

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

N° d'ordre : 57/D3C/2019

N° de série :02/MB/2019



Thèse de Doctorat
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle
Domaine : Science de la nature et de la vie
Option : **Biotechnologies microbiennes, Génomes et Environnement**

Présentée et soutenu par :

Aggoun Asma

Intitulé :

Etude des cinétiques de dégradation des résidus agro-alimentaires par la flore bactérienne ruminale, *in vitro*, en présence de différentes sources d'azote

Soutenu le 17 Juin 2019

Membres du jury :

Président : Prof. Boulahrouf Abderrahmane	(Université FM, Constantine 1)
Rapporteur : Prof Haddi Mohamed Laid	(Université FM, Constantine 1)
Examineur : Prof. Mihoubi Djeddar Ilhem	(Université FM, Constantine 1)
Examineur : Prof. Arhab Rabah	(Université Larbi Ben M'hidi d'Oum El Bougahi)
Examineur : Prof. Mehennaoui Smail	(Université Hadj Lakhdar, Batna 1)

Année Universitaire 2018/2019

Remerciements

La réalisation de cette thèse a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma gratitude au directeur de cette thèse, Professeur Haddi Mohamed Laid, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

Je désire aussi remercier le Professeur Andrea Squartini, du DAFNAE de l'Université de Padoue (Italie) ; le Dr Jong-Su Eun et le Dr Si-Yong Yang de l'ADVS de l'Université de l'Utah (USA) qui m'ont fourni les outils nécessaires à la réussite de ce travail lors de mes stages dans leurs laboratoires.

Je remercie Monsieur Boulahrouf Abderrahmane, Professeur à l'université des frères Mentouri Constantine 1, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Je remercie également Madame Mihoubi Djezzar Ilhem, Professeur à l'université des frères Mentouri Constantine 1, Monsieur Arhab Rabah, Professeur à l'université Larbi Ben M'hidi d'Oum El Bouaghi, et Monsieur Mehennaoui Smail, Professeur à l'université Hadj Lakhdar de Batna d'avoir eu l'amabilité d'accepter de juger ce travail.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers les amis et collègues qui m'ont apporté leur support moral et intellectuel tout au long de ma démarche. Un grand merci à Hafida Baoune pour tous ses conseils, qui ont grandement facilité mon travail. Un merci particulier à Meriem Gaci et Mohamed Badreddine Mokhtari

Enfin, je tiens à témoigner toute ma gratitude à Sarah Sharp, Il Dong pour leur confiance et leur support inestimable.

Je dédie ce travail à ma très chère maman, Smail Assia,
à mes très chers Mani et Didou,
à mes frères Amine et Younes.
à mes frères Aymen et Ilyes.
A la mémoire de mon Père

Table des matières

Remerciements	I
Liste des abréviations	VI
Liste des tableaux	VII
Liste des figures	VIII
Introduction	1
Chapitre I : Flore ruminale bovine et interactions microbiennes	4
1. Le rumen : anatomie et physiologie	4
1.1 Fonctions et avantages du rumen	4
1.2 Les microorganismes du rumen	5
1.2.1 Les bactéries du rumen	6
1.2.2 Les protozoaires	8
1.2.3 Les champignons	9
1.2.4 Les <i>Archaea</i>	9
2. Interactions entre les microorganismes	9
Chapitre II : Aliments pour ruminants	11
1. Le modèle bovin	11
1.1 Le bovin laitier de race importée (BLM : modern dairy cattle)	11
1.2 Le bovin laitier amélioré (BLA : improved dairy cattle)	11
1.3 Le bovin laitier local (BLL : local dairy cattle)	11
2. Résidus agro-alimentaires et plantes fibreuses	11
2.1 Les résidus de tomates.....	12
2.2 Les résidus d'oranges	13
2.3 Les cardes (chardon-Marie).....	14
2.4 Les chrysanthèmes.....	14
Chapitre III : Le métabolisme de l'azote dans le rumen et l'évaluation des aliments pour ruminants	16
1. La protéolyse ou dégradation des protéines	16
2. La synthèse de protéines microbiennes	18
3. Techniques de fermentation <i>in vitro</i>	19
3.1 La méthode de Tilley et Terry (1963)	19
3.2 La méthode de Menke et <i>al.</i> (1979) ou gastest de Hohenheim.....	19
3.3 Les incubations <i>in situ</i>	19

3.4 Evaluation enzymatique de la digestibilité.....	20
4. Méthodes de mesure de production de gaz.....	20
4.1 Le système de déplacement de liquide de Beuvink et <i>al.</i> (1992)	20
4.2 Méthode monomérique de Waghorn and Stafford (1993).....	20
4.3 Les systèmes de transducteurs de pression.....	20
Chapitre IV : Matériel et méthodes	22
Introduction.....	22
Expérience 1	23
1. Matériel végétal.....	23
2. Matériel Animal.....	24
3. Etude de la composition chimique des substrats	24
3.1 Détermination de la matière sèche résiduelle	24
3.2 Détermination de la matière organique et de la matière minérale	24
3.3 Dosage de l'azote total	24
3.4 Détermination de la concentration en sucres des différents substrats	25
3.5 Détermination de la composition de la paroi végétale.....	25
4. Elaboration de la cinétique de production de gaz <i>in vitro</i>	27
4.1 Préparation des substrats	27
4.2 Préparation et réduction des milieux d'incubation	27
4.3 Inoculation et incubation	28
4.4 Estimation du pourcentage de la dégradabilité apparente	29
5. Mesure du pH	29
6. Analyse statistique.....	30
Expérience 2	33
1. Matériel végétal.....	33
2. Matériel animal (inoculum)	33
3. Sources d'azote.....	34
4. Préparation des substrats	34
5. Inoculation et incubation	34
6. Les analyses post fermentation.....	34
6.1 La dégradabilité de la matière sèche.....	34
6.2 Azote ammoniacal	35
6.3 Analyse des acides gras volatils	35
6.4 Analyse de la fraction insoluble dans le détergent neutre	36

6.4 Analyse statistique	37
Chapitre V : Résultats et discussion.....	38
Expérience 1 : Etude de la fermentescibilité des résidus d'oranges, des résidus de tomates, des cardes et des chrysanthèmes	38
1. pH et dégradabilité des substrats	38
1.1 Les résidus d'oranges	41
1.2 Les résidus de tomates	43
1.3 Les cardes	45
1.4 Les chrysanthèmes.....	47
2. Analyse des paramètres cinétiques de production de gaz par substrat	50
2.1 Analyse par le modèle logistique.....	50
2.2 Analyse par le modèle exponentiel	63
3. Analyse des paramètres cinétiques de production de gaz par milieu	72
3.1 Analyse par le modèle logistique.....	72
3.2 Analyse par le modèle exponentiel.....	74
4. Cinétiques de dégradation des sources d'énergie en présence de différentes sources d'azote (Azzouz, 2017)	76
4.1 Sources d'azote comme source d'énergie.....	76
4.2 Résidus d'oranges comme source d'énergie.....	77
4.2 Cardes comme source d'énergie.....	78
Expérience 2 : Etude de la dégradabilité des résidus d'oranges et des cardes.....	80
1. Evaluation des paramètres de fermentation des résidus d'oranges après 24	80
2. Evaluation des paramètres de fermentation des cardes après 24 h	82
Conclusion	85
Références bibliographiques	87
Annexes	104
Article : Effect of organic and inorganic nitrogen sources on in vitro degradability of citrus byproduct and milk thistle	120
Résumé	127
Abstract.....	129
ملخص.....	131

Liste des abréviations

- ADF : fibre insoluble dans le détergent acide (% MS)
ADL : lignine (% MS)
AGV : acides gras volatils (milli moles)
 b_1 : production potentielle de gaz pour un temps d'incubation infini (ml/0,2 g de MS)
c : constante de vitesse en % de b par heure
 c_1 : constante de courbure (sans unité)
EE : extrait à l'éther
GDH : glutamate déshydrogénase
HNF : hydrates de carbone non fibreux
LR : liquide ruminal
LRTQ : liquide ruminal tel quel
LRF : liquide ruminal filtré
MS : matière sèche (% de la matière fraîche)
MM : matière minérale (% MS)
MO : matière organique (% MS)
NDF : fibre insoluble dans le détergent neutre (% MS)
PB : protéines brutes
 r_m : vitesse maximale de production de gaz (h^{-1})
t : temps d'incubation (h)
 $t_{1/2}$: temps (h) au bout duquel la demi-production de b_1 est atteinte
TDN : nutriments totaux digestibles (total digestible nutrients)
 t_m : temps au bout duquel la vitesse maximale de production de gaz est atteinte (h)

