaire. La réduction des émissions de CH₄ est un sujet qui demeure d'actualité depuis plus d'une décennie et les chercheurs sont toujours en quête d'une solution radicale mais jusqu'à présent, peu de stratégies se révèlent prometteuses. Les spécialistes de l'alimentation animale se penchent de plus en plus vers les métabolites secondaires des plantes comme les TC qui semblent réduire sensiblement les émissions de CH₄. Les TC sont des substances que l'on retrouve dans divers végétaux, en particulier les légumineuses ; ils sont impliqués dans un rôle de défense contre les insectes et les herbivores. L'intérêt s'est actuellement accentué sur plusieurs légumineuses fourragères en raison de leur richesse en protéines dont l'utilisation peut corriger les carences en azote non protéique et éviter les coûts supplémentaires. Ces plantes constituent une piste très intéressante que la recherche commence à explorer de près et sur tous les aspects nutritionnels. En effet, l'incorporation de légumineuses riches en TC s'avère une stratégie alimentaire à double impact: amélioration de la qualité nutritionnelle et réduction des émissions de CH₄. Les TC possèdent également des propriétés thérapeutiques contre les nématodes gastro-intestinaux. Cependant, la contrainte principale rencontrée avec ces plantes est leur astringence qui provient de la propriété qu'ont les protéines à se complexer sous l'effet des TC. Les plantes riches en TC sont le plus souvent directement utilisées en frais ce qui limite leur consommation par les animaux qui peuvent les refuser et s'abstenir de les manger.

En partant de l'hypothèse que la mise au point d'une technologie de type aliments granulés faciliterait la consommation de ces ressources en masquant leur astringence et

favorisant ainsi une forte ingestion accompagnée d'une réduction de la production de CH₄, l'objectif de cette étude était d'étayer l'hypothèse selon laquelle un nouveau concept de valorisation et d'administration de plantes riche en TC sous forme de granulé peut être, dans un futur proche, un moyen pratique de mitigation de la production de CH₄. Les plantes testées sont : *G. sepium*, *L. leucocephala* et *M. esculenta*. Cet essai a été conduits sur de deux races d'ovins dans un but de comparaison et de standardisation de l'impact des TC sur la méthanogénèse.

Les pages qui suivent exposent la publication présentant ces aspects, elle a été acceptée dans la revue de *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, et sera publiée en ligne très prochainement.

Potential of tannin-rich plants, *Leucaena leucocephala*, *Glyricidia sepium* and *Manihot esculenta*, to reduce enteric methane emissions in sheep

H. Archimède¹, M. Rira², D. J. Barde¹, F. Labirin³, C. Marie-Magdeleine¹, B. Calif¹, F. Periacarpin³, J. Fleury³, Y. Rochette², D. P. Morgavi² and M. Doreau²

¹INRA, UR143, Unité de Recherches Zootechniques, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, French West Indies

²INRA, UMR 1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, 63122 Saint-Genès Champanelle, France

³INRA UE1284, Plateforme Tropicale d'Expérimentation sur l'Animal, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, French West Indies

Correspondence

H. Archimède, INRA, UR143, Unité de Recherches Zootechniques, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, French West Indies.

Harry.Archimede@antilles.inra.fr

Summary

The objective of this work was to study nutritional strategies for decreasing enteric methane emission by ruminants. An in vivo trial was conducted in sheep to investigate the effect of three tropical tannin-rich plants (TRP) on methane emission, intake and digestibility. The TRP used were leaves of *Glyricidia sepium*, *Leucaena leucocephala* and *Manihot esculenta*, that contained respectively 39, 75, and 92 g condensed tannins /kg DM. Methane was determined with the sulphur hexafluoride tracer technique. Eight rumen-cannulated sheep of two breeds (4 Texel, 4 Blackbelly) were used in two 4 × 4 Latin square designs. Four experimental diets were tested. They consisted in a tropical natural grassland hay based on *Dichanthium spp.* fed alone (C) or in association with *G. sepium* (G), *L. Leucocephala* (L) and *M. esculenta* (M) given as pellets at 44% of the daily ration. Daily organic matter intake was higher in TRP diets (686, 984, 1054 and 1186 g /d for C, G, L and M, respectively; $p < 0.05$) while organic matter total tract digestibility was not affected (69.9, 62.8, 65.3 and 64.7% for C, G, L and M, respectively; $p > 0.05$). Methane emission was 47.1, 44.9, 33.3 and 33.5 g/kg digestible organic matter intake for C, G, L and M, respectively, and was significantly lower for L and M than for G and C. Our results confirm the potential of some TRP to reduce methane production. The strong decrease in methane and the increase in intake with TRPs may be due to their presentation as pellets.

Keywords

Ruminant, rumen, tropical plant, tannin, methane

Introduction

Livestock farming activities account for 14.5% of global greenhouse gas emissions of anthropogenic origin of which 39% are due to enteric methane emission from ruminants. (Gerber et al, 2013). In addition to this environmental impact, CH₄ represents a loss of 2-15% of gross energy intake of ruminants (Johnson *et al.*, 1995). Many strategies, including the use of some secondary metabolites of plants, exist to mitigate CH₄ emissions (Beauchemin et al., 2009; Hristov et al., 2013). Among these plant secondary metabolites, tannins are considered as a promising group of natural additives for CH₄ mitigation. Tannins are present in numerous plants in tropical areas. Depending on their chemical structure and concentration in ruminant diet, tannins may have positive or negative effects on animal responses. A decrease in performances is often the result of a decrease in intake when tannin-rich plants (TRP) are fed. This decrease is often associated with low palatability (Landau et al., 2000), and can be accompanied by a decrease in diet digestibility (Mueller-Harvey, 2006) and with potential toxicity to the animal (Reed, 1995). The higher protein supply of TRPs, associated with a decrease in rumen protein degradation induced by tannins, can result in improved animal performances, except when the intestinal protein digestibility is reduced. In addition, TRP can have a positive effect on health by reducing gastrointestinal nematode load in grazing ruminants (Waghorn, 2008). A meta-analysis by Jayanegara et al. (2012) showed that condensed (CT) and, to a lower extent, hydrolysable (HT) tannins reduce CH₄ emission but responses are variable. It is still unclear to which extent CH₄ reduction is associated with adverse effects on digestibility and on some rumen microbes, so it is imperative to account for these factors before using them as CH₄ mitigation agents. The objective of the present study was to investigate the effect of three TRP on enteric CH₄ emission, intake and feed digestion. In this experiment, we used pellets made from these plants as an innovative method of TRP administration and a possible way to enhance voluntary intake.

Material and methods

Experimental site and diets

The research was carried out in 2013, during the rainy season, at the experimental animal station of the National Agronomic Research Institute (INRA) of the French West Indies

(Guadeloupe, latitude 16.16 N, longitude 61.30 W). Temperatures ranged from 21-25°C (rainy season) to 27-31°C (dry season). The mean rainfall on the experimental site is 3000 mm/year. Experimental diets consisted in a hay of tropical natural grassland based on *Dichanthium spp.* fed alone or in association with 3 TRP forages given as pellets at 44% of the daily ration on average. Tannin-rich-plants were leaves of *Glyricidia sepium*, *L. leucocephala*, and *Manihot esculenta*. The hay came from a 75-day regrowth natural grassland grown with irrigation and mineral fertilisation (100 kg of N/ha/year) in Grande-Terre, northeast Guadeloupe. All the hay came from the same harvest. Tannin-rich-plants grew on ferrallitic soils without fertilisation. *Glyricidia sepium* and *Leucaena leucocephala* came from 9-12 months fallow farmland. *Manihot esculenta* was collected from a 12-month old plantation. The young branches (stem and leaves), less than 6 months old, of the 3 TRP were harvested then sun-dried for 2 days. The leaves with petioles were isolated from the stem and ground (3 mm screen) then pelleted using a GR150E system (Oliotechnology, Burgun, Wissembourg, France). The average size of the pellets was 12 mm long and 3 mm in diameter. Four diets were compared: *Dichanthium spp.* given alone as control (C), *Glyricidia sepium*, *Leucaena leucocephala*, and *Manihot esculenta* given as a mixture containing 56% *Dichanthium* hay and 44% TRP (G, L and M diets; respectively)

Animals and design

Two sheep breeds were used in two 4 x 4 Latin square designs, Texel (T, n= 4) of temperate origin and Blackbelly (BB, n= 4) of tropical origin. Rams from both breeds were born in French West Indies. All rams were 2 years old, and were reared following European Union recommendations for animal welfare in accordance with the regulations of the Animal Care Committee of INRA. Their body weight was 40.2±3.9 kg for T sheep and 51.2 ± 3.7 kg for BB rams, and each of them was fitted with a rumen cannula. Each period lasted 28 days with 21 days of adaptation to diets and to equipment for gas collection followed by 7 days of measurements of feed intake, total tract digestibility, and CH₄ emission. Fermentation and some microbial parameters were also measured at the end of each period and results were published by Rira et al. (2015). Rams were tied in stalls throughout the experiment, and had free access to water and salt block. During the period 4, one BB ram refused to eat L pellets and was kept on the diet C.

Rams were fed the hay *ad libitum* two times per day at 10-h interval (7 h and 17 h) and TRP pellets were offered at 7 h. The hay:TRP ratio was maintained as close as possible to the targeted ratio by adjusting the amount of hay and TRP offered daily based on the composition of the refusals of the previous day.

Measurements

Rams were individually weighed at the beginning and the end of each period. Intake and apparent digestibility were determined from the daily weighing of the amounts of diet offered and refused and of the faeces during 5 consecutive days. Cotton bags were glued to the hindquarters of the animals during the measurement period to collect faeces unsoiled by urine.

Five 200-g samples of the offered feeds and refusals, and five faecal samples (10% of the daily excretion) were taken for constituting representative samples for chemical analysis. Daily urinary output was also recorded. Urine was collected daily in 10-L drums containing sulphuric acid (2.5 vol 10% H₂SO₄ per 100 vol urine), and daily samples of urine were pooled before N determination.

Simultaneously with faeces collection, enteric CH₄ emission was measured over 5 consecutive days. The sulphur hexafluoride (SF₆) tracer technique (Johnson et al., 1994) was used as described by Martin et al. (2008). Briefly, brass permeation tubes (12.5 mm × 40 mm i.d.), weighing about 32 g, were loaded with about 600 mg of SF₆ gas (Air Liquide, Mitry-Mory, France) while in liquid N₂. They were then calibrated by bi-weekly weighing for a 10-week period. Permeation rate of SF₆ from the tubes was 1.015 ± 0.038 mg/d. A calibrated permeation tube was introduced orally into the rumen of each ram one week before the first experimental period and remained in the rumen throughout the experiment. Representative breath samples from each ram were collected in pre-evacuated (-0.8 atm) polyvinyl chloride 0.7-L cylindrical collection devices by means of capillary and Teflon tubing fitted to a halter. The collection devices were placed at the top of the animal stall and changed every 24 h before the morning feeding. Background concentrations of gases were measured daily in ambient air samples collected in a device placed in the barn with a good natural ventilation. The SF₆ and CH₄ gases were determined upon receipt of samples

to the analytical laboratory (between one to two weeks after the last sampling of each period).

Chemical analyses and analytical procedures

Dry matter (DM) content of fresh forage, refusals and faeces were determined by drying in a forced-draught oven at 60°C until constant weight. Samples for chemical analyses were dried under the same conditions. Diet and faeces samples were milled through a 1 mm screen (Reich hammer mill, Haan Germany) prior to analysis. Organic matter (OM) and N analyses were performed according to AOAC (1990, Methods 923.3 and 992.15, respectively for OM and N. Lyophilised faecal samples were analysed for ash and N, and fresh samples of urine for N by the same methods as for diets. Crude protein (CP) was estimated as $N \times 6.25$. Cell wall components [neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF) and acid detergent lignin (ADL)] in diet and faecal samples were determined as described by Van Soest et al. (1991) using a sequential procedure (AOAC, 2006, Methods 200.04 and 973.18, respectively for NDF and ADF + ADL). Condensed tannins were extracted in an ultrasonic bath with a 70% (vol/vol) aqueous acetone solution (Giner-Chavez et al., 1997) and isolated with Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). Condensed tannins content was determined using the vanillin–H₂SO₄ method according to Laurent (1975). A 70% (vol/vol) H₂SO₄ solution containing 1% vanillin (wt/vol) was added to the methanolic extract of the plant, and absorbance was measured at 500 nm. Concentrations were determined using as standard: 1) a commercial tannin extract (quebracho) to rank plants according to a well-known standard and 2) individual extracts of each plant for a more accurate determination of tannin concentration. An individual calibration curve was prepared from CT extracted from each plant, so that the tannin concentration of each plant was determined using its own standard.

Concentrations of SF₆ and CH₄ in breath and ambient air samples were determined by gas chromatography. A gas chromatograph (CP-9003, Varian-Chrompack, les Ulis, France) fitted with an electron capture detector and a Molecular Sieve 0.5 nm column maintained at 60 °C was used for the SF₆ analyses. Another gas chromatograph (Autosystem XL, Perkin Elmer Instruments, Courtaboeuf, France) fitted with a flame ionization detector and a Porapak N 80-100 mesh column (3 m × 3.2 mm i.d.; Alltech France Templemars, France) maintained at 60 °C, was used for determination of CH₄. The carrier gas used was

N₂ (30 mL/min) for the SF₆, and He (40 mL/min) for the CH₄. Chromatographic analyses were performed after calibration with standard gases (Air Liquide, Mitry-Mory, France) for SF₆ (202 ppt) and CH₄ (95.7 ppm). Daily CH₄ production was calculated using the permeation rate of SF₆ and the concentrations above the background of SF₆ and CH₄ in the breath sample:

$$\text{CH}_4 \text{ (g/d)} = \text{SF}_6 \text{ permeation rate (g/d)} \times [\text{CH}_4]/[\text{SF}_6]$$

Statistical analysis

Means corresponded to 5 days of measurement for intake, total tract digestibility, N balance, and CH₄ emission. Statistical analysis was performed using the MIXED procedure of SAS 9.2 release (2008). Diet, breed and period were fixed effects, and animal was a random effect nested within breed. The experimental unit was the animal. Difference between each TRP and C was tested with Dunnett's test. Additionally, the Tukey's test was used for comparison between the 4 means. Results of Dunnett's test are given in tables; results of Tukey's test are mentioned in text when relevant. Values are expressed as least square means and standard error of the mean (SEM). Statistical differences were declared significant at $p \leq 0.05$.

Results

Chemical composition

The chemical composition of control hay and TRPs is presented in Table 1. Tannin-rich plants had higher CP content and, although there were highly lignified, they were less rich in fibre (NDF and ADF) than C hay. Lignin content in TRPs was 3 to 4 times higher than for C hay. The highest content of lignin was observed for M (219 g/kg). Level of CT was similar for L and M when expressed using quebracho standard, L had a higher CT content than M but when it was expressed using their own standards, M had a higher CT content than L. In contrast, G had a CT content that was 2 to 4 times lower, depending on the standard, than L or M Intake and total tract digestibility.

Dry matter intake (g/kg LW, g/d) was lower ($p < 0.05$) with the C hay diet than with TRP diets (Table 2). Within TRPs, intake was higher with M diet than with G and L (Tukey's

test). Dry matter, OM and fibre intake, expressed in g/kg BW or g/d, was lower ($p < 0.05$) for T than BB.

Dry matter, OM, and ADF digestibility did not differ among diets (Table 2). However, NDF digestibility was lower for the TRP diets than for C diet. Compared to C diet, CP digestibility was lower for M diet, whereas no difference was observed between C, L and G diets. Whatever the diet component, there was no difference between animal genotypes in DM, OM or fibre digestibility, and interactions between diets and genotypes were not significant for any parameter.

Nitrogen partition

Nitrogen intake was higher for the TRP diets than for C diet ($p < 0.05$) (Table 3). Fecal N was higher in the 3 TRP diets than in C diet, and higher for M than for G, but did not differ between G and L, and between L and M (Tukey's test). Average ratio between faecal N and N intake was 39, 33, 39 and 47% for C, G, L and M diets, respectively. Tannin-rich plants decreased the urinary N output, but only G and L diets resulted in less urinary N than C diet, without difference between G and L diets (Tukey's test). Average ratio between urinary N and N intake was 47, 28, 28 and 21% for C, G, L and M diets, respectively. N balance was higher for TRPs than C diet without differences among G, L and M diets. The N intake, fecal N, urinary N output and retained N were lower for T than for BB.

Methane emission

Although daily CH₄ emission per ram was similar between diets (Table 4), CH₄ emission (g/kg DMI or g/kg OMI) was reduced with G, L, and M compared to the C diet. L and M had the lowest emissions and were also lower than for diet G (Tukey's test). Methane emission expressed as g / kg DDMI or g / kg DOMI was also reduced with L and M; emission did not differ among these later 2 diets (Tukey's test). Daily CH₄ emission per ram was not different between animal genotypes, but when expressed relative to DMI, OMI, DDMI or DOMI, CH₄ was lower ($p < 0.05$) for BB than for T. No interaction between diet and breed was observed.

Discussion

Chemical composition of tannin-rich plants

Tropical plants are known to contain significant amounts of plant secondary metabolites like CT that are able to suppress methanogenesis and decrease feed intake and digestibility. Chemical composition of the TRP used in this work was in the range of most published data (Meale et al., 2012; Yadete, 2014; Oduguwa et al., 2013). However, lignin content is higher than some published values for *L. leucocephala* and *G. sepium* but is in the same order of magnitude as values reported by Cudjoe and Mlambo (2014) for the same plants. Generally, reported CT contents are variable for a same plant; the CT contents of *L. leucocephala* and *G. sepium* were higher in the present study than in the work by Oduguwa et al., 2013. As well, CT content of *M. esculenta* was higher in this study than reported by Marie-Magdeleine et al. (2010) for the same geographical area. A possible explanation is that CT concentrations vary considerably according to environmental conditions, vegetation conditions and physiological properties of plants. Tannin-rich plants used in this experiment can differ in the type of CT as illustrated by differences in the ranking between *L. leucocephala* and *M. esculenta* depending on the CT standard used (quebracho vs plant CT). *Glyricidia sepium* contained less CT than the other two TRPs used in this experiment. However, Bhatta et al (2012) reported that *G. sepium* contains more hydrolysable tannins than CT, contrary to *L. leucocephala*.

Effects of CT on feed intake, digestibility and nitrogen balance

Diets containing CT are often associated to decreases in voluntary feed intake. This effect has been attributed to a deficiency in degradable protein reaching the rumen for an adequate microbial growth (Waghorn et al., 2008b) and also to a reduction in palatability (Landau et al., 2000). Our results differ from published data that often describe a reduction or no effect on intake of CT (Bhatta et al., 2002; Animut et al., 2008b). In our case, DM intake increased with increasing CT content, as in a study by Carulla et al. (2005) in which feed intake in sheep increased when tannins extract from *A. mearnsii* were included in the diet. The 3 TRP tested in the present study were given in pellet form, which may have masked their astringency and thus enhanced intake. In addition, the pelleting of forages increases their intake (Minson and Milford, 1968).

The addition of TRP had no effect on the digestibility of all investigated feed fractions except for that of NDF and CP. In the literature, similar amount of CT did not change (Carulla et al., 2005; Hariadi and Santoso, 2010) or decreased feed digestibility (Animut et al., 2008a, b; Grainger et al., 2009). Lower NDF digestibility can be explained by 3 factors: 1) the high level of lignin in tested TRP, 2) CT may depress fibre digestion by complexing with lignocellulose thus preventing microbial digestion, 3) CT can directly inhibit cellulolytic bacteria, activity of fibrolytic enzymes or both, which may adversely affect fibre degradation. In the present study, a direct inhibition of cellulolytic bacteria is not likely as concentration of three of them (*Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*) was not affected (Rira et al., 2015).

In the present study, M diet resulted in decreased protein digestibility compared to other diets. The general effect of tannins on protein digestion in the rumen is the formation of a tannin-protein complex preventing protein to be degraded by rumen microbes (Mueller-Harvey, 2006). A decrease in protein apparent digestibility when CT are consumed may be due to 1) a decrease of the amounts of protein digested in the rumen and increase of the amounts of protein available for digestion in the small intestine and/or 2) a lower intestinal digestibility when the tannin-protein complex is not completely broken down in the abomasum (Mueller-Harvey, 2006). However, the action of TC is not homogeneous and could partly depend on their structural diversity (procyanidin / prodelphinidin ratio for example) (Mueller-Harvey, 2006). The decrease in protein apparent digestibility may have happened for M diet, due to tannin specificity of *M. esculenta* (*Marie Magdeleine* unpublished data) and/or and a larger cell wall lignification. Perez-Maldonado and Norton (1996) also showed that faecal N increased by 14% when sheep and goats were fed tropical TRP. In the same way, Carulla et al. (2005) and Dschaak et al. (2011) suggest a shift in N excretion resulting in less urinary and more faecal N when diet was supplemented with CT extract. In our experiment, although urinary N daily output increased for G and L diets, urinary N as a percentage of N intake decreased from 47% for C diet down to 21-28% for TRP diets. Our results showed that nitrogen balance was positive with TRP addition, and this effect was not related to CT concentration. The positive nitrogen balance was not reflected in rams' weight gain. This may be explained by losses in faeces and urine. It can be noted that Widiawati et al. (2013) also reported a positive N balance for *L. Leucocephala* and *G. sepium* compared to a grass diet.

Anti-methanogenic potential of the tested TRP

Tannin rich plants were used in numerous *in vivo* and *in vitro* studies on CH₄ mitigation, especially *L. leucocephala* and to a lesser degree *G. sepium* (Soliva et al., 2008., Jayanegara et al., 2012, Soltan et al., 2012., Soltan et al., 2013). In contrast, the anti-methanogen property of *Manihot esculenta* on animals was not reported before. Our results were consistent with most published data, among others Rira et al, (2015) with the same TRP assayed *in vitro*. Soltan et al. (2013) showed that *L. leucocephala* inhibited CH₄ emission both *in vitro* and *in vivo*. Factors responsible for effects of CT on ruminal CH₄ emission per kg DM are very diverse: decreased fibre digestion, decreased number of cellulolytic bacteria and methanogens (McSweeney et al., 2001), and/or impaired substrate adhesion by fibrolytic microbes (Bento et al., 2005a).

In the present study, reduction of CH₄ emission was probably partly the result of the decrease in ruminal fibre digestion due to the formation of CT-cellulose complexes that are resistant to enzymatic digestion (Silanikove et al., 1996). This is suggested by the absence of significant effect on rumen acetate-to-propionate ratio, cellulolytic bacteria and methanogens reported by Rira et al. (2015). Nevertheless, the overall linear relationship between CH₄ emission per kg DM and methanogens population is significant (p=0.03, Fig.1).

Reducing the emission of methane with TRP could also be explained by the increase of intake and accordingly that of transit time of the particles in the rumen (Johnson and Johnson, 1995). Methane losses expressed as the proportion of gross energy intake declined by 1.6 percentage units for each multiple of intake. In addition, Bonsi et al. (1994) noted that supplementation with *L. leucocephala* leaves increased particulate passage rate when added to straw. This may have occurred in our experiment where the leaf part of TRP was given to animals, although C hay has a higher passage rate than straw, but it is likely that the distribution as pellets after grinding resulted in a more rapid passage of particles out of the rumen and thus in higher intake (Minson and Milford, 1968; Owens and Goetsch, 1986). The differences between TRPs on methane emission reduction could be partly explained by their structure (CT *versus* HT). Both CT and HT have an anti-methanogenic activity (Jayanegara et al., 2011). However, there is an

apparent lower magnitude in anti-methanogenic effect with HT, compared to CT (Jayanegara et al, 2011).

Rira et al. (2015) also indicate a linear relationship between CT content and CH₄ reduction *in vitro*. This tendency is confirmed *in vivo* as CH₄ reduction induced by CT contained in G diet was weaker than for L and M diets (Fig. 2). This latter TRP shows a strong effect on CH₄ emission. It is also necessary to indicate that CT effects should be considered not only by the amount present but also by the size and weight of molecules (Patra and Saxena, 2009; Huang et al., 2010), the number of linkage sites (Mueller-Harvey, 2006), and interaction with other compounds (fibre, proteins, and other secondary metabolites). Indeed, the expression of CT by two different standards (Figure 2) results in a variation in diet ranking for CH₄ emission between L and M; that is why it is necessary to remain careful in interpretation on CT contents of plants.

Methane emission per kg DM was higher for T than BB. This can be partially explained by a lower DM intake for T than for BB. Although breed variation is considered a minor factor in CH₄ emissions (Fraser et al., 2014), the difference between T and BB could be due to a better adaptation of BB to tropical plants reflected by a higher intake. The effect of the contribution of CT on CH₄ emission in this essay can be related on one hand to the direct effect of CT, and on the other hand to high levels of ingestion, what is not the case in other reported essays

Conclusion

An increase in intake was observed with animals consuming TRPs. This result is likely related to their mode of administration as pellets which can be a new method of TRP supply. Condensed tannins contained in TRPs had minor negative effects on overall animal digestion. In contrast a significant decrease in methane emission is observed when the animals consumed these TRPs, M and L leaves in particular. Before field application, it is necessary to confirm the efficacy of TRPs as pellets to reduce the emission of methane and feed the animals. Moreover, further studies should be conducted with pelleted versus un-pelleted TRPs to differentiate and understanding whether the effect pelleted TRPs comes from CT or the physical presentation.

Acknowledgements

This study was completed with the financial support of the EU FP7 AnimalChange project, of the French National Research Agency (ANR) project ANR-09-STRA-01 EPAD, of Region Guadeloupe and other European funding: FEOGA, FEDER, FSE. The authors thank Tatiana Silou Etienne, Frédéric Pommier and Pierre Justin Dumoulin for their technical assistance.

References

- Animut, G.; Puchala, R.; Goetsch, A.L.; Patra, A.K.; Sahlou, T.; Varel, V.H.; Wells, J., 2008a: Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannin from lespedeza. *Animal Feed Science and Technology* **144**, 212-227.
- Animut, G.; Puchala, R.; Goetsch, A.L.; Patra, A.K.; Sahlou, T.; Varel, V.H.; Wells, J., 2008b: Methane emission by goats consuming different sources of condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology* **144**, 228-241.
- AOAC., 1990: Official Methods for Analysis. Association of Official Analysis Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- AOAC., 2006: Official Methods for Analysis. Association of Official Analysis Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- Beauchemin, K. A.; McAllister, T. A.; McGinn, S. M., 2009: Dietary mitigation of enteric methane from cattle. CAB Reviews: *Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* **4** (035), 18 pp.
- Bento, M.H.L.; Acamovic, T.; Makkar, H.P.S., 2005: The influence of tannin, pectin, and polyethylene glycol on attachment of 15N-labeled rumen microorganisms to cellulose. *Animal Feed Science and Technology* **122**, 41-57.
- Bhatta, R.; Shinde, A.K.; Vaithiyathan, S.; Sankhyan, S.K.; Verma D.L., 2002: Effect of Polyethylene glycol-6000 on nutrient intake, digestion and growth of kids browsing *Prosopis cineraria*. *Animal Feed Science and Technology* **101**, 45-54.

- Bonsi, M. L. K.; Osuji, P. O.; Nsahlai, I. V.; Tuah, A. K., 1994: Graded levels of *Sesbania sesban* and *Leucaena leucocephala* as supplements to teff straw given to Ethiopian Menz sheep. *Animal Production* **59**, 235-244.
- Carulla, J.E.; Kreuzer, M.; Machmuller, A.; Hess, H.D., 2005: Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* **56**, 961-970.
- Cudjoe, N.; Mlambo, V., 2014: Buffer nitrogen solubility, *in vitro* ruminal partitioning of nitrogen and *in vitro* ruminal biological activity of tannins in leaves of four fodder tree species. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **98**: 722-730.
- Dschaak, C.M.; Williams, C.M.; Holt, M.S.; Eun, J.S.; Young, A.J.; Min, B. R., 2011: Effects of supplementing condensed tannin extract on intake, digestion, ruminal fermentation, and milk production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **94**, 2508-2519.
- Fraser, M. D.; Fleming H. R.; Moorby, J. M., 2014: Traditional vs Modern: Role of Breed Type in Determining Enteric Methane Emissions from Cattle Grazing as Part of Contrasting Grassland-Based Systems. *PLoS ONE* **9(9)**, e107861.
- Gerber, P. J.; Steinfeld, H.; Henderson, B.; Mottet, A.; Opio, C.; Dijkman, J.; Falcucci, A.; Tempio, G., 2013: Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome. E-ISBN 978-92-5-107921-8.
- Giner-Chavez, B.I.; Van Soest P. J.; Robertson J. B.; Lascano, C.; Reed J. D.; Pell, A.N., 1997: A method for isolating condensed tannins from crude plant extracts with trivalent ytterbium. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **74**, 359-368.
- Grainger, C.; Clarke, T.; Auldist, M. J.; Beauchemin, K. A.; McGinn S. M.; Waghorn, G. C.; Eckard, R.J., 2009: Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science* **89**, 241-251.

- Hariadi, B. T.; Santoso, B., 2010: Evaluation of tropical plants containing tannin on in vitro methanogenesis and fermentation parameters using rumen fluid. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**, 456-461.
- Hristov, A.N.; Oh, J.; Firkins, J.L.; Dijkstra, J.; Kebreab, E.; Waghorn, G.; Makkar H.P.S.; Adesogan, A.T.; Wang, W.; Lee, C.; Gerber, P.J.; Henderson, B.; Tricarico, J.M., 2013. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science* **91**, 5045-5069.
- Huang, XD.; Liang, JB.; Tan, HY.; Yahya, R.; Khamseekhiew, B.; Ho, Y. W., 2010: Molecular weight and protein binding affinity of Leucaena condensed tannins and their effects on in vitro fermentation parameters. *Animal Feed Science and Technology* **159**, 81-87.
- Jayanegara, A.; Leiber, F.; Kreuzer, M., 2012: Meta-analysis of the relationship between dietary tannins level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **96**, 365-375.
- Jayanegara, A.; Wina, E.; Soliva, CR.; Marquardt, 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. *Animal Feed Science and Technology* **163**, 231-243.
- Johnson, K. A.; Huyler, M.; Westberg, H.; Lamb, B.; Zimmerman, P., 1994: Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ tracer technique. *Environmental Science and Technology* **28**, 359-362.
- Johnson, K.A.; Johnson, D.E., 1995: Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* **73**, 2483-2492.
- 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 Animal Behaviour Science* **69**, 199-213.

- Laurent, S., 1975 : Etude comparative de différentes méthodes d'extraction et de dosage des tannins chez quelques ptéridophytes. (In French.) *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* **83**, 735-752.
- Martin, C.; Rouel, J.; Jouany, J.P.; Doreau, M.; Chilliard, Y., 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows with crude linseed, extruded linseed or linseed oil. *Journal of Animal Science* **86**, 2642-2650.
- Marie-Magdeleine, C.; Mahieu, M.; Philibert, L.; Despois, P.; Archimède, H., 2010. Effect of cassava (*Manihot esculenta*) foliage on nutrition, parasite infection and growth of lambs. *Small Ruminant Research* **93**, 10-18.
- McSweeney, C. S.; Palmer, B.; McNeill, D. M.; Krause, D.O., 2001: Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* **91**, 83-93.
- Meale, S. J.; Chaves, A. V.; Baah, J.; McAllister, T. A., 2012: Methane production of different forages in *in vitro* ruminal fermentation. *Asian Australian Journal of Animal Science* **25**, 86-91.
- Minson, D.J.; Milford, R., 1968 : The nutritional value of four tropical grasses when fed as chaff and pellets to sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* **8**, 270-276.
- 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.
- Oduguwa, B.O.; Oni, A.O.; Arigbede, O.M.; Adesunbola, J.O.; Sudekum, K.H., 2013: Feeding potential of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) peels ensiled with *Leucaena leucocephala* and *Gliricidia sepium* assessed with West African dwarf goats. *Tropical Animal Health and Production* **45**, 1363-1368.
- Owens, F.N.; Goetsch, A. L., 1986: Digesta passage and microbial protein synthesis. In: Milligan, L.P., Grovum, W.L., Dobson, A. (Eds.), *Control of Digestion and Metabolism in ruminants*. Prentice-Hall, NJ, pp. 196-226.