Liste des tableaux

Tableau 1 : composition chimique de la tomate (NRC, 2001 ; Stanton, 2014 ; Abbedou et <i>al.</i> , 2011)	14
Tableau 2 : composition chimique des chrysanthèmes, cardes, résidus de tomates et résidus d'oranges (n=2) moyennes (\pm écart-type) en % de MS	38
Tableau 3 : erreur (st) des deux modèles logistique et exponentiel pour les résidus d'oranges, résidus de tomates, cardes et chrysanthèmes dans les milieux simplifiés après 120 h de fermentation <i>in vitro</i>	71
Tableau 4 : caractéristiques de fermentation des résidus d'oranges dans les milieux N1, N2 et N3 après 24 h	82
Tableau 5 : caractéristiques de fermentation des cardes dans les milieux N1, N2 et N3 après 24 h	84
Tableau 6 : Composition, quantité pour 500 ml, mg d'azote par L de milieu, prix en euro par kg des milieux de fermentation simplifiés (expérience 1) (Annexe 4)	107
Tableau 7 : composition des milieux d'incubation simplifiés (expérience 2) (Annexe 4)	107
Tableau 8 : solutions stocks (Annexe 5)	111
Tableau 9 : composition des solutions standards de l'HPLC (Annexe 5)	111
Tableau 10 : composition des solutions de contrôle de qualité pour le dosage des AGV (Annexe 5)	111

Liste des figures

Figure 1 : photo montrant la fleur de cardes (<i>Silybum marianum</i>)	14
Figure 2 : capitule radiée chez l'espèce <i>Chrysanthemum coronarium L.</i>	15
Figure 3 : schéma récapitulatif de la synthèse et la dégradation des protéines dans le rumen par la flore bactérienne	17
Figure 4 : photo des milieux simplifiés dans le bain-marie sous flux de CO ₂	28
Figure 5 : photo d'une seringue inoculée et fermée	29
Figure 6 : superposition des données expérimentales aux données modélisées	31
Figure 7 : photo de vache équipée d'une canule ruminale	34
Figure 8 : pH initial et pH final moyens 120 h de la fermentation des résidus d'oranges	39
Figure 9 : pourcentage de dégradabilité moyen après 120 h de fermentation des résidus d'oranges avec les milieux simplifiés	43
Figure 10 : pH initial et pH final moyens après 120 h de la fermentation des résidus de tomates	44
Figure 11 : pourcentage de dégradabilité moyen après 120 h de fermentation des résidus de tomates avec les milieux simplifiés	45
Figure 12 : pH initial et pH final moyens après 120 h de la fermentation des cardes	46
Figure 13 : pourcentage de dégradabilité moyen après 120 h de fermentation des cardes avec les milieux simplifiés	47

Figure 14 : pH initial et pH final moyens après 120 h de la fermentation des chrysanthèmes	48
Figure 15 : pourcentage de dégradabilité moyen après 120 h de fermentation des chrysanthèmes avec les milieux simplifiés	49
Figure 16 : production potentielle de gaz pour un temps d'incubation infini (b₁) (ml/200 mg de MS) des substrats dans les milieux de fermentation simplifiés selon le modèle logistique	51
Figure 17 : constante de courbure des substrats (c) dans les milieux de fermentation simplifiés selon le modèle logistique	52
Figure 18 : cinétiques de production de gaz <i>in vitro</i> (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus d'oranges dans le milieu au bicarbonate d'ammonium, après 120 h d'incubation	53
Figure 19 : cinétiques de production de gaz <i>in vitro</i> (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus d'oranges dans le milieu au glutamate de sodium, après 120 h d'incubation.	53
Figure 20 : cinétiques de production de gaz <i>in vitro</i> (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus d'oranges dans le milieu au nitrate de potassium, après 120 h d'incubation	53
Figure 21 : cinétiques de production de gaz <i>in vitro</i> (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus d'oranges dans le milieu à l'extrait de levure, après 120 h d'incubation	53
Figure 22 . cinétiques de production de gaz <i>in vitro</i> (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus d'oranges dans le milieu sans azote, après 120 h d'incubation	54

Figure 23 : cinétiques de production de gaz <i>in vitro</i> (ajustées avec le modèle logistique) des résidus d'oranges dans les milieux simplifiés après 120 h d'incubation	55
Figure 24 : cinétiques de production de gaz <i>in vitro</i> (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus de tomates dans le milieu au bicarbonate d'ammonium, après 120 h d'incubation	55
Figure 25 : cinétiques de production de gaz <i>in vitro</i> (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus de tomates dans le milieu au glutamate de sodium, après 120 h d'incubation	55
Figure 26 : cinétiques de production de gaz <i>in vitro</i> (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus de tomates dans le milieu au nitrate de potassium, après 120 h d'incubation	56
Figure 27 : cinétiques de production de gaz <i>in vitro</i> (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus de tomates dans le milieu à l'extrait de levure, après 120 h d'incubation	56
Figure 28 : cinétiques de production de gaz <i>in vitro</i> (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus de tomates dans le milieu sans azote, après 120 h d'incubation	56
Figure 29 : cinétiques de production de gaz <i>in vitro</i> (ajustées avec le modèle logistique) des résidus de tomates dans les milieux simplifiés après 120 h d'incubation	57
Figure 30 : cinétiques de production de gaz <i>in vitro</i> (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des cardes dans le milieu au bicarbonate d'ammonium, après 120 h d'incubation	58
Figure 31 : cinétiques de production de gaz <i>in vitro</i> (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des cardes dans le milieu au glutamate de sodium, après 120 h d'incubation	58

- Figure 32 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des cardes dans le milieu au nitrate de potassium, après 120 h d'incubation
58
- Figure 33 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des cardes dans le milieu à l'extrait de levure, après 120 h d'incubation 58
- Figure 34 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus des cardes dans le milieu sans azote, après 120 h d'incubation 59
- Figure 35 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec le modèle logistique) des cardes dans les milieux simplifiés après 120 h d'incubation 60
- Figure 36 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des chrysanthèmes dans le milieu au bicarbonate d'ammonium, après 120 h d'incubation 61
- Figure 37 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des chrysanthèmes dans le milieu au glutamate de sodium, après 120 h d'incubation 61
- Figure 38 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des chrysanthèmes dans le milieu au nitrate de potassium, après 120 h d'incubation 61
- Figure 39 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des chrysanthèmes dans le milieu à l'extrait de levure, après 120 h d'incubation 61
- Figure 40 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des chrysanthèmes dans le milieu sans azote, après 120 h d'incubation 62

Figure 41 : cinétiques de production de gaz <i>in vitro</i> (ajustées avec le modèle logistique) des chrysanthèmes dans les milieux simplifiés après 120 h d'incubation	63
Figure 42 : production potentielle de gaz pour un temps d'incubation infini (b) (ml/200 mg de MS) des substrats dans les milieux de fermentation simplifiés selon le modèle exponentiel	65
Figure 43 : temps de latence ou d'adaptation de la flore ruminale aux substrats (lag) dans les milieux de fermentation simplifiés selon le modèle exponentiel	66
Figure 44 : cinétiques de production de gaz <i>in vitro</i> (ajustées avec le modèle exponentiel) des résidus d'oranges dans les milieux simplifiés après 120 h d'incubation	67
Figure 45 : cinétiques de production de gaz <i>in vitro</i> (ajustées avec le modèle exponentiel) des résidus de tomates dans les milieux simplifiés après 120 h d'incubation	68
Figure 46 : cinétiques de production de gaz <i>in vitro</i> (ajustées avec le modèle exponentiel) des cardes dans les milieux simplifiés après 120 h d'incubation	69
Figure 47 : cinétiques de production de gaz <i>in vitro</i> (ajustées avec le modèle exponentiel) des chrysanthèmes dans les milieux simplifiés après 120 h d'incubation	70
Figure 48 : production potentielle de gaz pour un temps d'incubation infini (b₁) (ml/200 mg de MS) des milieux simplifiés de fermentation selon le modèle logistique	73
Figure 49 : temps (t_{1/2}) au bout duquel la demi-production de b₁ est obtenue dans les milieux simplifiés de fermentation selon le modèle logistique	74
Figure 50 : production potentielle de gaz pour un temps d'incubation infini (b) (ml/200 mg de MS) des milieux de fermentation simplifiés selon le modèle exponentiel	75