- Perez-Maldonado, R.A.; Norton, B.W., 1996. The effects of condensed tannins from *Desmodium intortum* and *Calliandra calothyrsus* on protein and carbohydrate digestion in sheep and goats. *British Journal of Nutrition* **76**, 515-533.
- Patra, A. K.; Saxena, J., 2009: Dietary phytochemicals as rumen modifiers: A review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek* **96**, 363-375.
- Reid, J.D., 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science* **73**, 1516-1528.
- Rira, M.; Morgavi, D. P.; Archimède, H.; Marie-Magdeleine, C.; Popova, M.; Bousseboua, H.; Doreau, M., 2015: Potential of tannin-rich plants for modulating ruminal microbes and ruminal fermentation in sheep. *Journal of Animal Science* **93**, 334-347.
- SAS., 2008: Statistical Analysis System Release 8.01.SAS Institute INC., Cary, NC.
- Soliva, C. R.; Zeleke, A. B.; Clément, C.; Hess, H. D.; Fievez, V.; Kreuzer, M., 2008: In vitro screening of various tropical foliage, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* **147**, 53-71.
- Silanikove, N.; Gilboa, N.; Nir, I.; Perevolotsky, A.; Nitsan, Z., 1996: Effect of a daily supplementation of polyethylene glycol on intake and digestion of tannin-containing leaves (*Quercus calliprinos*, *Pistacia lentiscus*, and *Ceratonia siliqua*) by goats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 199-205.
- Soltan, Y.; Morsy, AS.; Sallam, S. M. A.; Louvandini, H.; Abdalla, AL., 2012: Comparative in vitro evaluation of forage legumes (prosopis, acacia, atriplex, and leucaena) on ruminal fermentation and methanogenesis. *Journal of Animal and Feed Sciences* **21**, 759-772.
- Soltan, Y.; Morsy, A. S.; Sallam, S. M. A.; Lucas, R. C.; Louvandini, H.; Kreuzer, M.; Abdalla, A. L., 2013: Contribution of condensed tannins and mimosine to the methane mitigation caused by feeding *Leucaena leucocephala*. *Archives of Animal Nutrition* **67**, 169-184.

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.

Widiawati, Y.; Winugroho, M.; Teleni, E., 2013: Nitrogen kinetics in growing sheep consuming *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium* or *Calliandra calothyrsus* as a sole diet. *Indonesian Journal of Animal and Veterinary Science* **17**, 215-220.

Yadete, G, K., 2014: Effect of wheat straw urea treatment and *Leucaena leucocephala* foliage hay supplementation on intake, digestibility, nitrogen balance and growth of lambs. *International Journal of Livestock Production* **6**, 88-96.

Table 1 Chemical composition [g/kg dry matter (DM)] of control and tannin-rich plants

| Attributes | <i>Control</i> | <i>Gliricidia</i> | <i>Leucaena</i> | <i>Manihot</i> |
|--|----------------|-------------------|---------------------|------------------|
| | <i>Hay</i> | <i>Sepium</i> | <i>leucocephala</i> | <i>esculenta</i> |
| Organic matter | 924 | 915 | 913 | 910 |
| Crude protein | 108 | 262 | 266 | 208 |
| Neutral detergent fibre | 764 | 387 | 387 | 430 |
| Acid detergent fibre | 402 | 283 | 252 | 345 |
| Acid detergent lignin | 48 | 184 | 167 | 219 |
| Condensed tannins | | | | |
| Using quebracho as standard | ND | 18 | 89 | 53 |
| Using extracts from each plant as standard | NA | 39 | 75 | 92 |

ND: not detected; NA: not analysed

Table 2 Effect of tropical tannin-rich plants on intake and total tract digestibility in Texel and Blackbelly sheep

| Attributes | Diet | | | | Breed | | | p value | | |
|-------------------------------|-------|---------|---------|---------|--------|-------|------|---------|-------|-------------|
| | C | G | L | M | BB | T | SEM | Diet | Breed | Interaction |
| Feed intake | | | | | | | | | | |
| Dry matter g/kg BW | 16.4 | 22.6* | 25.2* | 28.6* | 24.7 | 21.7 | 1.86 | 0.001 | 0.042 | 0.464 |
| Organic matter g/kg BW | 10.7 | 13.6* | 15.5b* | 17.5* | 15.4 | 13.2 | 1.32 | 0.003 | 0.032 | 0.335 |
| Dry matter g /d | 741.6 | 1069.1* | 1146.3* | 1291.2* | 1250.1 | 874.0 | 88.2 | 0.001 | 0.001 | 0.245 |
| Organic matter g/d | 685.6 | 984.1* | 1053.7* | 1185.7* | 1150.1 | 804.1 | 81.3 | 0.001 | 0.001 | 0.245 |
| Neutral detergent fibre g/d | 566.7 | 650.1 | 683.3 | 797.6* | 798.9 | 550.1 | 60.5 | 0.007 | 0.001 | 0.324 |
| Acid detergent fibre g/d | 298.3 | 377.2* | 384.2* | 487.1* | 456.8 | 316.6 | 32.7 | 0.001 | 0.001 | 0.215 |
| Crude protein g/d | 80.2 | 184.1* | 204.8* | 196.0* | 193.7 | 138.8 | 13.7 | 0.001 | 0.001 | 0.234 |
| Total tract digestibility (%) | | | | | | | | | | |
| Dry matter | 69.9 | 62.8 | 65.3 | 64.7 | 66.4 | 64.9 | 3.29 | 0.197 | 0.656 | 0.889 |
| Organic matter | 71.2 | 65.1 | 66.6 | 65.8 | 67.9 | 66.5 | 3.13 | 0.224 | 0.678 | 0.889 |
| Neutral detergent fibre | 76.2 | 64.3* | 66.9* | 66.8* | 69.3 | 67.7 | 3.34 | 0.012 | 0.633 | 0.775 |
| Acid detergent fibre | 74.6 | 57.1 | 59.9 | 59.7 | 63.9 | 61.7 | 3.96 | 0.224 | 0.678 | 0.660 |
| Crude protein | 62.4 | 66.9 | 59.9 | 51.7* | 61.6 | 58.8 | 4.22 | 0.018 | 0.540 | 0.707 |

C, control hay; G, diet containing *G. sepium*; L, diet containing *L. leucocephala*; M, diet containing *M. esculenta*

BW, body weight ; BB, Blackbelly ; T, Texel; d, day

* Within a row, indicates differences from control diet (p<0.05; Dunnett's test)

Table 3 Effect of tropical tannin-rich plants on nitrogen balance in Texel and Blackbelly sheep

| Attributes | Diet | | | | Breed | | | p value | | |
|-----------------|------|-------|-------|-------|-------|------|------|---------|-------|-------------|
| | C | G | L | M | BB | T | SEM | Diet | Breed | Interaction |
| N intake (g/d) | 12.8 | 29.5* | 32.8* | 31.4* | 30.9 | 22.2 | 2.19 | 0.001 | 0.001 | 0.234 |
| Fecal N (g/d) | 5.0 | 9.6* | 12.8* | 14.7* | 11.8 | 9.3 | 1.56 | 0.001 | 0.07 | 0.877 |
| Urinary N (g/d) | 6.0 | 8.2* | 9.3* | 6.5 | 8.7 | 6.3 | 0.98 | 0.023 | 0.063 | 0.458 |
| N balance (g/d) | 1.8 | 11.7* | 10.7* | 10.1* | 10.5 | 6.6 | 2.03 | 0.006 | 0.055 | 0.563 |

C, control hay; G, diet containing *G. sepium*; L, diet containing *L. leucocephala*; M, diet containing *M. esculenta*

BB, Blackbelly; T, Texel; d, day

* Within a row, indicates differences from control diet (p<0.05; Dunnett's test)

Table 4 Effect of tropical tannin-rich plants on methane production in Texel and Blackbelly she

| Attributes | Diet | | | | Breed | | | p value | | |
|-----------------------------|------|-------|-------|-------|-------|------|------|---------|-------|-------------|
| | C | G | L | M | BB | T | SEM | Diet | Breed | Interaction |
| CH ₄ (g/d) | 22.4 | 27.8 | 23.2 | 24.3 | 25.5 | 23.4 | 6.69 | 0.223 | 0.490 | 0.267 |
| CH ₄ (g/kg DMI) | 31.0 | 26.9* | 20.1* | 19.8* | 21.5 | 27.3 | 1.84 | 0.001 | 0.027 | 0.215 |
| CH ₄ (g/kg OMI) | 33.6 | 29.2* | 21.8* | 21.5* | 23.4 | 29.7 | 1.99 | 0.001 | 0.026 | 0.210 |
| CH ₄ (g/kg DDMI) | 44.4 | 42.9 | 31.2* | 31.4* | 32.8 | 42.2 | 2.71 | 0.002 | 0.026 | 0.089 |
| CH ₄ (g/kg DOMI) | 47.1 | 44.9 | 33.3* | 33.5* | 34.7 | 44.7 | 2.84 | 0.002 | 0.027 | 0.081 |

C, control hay; G, diet containing *G. sepium*; L, diet containing *L. leucocephala*; M, diet containing *M. esculenta*

BB, Blackbelly ; T, Texel; DMI, dry matter intake; OMI, organic matter intake; DDMI, digestible dry matter intake; DOMI, digestible organic matter intake; d, day

* Within a row, indicates differences from control diet (p<0.05; Dunnett's test)

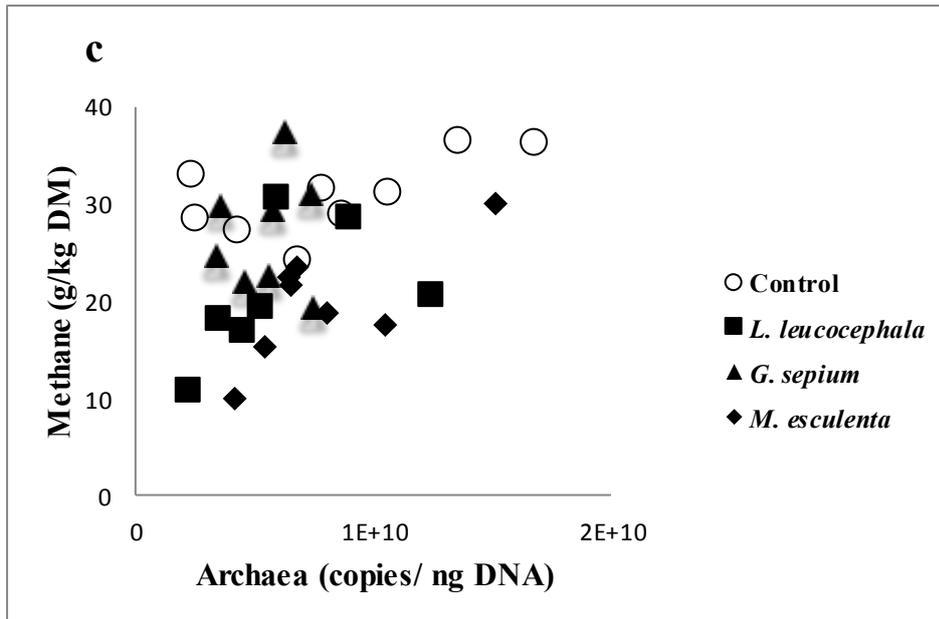


Figure 1. Relationship between methane emission and archaea population

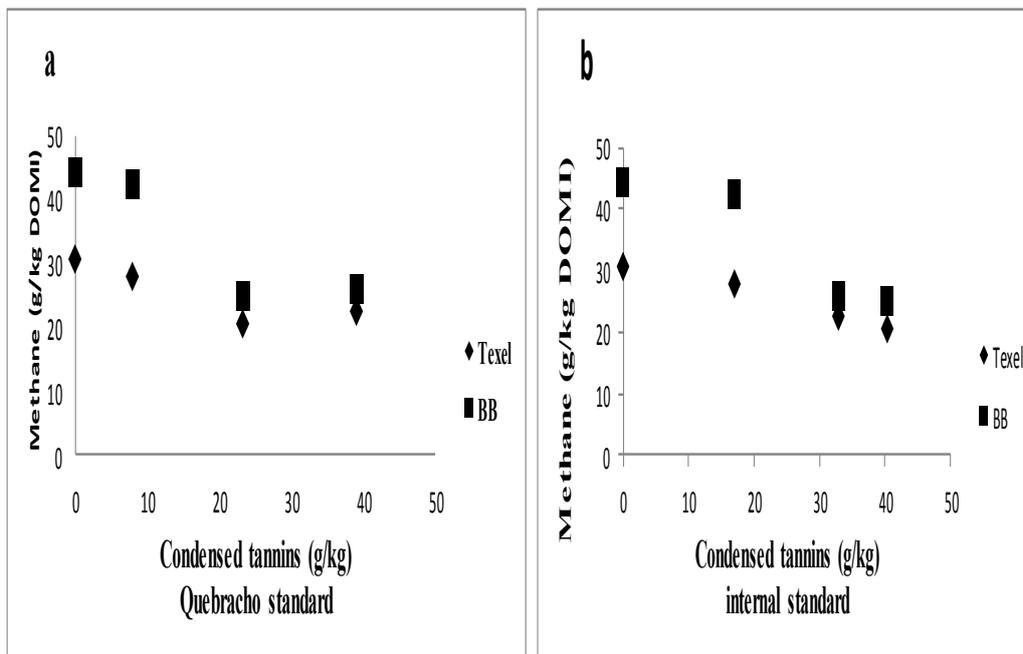


Figure 2. Relationship between methane emission and condensed tannins content in Texel and Blackbelly sheep

Internal standard means that standard used for condensed tannins determination in a plant was made of tannins extracted from the plant.

List of tables and figures

Table 1 Chemical composition [g/kg dry matter (DM)] of control and tannin-rich plants

Table 2 Effect of tropical tannin-rich plants on intake and total tract digestibility in Texel and Blackbelly sheep

Table 3 Effect of tropical tannin-rich plants on nitrogen balance in Texel and Blackbelly sheep

Table 4 Effect of tropical tannin-rich plants on methane production in Texel and Blackbelly sheep

Figure 1 Relationship between methane emission and archaea population

Figure 2 Relationship between methane emission and condensed tannins content in Texel and Blackbelly sheep

Chapitre III: Potentiel des plantes riches en tanins à moduler le microbiote et la fermentation ruminal chez les moutons

Avant propos

Parce qu'il existe des relations étroites entre l'efficacité de la fermentation des aliments dans le rumen et la méthanogénèse, les options d'atténuation comme l'utilisation des TC doivent être évaluées en termes d'efficacité sur le CH₄ et sur l'ensemble des fonctions du rumen et in fine sur le microbiote ruminal. La durabilité et la rentabilité des options d'atténuation proposées doivent être également prises en compte. Nos premiers résultats ont montré l'efficacité de trois plantes riches en TC : *G. sepium*, *L. leucocephala* et *M. esculenta* dans la mitigation de CH₄ avec un minimum d'effets négatifs sur l'ingestion et la digestibilité, mais leur mécanisme d'action n'est pas encore clair. Les TC sont supposés agir principalement sur les microorganismes du rumen et en particulier les archées méthanogènes. Cependant, leurs effets sur la méthanogénèse et sur le microbiote ruminal demeurent très controversés en raison de la variabilité des résultats obtenus.

L'étude présentée ci-dessous a comporté un essai *in vitro* conduit afin d'évaluer l'effet dose-réponse de ces trois plantes sur la fermentation ruminale et sur la production de CH₄ afin d'étudier la linéarité ou curvilinearité de la réponse. Elle a également visé la mise en évidence l'effet de la nature de la plante à même niveau d'inclusion, ce qui pourra servir à définir la dose optimale qui peut être recommandée pour l'utilisation de ces plantes dans le futur.

Ce chapitre présente également les données explicatives (fermentation et microbes) correspondant aux données de CH₄ du chapitre II, dans le cadre du même essai. Pour cette raison, les populations microbiennes du compartiment ruminal impliquées dans la méthanogénèse ont été appréhendées par des approches moléculaires afin d'accréditer ou d'infirmer la relation entre la méthanogénèse et les archées méthanogènes. Ainsi, la distribution des populations des bactéries et des archées méthanogènes en fonction du contenu en TC a été étudiée par la technique de PCR-DGGE. Enfin, la concentration des populations de bactéries et d'archées méthanogènes a été analysée par une quantification basée sur les gènes *rrs* et *mcrA*.

Les pages qui suivent exposent la publication présentant ces résultats; elle a été soumise en 2014 et publiée en 2015 dans la revue *Journal of Animal Science*.

Potential of tannin-rich plants for modulating ruminal microbes and ruminal fermentation in sheep¹

M. Rira,^{*,2} D. P. Morgavi,^{*} H. Archimède,[†]
C. Marie-Magdeleine,[†] M. Popova,[‡] H. Bousseboua,[‡] and M. Doreau^{*,3}

*INRA, UMR 1213 Herbivores, 63122 Saint-Genès Champanelle, France;

†INRA, Unité de Recherches Zootechniques, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, France;

and ‡Ecole Nationale Supérieure des Biotechnologies, Ali Mendjli, BP E66, 25100 Constantine, Algeria

ABSTRACT: The objective of this work was to study nutritional strategies for decreasing methane production by ruminants fed tropical diets, combining in vitro and in vivo methods. The in vitro approach was used to evaluate the dose effect of condensed tannins (CT) contained in leaves of *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala*, and *Manihot esculenta* (39, 75, and 92 g CT/kg DM, respectively) on methane production and ruminal fermentation characteristics. Tannin-rich plants (TRP) were incubated for 24 h alone or mixed with a natural grassland hay based on *Dichanthium* spp. (control plant), so that proportions of TRP were 0, 0.25, 0.5, 0.75, and 1.0. Methane production, VFA concentration, and fermented OM decreased with increased proportions of TRP. Numerical differences on methane production and VFA concentration among TRP sources may be due to differences in their CT content, with greater effects for *L. leucocephala* and *M. esculenta* than for *G. sepium*. Independently of TRP, the response to increasing doses of CT was linear for methane

production but quadratic for VFA concentration. As a result, at moderate tannin dose, methane decreased more than VFA. The in vivo trial was conducted to investigate the effect of TRP on different ruminal microbial populations. To this end, 8 rumen-cannulated sheep from 2 breeds (Texel and Blackbelly) were used in two 4 × 4 Latin square designs. Diets were fed ad libitum and were composed of the same feeds used for the in vitro trial: control plant alone or combined with pellets made from TRP leaves at 44% of the diet DM. Compared to TRP, concentration of *Ruminococcus flavefaciens* was greater for the control diet and concentration of *Ruminococcus albus* was least for the control diet. The methanogen population was greater for Texel than for Blackbelly. By contrast, TRP-containing diets did not affect protozoa or *Fibrobacter succinogenes* numbers. Hence, TRP showed potential for mitigating methane production by ruminants. These findings suggest that TRP fed as pellets could be used to decrease methane production.

Key words: methane, rumen microbial ecosystem, ruminal fermentation, sheep, tannin-rich plants, tropics

© 2015 American Society of Animal Science. All rights reserved. J. Anim. Sci. 2015.93:334–347
doi:10.2527/jas2014-7961

INTRODUCTION

It has been estimated that enteric methane (CH₄) accounts for 39% of greenhouse gas emissions by livestock supply chains (Gerber et al., 2013). In ruminants, CH₄ originates mainly from enteric fermentation. Research on mitigating CH₄ emissions from ruminants has received much attention, especially during the last decade (Martin et al., 2010). Some plant secondary compounds, in particular tannins, show potential for decreasing enteric CH₄ emissions

¹This research is part of the AnimalChange project funded by the European Community's FP7 Program. It was also supported by other EU funds (FEDER and FEADER) and by the Guadeloupe Region. The first author received a fellowship from the Algerian Ministry of Higher Education and Research.

²Present address: Ecole Nationale Supérieure des Biotechnologies, Ali Mendjli, BP E66, 25100 Constantine, Algeria.

³Corresponding author: michel.doreau@clermont.inra.fr

Received April 18, 2014.

Accepted October 21, 2014.

from ruminants (Jayanegara et al., 2012). Ruminants fed tropical forages containing tannins generally produce less CH_4 than when fed forages without tannins (Archimède et al., 2011). However, tannins are a diverse group of compounds, and information on the efficacy of different tannins contained in plants and their appropriate dose is still fragmentary.

The objectives of the present study were to investigate the effect of including, in a forage diet, 3 tropical tannin-rich plants (TRP) available in numerous countries in large amounts—*Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, and *Manihot esculenta*—on enteric CH_4 production and to evaluate their influence on amount of methanogens, protozoa, and total and main cellulolytic bacteria. For this purpose, 2 experiments were performed: an in vitro trial to evaluate the dose-response effect of these 3 plants on ruminal fermentation and CH_4 production and an in vivo trial to evaluate the effect of including these 3 plants as pellets in a forage diet, based on natural grassland hay, on ruminal fermentation and microbial populations. Replacing part of the diet by TRP in a pelleted form has not been investigated before for its effects on CH_4 production by ruminants, even though it may offer a valuable way to make practical use of TRP on a large scale.

MATERIALS AND METHODS

The in vivo study was performed in the French West Indies (Guadeloupe; 16.16 N, 61.30 W; 3,000 mm annual rainfall and temperatures range of between 21 and 25°C during the rainy season and 27 and 31°C during the dry season). The experiment took place during the rainy season from June to September 2012. The in vitro trial and the microbial ecosystem analyses of the in vivo trial were performed in France (metropolitan). These animals were treated in accordance with the guidelines and regulations for animal experimentation of the French Ministry of Agriculture and other applicable international guidelines for animal experimentation (Canadian Council on Animal Care, 1993).

Plant Origin and Chemical Characterization

Three TRP, *L. leucocephala*, *G. sepium*, and *M. esculenta*, were studied. Each resource was a mixture coming from collections on multiple sites placed on diversified clay soils (deep ferrallitic soils, allophane and halloysite soils, and vertisols). The soils were not fertilized. *Leucaena leucocephala* and *G. sepium* came from 9- to 12-mo-old fallow farmland and *M. esculenta* was collected from 12-mo-old plantations. The younger branches (stems and leaves), less than 6 mo old, of *L. leucocephala*, *G. sepium*, and *M. esculenta* were har-

vested and then sun dried for 2 d. The leaves with petioles were isolated from the stem, ground (through a 3-mm screen), and granulated with a GR150E system (Oliotechnology, Burgun, Wissembourg, France). The average size of the pellets was 12 mm long by 3 mm in diameter.

The forage used as control (Ctl) was hay from a 75-d regrowth of natural grassland based on *Dichanthium* spp. grown with irrigation and mineral fertilization (100 kg of mineral nitrogen $\cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{yr}^{-1}$) in Grande-Terre, Northeast Guadeloupe. Before feeding to animals, hay was coarsely chopped with a biomass chopper (Honda 8 HP overhead valve engine, Torrance, CA), resulting in a wide particle size range of approximately 20 to 50 mm in length.

All plant material that was analyzed was ground to pass through a 1-mm sieve and stored at 4°C for analysis according to the Association of Official Analytical Chemists (1990). Organic matter was determined by ashing at 550°C for 6 h (Association of Official Analytical Chemists [AOAC] method number 923.03). Crude protein was determined by the Dumas method (CP; $\text{N} \times 6.25$; AOAC method number 992.15). Cell wall components (NDF and ADF) were determined with residual ash (AOAC methods number 200.04 and 973.18). Condensed tannins (CT) were extracted in an ultrasonic bath with a 70% (vol/vol) aqueous acetone solution (Giner-Chavez et al., 1997) and isolated with Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). Condensed tannin content was determined using the vanillin- H_2SO_4 method according to Laurent (1975). A 70% (vol/vol) H_2SO_4 solution containing 1% vanillin (wt/vol) was added to the methanolic extract of the plant, and absorbance was measured at 500 nm. Concentrations were determined using as standard 1) a commercial tannin extract (quebracho) for all plants to rank plants according to tannin concentration and 2) individual extracts of each plant for a more accurate determination of tannin concentration. An individual calibration curve was prepared from CT extracted from each plant, so that the tannin concentration of each plant was determined using its own standard.

In Vitro Experiment

Incubation Procedure. The donor animals were 3 wethers of the Texel breed fitted with a ruminal cannula and weighing 61.5 ± 1.5 kg. They were fed 900 g daily of a hay diet (natural grassland based on *Dichanthium* spp. and grown in Guadeloupe) divided into equal amounts at 0700 and 1900 h and were adapted to this hay for 3 wk before the beginning of incubations.

Three series of 24-h incubations were performed and initiated at 3-d intervals. For each series, a homogenous

500-g sample of ruminal contents was obtained from each animal before morning feeding. Contents were strained through polyester cloth (250- μ m mesh aperture). The liquid phase from the 3 wethers was pooled in equal amounts and sent to the laboratory within 15 min after rumen sampling. Incubations were performed in 100-mL vials. Each incubation series comprised a blank without substrate and 13 vials containing 400 mg of substrate. Substrates were the Ctl, *L. leucocephala*, *G. sepium*, *M. esculenta*, and mixtures of the Ctl and each of the 3 TRP in ratios of 25:75, 50:50, and 75:25. Incubations were performed according to a procedure derived from Goering and Van Soest (1970) using 25 mL of buffer and 15 mL of strained rumen fluid. At the end of incubations, gas production was measured using a pressure transducer, and samples of gas (5 mL) were taken for analysis. Fermentor content was weighed and then centrifuged at $5,000 \times g$ for 10 min at 4°C. For VFA determination, 0.8 mL of filtrate was mixed with 0.5 mL of 4 mg/mL crotonic acid and 20 mg/mL metaphosphoric acid in 0.5 M HCl and frozen at -20°C until analysis. Ruminal liquid filtrate was sampled for VFA analysis as described by Morgavi et al. (2013). For ruminal ammonia (N-NH₃), 1 mL of supernatant was added to 0.1 mL of H₃PO₄ 5% (vol/vol) and frozen at -20°C until analysis.

Chemical Analyses and Calculations.

Gas composition was determined by gas liquid chromatography (Micro GC 3000A; Agilent Technologies, Les Ulis, France) within 2 h after sampling. Individual gas standards were used for calibration. Volatile fatty acids were analyzed by gas chromatography using crotonic acid as the internal standard on a CP 9002 Gas Chromatograph (CP 9002; Chrompack, Middelburg, Germany) using a wall-coated open-tubular fused silica column (0.25 mm i.d. by 25 m) coated with CP-wax 58 FFAP CB (Morgavi et al., 2013). Ruminal ammonia was determined colorimetrically using the automated phenol-hypochlorite method of Weatherburn (1967). Fermented OM (FOM; %) was calculated from VFA production according to a stoichiometric equation (Demeyer and Van Nevel, 1975):

$$\text{FOM} = 162(0.5 \text{ acetate} + 0.5 \text{ propionate} + \text{butyrate} + \text{valerate}) \times 40 / \text{OM introduced in the fermentor},$$

in which VFA are expressed in moles and 40 is the volume of liquid, in milliliters, in the fermentor.

Statistical Analyses. In a first step, an ANOVA that included effects of TRP source (*L. leucocephala*, *G. sepium*, or *M. esculenta*) and proportion of TRP (0, 25, 50, 75, or 100% of the mixture of Ctl hay and TRP source in the substrate) was performed. The values of the 3 runs

were averaged before being used for each TRP source and proportion. The GLM procedure of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) was used. The model was

$$Y = \mu + \text{Source}_i + \text{Proportion}_j + \epsilon,$$

in which *Y* is the dependent variable, μ is the overall mean, and ϵ is the error, *i* being the nature of the source (3 levels: *L. leucocephala*, *G. sepium* and *M. esculenta*) and *j* being the 5 levels of proportion: 0, 25, 50, 75 and 100% of the mixture of Ctl hay and TRP source in the substrate. Statistical differences were declared significant at $P \leq 0.05$.

In a second step, VFA and CH₄ production for all TRP and proportions were related to CT content of incubated substrates, determined either using quebracho extract or extracts from each TRP as standard. A covariance analysis was performed according to the model

$$Y = \mu + \text{Source}_i + a \text{Tannins} + b_i \text{Tannins} \times \text{Source}_i + \epsilon,$$

in which *Y* is the dependent variable, Tannins is the concentration in CT, Tannins \times Source is the interaction between tannin concentration and the source of TRP (*L. leucocephala*, *G. sepium*, or *M. esculenta*), μ is the overall mean, and ϵ the error, *a* and *b* being the coefficients of the model, and *i* being the nature of the source (3 levels: *L. leucocephala*, *G. sepium* and *M. esculenta*). Statistical differences were declared significant at $P \leq 0.05$. Then, polynomial regressions were tested using the GLM procedure of SAS between VFA concentration and CH₄ as dependent variables and tannin concentration as independent variable according to the model $Y = a + b \text{Tannins} + c \text{Tannins}^2 + \epsilon$, *a*, *b* and *c* being the coefficients of the equation. To provide more accurate estimates, the nonsignificant term was removed from the model.

Animals and Experimental Design. The research was performed during the rainy season at the experimental animal station of the INRA of the French West Indies (Petit-Bourg, Guadeloupe). Two sheep breeds were used, Texel (*n* = 4) of temperate origin and Blackbelly (*n* = 4) of tropical origin, in two 4 \times 4 Latin square designs, with 1 square per breed. Sheep were 2-yr-old rams. Their BW was 41.2 ± 3.9 kg for Texel and 51.2 ± 3.7 kg for Blackbelly sheep. Each was fitted with a ruminal cannula. Diets consisted of the same Ctl forage as in the in vitro study or in association with 3 treatments in which *L. leucocephala*, *G. sepium*, or *M. esculenta* were given as pellets at an average of 44% of the daily ration. Rams were adapted to each treatment for 21 d before ruminal sample collection and fed twice daily at 0700 and 1900 h. Animals had ad libitum access to forage. Rams were housed in a semiopen barn and had free access to water and salt block at all times.

Table 1. Oligonucleotides used as primers for PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and quantitative PCR (qPCR) analysis

| Oligonucleotides | Oligonucleotide sequences | Target | Amplicon length, bp | Use in | Primer references |
|------------------|---|---|---------------------|----------|----------------------------|
| 534R- | 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG | <i>rrs</i> bacteria | 193 | PCR-DGGE | Mnyzer et al., 1993 |
| 341F-GC | 5'-(GC)-CC TAC GGG AGG CAG CAG | | | | |
| <i>mcrA</i> t | 5'-TTC ATT GCR TAG TTW GGR TAG TT | <i>mcrA</i> methanogens | 460-490 | PCR-DGGE | Luton et al., 2002 |
| <i>mcrA</i> F-GC | 5'-(GC)-GGT GGT GTM GGA TTC ACA CAR TAY GCW ACA GC | | | | |
| <i>qmcA</i> -R | 5'-GBARGTCGWAUCCGTAGAATCC | <i>mcrA</i> methanogens | 140 | qPCR | Denman et al., 2007 |
| <i>qmcA</i> -F | 5'-TTCGGTGGATCD CARAGRGC | | | | |
| 799R2 | 5'-AACAGGATTAGATACCCCTG | <i>rrs</i> bacteria | 280 | qPCR | Edwards et al., 2007 |
| 520F | 5'-AGCAGCCGCGGTAAT | | | | |
| FS586-f | 5'-GTTCCGGAATTACTGGGCGTAAA | <i>rrs</i> <i>Fibrobacter succinogenes</i> | 121 | qPCR | Denman and McSweeney, 2006 |
| FS706-r | 5'-CGCCTGCCCCGAACTATC | | | | |
| RF96-f | 5'-CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG | <i>rrs</i> <i>Ruminococcus flavefaciens</i> | 132 | qPCR | Denman and McSweeney, 2006 |
| RF220-r | 5'-CGGTCCTGTATGTTATGAGGTTATACC | | | | |
| RA1281f | 5'-CCC TAA AAG CAG TCT TAG TTC G | <i>rrs</i> <i>Ruminococcus albus</i> | 175 | qPCR | Koike and Kobayashi, 2001 |
| RA1439r | 5'-CCT CCT TGC GGT TAG AAC A | | | | |

Ruminal Sampling. Ruminal content (approximately 200 g) samples were collected just before and 3 h after the morning meal and strained through polyester monofilament fabric (250-µm mesh aperture) to separate the liquid phase. The pH was immediately measured using a portable pH meter (CG837 Ag/AgCl electrode; Schott Geräte, Mainz, Germany). For VFA, ruminal fluid filtrate was collected and analysis was performed according to the above method.