Figure 51 : temps de latence ou d'adaptation de la flore ruminale aux substrats (lag) dans les milieux de fermentation simplifiés selon le modèle exponentiel	76
Figure 52 : production de gaz par les sources d'azote (10 mg/100 ml de milieu tamponné réduit inoculé épuisé) (Azzouz, 2017)	77
Figure 53 : production de gaz par la fermentation des résidus d'oranges (100 mg/100 ml) en présence de différentes sources d'azote (Azzouz, 2017)	78
Figure 54 : production de gaz par la fermentation des cardes (100 mg/100 ml) en présence de différentes sources d'azote (Azzouz, 2017)	79
Figure 55 : diagramme de fabrication conserve de tomate (CAB Annaba) (Annexe 1)	104
Figure 56 : schéma illustrant la production de déchets et de sous-produits Grigoras (2013) (Annexe 2)	105
Figure 57 : courbe de corrélation entre la dégradabilité des résidus d'oranges et le pH final (Annexe 7)	118
Figure 58 : courbe de corrélation entre la dégradabilité des résidus de tomates et le pH final (Annexe 7)	118
Figure 59 : courbe de corrélation entre la dégradabilité des cardes et le pH final (Annexe 7)	119

Introduction

L'Algérie souffre d'un déficit en viande et lait. Les bovins se caractérisent par un élevage principalement intensif pour le bovin laitier à fort rendement. La région méditerranéenne a des pâturages, prairies et jachères constituées principalement des plantes Fabacées et Poacées qui se caractérisent par une qualité insatisfaisante et une quantité modeste (Abdleguerfi, 2004). En effet, suite à cette réalité, une utilisation accrue des concentrés basés sur les céréales a vu le jour ces dernières décennies. Selon le MADR, il est estimé que 17,8 % de la superficie territoriale de l'Algérie est utilisé par l'agriculture (42 444 350 ha) en 2010 contre 18,2 % de la superficie territoriale (43 395 427 ha) en 2015.

La valorisation de sous-produits de l'industrie agro-alimentaire en vue de leur incorporation dans l'alimentation animale est l'une des alternatives pour satisfaire leurs besoins nutritionnels et dans le but de maintenir la rentabilité et la productivité du bétail. Les sous-produits frais ou ensilés contiennent des nutriments comme les pectines et les sucres facilement digestibles et des protéines brutes.

D'une part, les ruminants ont la capacité de dégrader les fibres des plantes dans leur pré-estomac par les bactéries, les protozoaires et champignons. Parmi les principaux produits de cette dégradation, les acides gras volatils, les protéines microbiennes et vitamine (Hungate, 1966). Et d'autre part, ce sont les bactéries qui jouent le plus grand rôle dans cette dégradation et ont donc besoin d'une source d'azote sous la forme la plus digestible.

La production annuelle de tomate fraîche en Algérie a augmenté en 2014 (1 065 609 tonnes) jusqu'à 2016 (1 280 570 tonnes) (FAO, 2017). Le taux d'accroissement de la tomate industrielle en l'année 2014/2015 est de 2 % d'après le MADR (MADR, 2018). Ce qui aboutit à une source considérable de parties non alimentaires (sous-produits) qui seront dirigées vers l'alimentation animale et contribuerons à diminuer les contraintes environnementales. La production d'orangers en Algérie a augmenté entre 2010 et 2015 (5 824 958 qx et 10 050 791 qx respectivement) selon la direction des statistiques agricoles et des systèmes d'information (DSASI) du MADR. De plus, les résidus d'oranges sont des aliments riches en énergie et en pectines, faibles en amidon (Nocek et Tamminga, 1991). Ils sont considérés en alimentation des ruminants depuis longtemps (Grasser et *al.*, 1995). Parmi les plantes herbacées endémiques de la région méditerranéenne, les cardes

(*Silybum marianum*) ou chardon-Marie qui font partie de la famille des *Asteraceae*. Cette plante a été utilisée en tant que plante médicinale mais aussi pour stimuler la lactation et la protection du foie (Anderson et al., 2002). Les chrysanthèmes font partie de la famille des *Asteraceae* aussi, dont les parties aériennes ont été utilisées en médecine orientale pour la protection contre certaines maladies. Les métabolites secondaires des chrysanthèmes ont plusieurs activités biologiques dont des activités anti-inflammatoires, antifongiques et antioxydantes (Wang et al., 2001 ; Takenaka et al., 2000 ; Yoshikawa et al., 2000). Ces plantes n'ont pas affecté les performances de l'animal ni la composition du lait lors de leur inclusion dans les pâturages (Sulas et al., 1999). La fétuque (*Festuca arundinacea*) est un fourrage qui a la capacité de s'adapter à des périodes de sécheresse, et très répandu dans Intermountain West (Utah, Idaho, Wyoming, Montana, et des régions de l'Arizona et du Nevada) (Christians, 2004).

Le but de notre travail est d'évaluer la dégradation des résidus de tomates, résidus d'oranges, cardes, chrysanthèmes et fétuque par la flore ruminale bovine en présence de sources d'azote organique et inorganique.

Dans ce travail, nous nous sommes aussi intéressés à l'évaluation de la dégradation des résidus agro-alimentaires d'oranges et de tomates ainsi que des cardes et des chrysanthèmes en testant quatre sources d'azotes différentes. Les protocoles utilisés dans cette étude sont les suivantes :

➤ Première expérience :

L'incubation *in vitro* des résidus d'oranges, résidus de tomates, cardes et chrysanthèmes s'est faite en présence des milieux simplifiés. Ces milieux contiennent, en plus du tampon carbonate, une source d'azote organique et inorganique et ils sont : le milieu A (bicarbonates d'ammonium, source d'azote inorganique) ; le milieu B (glutamate de sodium, source d'azote organique), le milieu C (nitrates de potassium, source d'azote inorganique), le milieu D (extrait de levure, source d'azote organique), et le milieu E (témoin sans azote ajouté). La flore ruminale bovine a été utilisée comme inoculum durant 120 h de fermentation à 39 °C pour connaître dans quelle mesure elle va métaboliser ces sources d'azote à travers l'interprétation des cinétiques de dégradation des substrats.

➤ Deuxième expérience :

L'incubation *in vitro* des résidus d'oranges, des cardes et de la fétuque a été faite en présence des milieux simplifiés avec une source d'azote organique et inorganique (en plus du tampon carbonate). Ces milieux sont : le milieu N1 (témoin sans azote ajouté), le milieu N2 (bicarbonates d'ammonium, source d'azote inorganique), et le milieu N3 (glutamate de sodium, source d'azote organique). L'inoculum utilisé provient du liquide ruminal bovin d'une fermentation de 24 h à 39 °C pour évaluer les principaux produits métaboliques et la dégradabilité de la matière sèche des substrats incubés.

Chapitre I : Flore ruminale bovine et interactions

1. Le rumen : anatomie et physiologie

La cavité abdominale comporte l'estomac des ruminants dans sa partie gauche ; cet estomac occupe les 3/4 de l'espace total (Church, 1979 ; Hofmann, 1988). Il est composé de 4 compartiments : le rumen, le réseau, omasum et abomasum. Le compartiment le plus large est le rumen et considéré comme le site de fermentation et d'hydrolyse des hydrates de carbone et de protéines en plus du réseau et de l'omasum. Le bicarbonate (sels de sodium ou de potassium) est le principal tampon des acides produits de la fermentation (Russell, 2002; Lee, 2014).

Le rumen peut contenir de 125 à 200 L chez un bovin adulte (Blair, 2011), le pH ruminal est de 5,5 – 7,0, en dessous de 5,5 les protozoaires ainsi que les bactéries fibrolytiques tendent à diminuer car ils sont intolérants à l'acide. Le rumen est en anaérobiose et de température 39-40 ° C (Lee, 2014). La pression osmotique du rumen est assurée par les mécanismes homéostatiques, est proche de celle du plasma et les fluides interstitiels assurée par les mécanismes homéostatiques (Russell, 2002) avec un environnement caractérisé par la présence de produits de fermentations tel que les principaux gaz (CO₂, CH₄, H₂), les acides gras volatils et l'ammoniaque (Fonty et *al.*, 1995). Ainsi, les gaz fournissent au ruminant environ 4-8 % d'énergie, tandis que la matière microbienne synthétisée fournit 26-32 % et les acides gras volatils 49-58 %.

1.1 Fonctions et avantages du rumen

Parmi les avantages du rumen :

- La digestion et l'extraction d'énergie à partir de la cellulose qui est l'hydrate de carbone le plus abondant.
- La synthèse de protéines microbiennes (et acides aminés essentiels) à partir de protéines de faible qualité, d'azote non protéique et de composants azotés recyclés.
- L'apport des composants du complexe de la vitamine B, ainsi que l'apport des acides gras volatils.
- Le temps de fermentation et une dégradation mécanique supplémentaires grâce à la rétention sélective de grosses particules pendant la rumination (mastication et régurgitation).
- Parmi les produits de fermentation les gaz (dioxyde de carbone et méthane) sont libérés par éructation.

- Les microorganismes attaquent les substances toxiques des aliments avant d'atteindre les intestins.

La plus importante digestion d'aliments se produit dans le rumen. La digestion des protéines (alimentaires et microbiennes) se produit dans l'abomasum. Le seul site d'absorption des sucres simples et acides aminés est l'intestin grêle. Une absorption moins importante se produit dans le gros intestin (Blair, 2011; Lee, 2014).

1.2 Les microorganismes du rumen

La symbiose entre ruminant et microorganismes qui comprennent les bactéries, les protozoaires ciliés et les champignons tous à majorité anaérobies strictes est ce qui fait de cet animal le seul sur la planète terre qui a le pouvoir de dégrader les parois des polysides végétales. Parmi les conditions qui affectent la croissance et le développement du microbiote ruminal on note : la température, le pH, la capacité tampon, la pression osmotique, le contenu en matière sèche, et le potentiel d'oxydo-réduction (Dehority, 2003)

En 1884 a été découvert expérimentalement la fermentation dans le rumen menée par les bactéries et les protistes qui s'y trouvent (Fonty et *al.*, 1995) par Von Tappeiner (Hungate, 1966). Les produits de la fermentation du matériel végétal sont les acides gras volatils (AGV), le méthane (CH₄), le dioxyde de carbone (CO₂), l'ammoniaque (NH₃) et les cellules microbiennes (Lee, 2014). La micro population du rumen se caractérise en nombre et en genre par sa grande densité (nombre très élevé de bactéries) et aussi par sa diversité et ses individus appartiennent aux grands taxons : *Bacteria*, *Eucarya*, *Archea* mais aussi aux virus (Fonty et *al.*, 1995).

La grande majorité est dominée par les bactéries avec un nombre de 10¹⁰ - 10¹¹ cellules/ml, plus élevée que celle des monogastriques (Fonty et *al.*, 1995). Plus de 350 espèces ont été identifiées (Fonty et *al.*, 1995; McDonald et *al.*, 2011) majoritairement anaérobies strictes non sporulées ainsi que des anaérobies facultatives (Belbis, 2007).

La microfaune, principalement des ciliés (10⁶/ml) représente 40 % de la biomasse microbienne. Robert Hungate considéré comme le père de la microbiologie du rumen a développé la technique des 'roll tubes' de culture des bactéries anaérobies du rumen et qui sert encore jusqu'à aujourd'hui à cultiver des bactéries d'autres habitats anaérobies (Krause et *al.*, 2013).

Les données en bases azotées (guanine + cytosine), l'hybridation d'ADN, le contenu en sucres des polysaccharides extracellulaires, l'ARNr 16S ont été des méthodes plus utiles que les cultures classiques pour identifier et classer les bactéries du rumen (Sharpe and Dellagio, 1977).

Le séquençage du génome complet (Morrison *et al.*, 2003 ; Morrison *et al.*, 2010) et le pyroséquençage (Roesch *et al.*, 2007) apportent plus d'information sur la composition des individus d'un écosystème.

La colonisation du tractus digestif se fait dès les premières 24 h après la naissance (Li *et al.*, 2012). Le développement du rumen est le résultat de relations entre les microorganismes du rumen, leurs produits métaboliques, leur nutrition et l'hôte. Ces microorganismes ou microbiote ruminal est équilibré sur le plan qualitatif et quantitatif en conditions normales. Ainsi cet équilibre est rompu selon le type de ration alimentaire par exemple si on nourrit une vache avec un aliment riche en amidon, c'est la flore amylolytique (qui dégrade l'amidon) qui sera prédominante parmi les autres microorganismes.

1.2.1 Les bactéries du rumen

Selon leur localisation dans le rumen on peut classer les bactéries en :

- Bactéries libres dans la phase liquide ruminal. Les bactéries, les protozoaires et les zoospores fongiques flottent et se nourrissent des nutriments solubles : sucres, acides aminés, peptides) (Russel JB, 2002).
- Bactéries adhérentes à l'épithélium ruminal environs 1 à 2 % principalement des bactéries protéolytiques qui dégradent les cellules épithéliales et récupèrent l'oxygène qui pourrait diffuser dans le rumen (Russel JB, 2002).
- Bactéries associées aux particules alimentaires : sous forme de biofilms et qui représentent 70 % du total, elles sont adhérentes de manière lâche ou fortement attachées. Les surfaces des bactéries sont chargées négativement reliées par des cations divalents et les lectines végétales (Russel JB, 2002). Les bactéries fortement attachées sont reliées par le matériel intérieur des cellules végétales qui est plus facilement dégradable.
- Bactéries attachées à la surface des protozoaires (Belbis, 2007).

Selon le substrat à dégrader on peut classer les bactéries du rumen comme suit :

a) Les bactéries cellulolytiques

Environs 4 à 9 % de la population bactérienne (Michalet-Doreau *et al.*, 2001 ; Belbis, 2007) et jusqu'à 17 % (Martin *et al.*, 2001 ; Belbis, 2007) sont des bactéries cellulolytiques ; ou encore 10^2 à 10^7 bactéries/ml (Fonty *et al.*, 1988 ; Amokrane, 2009). Ce sont les plus abondantes représentées principalement par *Ruminococcus albus* (cocci Gram + ou Gram -), les bacilles Gram négatif : *Fibrobacter succinogenes* (auparavant *Bacteroides succinogenes* :

non sporulant) et *Butyrivibrio fibrisolvens* (non sporulant, mobile) (Dehority, 2003). Deuxièmement le cocci: *Ruminococcus flavefaciens* qui peut être Gram - ou Gram + (Dehority, 2003). *Eubacterium* (auparavant *Cillobacterium*) *cellulosolvens* isolé par Bryant en 1958. Des bactéries anaérobies sporulantes du genre *Clostridium* sont aussi cellulolytiques en petit nombre (Hungate, 1957; Shane et al., 1969). Des espèces : *C. cellobioparvus*, *C. locheadii*, *C. longisporum* et *C. polysaccharolyticum* (Hungate, 1944; Hungate, 1957; Van Gylswyk et al., 1980).

Fibrobacter succinogenes dégrade la cellulose seulement quand elle métabolise les produits de fermentation de cette dernière (Russell, 2002). Les principales enzymes sont les β -1,4 endoglucanases ou carboxymethylcellulases, β -glucanases, xylanases et mannanases (Russell JB, 2002).

b) Les bactéries amylolytiques

On note la présence de *Ruminobacter amylophilus* (auparavant nommé *Bacteroides amylophilus*), *Streptococcus bovis*, *Prevotella ruminicola* (aussi hémicellulytique et capable de croître avec NH_3 comme seule molécule de faible poids moléculaire utilisée efficacement par cette espèce (Pittman and Bryant, 1964; Pittman et al., 1967; Dehority, 2003), *Succinimonas amylolytica* et *Selenomonas ruminantium* (Belbis, 2007; Amokrane, 2009 ; Dehority, 2003).

Des bactéries cellulolytiques sont également amylolytiques dont certaines souches comme *F. succinogenes*, *B. fibrisolvens* et *Clostridium* (Dehority, 2003). Les espèces bactériennes amylolytiques du rumen, attachées aux grains d'amidon, sont souvent ingérées par les protozoaires. Les produits de la dégradation de l'amidon par les protozoaires sont: l'acide butyrique, de plus faibles quantités d'acétate et d'acide lactique, ainsi que H_2 et CO_2 (Boufennara, 2012). La dégradation de l'amidon est faible dans le rumen, il est plutôt absorbé sous forme de glucose.

c) Les bactéries hémicellulolytiques

Dans la composition totale des hydrates de carbone des fourrages, environ 15 - 20 % est constitué d'hémicellulose (Dehority, 2003). Hungate (1950) a observé que *Butyrivibrio fibrisolvens* était une espèce prédominante à côté de *Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus albus*, et *Ruminococcus flavefaciens* (Shah and Collins, 1990). *Eubacterium ruminantium*, *E. uniforme*, *E. xylanophilum* représentent des bactéries qui dégradent l'hémicellulose en ses constituants (l'arabinose, le xylose, le glucose, le galactose, le mannose, le rhamnose, acides

glucuroniques, 4-O-méthylglucuronique (acides uroniques)) mais dans une moindre mesure (Van Gylswyk and van der Toom, 1985).

d) Les bactéries protéolytiques

Plusieurs espèces protéolytiques produisent de faibles quantités de protéinases, mais quand elles sont réunies, l'activité protéolytique augmente (Blackburn and Hobson, 1960). Les principales espèces protéolytiques du rumen sont : *Ruminobacter (Bacteroides) amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Butyrivibrio* et *Selenomonas ruminantium*. En 1985, Wallace et Brammal ont pu identifier en plus des espèces précédentes : *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Butyrivibrio alactacidigens*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* et *Clostridium*. *Prevotella ruminicola* est la plus importante espèce qui produit NH₃ dans le rumen (Bladen et al., 1961).