For molecular analysis, approximately 30 g of ruminal content was diluted with 15 mL of ice-cold PBS (pH 6.8) and homogenized using a Polytron grinding mill (Kinematica GmbH, Steinhofhalde, Switzerland) for three 1-min cycles with 1-min intervals on ice. Approximately 0.5 g was transferred into 2-mL tubes and immediately stored at -80°C for DNA extraction. Three milliliters of ruminal fluid was added to 3 mL of methyl green formalin saline (MFS) solution (35 mL/L formaldehyde, 0.14 mM NaCl, and 0.92 mM methyl green) and stored in the dark at room temperature until protozoa were counted.

Deoxyribonucleic Acid Extraction and PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Total DNA was extracted from approximately 200 mg of frozen ruminal sample using the QIAamp DNA purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the protocol of Yu and Morrison (2004). The DNA concentration and quality were checked by the A260 and A280 absorbance ratio in a NanoQuant Plate on a spectrophotometer (Infinity; Tecan, Männedorf, Switzerland). The extracted DNA was diluted to 10 ng/µL and used as a template for PCR to amplify the *rrs* gene of total bacteria and the *mcrA* gene for methanogens group. The primers used are listed in Table 1. When PCR products were used for denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), forward primers included a guanine-cytosine clamp (approximately

40 nucleotides). All PCR reactions were performed in a T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) using the conditions described by Sadet et al. (2007) and Popova et al. (2011). Polymerase chain reaction products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gel (wt/vol) to check their size and estimate their concentration using a Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA).

For DGGE analysis, the amount of PCR product loaded on gels was adjusted to 100 ng for both bacterial *rrs* and methanogen *mcrA* genes. Gels had a 6 to 8 (wt/vol) polyacrylamide gradient and a denaturant gradient of 30 to 55% for *rrs* and 10 to 30% for *mcrA*. Electrophoresis was performed in 0.5x Tris - Acetic acid - EDTA buffer (TAE buffer 1x, 40 mM Tris base, 40 mM glacial acetic acid, and 1 mM EDTA) at 200 V and 60°C for 5 h. Gels were silver stained using a commercial kit (Bio-Rad Laboratories) and analyzed using GelCompar II (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Quantitative PCR. The quantitative PCR (qPCR) for total bacteria (*rrs* gene) and methanogens (*mcrA* gene) was accomplished according to Morgavi et al. (2013). The slope and efficiency for *rrs* and *mcrA* primers were -3.45 and 95.59% and -3.43 and 95.09%, respectively, with $R^2 > 0.99$ in both cases. The cellulolytic bacteria *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, and *Ruminococcus albus* were quantified with primers targeting the *rrs* gene (Koike and Kobayashi, 2001; Denman and McSweeney, 2006). The slope and efficiency for each primer pair was, respectively, -3.19 and 105.8%, -3.52 and 92.3%, and -3.54 and 91.5%. The qPCR efficiency with DNA samples was found to be similar to that obtained with the standard curves. For each ruminal content sample, results were expressed as the mean of 3 replicates in *rrs* or *mcrA* copies per gram of ruminal content.

Protozoa Counting. Ruminal fluid/MFS solutions were diluted in an equal volume of PBS before protozoa enumeration under a microscope (400x) in a Neubauer chamber (Dutscher, Brumath, France).

Statistical Analysis. Statistical analyses were performed using the mixed procedure of SAS with treatment, breed, treatment × breed interaction, and period as fixed effects and animal within breed as random effect according to the model

$$Y = \mu + \text{treatment}_i + \text{breed}_j + \text{treatment} \times \text{breed}_{ij} + \text{period}_k + \epsilon$$

i being the nature of treatment (4 levels: control, *L. leucocephala*, *G. sepium* and *M. esculenta*), *j* being the animal breed (2 levels, Texel and Blackbelly) and *k* being the period number (4 levels from 1 to 4)

Orthogonal contrasts were also determined, first between the Ctl diet vs. all TRP (*G. sepium*, *L. leucocephala*, and *M. esculenta*; contrast C1) and second between the Ctl diet and *L. leucocephala* and *M. esculenta* (contrast C2); this latter contrast was calculated because the tannin content of *G. sepium* is much less than that of *L. leucocephala* and *M. esculenta*. For total VFA and N-NH₃ concentrations, an additional analysis was made using DMI and digestible OM as covariate. Statistical differences were declared significant at $P \leq 0.05$.

RESULTS

Chemical Composition

The nutrient composition and tannin content of TRP are shown in Table 2. All the TRP had greater CP content than the Ctl, with the most CP in *L. leucocephala* and *G. sepium*. By contrast, NDF and ADF

Table 2. Chemical composition in grams per kilogram DM of control and tannin-rich plants¹

| Item | Ctl | LI | Gs | Ms |
|--|-----------------|-----|-----|-----|
| OM | 924 | 913 | 915 | 910 |
| CP | 108 | 266 | 262 | 208 |
| NDF | 764 | 387 | 387 | 430 |
| ADF | 402 | 252 | 283 | 345 |
| Condensed tannins | | | | |
| Using extracts from each plant as standard | NA ² | 75 | 39 | 92 |
| Using quebracho as standard | ND ² | 89 | 18 | 53 |

¹Ctl = control (natural grassland hay); LI = *Leucaena leucocephala*; Gs = *Gliricidia sepium*; Ms = *Mammoth esculenta*.

²NA = not analyzed; ND = not detected.

contents were less in TRP than in the Ctl. Condensed tannin content of the tested forages ranged from 39 to 92 g/kg DM with standards extracted from each plant and 18 to 89 g equivalent quebracho/kg DM; *L. leucocephala* and *M. esculenta* leaves had greater CT concentration than *G. sepium* leaves.

In Vitro Experiment

Differences in ruminal fermentation among treatments were monitored through the production of total gas and CH₄, VFA concentration, OM degradation, and N-NH₃ content (Table 3). Gas and CH₄ production at 24 h decreased significantly with TRP proportion ($P = 0.03$ and $P = 0.02$, respectively) but did not significantly depend on TRP source ($P = 0.07$ and $P = 0.08$, respectively). When the statistical model included CT concentration as covariate, there was no effect of TRP source for any parameter and the interaction between TRP source and CT was not significant. Figure 1 shows the regression between CH₄ for all TRP with standards extracted from each plant or with quebracho

Table 3. Ruminal fermentation characteristics of 24-h in vitro incubations of tannin-rich plants (TRP)¹

| Percent of TRP | Ctl | | | | LI | | | | Gs | | | | Ms | | | | SEM | Source | Prop. |
|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-----|--------|-------|
| | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 | 25 | 50 | 75 | 100 | 25 | 50 | 75 | 100 | 25 | 50 | 75 | | | |
| Gas, mL/24 h | 66.2 | 60.0 | 59.1 | 56.3 | 54.5 | 65.3 | 64.1 | 60.7 | 64.6 | 65.9 | 56.9 | 53.0 | 48.2 | 3.68 | 0.07 | 0.03 | | | |
| CH ₄ , mL/24 h | 18.1 | 15.7 | 15.4 | 13.2 | 12.4 | 16.8 | 16.7 | 15.6 | 17.3 | 17.2 | 14.7 | 13.8 | 12.5 | 1.28 | 0.08 | 0.02 | | | |
| Total VFA, mM | 59.8 | 59.2 | 52.4 | 50.8 | 48.2 | 60.9 | 58.4 | 57.0 | 52.8 | 61.5 | 54.9 | 47.4 | 32.9 | 4.75 | 0.16 | 0.02 | | | |
| VFA, mol/100 mol | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acetate | 66.4 | 66.3 | 61.4 | 62.2 | 61.6 | 65.1 | 61.7 | 63.6 | 62.5 | 64.3 | 67.3 | 66.4 | 63.8 | 1.72 | 0.18 | 0.16 | | | |
| Propionate | 20.4 | 20.3 | 21.2 | 20.8 | 20.1 | 20.7 | 21.0 | 20.0 | 20.1 | 20.2 | 17.9 | 17.2 | 16.4 | 1.04 | 0.02 | 0.34 | | | |
| Butyrate | 6.4 | 6.2 | 7.3 | 7.3 | 7.8 | 6.7 | 7.5 | 6.8 | 7.0 | 7.3 | 7.3 | 7.4 | 8.3 | 0.37 | 0.20 | 0.02 | | | |
| Branched-chain VFA | 4.0 | 4.2 | 6.2 | 5.8 | 6.1 | 4.4 | 6.0 | 5.9 | 6.2 | 5.0 | 4.7 | 5.3 | 6.7 | 0.50 | 0.88 | 0.003 | | | |
| Valerate | 2.6 | 2.8 | 3.7 | 3.7 | 4.2 | 2.9 | 3.6 | 3.5 | 3.8 | 3.0 | 2.7 | 3.4 | 4.4 | 0.33 | 0.69 | 0.004 | | | |
| Acetate:propionate | 3.3 | 3.3 | 2.9 | 3.0 | 3.0 | 3.2 | 3.0 | 3.2 | 3.1 | 3.2 | 3.8 | 4.0 | 4.0 | 0.28 | 0.03 | 0.86 | | | |
| N-NH ₃ , mg/L | 16.9 | 19.5 | 20.9 | 19.6 | 21.4 | 20.8 | 21.6 | 23.2 | 21.7 | 23.1 | 18.5 | 22.0 | 20.9 | 1.39 | 0.43 | 0.02 | | | |
| FOM, ³ % | 50.6 | 49.2 | 43.7 | 42.4 | 40.7 | 51.2 | 49.1 | 48.3 | 44.7 | 51.5 | 46.2 | 40.4 | 28.3 | 3.84 | 0.14 | 0.02 | | | |

¹Ctl = control (natural grassland hay); LI = *Leucaena leucocephala*; Gs = *Gliricidia sepium*; Ms = *Mammoth esculenta*.

²Probability of the effect of source of TRP (Source) and proportion of TRP (Prop.) in the fermented substrate.

³FOM = fermented OM.

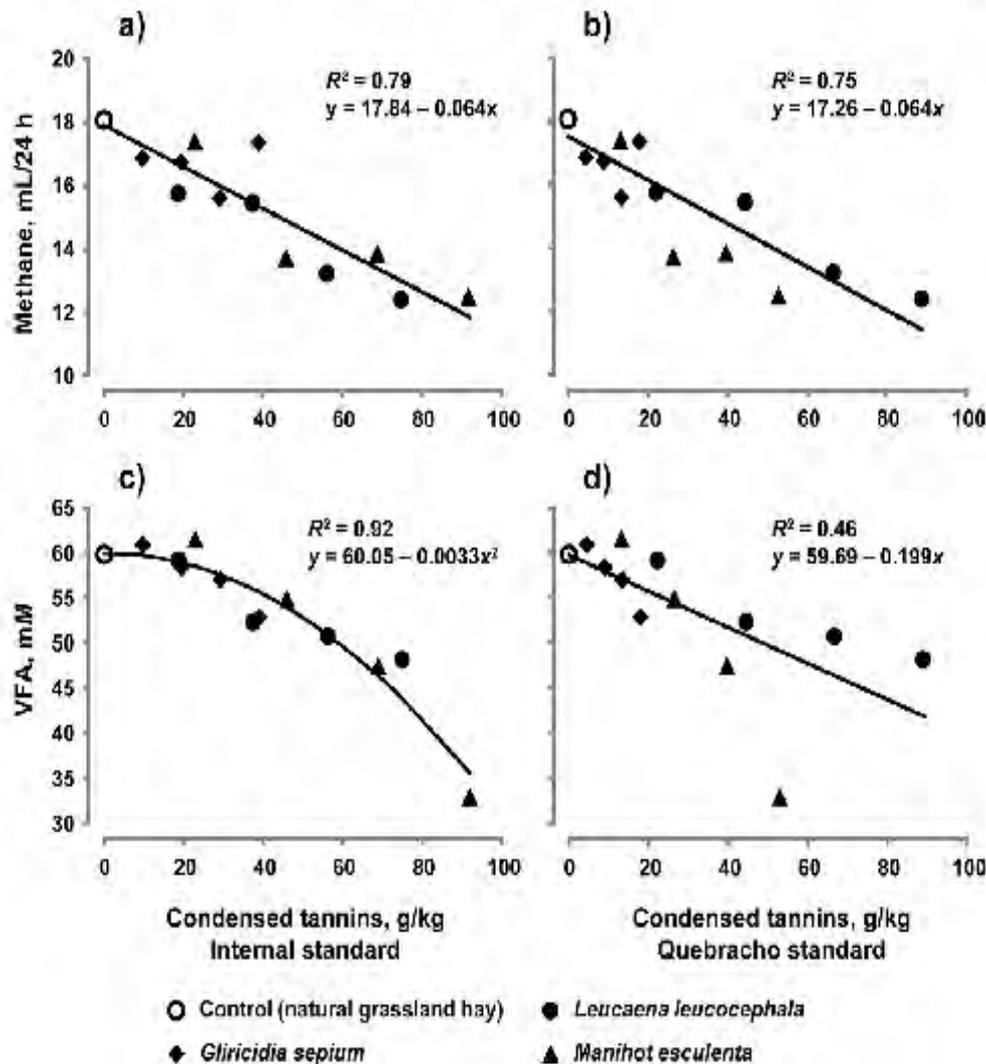


Figure 1. Correlation between methane production and VFA concentration and amount of condensed tannins *in vitro*. Condensed tannins were estimated using internal standards obtained from each tannin-rich plant (a and c) and using quebracho tannins as standard (b and d). All regressions are significant ($P < 0.0001$).

standard; both linear regressions are highly significant ($P < 0.0001$; $R^2 = 0.79$ and $R^2 = 0.75$, respectively). Quadratic terms of the regression were not significant.

Volatile fatty acid concentration, FOM, and $N-NH_3$ significantly decreased with TRP ($P = 0.02$) but did not significantly depend on TRP source ($P = 0.16$, $P = 0.14$, and $P = 0.43$, respectively). Neither acetate or propionate proportions nor acetate:propionate ratio varied with TRP proportion ($P = 0.16$, $P = 0.34$, and $P = 0.86$, respectively) with CT dose. However, propionate proportion and the acetate:propionate ratio varied with TRP source ($P = 0.02$ and $P = 0.03$, respectively), being lower and higher, respectively, for *M. esculenta* than for *G. sepium* and *L. leucocephala* (comparison

of means; data not shown). Butyrate, branched-chain VFA, and valerate proportions increased ($P = 0.02$, $P = 0.003$, and $P = 0.004$, respectively) with TRP proportion but did not vary with TRP source. When the statistical model included CT concentration as covariate, there was no effect of TRP source for any parameter and the interaction between TRP source and CT was not significant. Figure 1 shows the regression between VFA concentration and CT concentration for all TRP. When CT were expressed with standards extracted from each plant, the quadratic regression was significant ($P < 0.0001$, $R^2 = 0.92$). When CT were expressed with quebracho standards, the best fit was obtained by linear regression ($P = 0.01$, $R^2 = 0.46$).

Table 4. Dry matter intake, total tract OM digestibility, and ruminal fermentation characteristics before and after feeding in Texel and Blackbelly sheep fed control or tannin-rich diets¹

| Item | Texel | | | | Blackbelly | | | | SEM | P-values ² | | | |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|------------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|--------|--------|--------|
| | Ctl | LI | Gs | Mo | Ctl | LI | Gs | Mo | | Breed | Trt | C1 | C2 |
| DMI, kg/d | 0.63 | 1.00 | 0.85 | 1.01 | 0.85 | 1.29 | 1.29 | 1.57 | 0.010 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| OM digestibility, % | 71.3 | 66.2 | 65.0 | 63.7 | 71.2 | 66.9 | 65.3 | 68.0 | 3.99 | 0.68 | 0.22 | 0.05 | 0.08 |
| Fermentation before feeding | | | | | | | | | | | | | |
| pH | 6.6 | 6.6 | 6.3 | 6.8 | 6.3 | 6.4 | 6.2 | 6.7 | 0.09 | 0.01 | <0.001 | 0.54 | 0.06 |
| Total VFA, mM | 77.7 | 71.5 | 86.3 | 79.1 | 89.9 | 87.8 | 103.0 | 92.9 | 4.37 | <0.001 | 0.02 | 0.37 | 0.77 |
| VFA, mol/100 mol | | | | | | | | | | | | | |
| Acetate | 74.8 | 72.4 | 75.2 | 74.2 | 74.0 | 72.2 | 72.7 | 74.4 | 0.60 | 0.21 | 0.03 | 0.04 | 0.02 |
| Propionate | 15.7 | 16.7 | 16.4 | 16.0 | 17.2 | 16.7 | 17.8 | 15.8 | 0.55 | 0.09 | 0.15 | 0.80 | 0.72 |
| Butyrate | 7.8 | 8.6 | 6.1 | 7.8 | 7.4 | 9.2 | 7.7 | 8.2 | 0.44 | 0.34 | <0.001 | 0.15 | <0.01 |
| Branched-chain VFA | 0.6 | 0.8 | 0.9 | 0.7 | 0.5 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.09 | 0.10 | 0.06 | 0.01 | 0.30 |
| Valerate | 0.5 | 0.6 | 0.5 | 0.5 | 0.4 | 0.6 | 0.6 | 0.5 | 0.05 | 0.87 | 0.06 | 0.02 | 0.05 |
| Acetate:propionate | 4.7 | 4.3 | 4.6 | 4.7 | 4.3 | 4.3 | 4.1 | 4.7 | 0.15 | 0.12 | 0.11 | 0.52 | 0.84 |
| N-NH ₃ , mg/L | 5.0 | 4.6 | 4.8 | 4.9 | 4.5 | 4.6 | 4.3 | 5.0 | 0.16 | 0.13 | 0.11 | 0.60 | 0.97 |
| Fermentation 3 h after feeding | | | | | | | | | | | | | |
| pH | 6.6 | 6.3 | 6.2 | 6.6 | 6.4 | 6.3 | 6.3 | 6.6 | 0.08 | 0.59 | <0.001 | 0.03 | 0.37 |
| Total VFA, mM | 75.3 | 108.2 | 103.2 | 101.9 | 80.9 | 103.9 | 110.8 | 107.6 | 6.35 | 0.54 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| VFA, mol/100 mol | | | | | | | | | | | | | |
| Acetate | 74.6 | 70.4 | 73.3 | 70.4 | 73.0 | 70.8 | 71.4 | 71.6 | 0.81 | 0.57 | <0.001 | 0.001 | <0.001 |
| Propionate | 15.5 | 20.1 | 19.0 | 17.6 | 17.0 | 18.8 | 19.1 | 17.1 | 0.66 | 0.95 | <0.001 | 0.001 | <0.001 |
| Butyrate | 8.5 | 7.7 | 6.0 | 10.5 | 8.4 | 8.8 | 8.1 | 10.2 | 0.44 | 0.18 | <0.001 | 0.75 | 0.02 |
| Branched-chain VFA | 0.4 | 0.4 | 0.5 | 0.3 | 0.5 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.08 | 0.41 | 0.09 | 0.51 | 0.23 |
| Valerate | 0.6 | 1.0 | 0.7 | 0.7 | 0.6 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.08 | 0.56 | 0.01 | 0.05 | 0.03 |
| Acetate:propionate | 4.8 | 3.5 | 3.9 | 4.0 | 4.3 | 3.8 | 3.8 | 4.2 | 0.18 | 0.81 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| N-NH ₃ , mg/L | 7.2 | 7.2 | 7.2 | 4.3 | 4.8 | 3.6 | 4.0 | 6.0 | 1.50 | 0.09 | 0.95 | 0.62 | 0.59 |

¹Ctl = control (natural grassland hay); LI = *Leucaena leucocephala*; Gs = *Gliricidia sepium*; Mo = *Manihot esculenta*.

²Treatment × breed interaction was nonsignificant for all variables. Trt = treatment. Tannin-rich diets consisted of 44% leaf pellets of tannin-rich plants and 56% of the Ctl. C1 = Ctl vs. LI, Mo, and Gs; C2 = Ctl vs. LI and Mo

In Vivo Experiment

Ruminal Fermentation Characteristics. Ruminal fermentation characteristics of Texel and Blackbelly sheep fed TRP are shown in Table 4. Ruminal pH was greater ($P = 0.01$) for Texel than for Blackbelly before feeding but was not different 3 h after feeding ($P = 0.59$). Volatile fatty acid concentration was greater in TRP diets than for the Ctl diet before and 3 h after feeding ($P = 0.02$ and $P < 0.001$, respectively). When DMI and digestible OM were included as covariates, the effects of TRP on VFA concentration before and after feeding were not modified: covariates were not significant and treatment effect remained significant ($P = 0.02$ before feeding for both covariates and $P = 0.03$ and $P < 0.01$ after feeding when DMI and digestible OM were taken as covariates, respectively). Before feeding, the percentage of propionate and the acetate:propionate ratio did not vary among diets ($P = 0.15$ and $P = 0.11$, respectively), the percentage of acetate decreased ($P = 0.03$), and the percentage of butyrate increased ($P < 0.001$) in TRP diets. By contrast, the percentage of acetate and the acetate:propionate ratio decreased after feeding ($P < 0.001$) whereas that

of propionate and butyrate increased ($P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively) with diets containing TRP. No changes occurred in the percentage of branched-chain VFA before or after feeding ($P = 0.06$ and $P = 0.09$, respectively). Blackbelly sheep had greater total VFA concentration before feeding than Texel sheep ($P < 0.01$) whereas no significant difference among breeds was observed for other parameters before feeding and for any parameter after feeding. When DMI and digestible OM were included as covariates, the effect was unchanged: covariates were not significant and breed effect remained significant before feeding ($P = 0.03$ and $P = 0.02$ for DMI and digestible OM, respectively) and nonsignificant after feeding. In this study, TRP had no effect on N-NH₃ concentrations before or after feeding ($P = 0.11$ and $P = 0.95$, respectively); no effect of breed was observed before or after feeding ($P = 0.13$ and $P = 0.09$, respectively).

Microbial Populations. Results of qPCR amplification of the bacterial *rrs* and archaeal *mcrA* gene copies are summarized in Table 5. Concentration of bacterial *rrs* copies was significantly affected by CT ($P = 0.04$), but this effect did not seem to be related

Table 5. Abundance of total and fibrolytic bacteria and total methanogens determined by quantitative PCR in the rumen of Texel and Blackbelly sheep fed control or tannin-rich diets¹

| Item | Texel | | | | Blackbelly | | | | SEM | P-value ² | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|------------|-------|-------|-------|-------|----------------------|-------|-------|-------|
| | Ctl | Ll | Gs | Me | Ctl | Ll | Gs | Me | | Breed | Trt | C1 | C2 |
| Total bacteria ³ | 11.91 | 11.90 | 11.80 | 11.84 | 11.89 | 11.96 | 11.85 | 11.81 | 0.041 | 0.71 | 0.038 | 0.24 | 0.53 |
| <i>Fibrobacter succinogenes</i> ³ | 9.71 | 9.79 | 9.61 | 9.72 | 9.67 | 9.85 | 9.64 | 9.68 | 0.079 | 0.99 | 0.14 | 0.69 | 0.32 |
| <i>Ruminococcus albus</i> ³ | 8.00 | 8.79 | 8.33 | 8.49 | 7.60 | 8.42 | 8.34 | 8.16 | 0.261 | 0.19 | 0.046 | 0.01 | <0.01 |
| <i>Ruminococcus flavefaciens</i> ³ | 8.96 | 8.71 | 8.53 | 8.65 | 8.94 | 9.03 | 8.67 | 8.85 | 0.154 | 0.37 | 0.049 | 0.047 | 0.19 |
| Methanogens ⁴ | 10.00 | 9.85 | 9.72 | 9.84 | 9.76 | 9.71 | 9.70 | 9.74 | 0.082 | 0.04 | 0.25 | 0.09 | 0.19 |

¹Ctl = control (natural grassland hay); Ll = *Leucaena leucocephala*; Gs = *Gliricidia sepium*; Me = *Mammoth esculenta*.

²Treatment × breed interaction was nonsignificant for all variables. Trt = treatment. Tannin-rich diets consisted of 44% leaf pellets of tannin-rich plants and 56% of the Ctl. C1 = Ctl vs. Ll, Me, and Gs; C2 = Ctl vs. Ll and Me.

³rns copy number per gram DM (log₁₀).

⁴mcrA copy number per gram DM (log₁₀).

to the presence of CT, as the same effect was not observed for other TRP ($P = 0.24$ and $P = 0.53$ for contrasts C1 and C2, respectively). The effect of TRP on fibrolytic bacteria depended on the species: *R. albus* number was greater ($P = 0.046$) while *R. flavefaciens* number was less ($P = 0.049$) for TRP diets compared with the Ctl diet. The number of *F. succinogenes* were not changed ($P = 0.13$) by TRP. No breed effect was recorded for these bacterial groups ($P = 0.19$, $P = 0.37$, and $P = 0.99$, respectively). Methanogens number did not depend on the presence of TRP in the diet ($P = 0.25$) but was lower for Blackbelly than for Texel ($P = 0.04$).

No differences for bacterial and methanogenic community structures, as analyzed by DGGE, were induced by the TRP diets (data not shown). Bacterial communities clustered by breed (data not shown), but Shannon, Evenness, and Dominance diversity indices, calculated from the rns PCR-DGGE profiles, did not differ ($P = 0.24$, $P = 0.23$, and $P = 0.13$, respectively) between the Ctl and TRP diets (Table 6). No effect ($P = 0.56$, $P = 0.87$, and $P = 0.76$, respectively) on diversity was observed for methanogens calculated from mcrA DNA PCR-DGGE profiles.

Contrasting with the absence of effect of diets, the bacterial diversity indices differed between breeds: the Shannon and Evenness indices were greater ($P < 0.0001$ and $P = 0.01$, respectively) for Blackbelly than for Texel while the Dominance index was less ($P < 0.0001$) for Blackbelly. The opposite occurred for methanogens, where Shannon and Evenness indices were greater ($P < 0.0001$ and $P < 0.0005$, respectively) for Texel and the Dominance index was greater ($P < 0.0001$) for Blackbelly.

Total protozoal numbers did not vary among diets before and after feeding ($P = 0.18$ and $P = 0.24$, respectively; Table 7). Large entodiniomorphs (>100 μm) were less ($P < 0.01$) for TRP diets than for the Ctl diet. *Isotricha* spp. were more abundant after feeding for TRP diets than for the Ctl diet, which had the least amount ($P = 0.005$). Small entodiniomorphs (<100 μm) and *Dasytricha* spp. populations were not different among diets before and after feeding for small entodiniomorphs and for *Dasytricha* spp. Breed effect was not significant for total protozoa ($P = 0.94$ and $P = 0.67$ before and after feeding, respectively) and for the different protozoal classes.

Table 6. Diversity indices calculated from denaturing gradient gel electrophoresis profiles of total bacteria and methanogens in the rumen of Texel or Blackbelly sheep fed control or tannin-rich diets¹

| Item | Texel | | | | Blackbelly | | | | SEM | P-value ² | | | |
|----------------|-------|------|------|------|------------|------|------|------|-------|----------------------|------|------|------|
| | Ctl | Ll | Gs | Me | Ctl | Ll | Gs | Me | | Breed | Trt | C1 | C2 |
| Total bacteria | | | | | | | | | | | | | |
| Shannon | 1.43 | 1.50 | 1.45 | 1.48 | 1.60 | 1.57 | 1.59 | 1.71 | 0.044 | <0.0001 | 0.24 | 0.29 | 0.68 |
| Evenness | 0.90 | 0.91 | 0.92 | 0.92 | 0.93 | 0.94 | 0.94 | 1.00 | 0.032 | 0.01 | 0.23 | 0.21 | 0.53 |
| Dominance | 0.05 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.040 | <0.0001 | 0.13 | 0.02 | 0.02 |
| Methanogens | | | | | | | | | | | | | |
| Shannon | 1.14 | 1.15 | 1.15 | 1.13 | 0.94 | 1.00 | 0.95 | 0.98 | 0.028 | <0.0001 | 0.56 | 0.35 | 0.31 |
| Evenness | 0.93 | 0.92 | 0.93 | 0.90 | 0.84 | 0.86 | 0.83 | 0.84 | 0.026 | 0.0005 | 0.87 | 0.74 | 0.90 |
| Dominance | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.09 | 0.15 | 0.13 | 0.15 | 0.15 | 0.014 | <0.0001 | 0.76 | 0.70 | 0.56 |

¹Ctl = control (natural grassland hay); Ll = *Leucaena leucocephala*; Gs = *Gliricidia sepium*; Me = *Mammoth esculenta*.

²Treatment effect and treatment × breed interaction were nonsignificant for all variables. Trt = treatment. Tannin-rich diets consisted of 44% leaf pellets of tannin-rich plants and 56% of the Ctl. C1 = Ctl vs. Ll, Me, and Gs; C2 = Ctl vs. Ll and Me.

Table 7. Abundance of ruminal protozoa (log₁₀ cells/mL) in the rumen of Texel or Blackbelly sheep fed control or tannin-rich diets¹

| Item | Texel | | | | Blackbelly | | | | SEM | P-value ² | | | |
|--------------------------|-------|------|------|------|------------|------|------|------|-------|----------------------|-------|-------|--------|
| | Ctl | Ll | Gs | Ms | Ctl | Ll | Gs | Ms | | Breed | Trt | C1 | C2 |
| Before feeding | | | | | | | | | | | | | |
| Total protozoa | 4.97 | 5.02 | 4.99 | 5.09 | 4.95 | 5.05 | 5.05 | 5.01 | 0.043 | 0.94 | 0.18 | 0.04 | 0.03 |
| Entodiniomorphs < 100 µm | 4.93 | 4.98 | 4.96 | 5.06 | 4.92 | 5.01 | 5.01 | 4.97 | 0.047 | 0.90 | 0.25 | 0.06 | 0.06 |
| Entodiniomorphs > 100 µm | 3.52 | 3.44 | 3.18 | 3.35 | 3.40 | 3.21 | 3.13 | 3.36 | 0.081 | 0.10 | <0.01 | <0.01 | 0.09 |
| <i>Isotricha</i> spp. | 2.20 | 2.77 | 2.85 | 2.77 | 1.99 | 1.65 | 2.41 | 2.07 | 0.366 | 0.18 | 0.21 | 0.14 | 0.35 |
| <i>Dasytricha</i> spp. | 3.60 | 3.60 | 3.45 | 3.74 | 3.35 | 3.93 | 3.45 | 3.69 | 0.145 | 0.92 | 0.10 | 0.15 | 0.04 |
| 3 h after feeding | | | | | | | | | | | | | |
| Total protozoa | 4.92 | 4.84 | 4.97 | 4.90 | 4.83 | 4.92 | 4.94 | 4.89 | 0.042 | 0.67 | 0.24 | 0.32 | 0.76 |
| Entodiniomorphs < 100 µm | 4.87 | 4.79 | 4.95 | 4.85 | 4.78 | 4.87 | 4.90 | 4.84 | 0.049 | 0.63 | 0.19 | 0.36 | 0.87 |
| Entodiniomorphs > 100 µm | 3.45 | 3.01 | 3.11 | 3.20 | 3.24 | 3.12 | 3.04 | 3.12 | 0.084 | 0.30 | 0.011 | <0.01 | <0.01 |
| <i>Isotricha</i> spp. | 2.47 | 3.12 | 2.91 | 3.06 | 1.64 | 2.59 | 2.03 | 2.56 | 0.380 | 0.20 | 0.005 | <0.01 | <0.001 |
| <i>Dasytricha</i> spp. | 3.68 | 3.66 | 3.46 | 3.81 | 3.67 | 3.97 | 2.90 | 3.73 | 0.345 | 0.72 | 0.27 | 0.76 | 0.68 |

¹Ctl = control (natural grassland hay); Ll = *Leucaena leucocephala*; Gs = *Gliricidia sepium*; Ms = *Mammoth esculenta*.

²Treatment × breed interaction was nonsignificant for all variables. Trt = treatment. Tannin-rich diets consisted of 44% leaf pellets of tannin-rich plants and 56% of the Ctl. C1 = Ctl vs. Ll, Ms, and Gs; C2 = Ctl vs. Ll and Ms.

DISCUSSION

Fiber and CP content of forages used in this study were in the range of values reported by other authors (Assoumaya et al., 2007). However, more variation was observed for CT concentration. For *L. leucocephala*, our results were in the range of published data, but Longo et al. (2012) and Soltan et al. (2013), for example, reported CT contents less than the current study (56 and 23 g/kg DM, respectively); *Gliricidia* spp. CT content is variable and can range between 0.5 (Bhatta et al., 2012) and 83 g/kg DM (Foroughbakhch et al., 2012). In the current study, *M. esculenta* was rich in CT, contrary to studies by Jayanegara et al. (2011) and Marie-Magdeleine et al. (2010), who reported less CT content (4 and 40 g/kg DM, respectively) for the same species. Tannin accumulation is affected by factors such as cultivar, plant maturity, phenological stage, seasonal variations, and soil properties, which also determine degree of tannin polymerization (Waghorn, 2008). In addition, the increased temperature that characterizes the tropics is also directly associated with increased concentrations of secondary compounds in plants. This may result in differences in biological activity among species.