1.2.2 Les protozoaires

Leur présence compte autant que la moitié de la masse microbienne du rumen 10⁴ à 10⁶ protozoaires/ml (Jouany, 1978). La plupart sont des ciliés divisés en deux classes : les holotriches et les entodiniomorphes. Les holotriches possèdent des cils sur tout leur corps, ils métabolisent les polysaccharides non structuraux (sucres solubles). Ils sont divisés en deux groupes : *Isotricha* (135 × 70 μm) et *Dasytricha* (60 × 30 μm).

Les entodiniomorphes possèdent des cils sur des régions discrètes, ils utilisent l'amidon et d'autres composants des parois végétales, ils possèdent des enzymes qui dégradent la cellulose et l'hémicellulose et peuvent même cannibaliser d'autres protozoaires (Lee, 2014).

Ils comprennent les genres : *Entodinium*, *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Diploplastron*, *Polyplastron*, *Epidinium* et *Ophryoscolex* (Jouany, 1996). Les protozoaires du rumen se multiplient par voie asexuée (fission binaire) et irrégulièrement par voie sexuée. Leur croissance est très lente de 15 à 24 h pour un temps de doublement. Lorsque la ration est principalement composée de grains, ils engloutissent l'amidon pour réguler le pH et empêcher l'acidose.

Les protozoaires ont des besoins nutritionnels précis par exemple, ils ne se développent pas en absence de bactéries. Notamment, plusieurs protozoaires ont des bactéries sur leur surface (exo-symbiote) (Russell JB, 2002).

Au-delà d'un pH de 7,8 ou en dessous de 5, les protozoaires ciliés tendent à disparaître (Clarke, 1977).

1.2.3 Les champignons

Les champignons du rumen sont des anaérobies stricts, possèdent des flagelles sous la forme de zoospores (partie mobile) qui leur permettent de s'attacher et coloniser les surfaces des plantes en produisant un mycélium (partie non mobile) qui pénètre par protéolyse (Theodorou and Lowe, 1988). La taille des zoospores est de 6 à 10 μm alors que les sporanges (proviennent du mycélium d'une longueur de 450 μm) arrivent jusqu'à 100 μm . La population fongique peut compter de 8 % à 10 % de la biomasse microbienne ou 10^3 à 10^5 zoospores/ml du liquide ruminal (Krause et al., 2013). Ils sont plus abondants lorsqu'il y a plus de fibres car ce sont de bons digesteurs de fibres et notamment de cellulose car ils possèdent de meilleurs enzymes que les bactéries. On peut citer les xylanases, endo- et exo- β -glucanases, β -glucosidase, β -xylosidase et arabinosidase.

Parmi les espèces identifiées par Orpin (1975) on note *Neocallimastix frontalis*, *Caecomyces* (auparavant *Sphaeromonas*) *communis* qui n'as pas de mycélium branché et *Piromyces* (auparavant *Piromonas*) *communis* dont le rhizoïde est très branché. D'autres espèces ont été découvertes: *Neocallimastix patriciarum*, (zoospores polyflagelles), *N. hurleyensis* (possède des hydrogénosomes), *Oprinomyces joyonii* (thalle polycentrique, zoospores polyflagellées), *Anaeromyces* (monoflagellé) et *Caecomyces equi* (Russell, 2002).

1.2.4 Les Archaea

Bryant, Carl Woese and Wolf RS ont découvert les *Archaea* (référence à antiquité) comme nouveau domaine classé à part des vraies bactéries (Eubacteria) et des Eucaryotes. Grâce aux chercheurs qui se sont intéressés aux analyses moléculaires de la sous-unité ribosomale de l'ARN (ARNr 16S) y compris les microorganismes du rumen (Woese et al., 1990; Krause et al., 2013). Le méthane est l'un des produits de fermentation qui représente environ 2-12 % d'énergie perdue sous cette forme (Johnson and Johnson, 1995). La première fois qu'une bactérie méthanogène a été isolée, ce fut par Opperman (1957) où le formate ou l'hydrogène en présence de CO_2 est converti en méthane (CH_4). En 1958, Paul Smith et Hungate ont isolé *Methanobacterium ruminantium* de par sa forme et la morphologie des colonies dans 10^{-7} dilutions du liquide ruminal. Cette archaea fut renommé plus tard en *Methanobrevibacter ruminantium* par Grant et al. (1985) (Russell, 2002; Krause et al., 2013).

2. Interactions entre les microorganismes

Aucun organisme ne peut à lui seul dégrader les molécules complexes comme la cellulose, amidon et protéines (Bladen et al., 1961; Krause et al., 2013). Ainsi, les microorganismes coopèrent pour cataboliser les substrats et les fermenter (Wolin, 1975; Krause et al., 2013). Ils

interagissent dans un réseau alimentaire (Lee, 2014). Par exemple, les bactéries non cellulolytiques peuvent utiliser les cellodextrines produit par les espèces cellulolytiques (Russell, 1985). Aussi, les méthanogènes obtiennent de l'énergie en convertissant le CO_2 et l' H_2 en CH_4 , donc en utilisant les produits des espèces qui fermentent les hydrates de carbone (Wollin and Miller, 1988).

Russell (2002) a noté que ces bactéries sont souvent en biofilms et agissent en synergie. Des espèces individuelles possèdent à elles seules plusieurs enzymes. Il faut noter qu'un seul polymère exige la présence de multiples enzymes pour être dégradé.

Il existe des population de protozoaires qui réduisent la production de méthane indirectement en présence des bactéries méthanogènes (Hook et *al.*, 2010; Leahy et *al.*, 2010).

Chapitre II : Aliments pour ruminants

1. Le modèle bovin

Nous décrivons ci-dessous les trois principaux types de bovins en Algérie :

1.1 Le bovin laitier de race importée (BLM : modern dairy cattle)

Son élevage est intensif, localisé dans les régions urbaines et à fort potentiel d'irrigation. Les races importées sont d'origine européenne dont : la Frisonne Française, la Pie Noire, la Montbéliarde, la Holstein et la Simmentale. Elles sont utilisées pour la production laitière à cause de leur rendement élevé. Le rendement moyen est de 4000 à 4500 litres/vl/an (MADR, 2013).

1.2 Le bovin laitier amélioré (BLA : improved dairy cattle)

Son élevage est extensif (1-6 vaches), localisé dans des régions moins avantageuses et pauvre en végétation (forêts et montagnes). Les races sont soit résultantes d'un croisement entre l'importée et la locale soit entre les races importées. Elles sont représentées par la Frisonne Hollandaise Pie Noire (66 % de l'effectif du bovin laitier amélioré), la Frisonne Française Pie Noire, la Pie Rouge de l'Est et la Pie Rouge Montbéliarde. Le rendement moyen est de 3000 à 3500 litres/vl/an (MADR, 2013).

1.3 Le bovin laitier local (BLL: local dairy cattle)

Représenté par la Brune de l'Atlas et ses trois branches : la Guelmoise, la Sétifienne, la Chélifienne. Le bovin laitier local se trouve dans les collines et les montagnes (Kali et *al.*, 2011) et les plaines côtières, son rendement laitier est faible (MADR, 2013).

2. Résidus agro-alimentaires et plantes fibreuses

Les résidus choisis sont présents dans les sections suivantes, il en existe d'autres comme les résidus de pommes, les grignons d'olives mais nous n'avons ciblé que les résidus de tomates et d'oranges ainsi que deux plantes fibreuses qui sont endémiques de la région méditerranéenne : le chardon-Marie et les chrysanthèmes. Il est à noter que dans une partie du travail, nous avons utilisé la fétuque comme fourrage de contrôle avec les résidus d'oranges et le chardon-Marie.

2.1 Les résidus de tomates

La tomate (*Solanum lycopersicum*) fait partie de la famille des *Solanaceae*. C'est le deuxième légume produit mondialement après les pommes de terre (FAO, 2011). Les tomates qui ne sont pas destinées à la vente ou au traitement sont choisies comme aliments pour herbivores (principaux sous-produits : Annexe 2). Elles sont composées de la peau, les grains et la pulpe après séchage au soleil et broyage ou selon la méthode d'ensilage. La forte teneur en humidité, un mélange avec le blé, paille de riz ou tiges de maïs en 70 : 30 est conseillé (Bakshi, Kaur et Wadhawa, 2012).

Selon ANSES (2008) et Ventura, Pieltin et Castanon (2009) les résidus de tomates sont composés de 14 - 20 % de protéines brutes, 22 % ADF (fibre insoluble dans le détergent acide), 40 - 60 % d'hydrates de carbone non structuraux (dont 90-95 % sont des sucres solubles et 5 - 10 % pectines). La digestibilité *in vitro* de la matière organique était de 63 % de tomates fraîches équivaut à 2,59 Mcal DE/Kg MS. 1,5 kg de matière sèche de résidus de tomates peut être donné au mâle de chèvre *ad libitum* avec du foin de raygrass (Ventura, Pieltin et Castanon, 2009). Le taux de 50 % de tomates peut remplacer le fourrage qu'elles soient fraîches, ensilées ou séchées. Il a été observé que le remplacement complet d'un mélange concentré par les résidus de tomates séchés chez les buffles adultes n'as aucun effet négatif sur l'utilisation des nutriments, par contre chez les animaux en lactation, un taux de 35 % dans le mélange concentré est sans aucun effet négatif sur la production de lait (Caluya et al., 2003).

Le tableau 1 montre des valeurs des composants de la tomate algérienne et de la tomate de Wadhwa (2013), du NRC (2001), de Stanton (2014) et Abbedou et al. (2011). Ces valeurs comprennent le taux de matière sèche dont celle d'Algérie est proche des valeurs rapportées par Stanton (2014) et Abbedou et al. (2011). Le taux de matière organique et de protéines brutes de la tomate algérienne sont faibles par rapport aux autres références. Par ailleurs, le taux de matière minérale est supérieur aux autres résidus cités. Ces différences sont probablement dues aux conditions climatiques, à la composition du sol et aux conditions de croissance de la tomate.

Tableau 1 : composition chimique de la tomate (NRC, 2001 ; Stanton, 2014 ; Abbedou et al., 2011)

Composants de la tomate, % MS / référence	Tomate d'Algérie	Tomate (Wadhwa, 2013)	NRC (2001)	Pulpe séchée sans épiluchures (Stanton, 2014)	Abbedou et <i>al.</i> (2011)
MS %	90,46	25,3	24,7	92	95,2
MO	77,09	94,0	-	-	95,2
MM	22,91	6,0	5,5	6	-
PB	9,03	22,1	19,3	23	19,1
NDF	33,9	63,0	60,0	55	55,2
ADF	-	51,0	47,6	50	46,2
ADL	-	-	13,3	-	25,9
TDN	-	-	65,5	64	-
EE	-	-	13,3	10,6	9,99

ADF: fibre insoluble dans le détergent acide; ADL: lignine (acid detergent lignin); EE: extrait de l'éther; MM: matière minérale; MO: matière organique; MS: matière sèche; NDF: fibre insoluble dans le détergent neutre (neutral detergent fibre); PB: protéines brutes; TDN: nutriments totaux digestibles (total digestible nutrients)

2.2 Les résidus d'oranges

Les résidus d'oranges contiennent de fortes teneurs en énergie principalement les pectines 250 g/kg de MS (Tagliapietra et *al.*, 2014) qui sont rapidement dégradables (Barrios-Urdaneta et *al.*, 2003) et faible en amidon (Nocek et Tamminga, 1991). Les pectines sont composées d'acide galacturonique qui grâce à sa haute capacité d'échange de cations, aide la dégradation des fibres dans le rumen (Van Soest, 1994). Ces sous-produits agro-alimentaires ont été introduits dans l'alimentation des ruminants pour remplacer l'amidon et le maïs (Ammerman and Henry, 1991; Chapman et *al.*, 1983; Solomon et *al.*, 2000; Miron, 2002).

De plus les résidus d'oranges sont connus pour leur fraction NDF facilement digérée (Ben-Ghedalia et *al.*, 1989; Ammerman and Henry, 1991; Miron et *al.*, 2001). L'un des bénéfices de ce sous-produit reporté par Bampidis dans sa revue de 2006 est qu'il n'y ait pas de risque d'acidose, où l'acide acétique est un produit alternatif à l'acide lactique lors de la fermentation des pectines (Wing et *al.*, 1988).

2.3 Les cardes (chardon-Marie)

Le nom vernaculaire de cardes est le chardon-Marie (شوكة مريم) (*Silybum marianum* L. *Garten*) est une plante fibreuse qui appartient à la famille des *Asteracea* (Palomino, 2015) (figure 1). Elle est considérée comme une plante hivernale annuelle ou biennale, native de la région méditerranéenne, du Sinai et de l'est de l'Afghanistan (Abouzid et *al.*, 2016). Cette plante a été naturalisée dans l'ouest des Etats Unis d'Amérique, l'Afrique du Sud et l'Australie (Sindell, 1991; Bessam et *al.*, 2014). Elle est distribuée dans les hauts plateaux de la steppe, le sud de l'Atlas Saharien, les pâturages de sable et les régions basses humides en Algérie (Quézel, 1963) (figure 1); alors qu'en Italie, elle est plus répandue dans le sud de la Toscane et la Liguria, mais sporadique dans la vallée de Po (Martini, 2009). De plus, cette plante était utilisée depuis l'Antiquité en médecine (pour les soins du foie) et comme plante ornementale. Bean (1985) a reporté qu'elle a été utilisée dans l'alimentation des bovins dans l'ouest des Etats Unis d'Amérique (Dennis Chambreau et *al.*, 2007).



Figure 1 : photo montrant une fleur de cardes (*Silybum marianum*)

2.4 Les chrysanthèmes

Chrysanthemum coronarium (*Garland*) ou chrysanthème couronné (الأقحوان التاجي) est une plante annuelle d'origine méditerranéenne. Elle fait partie de la famille des *Asteraceae*, qui contient aussi la laitue, l'artichaut et le tournesol. Elle est originaire de l'Europe et l'Asie mais aussi distribuée en Afrique (Kumar, 2005). Au Japon et en Chine, elle est considérée comme un légume (Follet, 1990). Sa croissance en milieu de cultures fourragères augmente la teneur en MS pour le bétail (Sulas et Caredda, 1997). Broutée par les animaux (D'Urso et *al.*, 1993) et les moutons spécialement les parties florales en période d'Avril jusqu' à Juin (Sulas et *al.*, 1999). Cette plante est aussi considérée comme pâturage pour les brebis laitières en méditerranée et fortement appétissante (Roledo et *al.*, 1989).

Les fleurs sont jaunes ou bicolores (blanches et jaunes) (Sebastian, 2006) et ornementale et peut être désignée comme mauvaise herbe (Sebastian, 2006). Les feuilles ont une activité anti fongique (Alvares-Castellanos, 2001) et antioxydante (Takenaka, 2000). Une récente étude de Boulacel et *al.* (2015) dans la région de Constantine a permis d'identifier l'espèce de *Chrysanthemum coronarium L* de la famille des *Asteraceae* comme le montre la figure 2 (Boulacel et *al.*, 2015).