Relationship between Tannins and CH₄ Production

The use of tropical TRP in ruminant diets is considered a promising way to reduce CH₄ production (Jayanegara et al., 2012). Decreased CH₄ production observed in the present study when 3 tropical TRP were used in vitro, especially for *L. leucocephala* and *M. esculenta*, confirmed results reported from in vivo data with the same forages given at 44% of DM diet (31.0 and 22.2

g CH₄/kg DMI for the Ctl and TRP diets, on average; Rira et al., 2013). These results are consistent with most published results (Jayanegara et al., 2012). Soltan et al. (2013) showed that tropical forages, *L. leucocephala* among others, inhibit CH₄ production both in vitro and in vivo. Soliva et al. (2008) reported that *G. sepium* was not very effective at reducing CH₄ production. The weak CH₄ reduction induced by *G. sepium* seems to be linked to its reduced CT content. The current study shows for the first time a strong antimethanogenic action of *M. esculenta*, at variance with the results of Jayanegara et al. (2011). However, in this latter study, CT content was very small. In contrast to the current results, Bhatta et al. (2012) reported that leaves of *L. leucocephala* and *Gliricidia maculata*, a variety close to *G. sepium*, were not effective at reducing CH₄ in vitro. Most divergences with the current results are probably due to a difference in CT content of TRP. Another source of variation that should be taken into account when comparing results from different authors is the method used to quantify CT (Makkar, 2003b). More generally, studies using small to moderate tannin doses did not result in decreased CH₄ production (Beauchemin et al. [2007], with 20 g/kg DM quebracho tannin extract).

The current study used dose-response experiments to determine whether the relationship between CT content and CH₄ production was dose dependent and whether there were minimal and maximal threshold concentrations. In the in vitro study, CH₄ production linearly decreased as the amount of CT increased. This was observed for each TRP as their proportion increased but also when CH₄ production for all the treatments was plotted against CT concentration (Fig. 1). This suggests that CT is at least partially responsible

for this effect, consistent with Huang et al. (2010), who reported linear decreases in CH_4 production with increasing amount of CT in the range of 0 to 50 mg CT/g DM from *L. leucocephala*. A negative correlation was also found between the tannin content and CH_4 production when several sources were plotted, indicating that CH_4 production consistently declined as the CT content increased (Jayanegara et al., 2011). Similarly, Tan et al. (2011) reported a linear and quadratic decrease in total gas and CH_4 production with increasing CT contents from *L. leucocephala*. The same effect was observed by Hess et al. (2006) using a tropical TRP, with only a linear effect. Taken together, these results show the absence of a minimum threshold and a major effect of CT content on CH_4 production. It is often considered that factors other than tannin content may also be responsible for CT effects on ruminal CH_4 production, such as the diversity of CT related to their different chemical structures and activities. Several authors have emphasized that tannin effects should be considered not only by the amount present but also by the size and weight of molecules (Patra and Saxena, 2009; Huang et al., 2010), the number of linkage sites (Mueller-Harvey, 2006), and interaction with other compounds (fiber, proteins, and other secondary metabolites). In line with these hypotheses, Huang et al. (2011) showed with *L. leucocephala* that heavier molecular weight fractions of CT had a greater inhibitory effect on CH_4 production in vitro. Despite this reported effect of the nature of tannins, this work showed that, at least for the 3 TRP studied, CT content is the major driver of changes in fermentation. In addition, we demonstrated that the use of internal standards for CT quantification instead of a common standard improved the relationship between CT content and production of methane and concentration of VFA. Large differences in CT quantification induced by the choice of standards had been shown for 6 TRP including *M. esculenta* and *G. sepium* by Giner-Chavez et al. (1997). Another possible reason for CH_4 decrease may be the decreased NDF content of TRP compared with control forages, which is confounded with the tannin effect and may mask it (Johnson and Johnson, 1995). The positive relationship between cell wall components and in vivo production of CH_4 has already been discussed by many authors (Martin et al., 2010). Hence, reduction in CH_4 production with TRP is attributable not only to CT but could be due in part to differences in other feed composition characteristics.

Relationship with N-NH_3 and VFA Concentration

Ruminal N-NH_3 concentration generally tends to decrease with CT inclusion in the diet. In in vitro conditions, Sallam et al. (2010) and Soltan et al. (2013)

showed a decrease in N-NH_3 concentration with *L. leucocephala*. For the current study, in vitro results are not consistent with this tendency and showed an increase in N-NH_3 concentration, confirmed by the increase in branched-chain VFA originating from branched-chain AA. Differences among experiments may be due to differences in incubation conditions, because in vitro N-NH_3 concentration reflects the balance between protein degradation and synthesis and is not easy to interpret.

The current in vitro results were not consistent with the in vivo results. In the latter, N-NH_3 was not impacted by supplementation with TRP, which agrees with in vivo results found by Norrapoke et al. (2012) and Anantasook et al. (2013) with different TRP. There is general agreement that tannins decrease microbial protein degradation, mainly through the formation of tannin-protein complexes, which helps to decrease N-NH_3 concentration. However, in a review, Reed (1995) suggested that CT may 1) increase efficiency of N recycling to the rumen by decreasing ruminal N-NH_3 concentration and promoting urea influx into the rumen and 2) increase the glycoprotein content of saliva and stimulate saliva production, which could, in turn, increase N recycled to the rumen. Therefore, the CT amount in the in vivo experiment may have impacted N recycling, contributing to the lack of a negative effect of CT on ruminal N-NH_3 . Another hypothesis is that in the current in vivo experiment, DMI increased in TRP diets (16.5 and 25.8 kg/d for the Ctl and TRP diets, on average; Rira et al., 2013), resulting in a greater concentration of N-NH_3 .

A decrease in CH_4 production due to dietary changes can be due to a decrease in the extent of carbohydrate fermentation, and thus VFA production, and/or to a shift of the VFA pattern toward propionate. In the current study, increasing CT amount decreased in vitro total VFA concentration. However, the response of VFA to CT concentration was quadratic whereas the response of CH_4 was linear. This suggests that the mode of action of CT on methanogenesis may differ at low concentrations and at greater concentrations. The effects of CT on ruminal total VFA concentration and VFA pattern vary among studies, depending on CT dose and source. Other studies report that feeding TRP to ruminants reduces total VFA production (Goel and Makkar, 2012). This has been shown especially with tropical forages such as *L. leucocephala* and *G. sepium* (Tan et al., 2011; Bhatta et al., 2012). Soltan et al. (2012) reported a decrease in acetate:propionate ratio, together with increasing propionate with *L. leucocephala*. The dose-dependent decrease of total VFA observed in the current study when TRP were included in the diet is in agreement with a previous study on the dose-response effect of tannins (Getachew et al., 2008). In ad-

dition to the specific effect of CT, the decrease of VFA concentration could also be due to the presence of other secondary metabolites that interact with the CT and can negatively affect VFA concentrations. The tested plants grew in tropical environments where weather conditions (especially heat) favor the synthesis of numerous secondary metabolites such as saponins or essential oils, for example, saponins in *M. esculenta* leaves (Wobeto et al., 2007), which may potentially decrease CH₄ production (Martin et al., 2010). However, such compounds were not determined in our study.

A reduction of total VFA with CT supply was also expected in the current *in vivo* experiment, at least with *L. leucocephala* and *M. esculenta* because of their increased CT content, but an increase of total VFA with no change of VFA pattern was observed. The decrease of VFA concentration *in vivo* when TRP were included in the diet is the general trend (Beauchemin et al. [2007], with a quebracho tannin supplement), with no changes in the molar ratios of acetate, propionate, and butyrate (Waghorn and Shelton, 1997). Other *in vivo* studies with sheep (Priolo et al., 2000) and goats (Silanikove et al., 2006) reported that CT did not affect the VFA concentration in the rumen compared to animals receiving the same diets but supplemented with polyethylene glycol. Carulla et al. (2005) observed no change in total VFA concentration in sheep supplemented with *Acacia mearnsii* extract, but molar proportion of acetate decreased and that of propionate increased in sheep fed diets supplemented with CT, in line with a decrease in CH₄. To our knowledge, there are no *in vivo* data on VFA concentration for the 3 TRP that were used, so a specific effect of these plants cannot be shown. In the current experiment, the increase in VFA concentration with TRP supply may be due to an increased intake, probably because the TRP were dispensed as pellets. The increased total VFA concentration indicates that despite a reduction in CH₄ production, there was no inhibition of the fermentation. The VFA results also show a discrepancy between *in vitro* and *in vivo* conditions, a reminder that caution must be exercised with the interpretation and extrapolation of *in vitro* data: *in vitro* VFA concentration reflects production whereas *in vivo* VFA concentration reflects the balance of production, absorption, and outflow.

Relationship with OM Degradation

The reduction in total gas and CH₄ production *in vitro* may have been due to a decline in OM digestibility. Digestibility is clearly impaired by increasing amount of CT in many *in vitro* and *in vivo* studies. This may be associated with the property of tannins to form complexes with natural polymers such as proteins and carbohydrates

(Mueller-Harvey, 2006), which may therefore reduce their digestibility in the digestive tract of ruminants. In the leaves of trees such as *L. leucocephala* and *G. sepium*, tannins present in the NDF and ADF fractions are already tightly bound to cell walls and proteins, which reduces their digestibility (Makkar, 2003a).

These hypotheses were supported by the *in vitro* results, which showed a dose-dependent decrease in OM degradation. This was a consequence of VFA decrease, as it was calculated from VFA production. This agrees with Tan et al. (2011), who found a linear decrease of *in vitro* digestibility with increasing CT content. However, such a relationship is not observed in all experiments. For example, Huang et al. (2011) and Soltan et al. (2013) reported that the decline in CH₄ production with CT of *L. leucocephala* was not caused by a concomitant decrease in total-tract digestibility. Similarly, Carulla et al. (2005) found that an extract of *A. mearnsii* reduced CH₄ production by 12% without decreasing digestibility. The same result was observed in this study for *in vivo* digestibility measured with the same forages, suggesting that CH₄ mitigation is not simply the result of a reduced ruminal fermentation. However, the lower CH₄ production measured *in vivo* in this study (Rira et al., 2013) could also be due to a decrease in retention time in the rumen, suggested by the increased feed intake.

Effect on Rumen Microbial Populations

Plant secondary compounds such as CT can act against specific microbial groups so as to mitigate CH₄ production. Protozoa are important hydrogen producers, and reducing their numbers decreases CH₄ production (Guyader et al., 2014). In the current experiment, none of the TRP studied affected ruminal protozoal number. Effects of CT on protozoa are variable. In his review, Makkar (2003a) suggested that there is some evidence for decreased protozoal number in the presence of tannins. This has been confirmed by Animut et al. (2008), who found a linear decrease in protozoa numbers in goats fed various amount of CT-containing forage. By contrast, Carulla et al. (2005) observed that feeding tannins from *A. mearnsii* extract to sheep had no effects on total protozoal population. Similarly, Jayanegara and Palupi (2010) showed that the protozoal population was not affected by CT content in either *in vitro* or *in vivo* studies; this tendency was confirmed by the same authors in a meta-analysis that did not reveal any relationship between dietary tannins and protozoal populations (Jayanegara et al., 2012). Patra and Saxena (2009) suggested that the effect of CT on ruminal protozoal populations may depend on the type of plant and thus on the nature and concentration of tannins. To our knowledge,

the in vivo effect of *L. leucocephala*, *G. sepium*, and *M. esculenta* on protozoa has not been reported before, so it is difficult to make definitive conclusions. Sallam et al. (2010) observed a decrease in protozoa with *L. leucocephala*, but for an in vitro trial, and changes in microbial populations during in vitro incubations are difficult to interpret.

In the current study, the presence of CT in feed led to a decrease in total bacteria number without affecting the number of *F. succinogenes*. The population of *R. albus* was greater in the rumen of sheep when fed TRP; on the contrary, the number of *R. flavofaciens* decreased. Pilajun and Wanapat (2013) reported that supplementation with TRP did not change total bacterial number in swamp buffalo. However, other studies demonstrated that TRP reduced bacterial number (Patra and Saxena, 2009; Anantasook et al., 2013); more specifically, *F. succinogenes* was strongly reduced by *L. leucocephala* supply (Longo et al., 2013). The inhibitory activity of tannins against bacteria has been linked to the ability of tannins to form complexes with bacterial cell wall membranes causing morphological changes of the cell wall and secreted extracellular enzymes (Jones et al., 1994). In the current study, the decline of CH₄ production in the absence of any change in N-NH₃ concentration and OM degradation suggests that CT of forages may have a greater affinity for microbial protein than feed protein. Differences between the previous studies and the current study may be due to differences of diet, dose, and activity of tannins and environmental conditions.

The lack of any effect of CT-containing forages on protozoa and bacteria populations in the present study, together with a decrease in CH₄ production, suggest a direct effect of CT on methanogens, but no decrease in methanogen population was observed in the current study. The mitigating effect of tannins is often considered to be due to a decrease in methanogens, as several experiments have shown a decrease in methanogens when TRP are supplied (Tavendale et al., 2005; Animut et al., 2008). Nevertheless, several reports have shown no effect of TRP on methanogens (Norrapoke et al., 2012; Pilajun and Wanapat, 2013). An absence of toxic effect on methanogens when feeding TRP could be related to tannin-degrading enzymes and/or microbial extracellular secretions that reduce the tannin effect (Makkar, 2003a; Anantasook et al., 2013). More studies on methanogens resistance, tolerance, or adaptation to tannins are needed to characterize the causes of this effect. Longo et al. (2013) reported that methanogen populations decreased in the presence of TRP (*L. leucocephala*, among others) but recovered their initial value 24 h after the decrease. Several studies demonstrated that with prolonged tannin exposure, microorganisms develop ways to survive (Mlambo et al., 2007). In ad-

dition, action of CT on methanogens can be due to inhibition of either the population or their activity or both (Tavendale et al., 2005; Popova et al., 2011), and only methanogen amount was measured in the current study. The effect of CT on microbial populations depends on the relative affinity of CT for feed vs. microbial protein. The antimethanogenic activities of tannins may involve the tanning action of functional proteins (enzymes and coenzyme) located at accessible sites in methanogens (Pilajun and Wanapat, 2013). Supplementation with CT from forages showed that bacteria and methanogen diversity indices were not different from the Ctl. These results agree with Longo et al. (2013), who found that diversity indices of the methanogenic community did not change when *L. leucocephala* or other TRP were supplied. The absence of effects of CT on the microbial ecosystem may be due to putative changes in rumen outflow related to the dispensing of TRP as pellets.

Some of the differences in microbial populations among experiments may be due to differences in animal species or breeds. In the current study, a difference in methanogen population and bacterial and methanogen biodiversity between Texel and Blackbelly sheep was observed. King et al. (2011) reported a significant difference of methanogen population structure among Holstein and Jersey cattle, but a similarity of dominant archaeal populations was noted by Jeyanathan et al. (2011) between different ruminant species (sheep, cattle, and red deer). A few studies have found host species differences in the bacterial community of the rumen, but no study has compared the 2 breeds used in the current study.

In conclusion, CT from tropical forages showed, both in vitro and in vivo, a potential for mitigating CH₄ production by ruminants without noteworthy adverse effects on ruminal fermentation or in vivo digestibility. The dose-response relationship was linear, and for the 3 TRP studied, CT dose was the major factor for the response rather than the source of CT. The decreased CH₄ observed when TRP are added cannot be explained by changes of microbes that were minor; other analyses such as methanogen activity need to be performed. Interestingly, at low CT doses, the decrease in CH₄ is not accompanied by a decrease in VFA. Results from the in vivo study suggests that dietary CT from *L. leucocephala*, *M. esculenta*, and to a lesser extent from *G. sepium* in pellet form could be used to mitigate CH₄ production with no marked detrimental effects on other fermentative parameters. These findings are in line with other experiments showing that CT content of forages is a major determinant of their CH₄ production. Nevertheless, the development of the use of TRP in ruminant diets should take into consideration not only CH₄ production but also animal productivity.

LITERATURE CITED

- Anantasook, N., M. Wanapat, A. Cherdthong, and P. Gumun. 2013. Changes of microbial population in the rumen of dairy steers as influenced by plant containing tannins and saponins and roughage to concentrate ratio. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 26:1583-1591.
- Animut, G., R. Puchala, A. L. Goetsch, A. K. Patra, T. Sahlu, V. H. Varel, and J. Wells. 2008. Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. *Anim. Feed Sci. Technol.* 144:213-227.
- Archimède, H., M. Eugène, C. Marie-Magdeleine, M. Boval, C. Martin, D. P. Morgavi, P. Leconte, and M. Doreau. 2011. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166:59-64.
- Association of Official Analytical Chemists. 1990. *Official methods of analysis*. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Assoumaya, C., D. Sauvay, and H. Archimède. 2007. Etude comparative de l'ingestion et de la digestion des fourrages tropicaux et tempérés. (In French.) *INRA Prod. Anim.* 20:383-392.
- Beauchemin, K. A., S. M. McGinn, T. F. Martinez, and T. A. McAllister. 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 85:1990-1996.
- Bhatta, R., M. Saravanan, L. Baruah, and K. T. Sampath. 2012. Nutrient content, in vitro ruminal fermentation characteristics and methane reduction potential of tropical tannin-containing leaves. *J. Sci. Food Agric.* 92:2929-2935.
- Canadian Council on Animal Care. 1993. *Guide to the care and use of experimental animals*. Vol. 1. 2nd ed. Can. Coun. Anim. Care, Ottawa, Canada.
- Carulla, J. E., M. Kreuzer, A. Machmüller, and H. D. Hess. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 56:961-970.
- Demeyer, D. I., and C. J. Van Nevel. 1975. Methanogenesis, an integrated part of carbohydrate fermentation and its control. In: J. W. McDonald and A. C. I. Warner, editors, *Digestion and metabolism in the ruminant*. University of New England, Armidale, NSW, Australia. p. 366-382.
- Denman, S. E., and C. S. McSweeney. 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58:572-582.
- Denman, S. E., N. W. Tomkins, and C. S. McSweeney. 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62:313-322.
- Edwards, J. E., S. A. Huws, E. J. Kim, and A. H. Kingston-Smith. 2007. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62:323-335.
- Foroughbakhch, P. R., A. Carrillo Patra, A. Rocha Estrada, M. A. Alvarado Vazquez, and M. L. Cardenas Avila. 2012. Nutrient content and in vitro dry matter digestibility of *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp. and *Leucaena leucocaphala* (Lam. De Wit.). *J. Anim. Vet. Adv.* 11:1708-1712.
- Gerber, P. J., H. Steinfeld, B. Henderson, A. Mottet, C. Opio, J. Dijkman, A. Faluccci, and G. Tempio. 2013. *Tackling climate change through livestock - A global assessment of emissions and mitigation opportunities*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy.
- Getachew, G., W. Pittroff, D. H. Putnam, A. Dandekar, S. Goyal, and E. J. DePeters. 2008. The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on in vitro rumen fermentation and microbial protein synthesis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 140:444-461.
- Giner-Chavez, B. I., P. J. Van Soest, J. B. Robertson, C. Lascano, J. D. Reed, and A. N. Pell. 1997. A method for isolating condensed tannins from crude plant extracts with trivalent ytterbium. *J. Sci. Food Agric.* 74:359-368.
- Goel, G., and H. P. S. Makkar. 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Trop. Anim. Health Prod.* 44:729-739.
- Goering, H. K., and P. J. Van Soest. 1970. *Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications)*. Agric. Handbook No. 379. ARS-USDA, Washington, DC.
- Guyader, J., M. Eugène, P. Nozière, D. P. Morgavi, M. Doreau, and C. Martin. 2014. Influence of rumen protozoa on methane emissions in ruminants: A meta-analysis approach. *Animal* 8:1816-1825.
- Hess, H. D., T. T. Tiemann, F. Noto, J. E. Carulla, and M. Kreuzer. 2006. Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock. *Int. Congr. Ser.* 1293:164-167.
- Huang, X. D., J. B. Liang, H. Y. Tan, R. Yahya, and Y. W. Ho. 2011. Effects of *Leucaena* condensed tannins of differing molecular weights on in vitro CH₄ production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167:373-376.
- Huang, X. D., J. B. Liang, H. Y. Tan, R. Yahya, B. Khamsekhiew, and Y. W. Ho. 2010. Molecular weight and protein binding affinity of *Leucaena* condensed tannins and their effects on in vitro fermentation parameters. *Anim. Feed Sci. Technol.* 159:81-87.
- Jayanegara, A., F. Leiber, and M. Kreuzer. 2012. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 96:365-375.
- Jayanegara, A., and E. Palupi. 2010. Condensed tannin effects on nitrogen digestion in ruminants: A meta-analysis from in vitro and in vivo studies. *Media Peternakan* 33:176-181.
- Jayanegara, A., E. Wina, C. R. Soliva, S. Marquardt, M. Kreuzer, and F. Leiber. 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.* 163:231-243.
- Jeyanathan, J., M. Kirs, R. S. Rominus, S. O. Hoskin, and P. H. Janssen. 2011. Methanogen community structure in the rumens of farmed sheep, cattle and red deer fed different diets. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76:311-326.
- Johnson, K. A., and D. E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73:2483-2492.
- Jones, G., T. McAllister, K. Cheng, and A. Muir. 1994. Effect of sainfoin (*Onobrychis vicifolia* Scop) on growth and proteolysis by 4 strains of rumen bacteria: Resistance of *Prevotella* (*Bacteroides*) *ruminicola* B14. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1374-1378.
- King, E. E., R. P. Smith, B. St-Pierre, and A. D. G. Wright. 2011. Differences in the rumen methanogen populations of lactating Jersey and Holstein dairy cows under the same diet regimen. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:5682-5687.
- Koike, S., and Y. Kobayashi. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavigenicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204:361-366.
- Laurent, S. 1975. Etude comparative de différentes méthodes d'extraction et de dosage des tannins chez quelques pteridophytes. (In French.) *Arch. Physiol. Biochem.* 83:735-752.

- Longo, C., A. L. Abdalla, J. Liebich, I. Janzik, J. Hummel, P. S. Correa, K. H. Südekum, and P. Burauel. 2013. Evaluation of the effects of tropical tanniferous plants on rumen microbiota using qRT-PCR and DGGE analysis. *Czech J. Anim. Sci.* 58:106–116.
- Longo, C., J. Hummel, J. Liebich, I. C. S. Bueno, P. Burauel, E. J. Ambrosano, A. L. Abdalla, U. Y. Anele, and K. H. Südekum. 2012. Chemical characterization and in vitro biological activity of four tropical legumes, *Spyzobolium aterrimum* L., *Spyzobolium deeringianum*, *Leucaena leucocephala*, and *Mimosa caesalpinhi-aeblia*, as compared with a tropical grass, *Cynodon* spp. for the use in ruminant diets. *Czech J. Anim. Sci.* 57:255–264.
- Luton, P. E., J. M. Wayne, R. J. Sharp, and P. W. Riley. 2002. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148:3521–3530.
- Makkar, H. P. S. 2003a. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Rumin. Res.* 49:241–256.
- Makkar, H. P. S. 2003b. Quantification of tannins in tree and shrub foliage: A laboratory analysis. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Marie-Magdeleine, C., M. Mahieu, L. Philibert, P. Despois, and H. Archimède. 2010. Effect of cassava (*Manihot esculenta*) foliage on nutrition, parasite infection and growth of lambs. *Small Rumin. Res.* 93:10–18.
- Martin, C., D. P. Morgavi, and M. Doreau. 2010. Methane mitigation in ruminants: From microbe to the farm scale. *Animal* 4:351–365.
- Mlambo, V., J. L. N. Sikosana, F. L. Mould, T. Smith, E. Owen, and I. Mueller-Harvey. 2007. The effectiveness of adapted rumen fluid versus PEG to ferment tannin-containing substrates in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136:128–136.
- Morgavi, D. P., C. Martin, and H. Boudra. 2013. Fungal secondary metabolites from *Monascus* spp. reduce rumen methane production in vitro and in vivo. *J. Anim. Sci.* 91:848–860.
- Mueller-Harvey, I. 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 86:2010–2037.
- Muyzer, G., E. C. De Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695–700.
- Noorapoke, T., M. Wanapat, and S. Wanapat. 2012. Effects of protein level and mangosteen peel pellets (Mago-pel) in concentrate diets on rumen fermentation and milk production in lactating dairy crossbreds. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 25:971–979.
- Patra, A. K., and J. Saxena. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: A review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek* 96:363–375.
- Pilajun, R., and M. Wanapat. 2013. Microbial population in the rumen of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) as influenced by coconut oil and mangosteen peel supplementation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97:439–445.
- Popova, M., C. Martin, M. Eugène, M. M. Mialon, M. Doreau, and D. P. Morgavi. 2011. Effect of fibre- and starch-rich finishing diets on methanogenic Archaea diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166:113–121.
- Priolo, A., G. Waghorn, M. Lanza, L. Biondi, and P. Pennisi. 2000. Polyethylene glycol as a means for reducing the impact of condensed tannins in carob pulp: Effects on lamb growth performance and meat quality. *J. Anim. Sci.* 78:810–816.
- Reed, J. D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Anim. Sci.* 73:1516–1528.
- Rira, M., C. Marie-Magdeleine, H. Archimède, D. P. Morgavi, and M. Doreau. 2013. Effect of condensed tannins on methane emission and ruminal microbial populations. In: J. W. Oltjen, E. Kebreab, and H. Lapiere, editors, Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, p. 501–502.
- Sadet, S., C. Martin, B. Meunier, and D. P. Morgavi. 2007. PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal* 1:939–944.
- Sallam, S. M. A. H., I. C. S. Bueno, P. B. Godoy, E. F. Nozella, D. M. S. S. Vitti, and A. L. Abdalla. 2010. Ruminal fermentation and tannins bioactivity of some browses using a semi-automated gas production technique. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 12:1–10.
- Silamikove, N., S. Landau, D. Or, D. Kababya, I. Bruchental, and Z. Nitsan. 2006. Analytical approach and effects of condensed tannins in carob pods (*Ceratonia siliqua*) on feed intake, digestive and metabolic responses of kids. *Livest. Sci.* 99:29–38.
- Soliva, C. R., A. B. Zeleke, C. Clément, H. D. Hess, V. Fievez, and M. Kreuzer. 2008. In vitro screening of various tropical foliages, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147:53–71.
- Soltan, Y., A. S. Morsy, S. M. A. Sallam, H. Louvandini, and A. L. Abdalla. 2012. Comparative in vitro evaluation of forage legumes (prosopis, acacia, atriplex, and leucaena) on ruminal fermentation and methanogenesis. *J. Anim. Feed Sci.* 21:759–772.
- Soltan, Y., A. S. Morsy, S. M. A. Sallam, R. C. Lucas, H. Louvandini, M. Kreuzer, and A. L. Abdalla. 2013. Contribution of condensed tannins and mimosine to the methane mitigation caused by feeding *Leucaena leucocephala*. *Arch. Anim. Nutr.* 67:169–184.
- Tan, H. Y., C. C. Siew, N. Abdullh, J. B. Liang, X. D. Huang, and Y. W. Ho. 2011. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 169:185–193.
- Tavendale, M. H., L. P. Meagher, D. Pacheco, N. Walker, G. T. Attwood, and S. Sivakumaran. 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123:403–419.
- Waghorn, G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147:116–139.
- Waghorn, G., and I. Shelton. 1997. Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on the nutritive value of pasture for sheep. *J. Agric. Sci.* 128:365–372.
- Weatherburn, M. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39:971–974.
- Wobeto, C., A. D. Corrêa, C. M. P. De Abreu, C. D. Dos Santos, and H. V. Pereira. 2007. Antinutrients in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaf powder at three ages of the plant. *Cienc. Tecnol. Aliment. (Campinas, Bras.)* 27:108–112.
- Yu, Z., and M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* 36:808–813.

***DISCUSSION GENERALE,
CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES***

Le développement du marché des extraits de plantes (HE, TC...) dans le secteur de l'alimentation animale est en forte progression et pourrait avoir un impact économique dans les dix prochaines années. Ce développement s'explique d'une part parce qu'il constitue une alternative naturelle aux antibiotiques facteurs de croissance interdits depuis 2006 dans certains pays et, d'autre part, en raison de leurs effets sur les performances de production, la qualité des produits, la santé, le bien-être des animaux et surtout pour l'environnement.

Comme cela a été exposé dans la partie bibliographique, le terme extraits de plantes est un terme générique, bien que très vague, habituellement utilisé pour désigner des mélanges de molécules obtenues grâce à différentes techniques d'extraction, à partir de végétaux ou de parties de végétaux. La nature et la partie du végétal ainsi que le mode d'extraction conditionnent la composition du mélange. Les molécules actives de ces extraits, potentiellement utilisables en alimentation des ruminants, sont issues du métabolisme dit secondaire des plantes.

Les travaux de cette thèse avaient pour objectif de mettre en évidence le potentiel anti-méthanogène de deux familles de métabolites secondaires sur la production de CH₄ et sur les aptitudes fermentaires du microbiote ruminal d'ovins. Dans cette optique nous avons entrepris l'étude *in vitro* de l'effet des HE et des TC sur la méthanogénèse. Une étude *in vivo* a été uniquement engagée pour les TC. Les HE ont été extraites à partir de plantes méditerranéennes, couramment utilisées en médecine traditionnelle, et disponibles en Algérie en quantité suffisante pour une utilisation courante en alimentation animale. Il s'agit de *J. phoenicea* et de *M. pulegium*. S'ajoutent à ces deux plantes, trois plantes provenant de climat chaud, supposé favoriser la synthèse des métabolites secondaires au sein des végétaux, en particulier les TC. Il s'agit de: *G. sepium*, *L. leucocephala* et *M. esculenta* dont le contenu en TC a été dosé par deux types de standards : un standard commercial et un standard interne purifié à partir de chacune des 3 plantes, ce qui est une démarche originale.

L'étude de ces métabolites secondaires est menée comparativement à des substrats de référence: le foin de vesce-avoine pour les HE et un foin de prairie naturelle riche en *Dichanthium* spp. pour les TC. Dans ce cadre, des fermentations *in vitro* ont été réalisées pour évaluer l'effet dose-réponse de ces métabolites secondaires afin de mieux appréhender leur potentiel anti-méthanogène et de cerner de près les interactions qui se produisent au cours de la fermentation avant de passer à l'étude du métabolite qui s'avère efficace dans les conditions *in vivo*. Parallèlement et dans le but d'une généralisation de leur utilisation, les TC ont été testés sur deux races de moutons, le Texel qui est une race des zones tempérées et le

Blackbelly, une race des zones tropicales. Une validation des résultats à la fois sur une race tempérée et une race tropicale est une approche originale pour ce type d'études.