Figure 1 : capitule radiée chez l'espèce *Chrysanthemum coronarium L.*

Chapitre III : Le métabolisme de l'azote dans le rumen et l'évaluation des aliments pour ruminants

Le rôle des protéines bactériennes s'étend à plusieurs niveaux :

- Le métabolisme bactérien (enzymes de dégradation, enzymes de transports, ...)
- La croissance des bactéries du rumen
- Les constituants cellulaires bactériens

Il y a deux aspects du métabolisme de l'azote dans le rumen :

- 1- La protéolyse (Bach et *al.*, 2004)
- 2- La synthèse de protéines microbiennes

1. La protéolyse ou dégradation des protéines

Une fois les protéines alimentaires dans le rumen, plusieurs voies métaboliques peuvent être empruntées :

- La dégradation des protéines en peptides et acides aminés par la flore ruminale qui a un groupe d'enzymes protéolytiques extracellulaires. Les protéinases des bactéries sont plus actives (6 à 10 fois plus) que celles des protozoaires. Parmi les enzymes connues : cystéine protéases, serine protéase, aspartate protéase et métalloprotéinases (Brock et *al.*, 1982; Pfeffer et *al.*, 2005). L'étude de l'activité enzymatique est dure car la majorité des espèces se trouvent en biofilms (Russell, 2002).
 - La dégradation des peptides et acides aminés se fait par des populations microbiennes plus définies (Wallace et *al.*, 1997). Les peptides transportés à l'intérieur des bactéries du rumen sont dégradés en acides aminés par des peptidases. Les acides aminés suivent deux chemins : 1) l'incorporation dans les protéines microbiennes avec l'énergie disponible (ATP) appelée l'assimilation réductrice des nitrates (le produit de l'activité enzymatique demeure dans l'organisme) 2) la désamination en ammoniacque extracellulaire, AGV, CO₂ et ATP intracellulaire (Bach et *al.*, 2004).
- a) L'assimilation des nitrates et leur réduction en ammoniacque (ANRA : Assimilatory nitrate reduction to ammonia)

Cette réaction se produit si la matière organique disponible comme majeure source d'énergie et l'azote fermentescible n'est pas limitant, de plus le temps d'incubation est court. Ceci est affecté par la concentration d'ammoniacque dans le milieu. Ce processus est supprimé et réprimé par l'ammoniacque, les concentrations élevées en ammoniacque inhibent la nitrate

réductase (Payne, 1973 ; Leng, 2008). Les nitrates NO_3^- sont une source alimentaire réduite en ammoniacque. Suivant trois étapes de réductions : d'abord les nitrates en nitrites NO_2^- puis en NH_3 , ce processus de détoxification par des bactéries et protozoaires du rumen peut rendre des plantes moins toxiques aux ruminants avant leur exposition à la digestion gastrique et absorption (Lee, 2014).

Les enzymes qui catalysent l'incorporation des nitrates par les bactéries à travers l'action combinée de la dissimilatory nitrate reductase et l'assimilatory nitrite reductase sont caractérisées par :

- Leur solubilité.
- La tension d'oxygène a un effet mineur.
- L'ammoniacque est formé à des taux qui peuvent être assimilés dans l'azote organique.

b) La dégradation des nitrates en ammonium (DNRA : Dissimilatory nitrate reduction to ammonia) ou dénitrification des nitrates

Cette réaction se produit dans les conditions citées précédemment sauf qu'elle n'est pas affectée par les fortes concentrations d'ammoniacque dans le milieu (Leng, 2008). Les nitrates sont réduits en nitrites puis en ion ammonium par des bactéries anaérobies strictes. Les nitrates

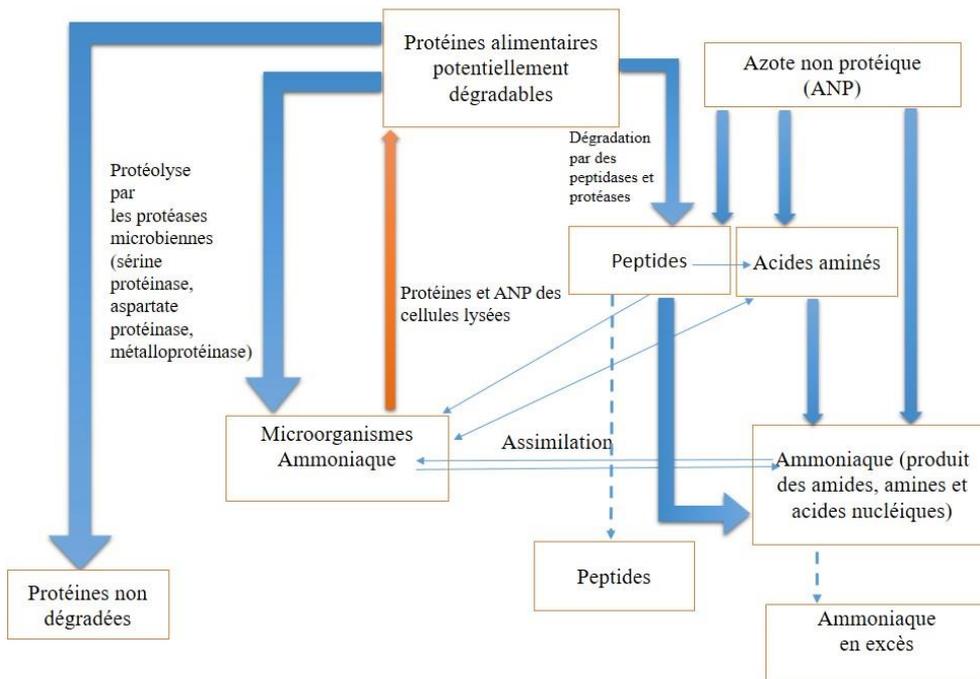


Figure 3 : schéma récapitulatif de la synthèse et la dégradation des protéines dans le rumen par la flore bactérienne (Bach et al., 2014 ; Nolan and Dobos 2005)

sont utilisés comme accepteur d'électrons, ils sont réduits par la nitrate réductase en nitrites (NO_2^-) ensuite en monoxyde d'azote NO , puis en protoxyde d'azote N_2O et en diazote N_2 . Si certaines enzymes sont manquantes, la réduction des nitrates en diazote peut être bloquée à n'importe quelle étape (Lee, 2014).

2. La synthèse de protéines microbiennes

Les bactéries du rumen synthétisent leurs propres protéines à partir des protéines alimentaires ingérées par le ruminant en plus de l'énergie fournie par les hydrates de carbones des nutriments alimentaires. Nolan (1975), Leng et Nolan (1984) ont étudié l'origine des protéines microbiennes par des essais avec du N^{15} et ils ont déclaré que 50 % provient de l'ammoniaque et le reste des peptides et acides aminés (NRC, 2001).

Les facteurs limitant la synthèse des protéines microbiennes sont :

- 1) La concentration d'ammoniaque affecte le taux de synthèse de protéines (Satter and Slyter, 1974; Mehrez et *al.*, 1977; Erfle et *al.*, 1977; Pisulewski et *al.*, 1981) bactériennes tandis que les protozoaires ne peuvent pas utiliser l'ammoniaque (Wallace, 1997 ; NRC, 2001).
- 2) La disponibilité et le taux d'azote dégradable : lorsqu'il y a un déficit en azote dégradable, la digestion microbienne est réduite et par conséquent la valeur énergétique de la ration (Walter, 2012). La quantité de 50 mg $\text{NH}_3\text{-N/l}$ est le seuil requis pour l'efficacité de la croissance microbienne selon Satter et Slyter (1974).
- 3) La disponibilité de l'énergie (les hydrates de carbone fermentescibles) (Thorne, P.J., 2009) : selon Hoover et Stokes (1991) et NRC (2001) le taux de digestion des hydrates de carbone est un facteur très important influençant la croissance microbienne.

L'ajout de peptides ou d'acides aminés à la place de l'urée ou de l'ammoniaque comme source d'azote majeure (Cotta and Russell, 1982 ; Griswold et *al.*, 1996) améliore la croissance ou l'efficacité microbienne. Aussi, quand les peptides sont ajoutés avec des fibres rapidement fermentescibles, la croissance microbienne est améliorée (Chikunya et *al.*, 1996).

Les acides aminés essentiels pour l'animal hôte proviennent des microorganismes du rumen (Czerkawski, 1986).

L'azote non protéique est une source d'azote complémentaire, efficace et économique pour éviter les déficiences en source d'azote dégradable (comprenant RDP : ruminally degradable protein ou protéine dégradable dans le rumen) dans l'alimentation des ruminants en même temps que RUP (ruminally undegraded feed crude protein ou protéine brute alimentaire non dégradable dans le rumen) (NRC, 2001 ; Roger Walter, 2012).

3. Techniques de fermentation *in vitro*

Pour l'évaluation de la valeur nutritive des aliments pour ruminants, plusieurs techniques dont ont été utilisées certaines sont biologiques.

3.1 La méthode de Tilley et Terry (1963)

Elle est effectuée en deux étapes et utilisée pour évaluer les fourrages qui sont incubées durant 48 h avec le liquide ruminal tamponné suivie de 48 h de digestion par la pepsine dans une solution acide pour digérer le substrat non dégradé et les protéines microbiennes. Néanmoins, cette méthode est limitée par le fait d'obtenir une seule observation et non plusieurs afin d'avoir un profil cinétique de dégradation complet. En 1970, Goering et Van Soest ont modifié la pepsine de la deuxième étape en la remplaçant par une solution de détergent neutre pour l'estimation de la vraie digestibilité de matière sèche (Grings et *al.*, 2005).