1/ Huiles essentielles

Les résultats obtenus ont révélé que les HE provoquent une baisse du CH₄ *in vitro*. Cette réduction s'est accompagnée d'une diminution de tous les paramètres fermentaires à savoir : AGV, NH₃ et digestibilité. Cependant, les protozoaires totaux ne sont pas affectés car leur nombre a curieusement augmenté. L'action inhibitrice des HE de *M. pulegium* sur le CH₄ et les paramètres fermentaires paraît plus forte que celle de *J. phoenicea*. Il faut noter aussi que *M. pulegium* est plus riche en HE que *J. phoenicea* comme le montre les rendements. La diminution de CH₄ est probablement liée à une perturbation du processus de la méthanogénèse causée par un déséquilibre de l'écosystème microbien car les HE sont connues pour leur activité antimicrobienne qui est variable en fonction de la composition de l'huile. Cette dernière est très importante car elle détermine le type d'inhibition bactériostatique/bactéricide, ainsi que l'ampleur de l'inhibition. En effet, le pouvoir bactéricide des HE est lié à la structure chimique (Dorman et Deans 2000 ; Ultee et al., 2002) des molécules aromatiques qui les composent. Ainsi, les propriétés bactéricides (Ultee et al., 2002, Gill et Holley 2004) et antifongiques (Chami et al., 2004) sont très importantes pour les HE de nature phénolique et dans une moindre mesure pour celles de nature terpénoïde. L'activité antimicrobienne des phénols est particulièrement due à la présence d'un cycle phénolique et/ou d'un groupement hydroxyle (Bayourthe et al., 2014). De ce fait, l'HE de *M. pulegium* serait plus bactériostatique/bactéricide que celle de *J. phoenicea* car les cétones dont fait partie le menthol (composé principal de l'HE de *M. pulegium*) sont plus efficaces que les terpènes dont fait partie le α -pinène (composé principal de l'HE de *J. phoenicea*) (Benchaar et al., 2011). Il ressort aussi de cette première étude, la forte liaison entre l'impact des HE et la dose utilisée où les concentrations élevées dans ce travail se sont montrées toxiques pour le microbiote ruminal inhibant ainsi la méthanogénèse. L'utilisation des HE dans la nutrition des ruminants dans le but de réduire les émissions de CH₄ entérique pourrait être limitée pour plusieurs raisons:

- ❖ Il apparaît que de fortes concentrations d'HE sont nécessaires afin d'inhiber la méthanogénèse ruminale. Ces concentrations sont beaucoup trop grandes pour être utilisées *in vivo* et sont peu pratiques sur terrain, en raison des effets potentiellement délétères qu'elles peuvent occasionner sur l'efficacité de fermentation ruminale et sur

la palatabilité. De plus, les fortes doses exigées pour réduire la production de CH₄, accompagnées du large spectre d'activité des HE, font que les effets avantageux de l'inhibition de CH₄ soient souvent contrebalancés par une inhibition globale de la production d'AGV et de la digestibilité. Ceci est nullement souhaitable en raison des conséquences négatives sur la productivité animale (Benchaar et al., 2008, 2009). Il ne faut pas également perdre de vue leur coût qui serait certainement élevé pour les éleveurs de pays comme l'Algérie.

- ❖ Le microbiote ruminal peut remarquablement s'adapter aux HE quand elles sont administrées à faibles doses (Cardozo et al., 2004 ; Busquet et al., 2005a) mais à doses élevées (Busquet et al., 2005a; Fraser et al., 2007), les effets des HE semblent disparaître au fil du temps (par exemple, 9 jours de culture continue). McIntosh et al. (2003) ont montré que des espèces bactériennes comme *P. ruminicola* et *P. bryantii* s'adaptent et peuvent pousser à des concentrations élevées en HE. La diversité des archées méthanogènes augmente en présence d'HE (Ohene-Adjei et al., 2008), qui est une preuve que le microbiote ruminal est capable de s'accommoder en présence de ces molécules. Cette réponse adaptative peut expliquer pourquoi, jusqu'à présent, les réponses *in vitro* (c'est-à-dire, l'exposition à court terme) sont très marquées par rapport aux réponses *in vivo* (c'est-à-dire, l'exposition à long terme). En fait, un certain nombre d'études *in vivo* ne rapportent aucun effet sur la digestibilité et sur la production d'AGV quand les HE et/ou leurs composants principaux sont testés chez les ovins (Chaves et al., 2008; Malecky et al., 2009). L'adaptation du microbiote ruminal aux HE représente un défi majeur pour l'utilisation de ces composés comme option d'atténuation des émissions du CH₄ entérique.

- ❖ Malgré leur efficacité dans la mitigation de CH₄, ainsi que l'intérêt croissant de leur utilisation pour la manipulation de la fermentation ruminale, peu de recherches sont entreprises afin de déterminer le devenir des HE dans le système digestif des ruminants. Selon certaines études, les composés d'HE comme les terpènes peuvent faire l'objet d'une bioconversion par le microbiote ruminal (Welch and Pederson, 1981; Schlichtherle-Cerny et al., 2004) qui aboutit parfois à leur transfert à la phase gazeuse, en raison de leur volatilité, et à leur élimination par éructation (Cluff et al., 1982; White et al., 1982). D'autres recherches clament que les HE sont absorbées à travers la paroi ruminale pour être ensuite excrétées dans l'urine (Michiels et al., 2008;

Malecky et al., 2009). Cependant, étant donné la diversité des HE en terme de structure chimique, il est impossible de trancher sur leur devenir et des recherches plus approfondies sont nécessaires afin de déterminer la mesure à laquelle les HE peuvent être dégradées et/ou métabolisées dans le système digestif de ruminants.

- ❖ Il faut également tenir compte du transfert de ces métabolites secondaires dans les produits animaux (viande et lait) et leur éventuelle toxicité pour le consommateur. Il a été prouvé que les HE pouvaient être absorbées dans différentes parties du système digestif des ruminants et donc le potentiel de résidus dans les produits animaux ne peut pas être exclu. (Viallon et al., 2000; Tornambe et al., 2006).

Basé sur nos résultats et sur les considérations décrites ci-dessus, il apparaît que le potentiel anti-méthanogène des HE de *J. phoenicea* et *M. pulegium* a été démontré *in vitro*, surtout quand ces métabolites secondaires ont été utilisés à forte dose. L'application *in vivo* de ces HE comme additifs alimentaires est limitée par la toxicité qu'elles peuvent engendrer sur les populations microbiennes du rumen perturbant ainsi la fermentation. En conclusion, il est difficile d'extrapoler les résultats prometteurs de l'inhibition de la méthanogénèse *in vitro* aux conditions *in vivo*, et beaucoup de travail reste à faire pour démontrer et expliquer leur efficacité. Jusqu'à présent aucun essai à long terme n'a été réalisé et leur préconisation comme option d'atténuation des impacts environnementaux de la production animale doit être prise avec beaucoup de précaution.

2/ Tanins condensés

La modification de la fermentation ruminale vers une moindre émission de CH₄ a reçu une attention particulière pendant la dernière décennie (Beauchemin et al., 2008; McAllister et Newbold, 2008). À cet égard, l'introduction de certaines plantes riches en TC est considérée comme une stratégie prometteuse d'atténuation des émissions de CH₄ ruminal. Malgré cela, le screening d'une vaste gamme de plantes fourragères disponibles serait beaucoup plus efficace si leurs propriétés communes comme la fraction tannique pourraient être dosées et identifiées de la même manière et avec la même méthode. Un objectif méthodologique de ce travail doctoral était de comparer deux standards de dosage des TC.

Les résultats obtenus montrent que les plantes ont des teneurs variables qui dépendent du type de plante et de la manière dont les teneurs sont exprimées, c'est-à-dire avec un

standard commercial ou avec les TC internes purifiés employés comme standards. *L. leucocephala* et *M. esculenta* sont plus riches en TC que *G. sepium* qui a vraiment une faible teneur, quel que soit le standard. A ce moment, on peut se poser la question suivante :

Le contenu en TC est-il variable selon le standard utilisé ?

Les spécialistes des tanins s'accordent à penser que la teneur en tanins d'une plante dépend de la méthode d'analyse qui a été employée. Il y a de nombreuses méthodes, qui se basent sur des principes très divers, et donc donnent des résultats différents pour une même plante (Makkar, 2003). En outre, les nombreuses publications disponibles dans la littérature et qui étudient le contenu en TC des plantes ne se fondent pas toutes sur un même standard. Il n'existe aucun consensus qui recommande l'utilisation d'un standard particulier de préférence à un autre. Une même plante peut avoir des contenus variables en fonction du standard utilisé pour le dosage. Ce manque de standardisation pose problème pour comparer les études qui évaluent la teneur en TC des plantes. Nous ne savons à quoi imputer les résultats. Quel standard particulier utilisé dans la mesure? Est-ce un hasard que plusieurs études basées chacune sur le même standard s'accordent? Pouvons-nous mettre ensemble les conclusions de ces nombreuses études alors qu'elles n'emploient pas les mêmes protocoles? Raisonnablement nous ne devrions pas prendre ce risque. Ainsi les chercheurs vont être amenés pour le bien de tous à se mettre d'accord. Dans le but de pouvoir mêler chaque conclusion à une nouvelle conclusion et de voir apparaître des contradictions justifiées et sans biais de mesure, il serait temps de standardiser les méthodes pour que les études entreprises se complètent à juste titre. Dans notre étude nous avons essayé d'apporter un élément de réponse en comparant 2 standards: le quebracho versus standards internes purifiés de chacune des 3 plantes.

L'utilisation du quebracho versus les TC de chaque plante comme standard a affecté le calcul de la quantité de TC mesurée. En effet, les 3 plantes n'ont pas la même teneur en TC. Avec les standards internes, les valeurs du contenu en TC ont presque doublé pour *M. esculenta* et *G. sepium*, alors qu'elle baisse pour *L. leucocephala*. L'utilisation des standards internes est recommandée par plusieurs auteurs. Reed (1995), Terrill et al. (1990; 1992), Jackson et al. (1996) ainsi que Dalzell et al. (1998) ont suggéré l'utilisation de TC purifiés à partir des plantes testées en tant que standards. En effet, les TC extraits de plantes herbacées et de légumineuses arbustives sont différents de la catéchine ou du quebracho, habituellement utilisés comme référence. Contrairement aux standards relatifs tels que la catéchine, la cyanidine ou le quebracho, l'utilisation des TC purifiés comme standards absolu pourrait empêcher une sous-estimation ou une surestimation de la teneur en TC dans un échantillon

particulier (Bae et al., 1993 ; Giner- Chavez et al., 1997). Cependant, il serait nécessaire de sélectionner les TC d'une grande variété d'espèces de plantes pour fournir une bibliothèque de TC purifiés pour une utilisation en tant que standard universel.

Dans notre étude, le quebracho semble être un standard inapproprié pour l'estimation de la teneur en TC avec la méthode à la vanilline-H₂SO₄. Ce dernier résulte en une sous-estimation de la concentration des TC. La méthode à la vanilline-H₂SO₄ mesure les monomères qui résultent de l'hydrolyse acide, or le quebracho est un dimère. Par conséquent, il produit moins de couleur que la réaction avec les monomères, ce qui a probablement entraîné une sous-estimation de la concentration des TC (Hagerman et Butler, 1989; Reed, 1995; Harborne, 1996). En définitive, l'utilisation de standards internes pourrait convenir au dosage des TC, surtout quand il s'agit d'études comparatives pour mieux estimer leurs taux.

En deuxième volet, l'objectif principal de cette recherche a été d'investiguer le processus de la méthanogénèse, en présence de plantes riches en TC. Il a essentiellement porté sur l'étude des acteurs microbiens impliqués dans la méthanogénèse. De manière plus spécifique, nous avons étudié la diversité et la quantité des populations microbiennes essentielles pour la production de CH₄ à savoir : protozoaires, bactéries totales, principales bactéries cellulolytiques (*R. albus*, *R. flavefaciens*, *F. succinogenes*) et archées méthanogènes. D'autre part, les principaux paramètres digestifs et fermentaires associés à la méthanogénèse ont été également appréhendés chez deux races de moutons :

a. Tanins condensés et fermentation

Les différences de fermentation ruminale sont mises en évidence par la production de gaz, de CH₄, d'AGV, de NH₃ et la dégradation de la MS. La production de CH₄ décroît d'une façon linéaire *in vitro* en présence de TC. Ce déclin est similaire pour *L. Leucocephala* et *M. esculenta* mais moins prononcé pour *G. sepium*. Les AGV ne sont pas affectés par l'addition des plantes jusqu'à la dose de 25%. Aux doses élevées, la production d'AGV est fortement affectée, surtout quand les plantes riches en TC sont testées à 100%. Le même effet est observé avec la production d'acétate et de propionate. Cependant, le ratio acetate:propionate ne varie pas avec la dose de TC. La concentration de NH₃ croît avec les doses de TC, indépendamment de leur nature. Cette augmentation est synergique à une augmentation des AGV à chaîne ramifiée produits à partir d'acides aminés à chaîne ramifiée et rendant compte sur l'équilibre entre la dégradation des protéines et leur synthèse.

La même tendance est observée pour le CH₄ *in vivo*, ce dernier diminue drastiquement surtout avec *M. esculenta*. Concernant les AGV, les résultats sont un peu contradictoires car on s'attendait à une réduction de la production d'AGV avec l'incorporation des TC dans le régime alimentaire des ovins ; au moins avec *L. leucocephala* et *M. esculenta* à cause de leur haut contenu en TC. Cependant, nous avons observé une augmentation des AGV et aucun changement de leur profil. Comme pour les AGV, la concentration de NH₃ tend généralement à diminuer avec l'inclusion des TC dans le régime, toutefois sa concentration ne varie pas pour les plantes testées.

La diminution de la concentration des AGV *in vivo* quand les TC sont inclus dans le régime est la tendance générale. Dans notre expérience, l'augmentation de la concentration des AGV avec l'addition des TC peut être due à une augmentation de l'ingestion résultant probablement du mode d'administration de ces plantes sous forme de pellets ; néanmoins la digestibilité n'est pas modifiée (Rira et al., 2013). Une partie de l'effet observé sur le CH₄ dû à la présentation sous forme de pellets, peut être attribuée à un transit accéléré ; or à même quantité ingérée quand le transit est plus rapide, le CH₄ est plus faible (Pinares Patino et al., 2003)

L'augmentation des AGV indique une absence d'effet des TC sur la fermentation, bien que la production de CH₄ soit réduite.

Nos résultats d'AGV et de NH₃ montrent aussi une contradiction entre les conditions *in vitro* et *in vivo* et incite à être prudent avec l'interprétation et l'extrapolation des données des *in vitro*. En effet, la concentration d'AGV *in vitro* donne une idée sur la production, tandis qu'*in vivo*, la concentration des AGV reflète l'équilibre entre leur production, leur absorption et leur flux.

b. Tanins condensés et microbiote ruminal

La stratégie employée pour étudier la diversité et la distribution des archées méthanogènes et des bactéries totales repose sur l'utilisation d'une technique d'empreinte moléculaire de PCR-DGGE. En effet, cette technique s'impose lorsque l'on souhaite comparer rapidement des échantillons et suivre les changements dans la composition des populations microbiennes. La technique de PCR-DGGE fournit un "profil" de la diversité microbienne par séparation physique des acides nucléiques sur un gel électrophorétique. Ainsi dans notre cas, cette technique est très utile pour comparer le profil de diversité, en fonction

des différentes plantes riches en TC testées. Le profil DGGE n'a mis en évidence aucun changement significatif dans la structure de la population des bactéries ou des archées méthanogènes (Annexe 8), ce qui montre que les TC n'ont aucun effet sur la distribution des populations microbiennes ciblées. Similairement, la concentration des bactéries totales, des archées méthanogènes et des principales bactéries cellulolytiques (*R. albus*, *R. flavofaciens*, *F. succinogenes*) estimée par qPCR est pratiquement inchangée, de même que la population de protozoaires qui sont le principal producteur d H₂, précurseur du CH₄ dans le rumen.

Le manque d'impact de TC sur les populations de protozoaires et de bactéries, simultanément à une diminution de la production de CH₄, pourrait suggérer un effet direct des TC sur les archées méthanogènes mais aucune diminution dans leur population n'a été observée. La baisse de la production de CH₄ due aux TC est souvent liée à une diminution de la population d'archées méthanogènes, comme plusieurs expériences l'ont déjà montré avec les plantes riches en TC dans les régimes alimentaires destinés aux ruminants (exemple, *Medicago sativa*, Lespedeza, Tavendale et al., 2005 et Animut et al., 2008). Néanmoins, plusieurs rapports ont montré une inefficacité des TC sur les archées méthanogènes (Norrapoke et al., 2012; Pilajun et Wanapat, 2013). **L'absence d'effet toxique sur cette population pourrait être due à son adaptation reliée aux enzymes de dégradation des TC et/ou aux sécrétions extracellulaires microbiennes qui protègent les archées méthanogènes réduisant ainsi la toxicité des TC (Anantasook et al., 2013). Cependant, dans notre étude, les archées méthanogènes n'ont pas variées, par conséquent le CH₄ ne devrait pas changer. S'il a baissé c'est que probablement l'activité (et non le nombre) des archées méthanogènes a diminué. C'est ce que suggèrent Popova et al. (2011). Plus d'études portant sur la détermination de l'activité des archées méthanogènes doivent être effectuées pour caractériser les causes de ce comportement.**

c. Les tanins condensés favorisent-ils l'ingestion et la digestibilité ?

Les régimes contenant des TC sont souvent associés à de faibles taux d'ingestions. Dans notre cas, le contraire s'est produit, on a observé une augmentation du taux d'ingestion avec les plantes riches en TC. La digestibilité *in vivo* à son tour augmentait comme conséquence aux forts taux d'ingestion. **L'administration des plantes riches en TC sous forme de pellets dans notre étude a vraisemblablement masqué l'astringence reprochée aux plantes riche en TC et par conséquent a favorisé l'ingestion (Minson et Milford, 1968). Ce résultat est très positif pour la production animale.**

d. Hypothèses émises sur l'effet des TC sur la méthanogénèse

L'inhibition de la méthanogénèse ruminale suite à l'incorporation de plantes riches en TC sous forme de pellets peut être expliquée par les éléments suivants :

- ❖ **Le mode d'administration :** incorporées sous forme de pellets, les plantes riches en TC sont très bien acceptées par l'animal. Ceci permet de dissimuler leur astringence et leur donne pas l'occasion de libérer leur goût amer. En conséquence, l'ingestion est stimulée parallèlement à une réduction de CH₄ sans altération des aptitudes fermentaires de l'animal. Les pellets peuvent également réduire le temps de séjour des aliments dans le rumen, en accélérant le passage des particules en dehors du rumen ; ce qui augmente parallèlement l'ingestion. En effet, un temps de rétention court dans le rumen est associé à une faible digestibilité de parois cellulaires et par conséquent à une moindre production de CH₄.

- ❖ **Inhibition de l'activité du microbiote ruminal:** l'action des TC sur les archées méthanogènes peut être due à l'inhibition de la croissance de la population ou de son activité, ou les deux ensemble (Tavendale et al., 2005, Popova et al., 2011). Nous avons seulement mesuré la concentration des archées méthanogènes sans leur activité. Il ne faut pas perdre de vue que l'effet des TC sur les populations microbiennes dépend de leur affinité relative aux protéines enzymatiques microbiennes. Cette hypothèse est fortement appuyée car les activités anti-méthanogènes des TC peuvent impliquer l'action de tannage des protéines fonctionnelles (enzymes et coenzymes) situées sur les sites accessibles chez les archées méthanogènes, comme le coenzyme M, par exemple, qui est spécifique aux archées méthanogènes. En conséquence, l'activité métabolique des archées méthanogènes devrait être inhibée tandis que leur nombre reste inchangé. Les TC peuvent également se fixer sur les enzymes microbiennes des bactéries cellulolytiques et des protozoaires et inhiber leur activité, ce qui réduirait la disponibilité du H₂ nécessaire à la production de CH₄ et diminuerait ainsi la méthanogénèse.

Pour conclure, les TC de *L. leucocephala*, *M. esculenta* et *G. sepium* ont montré, tant *in vitro* qu'*in vivo*, un fort potentiel dans la mitigation des émissions de CH₄ entérique, sans effets indésirables prononcés sur la fermentation ruminale et sur la digestibilité *in vivo*. La relation dose-réponse est linéaire pour les trois plantes étudiées,

le facteur dose est plus influençant que le facteur source de TC et conditionne majoritairement leur effet. La baisse de CH₄ observé quand les plantes riches en TC sont ajoutées ne peut être expliquée par les changements microbiens qui sont mineurs. De plus, elle ne s'accompagne pas d'une diminution des AGV.

Les résultats de l'étude *in vivo* suggèrent que les TC de *L. leucocephala*, *M. esculenta* et dans une moindre mesure de *G. sepium*, sous forme de pellets, pourraient être utilisés pour atténuer la production de CH₄ sans effets nuisibles marqués sur l'ensemble des paramètres fermentaires. Ces résultats sont conformes à la plus part des expériences qui ont montré que la teneur en TC d'un fourrage détermine son potentiel anti-méthanogène. Néanmoins, le développement de l'utilisation des plantes riches en TC dans les régimes des ruminants devrait prendre en considération, non seulement l'aspect écologique de la production de CH₄, mais aussi la productivité animale surtout dans un pays comme l'Algérie

L'utilisation des feuilles d'arbustes fourragers riches en TC dans l'alimentation des ruminants constitue une alternative alimentaire intéressante vue le déficit fourrager rencontré en Algérie et l'augmentation des prix des matières premières formulant les aliments concentrés. En effet, les valeurs azotées et énergétiques de ces feuilles d'arbustes peuvent couvrir les besoins des ruminants pendant une période longue de l'année et surtout en période de soudure. Ce qui permet d'envisager les feuilles de ces arbustes comme un supplément d'azote avec des fourrages ou des sous-produits fibreux. Vu les problèmes de surpâturage que connaissent la plupart des régions agricoles, il serait intéressant d'entreprendre la plantation de certains arbustes. Dans ce cadre, notre étude présente un intérêt quant au choix des espèces à exploiter et à planter.

Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse a permis d'élargir les connaissances sur l'impact des TC et des HE sur la méthanogénèse ruminale et en particulier:

- ❖ Les effets négatifs des HE sur la fermentation ruminale *in vitro*,
- ❖ Le choix du standard de dosage des TC dans les plantes riches en TC,
- ❖ L'effet des TC sur la fermentation entérique,
- ❖ La relation dose-réponse entre les TC et la production de CH₄ *in vitro*,
- ❖ La concentration et la distribution des populations microbiennes, en fonction des TC,

- ❖ Les changements de composition du microbiote ruminal impliqué dans la méthanogénèse chez deux races d'ovins recevant le même régime de plantes riches en TC sous forme de pellets, par mesure de densité du microbiote par qPCR.

Notre étude confirme que les métabolites secondaires comme les HE et les TC peuvent réduire la production de CH₄. Cependant, l'effet positif des deux HE testées sur la méthanogénèse est contrebalancé par leur impact négatif sur l'ensemble des fermentations ruminales contrairement aux TC. Les trois plantes riches en TC testées dans cette étude (*L. leucocephala*, *M. esculenta* et *G. sepium*) ont montré leur efficacité dans l'inhibition de la production de CH₄, tant *in vitro* qu'*in vivo*, avec des effets indésirables vraiment mineurs sur la fermentation ruminale et la digestibilité. La relation dose-réponse est linéaire et la dose est le facteur majeur qui conditionne l'amplitude de la réponse plutôt que la source de TC. Les résultats obtenus mettent en évidence que la baisse de CH₄ n'est pas nécessairement expliquée par les changements du microbiote ruminal. En effet, la concentration et la diversité des microorganismes ne sont pas forcément corrélées à la quantité de CH₄ produit et l'activité des microorganismes est un élément d'une importance majeure qui doit être pris en considération dans les études qui lient la production de CH₄ aux microorganismes du rumen.

Notre étude a montré que l'utilisation des plantes riches en TC comme additif a permis de contrôler l'activité de l'écosystème ruminal et d'optimiser son fonctionnement et de réduire les rejets polluants de CH₄ par l'animal et *in fine*, améliorer les processus fermentaires de l'animal. L'utilisation des plantes riches en TC comme additif représente une clé de contrôle car les TC, en tant qu'alternative naturelle, apparaissent comme étant de bons candidats pour atténuer la production de CH₄ et de réguler le fonctionnement du rumen.

L'augmentation de l'ingestion et des AGV permet d'envisager l'incorporation de ces plantes dans les rations alimentaires sous forme de pellets, qui présentent une nouvelle méthode d'administration du fait de l'avantage agronomique et environnemental qu'elles présentent.

Dans le but de progresser dans ce domaine, il est indispensable de :

- ❖ Définir la structure chimique des TC et élucider le rapport structure-activité biologique car l'effet des TC sur la digestibilité de la ration ne dépend pas seulement de la

quantité présente mais aussi de la taille, du poids des molécules (Huang et al., 2010) et du nombre de sites de liaisons (Mueller-Harvey, 2006),

- ❖ Déterminer la dose optimale de TC qui permet la protection des protéines de la ration contre leur dégradation dans le rumen, tout en évitant d'accroître les pertes d'azote dans les fèces,
- ❖ Appréhender les fonctions du microbiote (activité) directement sur les échantillons.
- ❖ Vérifier si l'utilisation d'extraits de tanins est aussi efficace pour réduire le CH₄ que celle de la plante correspondante, à même dose de tanins,
- ❖ Conduire de nouvelles études sur les plantes riches en TC granulées versus non granulées pour expliquer si l'effet des plantes riches en TC vient des TC eux mêmes ou de la présentation physique de la plante.

BIBLIOGRAPHIE

- Abreu, A., Carulla, J. E., Lascano, C. E., Diaz, T. E., Kreuzer, M., & Hess, H. D. (2004). Effects of fruits on ruminal fermentation and duodenal nitrogen flow of sheep fed a tropical grass diet with and without legume. *Journal of animal science*, 82, 1392-1400.
- Aerts, R. J., Barry, T. N., & McNabb, W. C. (1999). Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 75, 1-12.
- Agarwal, N., Kamra, D. N., Chaudhary, L. C., & Patra, A. K. (2006). Effect of *Sapindus mukorossi* extracts on in vitro methanogenesis and fermentation characteristics in buffalo rumen liquor. *Journal of applied animal research*, 30, 1-4.
- Agarwal, N., Shekhar, C., Kumar, R., Chaudhary, L. C., & Kamra, D. N. (2009). Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on in vitro methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Animal Feed Science and Technology*, 148, 321-327.
- Akkari, H., Darghouth, M. A., & Ben Salem, H. (2008). Preliminary investigations of the anti-nematode activity of *Acacia cyanophylla* Lindl.: excretion of gastrointestinal nematode eggs in lambs browsing *A. cyanophylla* with and without PEG or grazing native grass. *Small Ruminant Research*, 74, 78-83.
- Akrout, A., Chemli, R., Chreif, I., & Hammami, M. (2004). Etude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata (Tunisie). *Cahiers Options Méditerranéennes*, 62, 289-292.
- Alonso-Díaz, M. A., Torres-Acosta, J. F. D. J., Sandoval-Castro, C. A., & Capetillo-Leal, C. M. (2010). Polyphenolic compounds of nutraceutical trees and the variability of their biological activity measured by two methods. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12, 649-656.
- Alonso-Díaz, M. A., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Capetillo-Leal, C., Brunet, S., & Hoste, H. (2008a). Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Veterinary parasitology*, 153, 187-192.
- Alonso-Díaz, M. A., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Hoste, H., Aguilar-Caballero, A. J., & Capetillo-Leal, C. M. (2008c). Is goats' preference of forage trees affected by their tannin or fiber content when offered in cafeteria experiments?. *Animal Feed Science and Technology*, 141, 36-48.
- Anantasook, N., Wanapat, M., Cherdthong, A., & Gunun, P. (2013). Effect of plants containing secondary compounds with palm oil on feed intake, digestibility, microbial protein synthesis and microbial population in dairy cows. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 26, 820.
- Ando, S., Nishida, T., Ishida, M., Hosoda, K., & Bayaru, E. (2003). Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. *Livestock Production Science*, 82, 245-248.
- Animut, G., Puchala, R., Goetsch, A. L., Patra, A. K., Sahl, T., Varel, V. H., & Wells, J. (2008a). Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. *Animal Feed Science and Technology*, 144, 212-227.

- Animut, G., Puchala, R., Goetsch, A. L., Patra, A. K., Sahl, T., Varel, V. H., & Wells, J. (2008b). Methane emission by goats consuming different sources of condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 144, 228-241.
- Araujo, R. C., Pires, A. V., Mourão, G. B., Abdalla, A. L., & Sallam, S. M. A. (2011). Use of blanks to determine in vitro net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers. *Animal feed science and technology*, 166, 155-162.
- Archimède, H., Bastianelli, D., Boval, M., Tran, G., & Sauvant, D. (2011). Ressources tropicales: disponibilité et valeur alimentaire. *Productions animales*, 24, 23-40.
- Archimède, H., Eugène, M., Magdeleine, C. M., Boval, M., Martin, C., Morgavi, D. P., Lecomte, P., & Doreau, M. (2011). Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 59-64.
- Archimède, H., Sauvant, D., Assoumaya, C., Fanchone, A., & Boval, M. (2009). Fourrages tropicaux: valeur alimentaire comparée aux fourrages tempérés et évaluation au pâturage. *Rencontre. Recherche. Ruminants*, 16, 17-24.
- Ashby, K. D., Casey, T. A., Rasmussen, M. A., & Petrich, J. W. (2001). Steady-state and time-resolved spectroscopy of F420 extracted from methanogen cells and its utility as a marker for fecal contamination. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 1123-1127.
- Association of Official Analytical Chemists. 1990. *Official methods of analysis*. 15th ed. Association of Official Analysis Chemists, Arlington, VA.
- Association of Official Analytical Chemists. 2006: *Official Methods for Analysis*. Association of Official Analysis Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- Assoumaya, C., Sauvant, D., & Archimède, H. (2007). Etude comparative de l'ingestion et de la digestion des fourrages tropicaux et tempérés. *Productions Animales*, 20, 383-392.
- Bae, H. D., McAllister, T. A., Yanke, J., Cheng, K. J., & Muir, A. D. (1993). Effects of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. *Applied and environmental microbiology*, 59, 2132-2138.
- Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R., & Wolfe, R. S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological reviews*, 43, 260-296.
- Barone R. (1984). Anatomie comparée des Mammifères domestiques. In: Vigot (Ed). *Splanchnologie*, Tome 4, Paris, France.
- Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., & Hoste, H. (2005). Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the in vitro larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology*, 131, 531-538.
- Barry, T. N., & McNabb, W. C. (1999). The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition*, 81, 263-272.

- Bayourthe, C., & Ali-Haimoud-Lekhal, D. (2014). Les extraits de plantes chez le ruminant: effets sur les fermentations dans le rumen et la qualité lipidique des produits animaux. *INRA Production Animale*, 27, 317-328.
- Beauchemin, K. A., & McGinn, S. M. (2006). Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *Journal of Animal Science*, 84, 1489-1496.
- Beauchemin, K. A., Kreuzer, M., O'mara, F., & McAllister, T. A. (2008). Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Animal Production Science*, 48, 21-27.
- Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., Martinez, T. F., & McAllister, T. A. (2007). Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 85, 1990-1996.
- Benchaar, C., & Greathead, H. (2011). Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 338-355.
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A., & Beauchemin, K. A. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 209-228.
- Benchaar, C., Hristov, A.N., & Greathead, H. (2009). Essential oils as feed additives in ruminant nutrition. In: Steiner, T. (Ed.), *PhytoGenics in Animal Nutrition. Natural Concepts to Optimize Gut Health and Performance*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 111–146.
- Benchaar, C., Petit, H. V., Berthiaume, R., Ouellet, D. R., Chiquette, J., & Chouinard, P. Y. (2007). Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *Journal of Dairy Science*, 90, 886-897.
- Benchaar, C., Petit, H. V., Berthiaume, R., Whyte, T. D., & Chouinard, P. Y. (2006). Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. *Journal of dairy science*, 89, 4352-4364.
- Berenbaum, M. R. (1983). Effects of tannins on growth and digestion in two species of papilionids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 34, 245-250.
- Bernays, E. A., & Chamberlain, D. J. (1980). A study of tolerance of ingested tannin in *Schistocerca gregaria*. *Journal of Insect Physiology*, 26, 415-420.
- Bhatta, R., Baruah, L., Saravanan, M., Suresh, K. P., & Sampath, K. T. (2013). Effect of medicinal and aromatic plants on rumen fermentation, protozoa population and methanogenesis in vitro. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 97, 446-456.
- Bhatta, R., Saravanan, M., Baruah, L., & Prasad, C. S. (2015). Effects of graded levels of tannin-containing tropical tree leaves on in vitro rumen fermentation, total protozoa and methane production. *Journal of applied microbiology*, 118, 557-564.
- Bhatta, R., Saravanan, M., Baruah, L., & Sampath, K. T. (2012). Nutrient content, in vitro ruminal fermentation characteristics and methane reduction potential of tropical tannin-containing leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2929-2935.

- Bhatta, R., Uyeno, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Yabumoto, Y., Nonaka, I., Enishi, O., & Kurihara, M. (2009). Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *Journal of Dairy Science*, 92, 5512-5522.
- Bhatti, H. Q., Iqbal, Z., Chatha, S. A. S., & Bukhari, I. H. (2007). Variations in oil potential and chemical composition of *Eucalyptus crebra* among different districts of Punjab-Pakistan. *International Journal of Agriculture and Biology*, 9, 136-138.
- Bodas, R., López, S., Fernandez, M., García-González, R., Rodríguez, A. B., Wallace, R. J., & González, J. S. (2008). In vitro screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 245-258.
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F. J., & López, S. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176, 78-93.
- Bouazza, L., Bodas, R., Boufennara, S., Bousseboua, H., & López, S. (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., Bouazza, L., López, S., Bousseboua, H., Bodas, R. (2013). Effect of polyethylene glycol addition on methane production from some Algerian brows e plant species in an in vitro gas system. Zaragoza : CIHEAM / INRAT / OEP / IRESA / FAO Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 107.
- Boufennara, S., Lopez, S., Bousseboua, H., Bodas, R., & Bouazza, L. (2012). Chemical composition and digestibility of some browse plant species collected from Algerian arid rangelands. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 10, 88-98.
- Bourbouze, A., & Donadieu, P. (1987). L'élevage sur parcours en regions mediterraneennes. *Options Mediterraneennes*, France.
- Bouzouita, N., Kachouri, F., Ben Halima, M., & Chaabouni, M. M. (2008). Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 10, 119-125.
- Brailsford, M. D., & Hartman, P. A. (1968). Characterization of *Streptococcus durans* bacteriophages. *Canadian Journal of Microbiology*, 14, 397-402.
- Broadhurst, R. B., & Jones, W. T. (1978). Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29, 788-794.
- Brown, E. G., Anderson, R. C., Carstens, G. E., Gutierrez-Bañuelos, H., McReynolds, J. L., Slay, L. J., Callaway, T.R., & Nisbet, D. J. (2011). Effects of oral nitroethane administration on enteric methane emissions and ruminal fermentation in cattle. *Animal feed science and technology*, 166, 275-281.

- Brunet, S. (2008). Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestif des ruminants (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.) Lavoisier.
- Bruneton, J., & Pharmacognosy, P. (1995). Medicinal Plants Intercept. Andover, UK, 691-693.
- Burns, R. E. (1971). Method for estimation of tannin in grain sorghum. *Agronomy Journal*, 63, 511-512.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Kamel, C. (2006). Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science*, 89, 761-771.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Cardozo, P. W., & Kamel, C. (2005a). Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 88, 2508-2516.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Carro, M. D., & Kamel, C. (2005b). Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 88, 4393-4404.
- Busquet, M., Greathead, H., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Kamel, C. (2003). Efecto del extracto de ajo y el cinemaldehido sobre la producción, composición y residuos en leche en vacas de alta producción. *ITEA*, 24, 756-758.
- 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. *Options méditerranéennes*, 52, 175-178.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007). Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science*, 90, 2580-2595.
- Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Kamel, C. (2004). Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science*, 82, 3230-3236.
- Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Kamel, C. (2005). Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *Journal of animal science*, 83, 2572-2579.
- Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Kamel, C. (2006). Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. *Journal of animal science*, 84, 2801-2808.
- 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. *Crop and Pasture Science*, 56, 961-970.

- Chami, N., Chami, F., Bennis, S., Trouillas, J., & Remmal, A. (2004). Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 8, 217-226.
- Chaucheyras-Durand, F., Walker, N. D., & Bach, A. (2008). Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 5-26.
- Chaves, A. V., Baah, J., Wang, Y., McAllister, T. A., & Benchaar, C. (2012). Effects of cinnamon leaf, oregano and sweet orange essential oils on fermentation and aerobic stability of barley silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 906-915.
- Chaves, A. V., He, M. L., Yang, W. Z., Hristov, A. N., McAllister, T. A., & Benchaar, C. (2008). Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. *Canadian Journal of Animal Science*, 88, 117-122.
- Cheeke, P. R. (1996). Biological effects of feed and forage saponins and their impacts on animal production. In *Saponins used in Food and Agriculture* (pp. 377-385). Springer US.
- Chentli, A., Gillmann, L., Bouazza, L., Medjkal, S., Limami, M. A., Le Paven, M. C., & Bousseboua, H. (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*, 2, 660-671.
- Cieslak, A., Szumacher-Strabel, M., Stochmal, A., & Oleszek, W. (2013). Plant components with specific activities against rumen methanogens. *Animal*, 7, 253-265.
- Cieslak, A., Zmora, P., Pers-Kamczyc, E., & Szumacher-Strabel, M. (2012). Effects of tannins source (*Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation in vivo. *Animal feed science and technology*, 176, 102-106.
- Cluff, L. K., Welch, B. L., Pederson, J. C., & Brotherson, J. D. (1982). Concentration of monoterpenoids in the rumen ingesta of wild mule deer. *Journal of Range Management*, 192-194.
- Cortés, J. E., Moreno, B., Pabón, M. L., Avila, P., Kreuzer, M., Hess, H. D., & Carulla, J. E. (2009). Effects of purified condensed tannins extracted from *Calliandra*, *Flemingia* and *Leucaena* on ruminal and postruminal degradation of soybean meal as estimated in vitro. *Animal feed science and technology*, 151, 194-204.
- Dahouda, M., Toleba, S. S., Youssao, A. K. I., Mama, A. L. I., & Hornick, J. L. (2009). Utilisation des cossettes et des feuilles de manioc en finition des pintades (*Numida meleagris*, L): performances zootechniques, coûts de production, caractéristiques de la carcasse et qualité de la viande. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 153, 82-87.
- Dalzell, S. A., & Kerven, G. L. (1998). A rapid method for the measurement of *Leucaena* spp proanthocyanidins by the proanthocyanidin (butanol/HCl) assay. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78, 405-416.
- Dehority, B. A. (2003). *Rumen microbiology* (Vol. 14). Nottingham: Nottingham University Press.

- Denman, S. E., Tomkins, N. W., & McSweeney, C. S. (2007). Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiology Ecology*, 62, 313-322.
- Derwich, E., Benziane, Z., & Boukir, A. (2009). Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3, 3818-3824.
- Deshpande, S. S., Cheryan, M., Salunkhe, D. K., & Luh, B. S. (1986). Tannin analysis of food products. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 24, 401-449.
- Dlugokencky, E. J., Bruhwiler, L., White, J. W. C., Emmons, L. K., Novelli, P. C., Montzka, S. A., Masarie, K.A., Lang, P.M., Crotwell, A.M., Miller, G.B., & Gatti, L. V. (2009). Observational constraints on recent increases in the atmospheric CH₄ burden. *Geophysical Research Letters*, 36 DOI: 10.1029/2009GL039780.
- Doreau, M., & Jouany, J. P. (1998). Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on nutrient digestion in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 81, 3214-3221.
- Doreau, M., Martin, C., Eugène, M., Popova, M., & Morgavi, D. P. (2011). Leviers d'action pour réduire la production de méthane entérique par les ruminants. *Productions Animales*, 24, 461-474.
- Dorigo, U., Volatier, L., & Humbert, J. F. (2005). Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research*, 39, 2207-2218.
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88, 308-316.
- Edwards, J. E., Huws, S. A., Kim, E. J., & Kingston-Smith, A. H. (2007). Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS microbiology ecology*, 62, 323-335.
- Ellis, J. L., Kebreab, E., Odongo, N. E., McBride, B. W., Okine, E. K., & France, J. (2007). Prediction of methane production from dairy and beef cattle. *Journal of dairy science*, 90, 3456-3466.
- Ennajar, M., Bouajila, J., Lebrihi, A., Mathieu, F., Abderraba, M., Raies, A., & Romdhane, M. (2009). Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of essential oils and various extracts of *Juniperus phoenicea* L.(Cupressaceae). *Journal of food science*, 74, 364-371.
- Feeny, P. (1970). Seasonal Changes in Oak Leaf Tannins and Nutrients as a Cause of Spring Feeding by Winter Moth Caterpillars. *Ecology*, 51, 565-581.
- Finlay, B. J., Esteban, G., Clarke, K. J., Williams, A. G., Embley, T. M., & Hirt, R. P. (1994). Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters*, 117, 157-161.
- Fonty, G. & Chaucheyras-Durand, F. (2007). *Les écosystèmes digestifs*, Edition Tec & Doc. Lavoisier. (pp. 168 to 170 and 311).
- Fonty, G., Gouet, P., Jouany, J. P., & Senaud, J. (1987). Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. *Journal of General Microbiology*, 133, 1835-1843.

- Fonty, G., Jouany, J. P., Forano, E., & Goet, P. (1995). L'écosystème microbien du réticulo-rumen. Nutrition des ruminants domestiques. INRA, Paris, France, 299-347.
- Forsberg, C. W., Cheng, K. J., & White, B. A. (1997). Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. In *Gastrointestinal microbiology* (pp. 319-379). Springer US.
- Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Berntsen, T., Betts, R., Fahey, D. W., Haywood, J., Lean, J., Lowe, D.C., Myhre, G., Nganga, J., Prinn, R., Raga, G.; Schulz, M., & Van Dorland, R. (2007). Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. Chapter 2. In *Climate Change 2007. The Physical Science Basis*.
- Fraser, M. D., Fychan, R., & Jones, R. (2000). Voluntary intake, digestibility and nitrogen utilization by sheep fed ensiled forage legumes. *Grass and Forage Science*, 55, 271-279.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M., & Rossi, P. (2002). Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*, 4, 634-643.
- Frutos, P., Raso, M., Hervás, G., Mantecón, Á. R., Pérez, V., & Giráldez, F. J. (2004). Is there any detrimental effect when a chestnut hydrolysable tannin extract is included in the diet of finishing lambs?. *Animal Research*, 53, 127-136.
- Garcia, J. L., Patel, B. K., & Ollivier, B. (2000). Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe*, 6, 205-226.
- García-González, R., López, S., Fernandez, M., Bodas, R., & González, J. S. (2008). Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 36-52.
- Gerber, P. J., H. Steinfeld, B. Henderson, A. Mottet, C. Opio, J. Dijkman, A. Falcucci, and G. Tempio. 2013. Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy.
- Gershenson, J., & Croteau, R. (1999). Terpenoids. in: *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. Vol. 1. Academic Press, San Diego, CA:165–219.
- Getachew, G., Pittroff, W., Putnam, D. H., Dandekar, A., Goyal, S., & DePeters, E. J. (2008). The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on in vitro rumen fermentation and microbial protein synthesis. *Animal feed science and technology*, 140, 444-461.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2004). Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and environmental microbiology*, 70, 5750-5755.
- Giner-Chavez, B. I., Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lascano, C., Reed, J. D., & Pell, A. N. (1997). A method for isolating condensed tannins from crude plant extracts with trivalent ytterbium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 359-368.

- Goel, G., & Makkar, H. P. (2012). Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical animal health and production*, 44, 729-739.
- Goel, G., Makkar, H. P. S., & Klaus Becker. (2009). Inhibition of methanogens by bromochloromethane: effects on microbial communities and rumen fermentation using batch and continuous fermentations. *British Journal of Nutrition*, 101, 1484-1492]
- Goel, G., Makkar, H. P., & Becker, K. (2008a). Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage-and concentrate-based feeds to methane. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 72-89.
- Goel, G., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2008b). Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 770-777.
- Gouet, P., Grain, J., Dubourguier, H., & Albagnac, G. (1986). Interactions entre espèces microbiennes anaérobies dans le rumen. *Reproduction Nutrition Développement*, 26, 147-159.
- Grainger, C., Clarke, T., Auldish, M. J., Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., Waghorn, G. C., & Eckard, R. J. (2009). Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*, 89, 241-251.
- Guo, Y. Q., Liu, J. X., Lu, Y., Zhu, W. Y., Denman, S. E., & McSweeney, C. S. (2008). Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 421-426.
- Gupta, B. S., Satapathy, N., Chhabra, S. S., & Ranjhan, S. K. (1970). Effect of various levels of Chakunda leaf meal on growth and egg production of White Leghorn birds. *Indian Veterinary Journal*, 47, 1094-1101.
- Guyader, J., Eugène, M., Nozière, P., Morgavi, D. P., Doreau, M., & Martin, C. (2014). Influence of rumen protozoa on methane emission in ruminants: a meta-analysis approach. *Animal*, 8, 1816-1825.
- Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1989). Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *Journal of Chemical Ecology*, 15, 1795-1810.
- Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1994). Assay of condensed tannins or flavonoid oligomers and related flavonoids in plants. *Methods in enzymology*, 234, 429-437.
- Hariadi, B. T., & Santoso, B. (2010). Evaluation of tropical plants containing tannin on in vitro methanogenesis and fermentation parameters using rumen fluid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 456-461.
- Hart, K. J., Yanez-Ruiz, D. R., Duval, S. M., McEwan, N. R., & Newbold, C. J. (2008). Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 8-35.
- Haslam, E. (1989). Plant polyphenols: vegetable tannins revisited. CUP Archive.

- Hassanat, F., & Benchaar, C. (2013). Assessment of the effect of condensed (acacia and quebracho) and hydrolysable (chestnut and valonea) tannins on rumen fermentation and methane production in vitro. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 332-339.
- Hayler, R., Steingass, H., & Drochner, W. (1998). Effects of various feedstuffs rich in tannin content on rumen methanogenesis in-vitro-using the Hohenheim (Germany) Gas Test. In *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology (Germany)*.
- Hegarty, R. S. (1999). Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Crop and Pasture Science*, 50, 1321-1328.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6, 986-994.
- Hespell, R. B., Akin, D. E., & Dehority, B. A. (1997). *Bacteria, fungi, and protozoa of the rumen*. Mackie RI, White BA, Isaacson RE. *Gastrointestinal Microbiology*. Chapman and Hall, New York.
- Hess, H. D., Monsalve, L. M., Lascano, C. E., Carulla, J. E., Diaz, T. E., & Kreuzer, M. (2003a). Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on in vitro ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Crop and Pasture Science*, 54, 703-713.
- Hess, H. D., Kreuzer, M., Diaz, T. E., Lascano, C. E., Carulla, J. E., Soliva, C. R., & Machmüller, A. (2003b). Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology*, 109, 79-94.
- Hess, H.D., Beuret, R.A., Lotscher, M., Hindrichsen, I.K., Machmuller, A., Carulla, J.E., Lascano, C.E., & Kreuzer, M., 2004. Ruminal fermentation, methanogenesis and nitrogen utilization of sheep receiving tropical grass hay-concentrate diets offered with *Sapindus saponaria* fruits and *Cratylia argentea* foliage. *Animal. Science*, 79, 177–18.
- Hobson, P. N., & Stewart, C. S. (Eds.). (1997). *The rumen microbial ecosystem*. Springer Science & Business Media.
- Holtshausen, L., Chaves, A. V., Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., McAllister, T. A., Odongo, N. E., Cheeke, P.R., & Benchaar, C. (2009). Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92, 2809-2821.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S. M., & Hoskin, S. O. (2006). The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*, 22, 253-261.
- Hostettmann, K., & Marston, A. (1995). *Saponins*. Cambridge University Press.
- Hu, W. L., Liu, J. X., Ye, J. A., Wu, Y. M., & Guo, Y. Q. (2005). Effect of tea saponin on rumen fermentation in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 120, 333-339.
- Huang, X. D., Liang, J. B., Tan, H. Y., Yahya, R., & Ho, Y. W. (2011). Effects of *Leucaena* condensed tannins of differing molecular weights on in vitro CH₄ production. *Animal feed science and technology*, 166, 373-376.

- Huang, X. D., Liang, J. B., Tan, H. Y., Yahya, R., Khamsekhiew, B., & Ho, Y. W. (2010). Molecular weight and protein binding affinity of *Leucaena* condensed tannins and their effects on in vitro fermentation parameters. *Animal feed science and technology*, 159, 81-87.
- Imai, H., Osawa, K., Yasuda, H., Hamashima, H., Arai, T., & Sasatsu, M. (2000). Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint of the growth of pathogenic bacteria. *Microbios*, 106, 31-39.
- Jackson, F. S., Barry, T. N., Lascano, C., & Palmer, B. (1996). The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree, shrub and forage legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 103-110.
- Janse, I., Bok, J., & Zwart, G. (2004) A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 57, 279-281.
- Janssen, P.H., & Kris, M. (2008) Structure of the archael community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology* , 74, 3619–3625.
- Jayanegara, A., & Palupi, E. (2011). Condensed tannin effects on nitrogen digestion in ruminants: A meta-analysis from in vitro and in vivo studies. *Media Peternakan-Journal of Animal Science and Technology*, 33, 176-181.
- Jayanegara, A., Leiber, F., & Kreuzer, M. (2012). Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96, 365-375.
- Jayanegara, A., Togtokhbayar, N., Makkar, H. P., & Becker, K. (2009). Tannins determined by various methods as predictors of methane production reduction potential of plants by an in vitro rumen fermentation system. *Animal Feed Science and Technology*, 150, 230-237.
- Jean-Blain, C. (1998). Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Revue de médecine vétérinaire*, 149, 911-920.
- Johnson, D. E., & Ward, G. M. (1996). Estimates of animal methane emissions. *Environmental monitoring and assessment*, 42, 133-141.
- Johnson, K. A., & Johnson, D. E. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of animal science*, 73, 2483-2492.
- Jouany, J. P. (1994). Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA Productions animales*, 7, 207-225.
- Jouany, J. P., & Ushida, K. (1999). The role of protozoa in feed digestion. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 12, 113-128.
- Jouany, J. P., Broudiscou, L., Prins, R. A., & Komisarczuk-Bony, S. (1995). De la population microbienne du rumen. *Nutrition des ruminants domestiques: ingestion et digestion*, 349.
- Kamel, C., Greathead, H. M. R., Tejido, M. L., Ranilla, M. J., & Carro, M. D. (2008). Effects of allicin and diallyl disulfide on in vitro rumen fermentation of a mixed diet. *Animal feed science and technology*, 145, 351-363.

- Kittelmann, S., Naylor, G. E., Koolaard, J. P., & Janssen, P. H. (2012). A proposed taxonomy of anaerobic fungi (Class Neocallimastigomycetes) suitable for large-scale sequence-based community structure analysis. *PLoS ONE* 7(5): e36866. doi:10.1371/journal.pone..
- Klappenbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R., & Schmidt, T. M. (2001) rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic acids research* 29, 181-184.
- Klevenhusen, F., Zeitz, J. O., Duval, S., Kreuzer, M., & Soliva, C. R. (2011). Garlic oil and its principal component diallyl disulfide fail to mitigate methane, but improve digestibility in sheep. *Animal feed science and technology*, 166, 356-363.
- Klieve, A. V., & Bauchop, T. (1988). Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. *Applied and environmental microbiology*, 54, 1637-1641.
- Klieve, A. V., & Swain, R. A. (1993). Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pulsed-field gel electrophoresis and laser densitometry. *Applied and environmental microbiology*, 59, 2299-2303.
- Klieve, A. V., Bain, P. A., Yokoyama, M. T., Ouwerkerk, D., Forster, R. J., & Turner, A. F. (2004). Bacteriophages that infect the cellulolytic ruminal bacterium *Ruminococcus albus* AR67. *Letters in applied microbiology*, 38, 333-338.
- Klita, P. T., Mathison, G. W., Fenton, T. W., & Hardin, R. T. (1996). Effects of alfalfa root saponins on digestive function in sheep. *Journal of Animal Science*, 74, 1144-1156.
- Klocke, J. A., & Chan, B. G. (1982). Effects of cotton condensed tannin on feeding and digestion in the cotton pest, *Heliothis zea*. *Journal of Insect Physiology*, 28, 911-915.
- Köhler, T., Laßner, D., Rost, A. K., Thamm, B., Pustowoit, B., & Remke, H. (2012). Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction: nonradioactive PCR methods. Springer Science & Business Media.
- Krause, D. O., Smith, W. J., Brooker, J. D., & McSweeney, C. S. (2005). Tolerance mechanisms of streptococci to hydrolysable and condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 121, 59-75.
- Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., & Satya, S. (2012). Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). *Acta tropica*, 122, 212-218.
- Kumar, R., Kamra, D. N., Agarwal, N., & Chaudhary, L. C. (2009). Effect of eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) oil on in vitro methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 9, 237-243.
- Lascano, C.E & Kreuzer, M. (2004). Ruminal fermentation, methanogenesis and nitrogen utilization of sheep receiving tropical grass hay-concentrate diets offered with *Sapindus saponaria* fruits and *Cratylia argentea* foliage. *Animal Science-Glasgow Then Penicuik*, 79, 177-189.
- Lassey, K. R. (2008). Livestock methane emission and its perspective in the global methane cycle. *Animal Production Science*, 48, 114-118.

- Lawson, D. L., Merritt, R. W., Klug, M. J., & Martin, J. S. (1982). The utilization of late season foliage by the orange striped oakworm, *Anisota senatoria*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 32, 242-248.
- Le Houérou, H. N. (1971). Les bases écologiques de l'amélioration fourragère et pastorale en Algérie. FAO report, Rome.
- Leahy, S. C., Kelly, W. J., Altermann, E., Ronimus, R. S., Yeoman, C. J., Pacheco, D. M., Li, D., Kong, Z., McTavish, S., Sang, C., Lambie, S.C., Janssen, P.H., Dey, & Attwood, G. T. (2010). The genome sequence of the rumen methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions. *PLoS ONE* 5(1): e8926. doi:10.1371/journal.pone.0008926.
- Lee, C., & Beauchemin, K. A. (2014). A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. *Canadian Journal of Animal Science*, 94(4), 557-570.
- Leinmüller, E., Steingass, H., & Menke, K. H. (1991). Tannins in ruminant feedstuffs. *Biannual Collection of Recent German Contributions Concerning Development through Animal Research*, 33, 9-62.
- Leng, R. A. (1990). Factors affecting the utilization of 'poor-quality' forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutrition Research reviews*, 3, 277-303.
- Li, W., & Powers, W. (2012). Effects of saponin extracts on air emissions from steers. *Journal of Animal Science*, 90, 4001-4013.
- Lila, Z. A., Mohammed, N., Kanda, S., Kamada, T., & Itabashi, H. (2003). Effect of sarsaponin on ruminal fermentation with particular reference to methane production in vitro. *Journal of Dairy Science*, 86, 3330-3336.
- Lin, B., Lu, Y., Wang, J. H., Liang, Q., & Liu, J. X. (2012a). The effects of combined essential oils along with fumarate on rumen fermentation and methane production in vitro. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 575, 54-67.
- Lin, B., Wang, J H., Lu, Y., Liang, Q., & Liu JX (2012b). In vitro rumen fermentation and methane production are influenced by active components of essential oils combined with fumarate. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97, 1-9.
- Lovett, D., Lovell, S., Stack, L., Callan, J., Finlay, M., Conolly, J., & O'Mara, F. P. (2003). Effect of forage/concentrate ratio and dietary coconut oil level on methane output and performance of finishing beef heifers. *Livestock Production Science*, 84, 135-146.
- Lovett, G. M., Canham, C. D., Arthur, M. A., Weathers, K. C., & Fitzhugh, R. D. (2006). Forest ecosystem responses to exotic pests and pathogens in eastern North America. *BioScience*, 56, 395-405.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

- Luton, P. E., Wayne, J. M., Sharp, R. J., & Riley, P. W. (2002). The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology*, 148, 3521-3530.
- Macheboeuf, D., Coudert, L., Bergeault, R., Lalière, G., & Niderkorn, V. (2014). Screening of plants from diversified natural grasslands for their potential to combine high digestibility, and low methane and ammonia production. *Animal*, 8, 1797-1806.
- Macheboeuf, D., Morgavi, D. P., Papon, Y., Mousset, J. L., & Arturo-Schaan, M. (2008). Dose-response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumen microbial population. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 335-350.
- Machmüller, A., Soliva, C. R., & Kreuzer, M. (2003). Methane-suppressing effect of myristic acid in sheep as affected by dietary calcium and forage proportion. *British Journal of Nutrition*, 90, 529-540.
- Makkar, H. P. (2003). Quantification of tannins in tree and shrub foliage : a laboratory analysis. Ed. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, the Netherlands, 116 p
- Malecky, M., Broudiscou, L. P., & Schmidely, P. (2009). Effects of two levels of monoterpene blend on rumen fermentation, terpene and nutrient flows in the duodenum and milk production in dairy goats. *Animal feed science and technology*, 154, 24-35.
- Manh, N. S., Wanapat, M., Uriyapongson, S., Khejornsart, P., & Chanthakhoun, V. (2012). Effect of eucalyptus (*Camaldulensis*) leaf meal powder on rumen fermentation characteristics in cattle fed on rice straw. *African Journal of Agricultural Research*, 7, 1997-2003.
- Mansouri, N., Satrani, B., Ghanmi, M., El Ghadraoui, L., & Aafi, A. (2011). Etude chimique et biologique des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* ssp. *lycia* et *Juniperus phoenicea* ssp. *turbinata* du Maroc. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 15, 415-424.
- Mao, H. L., Wang, J. K., Zhou, Y. Y., & Liu, J. X. (2010). Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livestock Science*, 129, 56-62.
- Marotti, M., Piccaglia, R., Giovanelli, E., Deans, S. G., & Eaglesham, E. (1994). Effects of planting time and mineral fertilization on peppermint (*Mentha x piperita* L.) essential oil composition and its biological activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 9, 125-129.
- Martin C., Morgavi D., Doreau M., & Jouany JR. (2006) Comment réduire la production de méthane chez les ruminants? *Fourrages*, 187, 283-300.
- 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 associated with rumen solid digesta. *Reproduction Nutrition Development*, 41, 413-424.
- Martin, C., Morgavi, D. P., & Doreau, M. (2010). Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*, 4, 351-365.
- Martínez Ortiz De Montellano, C., Vargas-Magaña, J. J., Aguilar-Caballero, A. J., Sandoval-Castro, C. A., Cob-Galera, L., May-Martínez, M., Miranda-Soberanis, R., Hoste, H., Cámara Sarmiento,

- R., & Torres-Acosta, J. F. J. (2007). Combining the effects of supplementary feeding and copper oxide needles for the control of gastrointestinal nematodes in browsing goats. *Veterinary Parasitology*, 146, 66-76.
- Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., Vargas-Magaña, J. J., Canul-Ku, H. L., Miranda-Soberanis, R., Capetillo-Leal, C., Sandoval-Castro, C. A., Hoste, H., & Torres-Acosta, J. F. J. (2010). Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 172, 283-290.
- Maxson, E. D., & Rooney, L. W. (1972). Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. *American Association of Cereal Chemists*, 49, 719.
- McAllister, T. A., & Newbold, C. J. (2008). Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Animal Production Science*, 48, 7-13.
- McAllister, T. A., Martinez, T., Bae, H. D., Muir, A. D., Yanke, L. J., & Jones, G. A. (2005). Characterization of condensed tannins purified from legume forages: chromophore production, protein precipitation, and inhibitory effects on cellulose digestion. *Journal of Chemical Ecology*, 31, 2049-2068.
- McArthur, C., Hagerman, A. E., & Robbins, C. T. (1991). Physiological strategies of mammalian herbivores against plant defenses. *Plant defenses against mammalian herbivory*, 103-114.
- McCourt, A. R., Yan, T., & Mayne, S. (2008). Validation of the sulfur hexafluoride (SF₆) tracer technique as a method of predicting methane output from dairy cows. *Proceedings of British Society of Animal Science Annual Conference.*, Scarborough, UK. Edinburgh, UK, 120.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D. & Morgan, C.A., 2002. *Animal Nutrition*. (6th ed.) Adison Wesley. Publ. Longman, Singapore Ltd.
- McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., Beever, D. A., & Newbold, C. J. (2003). Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5011-5014.
- McMahon, L. R., Majak, W., McAllister, T. A., Hall, J. W., Jones, G. A., Popp, J. D., & Cheng, K. J. (1999). Effect of sainfoin on in vitro digestion of fresh alfalfa and bloat in steers. *Canadian Journal of Animal Science*, 79, 203-212.
- McMichael, A. J., Powles, J. W., Butler, C. D., & Uauy, R. (2007). Food, livestock production, energy, climate change, and health. *The lancet*, 370, 1253-1263.
- Medini, H., Marzouki, H., Chemli, R., Khouja, M. L., Marongiu, B., Piras, A., & Tuveri, E. (2009). Comparison of the antimicrobial activity and the essential oil composition of *Juniperus oxycedrus* subsp. *macrocarpa* and *J. oxycedrus* subsp. *rufescens* obtained by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide extraction methods. *Chemistry of Natural Compounds*, 45, 739-741.
- Menaceur, F., Benchabane, A., Hazzit, M., & Baaliouamer, A. (2013). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Algerian *Juniperus phoenicea* L. Extracts. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 3, 87-96.

- Michalet-Doreau, B., Fernandez, I., Peyron, C., Millet, L., & Fonty, G. (2001). Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reproduction Nutrition Development*, 41, 187-194.
- Michelland, R. J. (2009). Caractérisation moléculaire des procaryotes et facteurs de variation des écosystèmes digestifs chez deux mammifères herbivores: approche comparée vache/lapin. Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- Michiels, J., Missotten, J., Dierick, N., Fremaut, D., Maene, P., & De Smet, S. (2008). In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 2371-2381.
- Milford, R., & Minson, D. J. (1968). The digestibility and intake of six varieties of Rhodes grass (*Chloris gayana*). *Animal Production Science*, 8, 413-418.
- Miller, T. L. (1995). Ecology of methane production and hydrogen sinks in the rumen. In *Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction*. (Eds W von Engelhardt, S Leonhard-Marek, G Breves, D Giesecke) pp. 317-331.
- Min, B. R., Attwood, G. T., Reilly, K., Sun, W., Peters, J. S., Barry, T. N., & McNabb, W. C. (2002). Lotus corniculatus condensed tannins decrease in vivo populations of proteolytic bacteria and affect nitrogen metabolism in the rumen of sheep. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 911-921.
- 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. *Animal Feed Science and Technology*, 106, 3-19.
- Min, B. R., Pinchak, W. E., Anderson, R. C., Fulford, J. D., & Puchala, R. (2006). Effects of condensed tannins supplementation level on weight gain and in vitro and in vivo bloat precursors in steers grazing winter wheat. *Journal of Animal Science*, 84, 2546-2554.
- Min, B. R., Pinchak, W. E., Fulford, J. D., & Puchala, R. (2005). Wheat pasture bloat dynamics, in vitro ruminal gas production, and potential bloat mitigation with condensed tannins. *Journal of Animal Science*, 83, 1322-1331.
- Min, B. R., Solaiman, S., Shange, R., & Eun, J. S. (2014). Gastrointestinal bacterial and methanogenic archaea diversity dynamics associated with condensed tannin-containing pine bark diet in goats using 16S rDNA amplicon pyrosequencing. *International Journal of Microbiology*, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/141909>.
- Minson, D. J. (1990). Intake of grazed forage. *Forage in Ruminant Nutrition*. Academy Press. San Diego. USA.
- Mohammed, N., Ajisaka, N., Lila, Z. A., Hara, K., Mikuni, K., Hara, K., Kanda, S., & Itabashi, H. (2004). Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation in vitro and in steers. *Journal of Animal Science*, 82, 1839-1846.

- Molan, A. L., Attwood, G. T., Min, B. R., & McNabb, W. C. (2001). The effect of condensed tannins from *Lotus pedunculatus* and *Lotus corniculatus* on the growth of proteolytic rumen bacteria in vitro and their possible mode of action. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 626-633.
- Moran, D., MacLeod, M., Wall, E., Eory, V., McVittie, A., Barnes, A., Rees, R.M., Topp, C.F.E., Pajot, G., Matthews, R., Smith, P., Moxey, A., 2011. Developing carbon budgets for UK agriculture, land-use, land-use change and forestry out to 2022. *Climatic Change*, 105, 529-553.
- Morgavi, D.P., Martin, C., Boudra, H., (2010b). Fungal secondary metabolites reduce rumen methane production in vitro and in vivo. *Proceedings of the Greenhouse Gases and Animal Agriculture (GGAA) Conference, Banff, Canada, E.J. McGeough and S.M. McGinn, eds*, 162
- Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C., & Newbold, C. J. (2010a). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 4, 1024-1036.
- Morgavi, D. P., Jouany, J. P., & Martin, C. (2008). Changes in methane emission and rumen fermentation parameters induced by refaunation in sheep. *Animal Production Science*, 48, 69-72.
- Morgavi, D. P., Martin, C., & Boudra, H. (2013). Fungal secondary metabolites from spp. reduce rumen methane production in vitro and in vivo. *Journal of Animal Science*, 91, 848-860.
- Morgavi, D. P., Martin, C., Jouany, J. P., & Ranilla, M. J. (2012). Rumen protozoa and methanogenesis: not a simple cause-effect relationship. *British Journal of Nutrition*, 107, 388-397.
- Morrison, C., & Gannon, F. (1994). The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1219, 493-498.
- Moss, A. R., Jouany, J. P., & Newbold, J. (2000, May). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. In *Annales de zootechnie* 3, 231-253.
- 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.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700.
- Myers, R. M., Fischer, S. G., Maniatis, T., & Lerman, L. S. (1985). Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 13, 3111-3129.
- Narvaez, N., Wang, Y., & McAllister, T. (2013). Effects of extracts of *Humulus lupulus* (hops) and *Yucca schidigera* applied alone or in combination with monensin on rumen fermentation and microbial populations in vitro. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2517-2522.
- Naumann, H. D., Tedeschi, L. O., Muir, J. P., Lambert, B. D., & Kothmann, M. M. (2013). Effect of molecular weight of condensed tannins from warm-season perennial legumes on ruminal methane production in vitro. *Biochemical Systematics and Ecology*, 50, 154-162.

- Newbold, C. J., & Rode, L. M. (2006, July). Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. In International congress series (Vol. 1293, pp. 138-147). Elsevier.
- Newbold, C. J., Lassalas, B., & Jouany, J. P. (1995). The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production in vitro. *Letters in Applied Microbiology*, 21, 230-234.
- Newbold, C. J., McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., & Wallace, R. J. (2004). Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Animal feed science and technology*, 114, 105-112.
- Niderkorn, V., Baumont, R., Le Morvan, A., & Macheboeuf, D. (2011). Occurrence of associative effects between grasses and legumes in binary mixtures on in vitro rumen fermentation characteristics. *Journal of animal science*, 89, 1138-1145.
- Normand P, Ponsonnet C, Nesme X, Neyra M & Simonet P (1996) ITS analysis of prokaryotes. In *Molecular microbial ecology manual*, pp. 1-12.
- Norrapoke, T., Wanapat, M., & Wanapat, S. (2012). Effects of protein level and mangosteen peel pellets (Mago-pel) in concentrate diets on rumen fermentation and milk production in lactating dairy crossbreds. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 25, 971-979.
- Odum, E. P., Odum, H. T., & Andrews, J. (1971). *Fundamentals of ecology* (Vol. 3). Philadelphia: Saunders.
- Ogimoto and IMAI, *Atlas of Rumen Microbiology*, Japan Scientific Societies press, 1981.
- Ohene-Adjei, S., Chaves, A. V., McAllister, T. A., Benchaar, C., Teather, R. M., & Forster, R. J. (2008). Evidence of increased diversity of methanogenic archaea with plant extract supplementation. *Microbial Ecology*, 56, 234-242.
- Ohene-Adjei, S., Teather, R. M., Ivan, M., & Forster, R. J. (2007). Postinoculation protozoan establishment and association patterns of methanogenic archaea in the ovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4609-4618.
- Olugbemi, T. S., Mutayoba, S. K., & Lekule, F. P. (2010). Evaluation of Moringa oleifera leaf meal inclusion in cassava chip based diets fed to laying birds. *Chemical Analysis*, 1500, 95-5.
- Orduño, G. H., Acosta, J. T., Castro, C. S., Caballero, A. A., Ramirez, R. R., Hoste, H., & Quintana, J. C. (2008). In vitro anthelmintic effect of Acacia gaureri, Havadia albicans and Quebracho tannin extracts on a Mexican strain of Haemonchus contortus L3 larvae. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 8, 191-197.
- Orpin, C. G. (1981). Fungi in ruminant degradation. In *Agricultural Science Seminar: Degradation of plant cell wall material*. London: Agriculture Research Council, 129-150.
- Orpin, C. G., & Joblin, K. N. (1997). The rumen anaerobic fungi. In *The rumen microbial ecosystem*. Springer Netherlands, 140-195.
- Orpin, C. G., & Munn, E. A. (1974). The occurrence of bacteriophages in the rumen and their influence on rumen bacterial populations. *Experientia*, 30, 1018-1020.

- Patra, A. K., & Saxena, J. (2009a). Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96, 363-375.
- Patra, A. K., & Saxena, J. (2009b). The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition Research Reviews*, 22, 204-219.
- Patra, A. K., & Saxena, J. (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71, 1198-1222.
- Patra, A. K., & Saxena, J. (2011). Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 24-37.
- Patra, A. K., & Yu, Z. (2014). Effects of vanillin, quillaja saponin, and essential oils on in vitro fermentation and protein-degrading microorganisms of the rumen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 897-905.
- Patra, A. K., Kamra, D. N., & Agarwal, N. (2006a). Effect of plant extracts on in vitro methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology*, 128, 276-291.
- Patra, A. K., Kamra, D. N., & Agarwal, N. (2006b). Effect of plants containing secondary metabolites on in vitro methanogenesis, enzyme profile and fermentation of feed with rumen liquor of buffalo. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 6, 203-213.
- Patra, A. K., Kamra, D. N., & Agarwal, N. (2010). Effects of extracts of spices on rumen methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feeds in vitro. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 511-520.
- Paul, S. S., Deb, S. M., & Singh, D. (2011). Isolation and characterization of novel sulphate-reducing *Fusobacterium* sp. and their effects on in vitro methane emission and digestion of wheat straw by rumen fluid from Indian riverine buffaloes. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 132-140.
- Paynter, M. J. B., & Hungate, R. E. (1968). Characterization of *Methanobacterium mobilis* isolated from the bovine rumen. *Journal of Bacteriology*, 95, 1943-1951.
- Pei, C. X., Mao, S. Y., Cheng, Y. F., & Zhu, W. Y. (2010). Diversity, abundance and novel 16S rRNA gene sequences of methanogens in rumen liquid, solid and epithelium fractions of Jinnan cattle. *Animal*, 4, 20-29.
- Pellikaan, W. F., Stringano, E., Leenaars, J., Bongers, D. J., van Laar-van Schuppen, S., Plant, J., & Mueller-Harvey, I. (2011). Evaluating effects of tannins on extent and rate of in vitro gas and CH₄ production using an automated pressure evaluation system (APES). *Animal Feed Science and Technology*, 166, 377-390.
- Pen, B., Sar, C., Mwenya, B., & Takahashi, J. (2008). Effects of *Quillaja saponaria* extract alone or in combination with *Yucca schidigera* extract on ruminal fermentation and methanogenesis in vitro. *Animal Science Journal*, 79, 193-199.

- Pen, B., Sar, C., Mwenya, B., Kuwaki, K., Morikawa, R., & Takahashi, J. (2006). Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on in vitro ruminal fermentation and methane emission. *Animal Feed Science and Technology*, 129, 175-186.
- Pen, B., Takaura, K., Yamaguchi, S., Asa, R., & Takahashi, J. (2007). Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* with or without β 1–4 galacto-oligosaccharides on ruminal fermentation, methane production and nitrogen utilization in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 138, 75-88.
- Perez, J. O., Avilés-Nova, F., Albarrán-Portillo, B., Rojas-Hernández, S., Córdoba-Izquierdo, A., Villa-Mancera, A., & Castelan-Ortega, O. A. (2014). Chemical composition of leguminous tree foliage and effect of polyethylene glycol on gas production and in vitro digestion parameters. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17, 207-214.
- Pilajun, R., & Wanapat, M. (2013). Microbial population in the rumen of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) as influenced by coconut oil and mangosteen peel supplementation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97, 439-445.
- Pinares-Patino, C. S., Ulyatt, M. J., Waghorn, G. C., Lassey, K. R., Barry, T. N., Holmes, C. W., & Johnson, D. E. (2003). Methane emission by alpaca and sheep fed on lucerne hay or grazed on pastures of perennial ryegrass/white clover or birdsfoot trefoil. *The Journal of Agricultural Science*, 140, 215-226.
- Popova, M., Martin, C., Eugène, M., Mialon, M. M., Doreau, M., & Morgavi, D. P. (2011). Effect of fibre-and starch-rich finishing diets on methanogenic Archaea diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 113-121.
- Porter, L. J., Hrstich, L. N., & Chan, B. G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25, 223-230.
- Poungchompu, O., Wanapat, M., Wachirapakorn, C., Wanapat, S., & Cherdthong, A. (2009). Manipulation of ruminal fermentation and methane production by dietary saponins and tannins from mangosteen peel and soapberry fruit. *Archives of Animal Nutrition*, 63, 389-400.
- Price, M. L., & Butler, L. G. (1977). Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 1268-1273.
- Price, M. L., Van Scoyoc, S., & Butler, L. G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 1214-1218.
- Puchala, R., Min, B. R., Goetsch, A. L., & Sahlu, T. (2005). The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. *Journal of Animal Science*, 83, 182-186.
- Qi, Y., Patra, G., Liang, X., Williams, L.E., Rose, S., Redkar, R.J., & DelVecchio, V.G. (2001). Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3720-3727.
- Ramirez-Restrepo, C. A., Barry, T. N., Marriner, A., Lopez-Villalobos, N., McWilliam, E. L., Lassey, K. R., & Clark, H. (2010). Effects of grazing willow fodder blocks upon methane production and blood composition in young sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 155, 33-43.

- Ramírez-Restrepo, C. A., Barry, T. N., Pomroy, W. E., López-Villalobos, N., McNabb, W. C., & Kemp, P. D. (2005). Use of *Lotus corniculatus* containing condensed tannins to increase summer lamb growth under commercial dryland farming conditions with minimal anthelmintic drench input. *Animal Feed Science and Technology*, 122, 197-217.
- Ranjard, L., Poly, F., & Nazaret, S. (2000). Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology*, 151, 167-177.
- Reed, J. D. (1995). Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of animal science*, 73, 1516-1528.
- Reese, J. C., Chan, B. G., & Waiss Jr, A. C. (1982). Effects of cotton condensed tannin, maysin (corn) and pinitol (soybeans) on *Heliothis zea* growth and development. *Journal of Chemical Ecology*, 8, 1429-1436.
- Reeve, J. N., Nölling, J., Morgan, R. M., & Smith, D. R. (1997). Methanogenesis: genes, genomes, and who's on first?. *Journal of Bacteriology*, 179, 59-75.
- Rira, M., Marie-Magdeleine, C., Archimède, H., Morgavi, D. P., & Doreau, M. 2013. Effect of condensed tannins on methane emission and ruminal microbial populations. In: J. W. Oltjen, E. Kebreab, and H. Lapierre, editors, *Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands. p. 501–502.
- Ritchie, A. E., Robinson, I. M., & Allison, M. J. (1970). Rumen bacteriophage: survey of morphological types. *Microscopie Electronique*, 3, 333-334.
- Riviere, C. (1897). Le manioc en Algerie et dans le bassin mediterraneen. *Bulletin de la Societe Nationale D'acclimatation de France.*, 1897, 490-496.
- Roth, S., Steingäß, H., & Drochner, W. (2002). Minderung von Methanemissionen und Optimierung der N-Versorgung bei Wiederkäuern durch die Behandlung von Futtermitteln mit Tanninen. *Hohenheimer Umweltagung*, Verlag Günter Heimbach, Stuttgart, 181-186.
- Rouviere, P. E., & Wolfe, R. S. (1988). Novel biochemistry of methanogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 7913-7916.
- Sadet, S. (2008). Etude de la diversité spécifique des bactéries attachées à la paroi du rumen: effet du régime alimentaire. Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.
- Sadet, S., Martin, C., Meunier, B., & Morgavi, D. P. (2007). PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal*, 1, 939-944.
- Sallam S.M.A., Abdelgaleil S.A.M., Bu en o I.C.S., Nassera M.E.A., Araujo R.C., Abdalla A.L. (2011) Effect of essential oils on ruminal fermentation, microbial population and methane emission in vitro. In: Ranilla M.J. (ed.), Carro M.D. (ed.), Ben Salem H. (ed.), Moran d-Fehr P. (ed.). *Challenging strategies to promote the sheep and goat sector in the current global context*. Zaragoza : CIHEAM / CSIC / Universidad de León / FAO, 2011. p. 149 -156 (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 99)

- Sallam, S. M. A., & Abdelgaleil S.A.M.(2010). Effect of different levels of citrus essential oil and its active components on rumen microbial fermentation and methane emission in vitro. *Cuban Journal of Agriculture Science* 44, 367–371.
- Sallam, S. M. A., Bueno, I. C. S., Brigide, P., Godoy, P. B., Vitti, D. M. S. S., & Abdalla, A. L. (2009). Efficacy of eucalyptus oil on in vitro ruminal fermentation and methane production. *Options Mediterraneennes*, 85, 267-272.
- Santoso, B., Mwenya, B., Sar, C., Gamo, Y., Kobayashi, T., Morikawa, R., Kimura, K., Mizukoshi, H., & Takahashi, J. (2004). Effects of supplementing galacto-oligosaccharides, *Yucca schidigera* or nisin on rumen methanogenesis, nitrogen and energy metabolism in sheep. *Livestock Production Science*, 91, 209-217.
- Sarkar, S. K., & Howarth, R. E. (1976). Specificity of the vanillin test for flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24, 317-320.
- Sauvant, D., & Giger-Reverdin, S. (2007, September). Empirical modelling by meta-analysis of digestive interactions and CH₄ production in ruminants. In 2nd EAAP International Symposium on energy and protein metabolism and nutrition. Wageningen Academic Publisher, Vol. 124, p. np.
- Scalbert, A. (1992). Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In *Plant polyphenols*. Springer US, pp. 259-280.
- Schlichtherle-Cerny, H., Imhof, M., Fernandez Garcia, E., & Bosset, J. O. (2004). Changes in terpene composition from pasture to cheese. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 95, 681-688.
- Sharp, R., Ziemer, C. J., Stern, M. D., & Stahl, D. A. (1998). Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbiology Ecology*, 26, 71-78.
- Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L. S., & Myers, R. M. (1989). Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 232-236.
- Shimizu T, Ohshima S, Ohtani K, Hoshino K, Honjo K & Hayashi H (2001) Sequence heterogeneity of the ten rRNA operons in *Clostridium perfringens*. *Systematic and Applied Microbiology* 24, 149-156.
- Shin, E. C., Cho, K. M., Lim, W. J., Hong, S. Y., An, C. L., Kim, E. J., Kim, Y.K., B.R. Choi, B.R., An, J.M., Kang, J.M., Kim, H., & Yun, H. D. (2004). Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 378-383.
- Silber, M. L., Davitt, B. B., Khairutdinov, R. F., & Hurst, J. K. (1998). A mathematical model describing tannin–protein association. *Analytical Biochemistry*, 263, 46-50.
- Singer, M. D., Robinson, P. H., Salem, A. Z. M., & DePeters, E. J. (2008). Impacts of rumen fluid modified by feeding *Yucca schidigera* to lactating dairy cows on in vitro gas production of 11

- common dairy feedstuffs, as well as animal performance. *Animal Feed Science and Technology*, 146, 242-258.
- Sivakumaran, S., Molan, A. L., Meagher, L. P., Kolb, B., Foo, L. Y., Lane, G. A., Attwooda, G.A., Fraser, K., & Tavendale, M. (2004). Variation in antimicrobial action of proanthocyanidins from *Dorycnium rectum* against rumen bacteria. *Phytochemistry*, 65, 2485-2497.
- Skillman, L. C., Evans, P. N., Naylor, G. E., Morvan, B., Jarvis, G. N., & Joblin, K. N. (2004). 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe*, 10, 277-285.
- 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. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 222-228.
- Śliwiński, B. J., Kreuzer, M., Wettstein, H. R., & Machmüller, A. (2002). Rumen fermentation and nitrogen balance of lambs fed diets containing plant extracts rich in tannins and saponins, and associated emissions of nitrogen and methane. *Archives of Animal Nutrition*, 56, 379-392.
- Smith, A. H., Zoetendal, E., & Mackie, R. I. (2005). Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial Ecology*, 50, 197-205.
- Smith, P. H., & Hungate, R. E. (1958). Isolation and characterization of *Methanobacterium ruminantium* sp. *Journal of Bacteriology*, 75, 713.
- Soliva, C. R., Widmer, S., & Kreuzer, M. (2008). Ruminal fermentation of mixed diets supplemented with St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) flowers and pine (*Pinus mugo*) oil or mixtures containing these preparations. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 17, 352-362.
- Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K. B., Tignor, M., & Miller, H. L. (2007). The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change, 235-337.
- Soltan, Y. A., Morsy, A. S., Sallam, S. M. A., Louvandini, H., & Abdalla, A. L. (2012). Comparative in vitro evaluation of forage legumes (prosopis, acacia, atriplex, and leucaena) on ruminal fermentation and methanogenesis. *Journal of Animal and Feed Sciences* (21), 753-766.
- Spanghero, M., Zanfi, C., Fabbro, E., Scicutella, N., & Camellini, C. (2008). Effects of a blend of essential oils on some end products of in vitro rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 364-374.
- Sparg, S., Light, M. E., & Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 219-243.
- Spencer, C. M., Cai, Y., Martin, R., Gaffney, S. H., Goulding, P. N., Magnolato, D., Lilley T.H., & Haslam, E. (1988). Polyphenol complexation-some thoughts and observations. *Phytochemistry*, 27, 2397-2409.
- Staerfl, S. M., Zeitz, J. O., Kreuzer, M., & Soliva, C. R. (2012). Methane conversion rate of bulls fattened on grass or maize silage as compared with the IPCC default values, and the long-term methane mitigation efficiency of adding acacia tannin, garlic, maca and lupine. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 148, 111-120.

- Stewart, C. S., Fonty, G., & Gouet, P. (1988). The establishment of rumen microbial communities. *Animal Feed Science and Technology*, 21, 69-97.
- Swain, T., & Hillis, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10, 63-68.
- Szumacher-Strabel, M., & Cieślak, A. (2010). Potential of phytofactors to mitigate rumen ammonia and methane production. *Journal of Animal Feed Science and Technology*, 19, 319-337.
- Szumacher-Strabel, M., Zmora, P., Roj, E., Stochmal, A., Pers-Kamczyc, E., Urbańczyk, A., Oleszek, W., Lechniak, D., & Cieślak, A. (2011). The potential of the wild dog rose (*Rosa canina*) to mitigate in vitro rumen methane production. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 20, 285–299.
- Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., & Benno, Y. (2001). Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2766-2774.
- Takahashi, J., Miyagawa, T., Kojima, Y., & Umetsu, K. (2000). Effects of *Yucca shidigera* extract, probiotics, monensin and L-cysteine on rumen methanogenesis. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 13, 499-501.
- Tan, H. Y., Sieo, C. C., Abdullah, N., Liang, J. B., Huang, X. D., & Ho, Y. W. (2011). Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 169, 185-193.
- Tarakanov, B. V. (1971). Bacteriophages in the contents of cattle rumen. *Mikrobiologija*, 40, 544.
- Tatsuoka, N., Hara, K., Mikuni, K., Hara, K., Hashimoto, H., & Itabashi, H. (2008). Effects of the essential oil cyclodextrin complexes on ruminal methane production in vitro. *Animal Science Journal*, 79, 68-75.
- Tavendale, M. H., Meagher, L. P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G. T., & Sivakumaran, S. (2005). Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 403-419.
- Terrill, T. H., Rowan, A. M., Douglas, G. B., & Barry, T. N. (1992). Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58, 321-329.
- Terrill, T. H., Windham, W. R., Evans, J. J., & Hoveland, C. S. (1990). Condensed tannin concentration in sericea lespedeza as influenced by preservation method. *Crop Science*, 30, 219-224.
- Thauer, R. K. (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson: 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture. *Microbiology*, 144, 2377-2406.
- Tiret, L. (2001). Physiologie de la digestion. Polycopié. Alfort: Ecole Nationale Vétérinaire, Unité Pédagogique de Physiologie et Thérapeutique.-69 p.

- Tokura, M., Chagan, I., Ushida, K., & Kojima, Y. (1999a). Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. *Current Microbiology*, 39, 123-128.
- Tokura, M., Tajima, K., & Ushida, K. (1999b). Isolation of *Methanobrevibacter* sp. as a ciliate-associated ruminal methanogen. *The Journal of general and applied microbiology*, 45, 43-47.
- Tokura, M., Ushida, K., Miyazaki, K., & Kojima, Y. (1997). Methanogens associated with rumen ciliates. *FEMS Microbiology Ecology*, 22, 137-143.
- Tornambé, G. A. B. R. I. E. L. E., Cornu, A., Pradel, P., Kondjoyan, N., Carnat, A. P., Petit, M., & Martin, B. (2006). Changes in terpene content in milk from pasture-fed cows. *Journal of Dairy Science*, 89, 2309-2319.
- Torsvik, V., Daae, F. L., Sandaa, R. A., & Øvreås, L. (1998). Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology*, 64, 53-62.
- Tymensen, L. D., Beauchemin, K. A., & McAllister, T. A. (2012). Structures of free-living and protozoa-associated methanogen communities in the bovine rumen differ according to comparative analysis of 16S rRNA and *mcrA* genes. *Microbiology*, 158, 1808-1817.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1561-1568.
- Ushida, K., & Jouany, J. P. (1994). Fibre digesting capacities of 5 genera of rumen ciliates. In *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology (Germany)*. DLG.
- van Elsas, J. D., Jansson, J. K., & Trevors, J. T. (2006). *Modern soil microbiology*. CRC Press.
- Van Soest, P.J., Jrobertson, J.B., & Lewis, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.
- Van Zijderveld, S. M., Gerrits, W. J. J., Dijkstra, J., Newbold, J. R., Hulshof, R. B. A., & Perdok, H. B. (2011). Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94, 4028-4038.
- Verma, V., Chaudhary, L. C., Agarwal, N., Bhar, R., & Kamra, D. N. (2012). Effect of feeding mixture of garlic bulb and peppermint oil on methane emission, rumen fermentation and microbial profile in buffaloes. *Animal Nutrition and Feed Technology* 12: 157-164
- Viallon, C., Martin, B., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Garel, J. P., Coulon, J. B., & Berdagué, J. L. (2000). Transfer of monoterpenes and sesquiterpenes from forages into milk fat. *Le lait*, 80, 635-641.
- Vincken, J. P., Heng, L., de Groot, A., & Gruppen, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68, 275-297.
- Volatier L. (2004), Réponse d'une communauté périphytique à un effluent complexe: études en bio-essais et en canaux artificiels. *Science et Technique du déchet*. Lyon: L'Institut des Sciences Appliquées de Lyon, 289 p.

- 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., & McNabb, W. C. (2003). Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 383-392.
- Waghorn, G. C., Tavendale, M. H., & Woodfield, D. R. (2002). Methanogenesis from forages fed to sheep. In *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, Vol. 64, pp. 167-171.
- Wallace, R. J. (1986) Ecology of Rumen Microorganisms : Protein Use. In : Dobson A, Dobson
- Wang, J., Zhao, H., Kong, W., Jin, C., Zhao, Y., Qu, Y., & Xiao, X. (2009). Microcalorimetric assay on the antimicrobial property of five hydroxyanthraquinone derivatives in rhubarb (*Rheum palmatum* L.) to *Bifidobacterium adolescentis*. *Phytomedicine*, 17, 684-689.
- Wang, X. F., Mao, S. Y., Liu, J. H., Zhang, L. L., Cheng, Y. F., Jin, W., & Zhu, W. Y. (2011). Effect of gynosaponins on methane production and microbe numbers in a fungus-methanogen coculture. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 20, 272-284.
- Wang, Y., McAllister, T. A., Yanke, L. J., & Cheeke, P. R. (2000). Effect of steroidal saponin from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 887-896.
- Waterman, P. G., Mole, S., & Tomas-Barberan, F. A. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. *Phytochemistry*, 238.
- Weatherburn, M. W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39, 971-974.
- Welch, B. L., & Pederson, J. C. (1981). In vitro digestibility among accessions of big sagebrush by wild mule deer and its relationship to monoterpenoid content. *Journal of Range Management*, 497-500.
- White, S. M., Welch, B. L., & Flinders, J. T. (1982). Monoterpenoid content of pygmy rabbit stomach ingesta. *Journal of Range Management*, 107-109.
- Whitford, M. F., Teather, R. M., & Forster, R. J. (2001). Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC microbiology*, 1-5.
- Williams, A. G., & Coleman, G. S. (1997). The rumen protozoa. In *The rumen microbial ecosystem*. Springer Netherlands. pp. 73-139.
- Wina, E., Muetzel, S., & Becker, K. (2005). The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Production A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8093-8105.
- Wina, E., Muetzel, S., & Becker, K. (2006). The dynamics of major fibrolytic microbes and enzyme activity in the rumen in response to short-and long-term feeding of *Sapindus rarak* saponins. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 114-122.

- Wolfe, R. S. (1993). An historical overview of methanogenesis. In *Methanogenesis*. Springer US. pp. 1-32.
- Wolin, M. J., Miller, T. L., & Stewart, C. S. (1997). Microbe-microbe interactions. In *The rumen microbial ecosystem*. Springer Netherlands. pp. 467-491.
- Woodward, S. L., Waghorn, G. C., Lassey, K. R., & Laboyrie, P. G. (2002). Does feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) reduce methane emissions from dairy cows? In: *Proceedings-New Zealand Society of Animal Production*, 62, 227-230).
- Woodward, S. L., Waghorn, G. C., Ulyatt, M. J., & Lassey, K. R. (2001). Early indications that feeding Lotus will reduce methane emissions from ruminants. In *Proceedings-New Zealand Society of Animal Production*, 61, 23-26.
- Wright, A. D. G., Williams, A. J., Winder, B., Christophersen, C. T., Rodgers, S. L., & Smith, K. D. (2004). Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1263-1270.
- Wu, J. Y., Gardner, B. H., Kushner, N. N., Pozzi, L. A. M., Kensil, C. R., Cloutier, P. A., ... & Newman, M. J. (1994). Accessory cell requirements for saponin adjuvant-induced class I MHC antigen-restricted cytotoxic T-lymphocytes. *Cellular Immunology*, 154, 393-406.
- 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. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64, 1737-1742.
- Yang, W. Z., Benchaar, C., Ametaj, B. N., Chaves, A. V., He, M. L., & McAllister, T. A. (2007). Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 90, 5671-5681.
- Yaninek, J. S., & Schulthess, F. (1993). Developing an environmentally sound plant protection for cassava in Africa. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 46, 305-324.
- Yu Z & Morrison M (2004) Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* 36, 808-812.
- Zeleke, A. B., Clément, C., Hess, H. D., Kreuzer, M., & Soliva, C. R. (2006, July). Effect of foliage from multi-purpose trees and a leguminous crop residue on in vitro methanogenesis and ruminal N use. In *International Congress Series*, 1293, 168-171.
- Zhou, Y. Y., Mao, H. L., Jiang, F., Wang, J. K., Liu, J. X., & McSweeney, C. S. (2011). Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 93-100.
- Zmora, P., Cieslak, A., Jedrejek, D., Stochmal, A., Pers-Kamczyc, E., Oleszek, W., Nowak, A., Szczechowiak, J., Lechniak, D., & Szumacher-Strabel, M. (2012). Preliminary in vitro study on the effect of xanthohumol on rumen methanogenesis. *Archives of Animal Nutrition*, 66, 66-71.

ANNEXES

Annexe 1. Composition et préparation du milieu de fermentation *in vitro*

1/ Solutions nécessaires

Tampon 1:

- ❖ $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 4g
- ❖ NaHCO_3 35g
- ❖ H_2O qsp 1L

Tampon 2:

- ❖ Na_2HPO_4 anhydre 5,7g
- ❖ KH_2PO_4 anhydre 6,2g
- ❖ $\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5g
- ❖ H_2O qsp 1L

Solution de Résazurine:

- ❖ 100 mg pour 100 mL

Solution d'oligoéléments:

- ❖ $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ 13,2g
- ❖ $\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$ 10,0g
- ❖ $\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ 1,0g
- ❖ $\text{FeCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ 0,8g
- ❖ H_2O qsp 100 mL

2- Préparation du tampon

Ajouter les éléments suivants:

| Volume (L) | 0,2 | 0,3 | 0,32 | 0,5 | 0,84 | 1 | 1,3 | 1,5 | 1,68 |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|------|
| Trypticase, g | 0,476 | 0,71 | 0,76 | 1,19 | 2 | 2,38 | 3,09 | 3,57 | 4 |
| H_2O , mL | 97,4 | 142,8 | 152,4 | 238 | 400 | 476 | 618,8 | 714 | 800 |
| Microminéraux, mL | 0,024 | 0,035 | 0,038 | 0,06 | 0,1 | 0,12 | 0,155 | 0,18 | 0,2 |
| Solution tampon, mL | 47,6 | 71,4 | 76,2 | 119 | 200 | 238 | 309,4 | 357 | 400 |
| Macrominéraux, mL | 47,6 | 71,4 | 76,2 | 119 | 200 | 238 | 309,4 | 357 | 400 |
| Résazurine sol., mL | 0,23 | 0,36 | 0,38 | 0,6 | 1 | 1,2 | 1,56 | 1,8 | 2 |
| Cystéine-HCl, mg | 59,5 | 89,3 | 95,2 | 148,8 | 250 | 297,6 | 386,9 | 446,4 | 500 |

- ❖ Ajuster le pH à la valeur souhaitée, à l'aide d'acide Trans-Niconitique (1M),
- ❖ Noter sur le flacon le niveau du liquide au marqueur,
- ❖ Faire bouillir le mélange jusqu'à obtention de la coloration rose stable,
- ❖ Compléter avec l'eau le volume qui s'est évaporé, en ajustant le volume au
- ❖ niveau du trait sur le flacon,
- ❖ Laisser refroidir sous flux de CO₂ passant à travers du piège à oxygène,
- ❖ Ajouter la cystéine,
- ❖ Vérifier et réajuster le pH si nécessaire.

Annexe 2. Dosage de l'ammoniac

1/ Principe

Le principe est basé sur la réaction de Berthelot. En milieu alcalin et en présence d'hypochlorite de sodium, l'azote ammoniacal forme avec deux molécules de phénol une molécule d'indophénol de coloration bleue. Cette réaction est catalysée par un complexe formé par le nitroprussiate de sodium et la soude. Plus le NH₃ sera concentré, plus la coloration bleue sera intense.

2/ Réactifs

- ❖ Phénol liquide à 80%,
- ❖ Nitroprussiate de Sodium (297,95 g/mol),
- ❖ Hydroxyde de Sodium (40 g/mol),
- ❖ Hypochlorite de Sodium (Bouteille de javel récente ou récemment ouverte),
- ❖ Sulfate d'ammonium,
- ❖ Solution A (106,2 mmol/L phénol ; 167,8 µmol/L mg nitroprussiate de sodium),
- ❖ Solution B (50 mmol/L NaOH ; 0,081 % CA en eau de Javel),
- ❖ Solution Stock Ammoniac (50 mmol/L (NH₄)₂ SO₄ ; équivalent à 100 mmol/L NH₃-N),
- ❖ Solution de travail d'Ammoniac (1 mmol/L (NH₄)₂ SO₄ ; équivalent à 2 mmol/L NH₃-N).

3/ Mode opératoire

- ❖ Décongeler les échantillons,

- ❖ Pipeter dans les puits 20 μL de standard ou d'échantillons en triplicatas,
- ❖ Ajouter 100 μL de Solution A,
- ❖ Couvrir et agiter 10 secondes sur un agitateur de microplaque,
- ❖ Ajouter 100 μL de Solution B,
- ❖ Couvrir et agiter 10 secondes sur un agitateur de microplaque,
- ❖ Incuber 15 min à 39°C avec le couvercle,
- ❖ Lire sur le spectrophotomètre à 630 nm.

4/ Expression des résultats

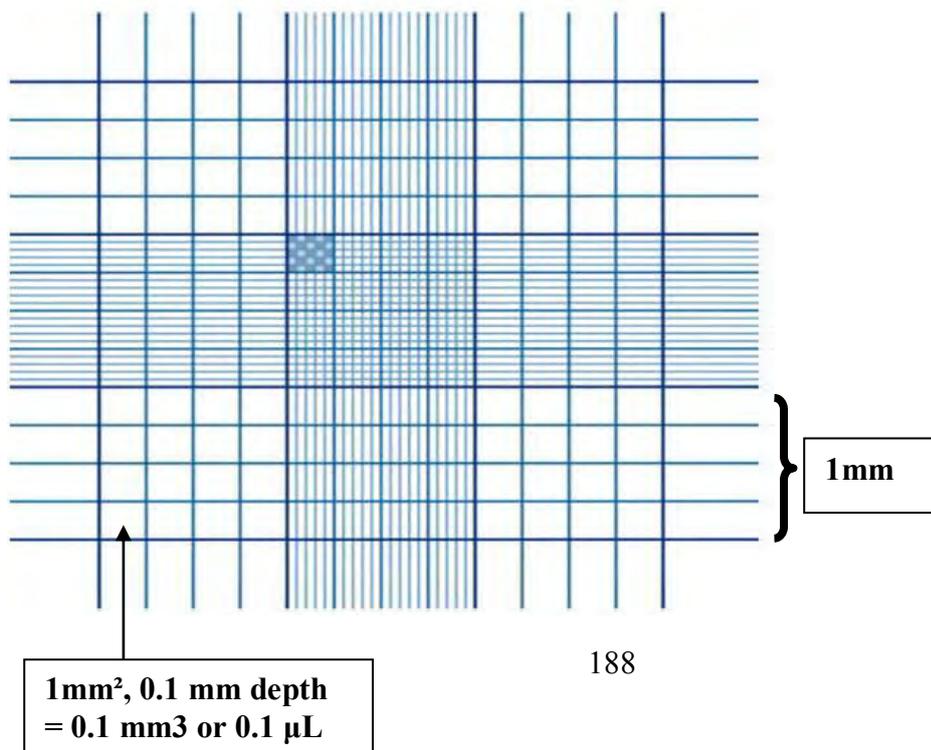
- ❖ Calculer l'équation ($y = ax + b$) de la droite étalon et le r^2 . Placer la DO en ordonnées et la concentration en abscisse,
- ❖ La gamme est validée si le $r^2 > 0,995$ et si $0,98 < a < 1,20$ et si $0 < b < 0,05$,
- ❖ Calcul de la concentration de NH_3 selon la formule suivante: $x = [(y - b) / a] \times Fd$ où Fd est le facteur de dilution = 11 (dilution $\times 1,1$ dans H_3PO_4 et 10 dans H_2O).

Annexe 3. Comptage des protozoaires

1/ Principe

Les protozoaires sont fixés par le formaldéhyde et colorés en bleu par le vert de méthyle au niveau des noyaux. Le comptage se fait ensuite sous microscope.

2/ Mode opératoire



- ❖ Diluer les échantillons avec du MFS ou tout autre solution isotonique type PBS. Une dilution au $\frac{1}{2}$ devrait convenir (500 μL PBS + 500 μL échantillon),
- ❖ Lors de chaque dilution et pour charger la chambre de comptage, remettre l'échantillon en suspension. Pour cela, procéder à de nombreuses inversions du tube (environ 10) et pipeter au centre du tube,
- ❖ Charger la cellule de Neubauer avec **15 μL** . Prendre soin de pipeter l'échantillon très doucement afin d'éviter que tous les gros protozoaires ne se trouvent ramassés sur les cotés du liquide,
- ❖ Répéter le pipetage et le comptage deux fois. Si les résultats totaux diffèrent de
 - Plus de 10%, répéter le comptage,
- ❖ Compter les Entodiniomorphes de petite taille ($<100\mu\text{m}$) dans les 4 grands carrés (rose sur la figure) de 1 mm^2 . La profondeur de la cellule est de 0,1mm. Ainsi, le volume de chaque grand carré est de 0,1 μL (mm^3) et le volume total des 4 grands carrés est de 0,4 μL (mm^3),
- ❖ Puis compter les Entodiniomorphes de grande taille ($>100\mu\text{m}$), les Isotricha et les Dasytricha sur la totalité de la lamelle. Le comptage s'effectue donc dans 15 μL .

3/ Expression des résultats

Le résultat s'exprime en **nombre de protozoaires / mL**, il faut procéder comme suit:

Protozoaires comptés sur les 4 grands carrés x facteur de dilution x facteur de conversion

Volume des 4 carrés

- ❖ *Facture de dilution* = 4, deux dilutions au $\frac{1}{2}$ (préparation échantillon et dilution du comptage),
- ❖ *Volume de la chambre* = 4 x 1 mm^2 (surface) x 0,1mm (profondeur) = 0,4 μL (mm^3) pour les petits Entodiniomorphes. 15 μL pour les gros Entodiniomorphes, les isotricha et les dasytricha,
- ❖ *Facteur de conversion* = 1000 pour convertir les μL en mL.

Annexe 4. Dosage des tanins condensés

Les TC sont dosés comme suit :

200 mg de plantes broyées sont mélangés avec 3 mL de méthanol, laisser reposer 30 minutes puis filtrer sur du coton. Ajouter 2 mL de méthanol puis filtrer à nouveau sur le coton. Presser le coton pour récupérer le filtrat tout en évitant de laisser passer des particules.

- ❖ **Chaque filtrat d'échantillon est fait en triple.**
- ❖ Tous les filtrats d'échantillons (**F**) et les points de gamme (**G**) sont faits avec un «blanc» échantillon (**FB**) ou un « blanc » gamme(**GB**)
- ❖ **Répartir 0,1mL de chaque point de gamme ou de blanc ou de filtrat d'échantillon dans les tubes correspondants.** La réaction doit se faire dans un bain d'eau glacé ou la température devra être inférieure à 10°C.

Dans les tubes à essai mettre,

- ❖ **FB ou GB** : 0,1 mL de point de gamme ou 0,1 mL de filtrat d'échantillon + 2mL d'eau distillée + 4 mL H₂SO₄ 70%.
- ❖ **F ou G** : 0,1 mL de point de gamme ou de filtrat d'échantillon + 2 mL d'eau distillée + 4 mL de vanilline 1%.

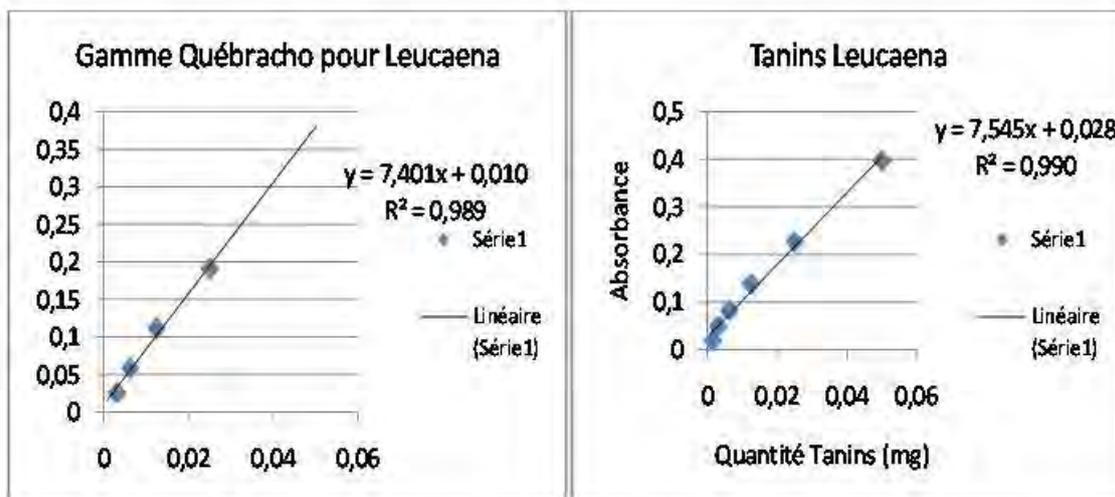
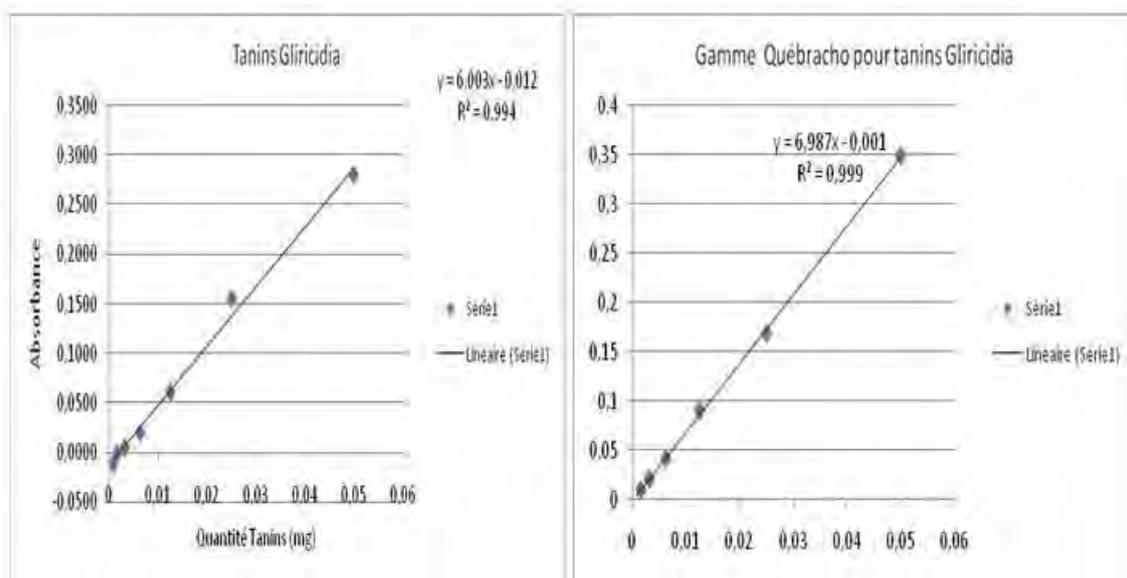
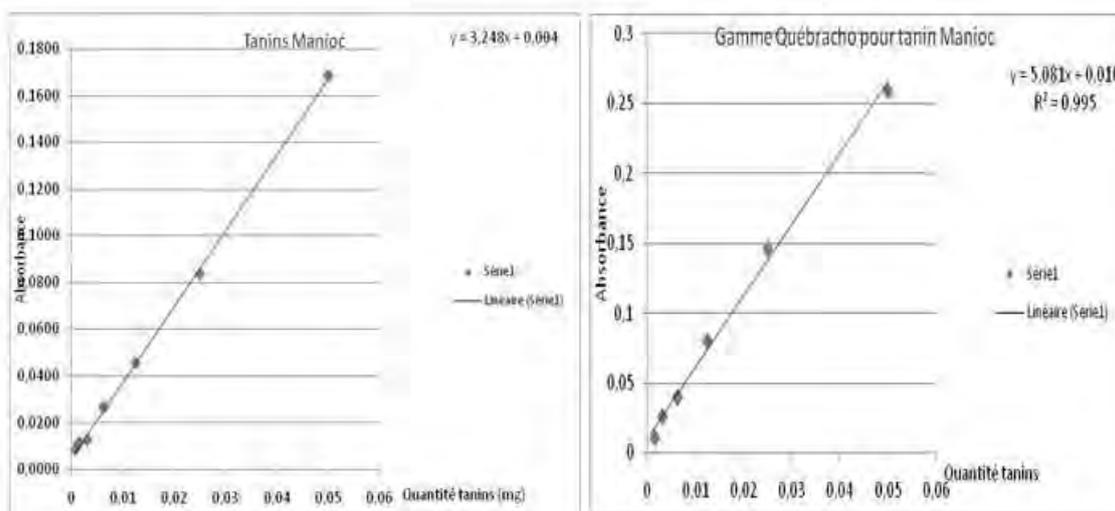
Faire trois blancs :

- ❖ Blanc vanilline (**BV**): 0,1 mL de vanilline + 2 mL d'eau distillée + 4 mL de vanilline 1%.
- ❖ Blanc vanilline méthanol (BV Me): 0,1 mL de Méthanol + 2 mL d'eau distillée + 4 mL de vanilline 1%.
- ❖ Blanc H₂SO₄ : 0,1 mL de point de gamme ou l'échantillon + 2 mL d'eau distillée + 4 mL H₂SO₄ 70%.

Agiter vigoureusement et laisser 20 min à température ambiante et mesurer la DO à 500 nm.

La DO finale est calculée de la manière suivante : $A = (F \text{ ou } G) - (FB \text{ ou } GB) - BV$.

La courbe de calibration est faite à partir de la gamme des tanins de chaque plante étudiée et les valeurs en proanthocyanidines des échantillons sont calculées à partir de l'équation issue de cette courbe.



Annexe 5. Dosage de l'azote

L'azote est dosé par la méthode de Dumas. Le principe de l'analyse consiste en la combustion de l'échantillon dans un four à haute température et dans un milieu riche en oxygène. Les gaz issus de la combustion sont alors séparés, piégés chimiquement et purifiés. Les NO_x sont réduits en N₂ sur du tungstène métallique et le flux gazeux est dirigé vers le détecteur thermo-conductif. Le détecteur thermo-conductif fonctionne sur le principe d'une différence de conductivité thermique entre deux flux gazeux. Dans une première chambre s'écoule le flux gazeux de référence (CO₂). Dans la seconde, s'écoule le mélange gazeux CO₂ + N₂. La différence de conductivité entre les deux gaz est alors intégrée et quantifiée. Cette opération est réalisée dans un Analyseur Élémentaire RapidN Cube et les résultats sont traités avec le Logiciel RapidN Cube.

Annexe 6. Evaluation des constituants pariétaux

La technique de VAN SOEST est basée sur trois hydrolyses successives:

- ❖ La cellule est gonflée par ébullition avec une solution détergente neutre à base de lauryl sulfate de sodium, pour qu'elle libère son contenu cellulaire. Il n'y reste que l'hémicellulose, la cellulose et la lignine qu'on appelle « **Fibre au Détergent Neutre, NDF** ».
- ❖ Par ébullition avec une solution sulfurique de bromure de cetyltriméthyl-ammonium, les protéines, les glucides et les hémicelluloses sont solubilisés, permettant ainsi de déterminer l'ensemble : cellulose + lignine encore appelé « **Fibre au Détergent Acide, ADF** ».
- ❖ A partir de cette Fibre au Détergent Acide, la lignine est estimée après solubilisation de la cellulose dans l'acide sulfurique 72 %.

1/ Réactifs

- ❖ Préparation de **N.D.S** : lauryl sulfate de sodium, 240 g ; EDTA, 148,88 g ; sodium borate decahydrate, 54,48g ; disodium hydrogène phosphate, 36,48 g ; 2-Ethoxy éthanol, 80 mL ; pH 7.
- ❖ Préparation de **A.D.S** 1N : eau 5000 mL ; cetyltrimethyl ammonium bromide, 160g ; acide sulfurique pur, 392 g ; eau qsp, 8000 ML.

- ❖ Préparation de la solution ADL à $d = 1,634$ à 20°C à partir H_2SO_4 $d = 1,84$.

2/ Mode opératoire pour les fourrages

- ❖ Après séchage des sachets à l'étuve 103°C , 120 mn minimum,
- ❖ Introduire et peser environ 0,47 g à 0,52 g d'échantillons, directement dans le sachet après tare,
- ❖ Fermer en soudant les sachets à 3 mm du bord.

Hydrolyse N.D.S. fourrage

- ❖ Etaler uniformément l'échantillon à l'intérieur du sachet pour permettre une meilleure attaque des solutions et une meilleure filtration,
- ❖ Placer les sachets remplis avec l'échantillon et soudés en veillant à ce que les sachets ne soient pas superposés mais décalés les uns par rapport aux autres,
- ❖ Mettre environ 2L de solution N.D.S. ou A.D.S,
- ❖ Mettre en route le digesteur 1 heure,
- ❖ A la fin de l'hydrolyse, rincer les échantillons avec environ 1,7 L d'eau chaude, répéter l'opération 4 fois le rinçage,
- ❖ Placer les sachets dans le panier et faire 20 tours sous le courant d'eau chaude,
- ❖ Essorer les sacs en comptant 20 tours pour enlever l'excès d'eau,
- ❖ Arroser copieusement avec de l'acétone,
- ❖ Sécher les sachets à l'étuve à 103°C pendant une nuit.

Hydrolyse A. D. S : mode opératoire identique à N.D.S fourrage

Détermination de la lignine

- ❖ Placer les sachets dans l'acide,
- ❖ Immerger les sachets dans l'eau et les retourner pendant 5 min,
- ❖ Immerger les sachets dans l'acide en agitant toutes les 20 min pendant 3 heures,
- ❖ Retirer les sachets à l'eau chaude sous le robinet pendant environ 1 à 2 min
- ❖ Les sachets sont ensuite placés dans le digesteur, puis passer à l'essoreuse pendant 20 tours sous le robinet d'eau chaude.
- ❖ Remettre les sachets dans le digesteur pour 2 rinçages supplémentaires avec eau chaude pendant 2 fois 5 min,

- ❖ Puis arroser copieusement avec de l'acétone,
- ❖ Rincer dans l'étuve à 103°C.

3/ Expression des résultats

Les formules utilisées pour la teneur en NDF, ADF, ADL sont les suivantes :

- ✓ NDF % : (Poids résidu NDF- poids sachet vide) / poids sachet plein/ MS x 10 000
- ✓ ADF % : (Poids résidu ADF- poids sachet vide) / poids sachet plein/ MS x 10 000
- ✓ ADL % : (Poids résidu ADL - poids sachet vide) / poids sachet plein/ MS x 10 000

Annexe 7. Mesure de méthane

1/ Préparation de la capsule contenant le gaz traceur (SF₆)

- ❖ Sur une balance précise au 1/100ème de mg peser la capsule vide propre, dégraissée et séchée, avec la pièce de Téflon et le fritté. Utiliser des gants et une pince pour manipuler la capsule,
- ❖ Plonger le corps de la capsule en laiton dans un bain d'azote liquide durant quelques minutes jusqu'à ce que celui-ci ait atteint une température cryogénique maximale,
- ❖ Prélever 1 seringue de 50 mL de SF₆ pur par l'intermédiaire du septum installé sur le détendeur de la bouteille de gaz,
- ❖ Sortir la capsule de l'azote liquide et la vider du liquide,
- ❖ Transvaser délicatement la seringue de SF₆ dans la capsule en prenant soin de positionner l'aiguille verticalement et à 5 mm environ du fond de la capsule.de remplissage. Prélever et injecter de nouveau du gaz SF₆ jusqu'à remplissage complet de la capsule,
- ❖ Refermer très rapidement le corps de la capsule en vissant la noix munie du film Téflon et du fritté,
- ❖ Peser la capsule (sèche) lorsque sa température est stabilisée à celle de la température ambiante. Cette pesée sert à vérifier qu'une quantité suffisante de SF₆ a été introduite dans la capsule. Elle est correcte si celle-ci est supérieure à 600 mg environ,
- ❖ Déterminer la vitesse de diffusion du SF₆ avant introduction de la capsule dans l'animal selon la procédure classique.

2/ Calibration de la capsule SF₆

- ❖ Disposer la capsule dans un erlenmeyer placé à température d'utilisation (ex : bain marie à 39°C pour l'introduction dans le rumen) et balayé par un flux d'azote pour éviter l'accumulation des gaz.
- ❖ Peser au moins une fois par semaine la capsule (précision au 1/100ème de mg) en prenant soin de ne pas toucher la capsule avec les doigts ou de ne pas la souiller. Relever la date et l'heure de la pesée.
- ❖ Six à huit semaines de pesées sont généralement nécessaires pour obtenir une bonne estimation du flux de gaz.

3/ Expression des résultats

- ❖ **Estimation de la vitesse de diffusion du gaz SF₆ :**

$$\frac{\text{Perte de SF}_6 \text{ entre 2 pesées (ng)}}{\text{Temps écoulé entre les 2 pesées (min)}} = \text{flux de SF}_6 \text{ en ng/min}$$

- ❖ **Estimation de la durée de vie de la capsule SF₆ :**

La vitesse de diffusion de la capsule est linéaire jusqu'à une valeur minimale de 0,100g de SF₆ restant dans la capsule. Dans le calcul de la durée de vie de la capsule, il est donc primordial d'en tenir compte.

$$\frac{\text{Pesée finale (g)} - \text{pesée capsule vide (g)} - 0.100\text{g}}{(\text{flux de SF}_6 \text{ en ng/mn}) \times 60 \times 24 \times 30} = \text{durée de vie}$$

Annexe 8. Protocole de DGGE

La composition des solutions dénaturantes utilisées pour la réalisation des gels de DGGE est la suivante :

| Dénaturant (%) | 0 | 55 | 30 | 10 |
|-----------------------------|------|------|------|-----|
| Acrylamide/Bis40% (mL) | 18,8 | 20 | 15 | 15 |
| TAE 50X(mL) | 2 | 1 | 1 | 1 |
| Formamide (mL) | 0 | 22 | 12 | 4 |
| Urée | 0 | 23,1 | 12,6 | 4,2 |
| H ₂ O MilliQ QSP | 100 | 100 | 100 | 100 |

La réalisation d'un gel comporte les étapes suivantes :

- ❖ Nettoyage des plaques à l'eau savonneuse, rinçage à l'eau distillée puis à l'éthanol, séchage et essuyage soigneux,
- ❖ Montage des deux plaques et des deux "spacers" (pièces d'écartement, 1 mm).

La matrice est créée par la polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide. La grosseur des pores formés est fonction de la concentration d'acrylamide. Plus la concentration est élevée, plus les pores seront petits.

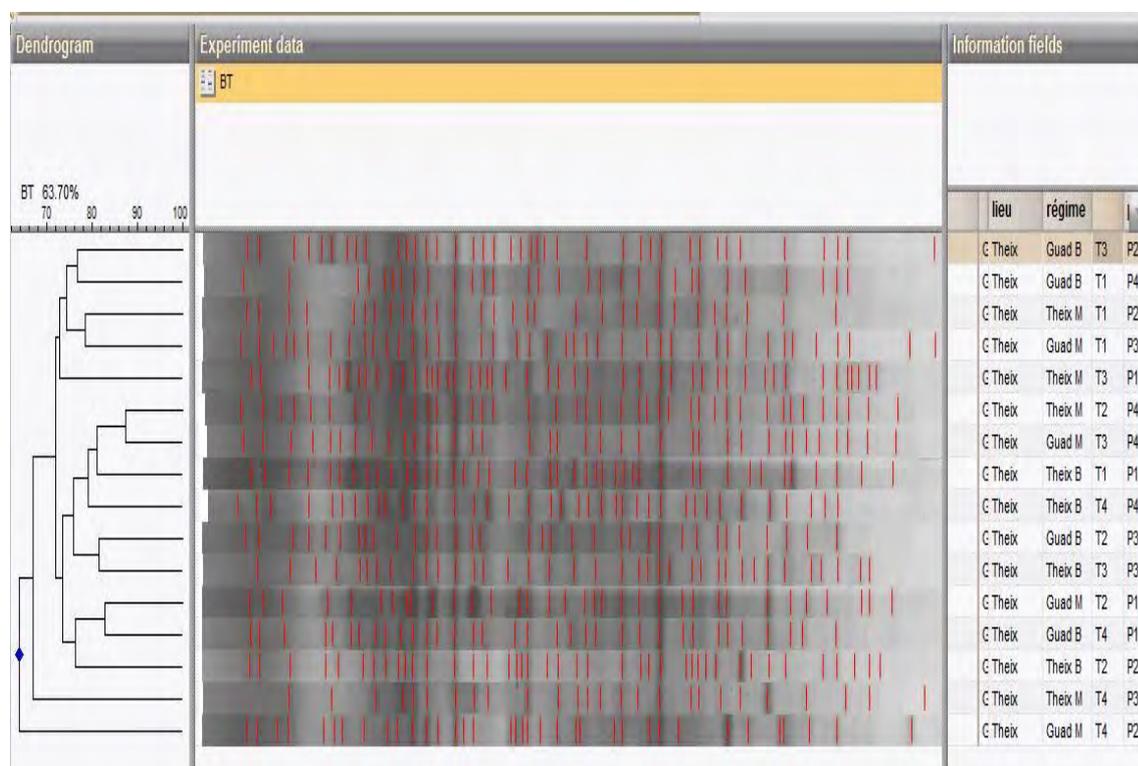
1/ Gel dénaturant : ce gel est coulé à l'aide d'un "formeur de gradient", c'est un système à deux colonnes, l'une contenant la solution la plus dénaturante. L'autre la solution la moins dénaturante, qui permet la réalisation d'un gradient de dénaturant au sein du gel. Chaque colonne contient : 12 mL de solution dénaturante + 12 µL de TEMED + 120 µL d'APS. L'ensemble est placé sous agitation. L'ouverture du robinet de jonction amorce le mélange des solutions. La solution la plus dénaturante est progressivement diluée par la moins dénaturante (gel plus dénaturant en bas, moins dénaturant en haut). Le gel est coulé *via* un tuyau associé à une aiguille introduite entre les plaques. La surface du gel est recouverte de butanol saturé en eau (environ 1 mL) car le polyacrylamide ne polymérise pas au contact de l'air. La polymérisation se fait pendant 1h.

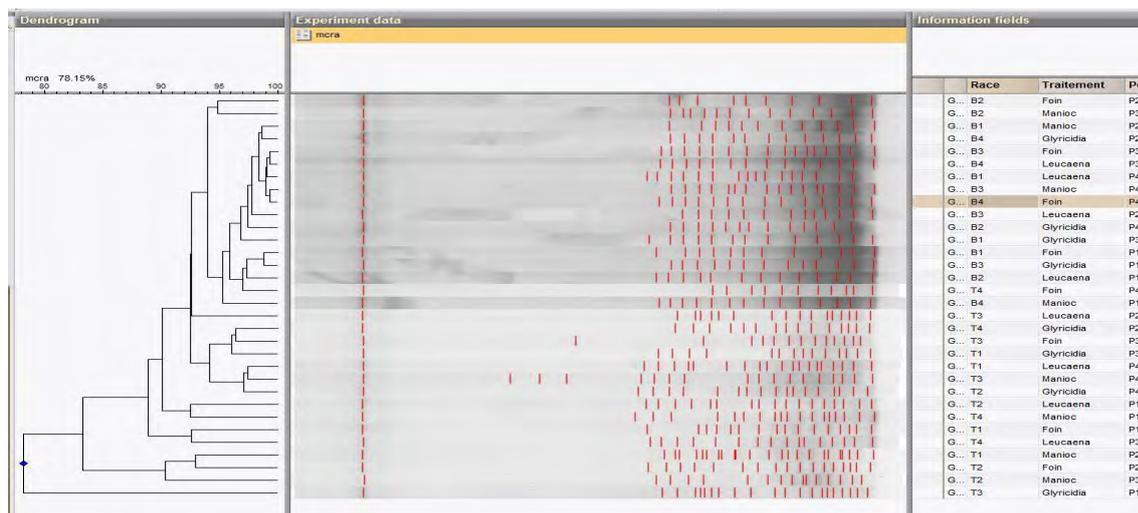
Gel de concentration (stacking) ou gel d'entassement : il sert à regrouper les acides nucléiques. Le butanol est rincé à l'eau distillée. Le gel de concentration est coulé à la pipette et contient : 5 mL de solution d'Acrylamide/Bis à 0% de dénaturant + 50 µL d'APS + 50 µL

de TEMED. Le peigne permettant la formation de 16 puits est inséré dans ce gel entre les plaques. La polymérisation se fait pendant 30 min.

Dépôts et migration : une fois le peigne ôté, les puits doivent être soigneusement rincés au tampon TAE 1X. Les plaques sont fixées à leur support, le tout est placé dans la cuve remplie de TAE 1X ($\approx 5L$) préchauffée à 60°C. Les produits PCR sont mélangés à une solution de dépôt. La quantité d'ADN doit être homogène dans tous les puits, dans la mesure du possible. Une pompe et une agitation magnétique assurent une circulation du tampon dans la cuve et ainsi, une homogénéisation de la température. L'électrophorèse est réalisée pendant 5 h à 200 V.

Révélation : les gels sont colorés avec un kit commercial (Laboratoires Bio-Rad) et ont analysés en utilisant GelComparII (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).





RESUMES

La réduction des émissions de méthane liées à l'élevage est une préoccupation majeure qui nécessite l'implication des pouvoirs publics et des acteurs des filières animales à l'échelle mondiale.

L'objectif de ce travail de thèse était de tester, dans un premier temps, le pouvoir anti-méthanogène, *in vitro*, d'extraits de plantes riches en huiles essentielles et en tanins condensés. Dans un second temps, une étude *in vivo* a été engagée pour une validation des résultats obtenus *in vitro* et pour une meilleure connaissance de la méthanogenèse ruminale et des phénomènes fermentaires induits.

Nos travaux permettent de conclure que les huiles essentielles et les tanins condensés ont le potentiel d'atténuer la production de méthane *in vitro*. Les huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Juniperus phoenicea* affectent négativement la fermentation ruminale *in vitro*. Les tanins condensés réduisent la production de méthane *in vivo* sans effets indésirables notables sur la fermentation ruminale et sur la digestibilité. L'effet des tanins condensés est plutôt lié à la dose et non à la nature de la plante. Ce travail de thèse a aussi mis en évidence l'absence de relation entre la concentration, la diversité des archées méthanogènes et la méthanogénèse ruminale. La réduction du méthane est due à l'inhibition de l'activité des archées méthanogènes plutôt qu'à la diminution de leur concentration. La présentation des plantes riches en tanins sous forme de pellets a également accélérer le transit.

Les résultats obtenus suggèrent que les tanins condensés contenus dans *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* et dans une moindre mesure *Glyricidia sepium*, sous forme de pellets, peuvent être utilisés pour atténuer la production de CH₄ sans effets nuisibles marqués sur le processus fermentaire.

Mots clés : Méthane, tanins condensés, huiles essentielles, fermentation, microbiote ruminal, moutons

Strategies of methane reduction will have to take into account the other environmental impacts and the social-economic stakes. Therefore, the main encouraging way envisaged to reduce enteric methane is the use of additives containing plants secondary metabolites.

The objective of this thesis work was to test at first the *in vitro* potential of essential oil extracts and condensed tannins-rich plants to reduce methane production. Secondly, an *in vivo* study was conducted for a validation of results obtained *in vitro* and for a better knowledge of ruminal methanogenesis and fermentative phenomena.

Our work allows concluding that essential oil and condensed tannins have the potential to decrease *in vitro* methane production. Essential oils of *Mentha pulegium* and *Juniperus phoenicea* negatively affect *in vitro* ruminal fermentation. Condensed tannins reduce *in vivo* methane production without notable unwanted effects on ruminal fermentation and on digestibility. The effect of condensed tannins is rather linked to the dose and not to the nature of the plant. This work also highlighted the absence of relation between concentration and diversity of methanogens and methanogenesis. Reduction of methane is due to the inhibition of the activity of methanogens rather than to the decrease of their concentration. The presentation of tannins rich plants under granular shape had also accelerated the transit.

Results from the *in vivo* study suggests that dietary condensed tannins from *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta*, and to a lesser extent from *Gliricidia sepium* in pellet form could be used to mitigate methane production with no marked detrimental effects on other fermentative parameters.

Key words: Methane, condensed tannins, essential oils, fermentation, rumen microbes, sheep

تُجرى تجارب لقياس إنتاج الميثان (CH_4) واحداً من بين الغازات المنبعثة من عمليات التخمير اللاهوائي. حيث يتم قياس إنتاج الميثان في ظل ظروف مختلفة من تركيز الركائز ودرجة الحرارة ونسبة المواد المتخمرة. حيث يتم قياس إنتاج الميثان في ظل ظروف مختلفة من تركيز الركائز ودرجة الحرارة ونسبة المواد المتخمرة.

تُجرى تجارب لقياس إنتاج الميثان (CH_4) واحداً من بين الغازات المنبعثة من عمليات التخمير اللاهوائي. حيث يتم قياس إنتاج الميثان في ظل ظروف مختلفة من تركيز الركائز ودرجة الحرارة ونسبة المواد المتخمرة. حيث يتم قياس إنتاج الميثان في ظل ظروف مختلفة من تركيز الركائز ودرجة الحرارة ونسبة المواد المتخمرة.

- ❖ أولاً، يتم قياس إنتاج الميثان (CH_4) في ظل ظروف مختلفة من تركيز الركائز ودرجة الحرارة ونسبة المواد المتخمرة.
- ❖ ثانياً، يتم قياس إنتاج الميثان (CH_4) في ظل ظروف مختلفة من تركيز الركائز ودرجة الحرارة ونسبة المواد المتخمرة.

تُجرى تجارب لقياس إنتاج الميثان (CH_4) واحداً من بين الغازات المنبعثة من عمليات التخمير اللاهوائي. حيث يتم قياس إنتاج الميثان في ظل ظروف مختلفة من تركيز الركائز ودرجة الحرارة ونسبة المواد المتخمرة. حيث يتم قياس إنتاج الميثان في ظل ظروف مختلفة من تركيز الركائز ودرجة الحرارة ونسبة المواد المتخمرة.

كل ما تم ذكره في هذا الملخص، هو مجرد ملخص، ولا يمكن الاعتماد عليه في اتخاذ القرارات.