3.2 La méthode de Menke et *al.* (1979) ou gas test de Hohenheim

Elle consiste à incuber des nutriments (200 mg de matière sèche) avec le liquide ruminal et une salive artificielle durant 24 h. La fermentation a eu lieu dans des seringues en verre de 100 ml munies d'un piston en utilisant un aliment standard qui est la farine de foin et l'amidon de maïs. Les seringues sont mises dans des étuves réglées 39 °C. La production de gaz *in vitro* est corrélée avec la digestibilité de la matière organique *in vivo* chez les moutons. Des paramètres comme les protéines brutes, le gras brut, la fibre brute et les cendres brutes contribuent à l'évaluation de l'énergie métabolisable. Des modifications de cette méthode ont été introduites premièrement par Blümmel et Ørskov (1993) où l'incubateur a été remplacé par un bain-marie contenant les seringues, et deuxièmement par Blümmel et *al.* (1993) and Makkar et *al.* (1995) en augmentant le poids du substrat de 200 à 500 mg ainsi que le volume du tampon.

3.3 Les incubations *in situ*

La méthode de Mehrez et Ørskov (1977) où des sachets en nylon qui contiennent les substrats sont placés dans le rumen d'animal fistulé ensuite retiré à des intervalles de temps choisis afin de calculer la perte de matière sèche. Parmi les inconvénients, la nécessité d'utiliser trois animaux fistulés pour la variabilité des données mais aussi un nombre limité d'échantillons à analyser à la fois.

Ces méthodes *in vitro* doivent être corrélées avec des paramètres mesurés *in vivo*, elles sont moins chères et prennent moins de temps.

La mesure du volume de gaz produit reflète la conversion des aliments en AGV et gaz (dioxyde de carbone, méthane et dihydrogène). Des relations stoechiométriques qui relient la production des acides gras volatils et les gaz à (Beuvink and Spoelstra, 1992; Blümmel and Ørskov, 1993; Grings, 2005).

3.4 Evaluation enzymatique de la digestibilité

Dans ces méthodes, les enzymes remplacent les microorganismes. Elles ressemblent à la technique de Tilley et Terry (1963) du fait qu'elles donnent une digestibilité au point final (De Boever et al., 1986; Getachew, 1998). Parmi ses avantages on peut citer la substitution du liquide ruminal par l'inoculum fécal qui évite la présence d'un animal fistulé donneur d'inoculum (Mauricio et al., 1997 ; Getachew et al., 1998). Les inconvénients sont que ces méthodes ne détectent pas les effets associatifs et les toxines.

4. Méthodes de mesure de production de gaz

Plusieurs méthodes basées sur la mesure du gaz produit existent.

4.1 Le système du déplacement de liquide de Beuvink et al. (1992)

La mesure de gaz se fait par le calcul du déplacement d'un liquide qui est une solution saturée de NaCl (pH 1,0). Cette solution est reliée aux flacons de 100 ml contenant l'inoculum et le liquide ruminal tamponné placés dans un bain-marie agitateur et réglé à 39 °C.

4.2 Méthode monométrique de Waghorn and Stafford (1993)

L'incubation se fait dans des flacons de 250 ml (1250 mg de foin de luzerne dans un mélange de 20 ml de liquide ruminal et 60 ml de salive artificielle) mis dans un bain-marie agitateur à 39 °C. Les flacons sont reliés à un monomètre afin de mesurer le volume de gaz à pression atmosphérique.

4.3 Les systèmes de transducteurs de pression

4.3.1 Méthode de Theodorou et al. (1994)

Cette méthode ressemble aux méthodes d'évaluation de la digestibilité de substrats lors d'incubation *in vitro* avec un liquide ruminal tamponné, la différence est qu'elle se déroule dans des bouteilles de culture étanches aux gaz pour accumuler ces derniers. La lecture de production de gaz se fait par un transducteur de pression.

4.3.2 La méthode de Pell and Schofield (1993)

Elle diffère de celle de Theodorou et *al.* (1994) par le fait d'utiliser des capteurs de pression liés à un système informatique afin de suivre la production de gaz.

Dans la méthode de Cone et *al.* (1996) un ordinateur enregistre la pression de gaz au fil du temps pour établir la courbe de cinétique de production de gaz.

Chapitre IV : Matériel et méthodes

Introduction

Afin d'évaluer la fermentescibilité des substrats (les résidus d'oranges, les résidus de tomates, les cardes et les chrysanthèmes) pour l'alimentation des bovins en présence de sources d'azote organique et inorganique, notre travail s'est fait en deux expériences indépendantes. Dans la première expérience, nous avons utilisé quatre substrats : les résidus d'oranges, les résidus de tomates, les cardes et les chrysanthèmes lors d'une fermentation *in vitro* avec le liquide ruminal bovin qui a duré 120 h à 39 °C dans des seringues en verre en présence de sources d'azote organique et inorganique (Laboratoire de biotechnologies microbiennes, Université des Frères Mentouri Constantine 1, Algérie).

Pour justifier le choix des sources d'azotes inorganiques qui sont le bicarbonate d'ammonium et le nitrate de potassium ; d'après la littérature la forme la plus simple et la mieux fermentée par le microbiote ruminal est l'ammoniaque (Hungate, 1966). Les nitrates quant à eux sont des accepteurs plus favorables énergétiquement, autrement dit, leur réduction en ammoniaque génère plus d'ATP et ceci augmente la croissance microbienne dans le rumen, donc les nitrates peuvent substituer l'azote dans un régime pauvre en ce dernier (Leng, 2008).

L'incubation d'acides aminés individuels a causé un effet positif sur le taux de croissance des bactéries du rumen avec l'acide glutamique et la glutamine ($p < 0,01$) comparé au contrôle, où le sulfate d'ammonium a été ajouté comme source d'azote selon les travaux de Kajikawa *et al.* (2002). Un corpus de littérature important et croissant a étudié l'utilisation de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) dans l'alimentation des ruminants. En effet Williams *et al.*, (1991) a rapporté que la levure augmente le taux initial de la digestion des fibres. De plus, elle augmente aussi la production de lait chez les vaches laitières (Kung *et al.*, 1997).

Dans la seconde expérience, nous avons utilisé deux substrats, un résidu agro-alimentaire : les résidus d'oranges et une plante fibreuse : les cardes lors une incubation avec le liquide ruminal bovin à 39 °C pendant 24 h dans des flacons à capuchons en caoutchouc (Laboratoire ADVS, Université de l'Utah, USA) afin d'étudier la dégradabilité de ces substrats.

Expérience 1 : étude de la fermentescibilité des résidus d'oranges, des résidus de tomates, des cardes et des chrysanthèmes

Le but de cette étude est de déterminer :

- La composition chimique des substrats (matière sèche, matière minérale et organique, azote total, concentration en sucres totaux, teneur en NDF, ADF et ADL)
- La fermentescibilité des substrats par la flore ruminale bovine.
- L'analyse statistique des cinétiques de production de gaz par la flore ruminale bovine selon deux modèles.

1. Matériel végétal

Les substrats qui ont été utilisés sont :

- Résidus d'oranges : prélevés de l'ENAJUC de Ramdane Djamel (Skikda). Ces résidus sont composés d'écorces, de pulpe et de pépins de différentes variétés d'oranges. Ils ont été transportés frais au laboratoire puis mis à l'étuve à 70 °C jusqu'à poids constant.
- Résidus de tomates : ils ont été préparés selon la procédure du complexe industriel de la Conserverie Alimentaire Ben Amor à Annaba (voir Annexe 1). Les tomates ont été récupérées du marché de la ville de Constantine. Ces tomates ont été lavées à l'eau du robinet puis à l'eau distillée deux fois. Les tomates ont été placées dans un récipient contenant de l'eau distillée bouillante puis directement dans de l'eau distillée froide pour enlever facilement la peau. À l'aide d'une moulinette, le jus de tomate a été extrait et passé à travers un tamis de 1,5 mm de diamètre. Le poids frais des résidus de tomates (pulpe, graines, épiluchures) a été noté puis ces résidus ont été mis dans l'étuve à 70 °C pendant 72 h.
- Chrysanthèmes (*Chrysanthemum coronarium*) obtenus de la Sardaigne (Italie).
- Chardon-Marie ou cardes (*Silybum marianum*) obtenus de la Sardaigne (Italie).

Les deux plantes fibreuses ont été fournies par l'Instituto per il Sistema Produzione Animale in Ambiente Mediterraneo (CNR, Sassari, Italy). Les chrysanthèmes et les cardes ont été récoltés en fin de croissance (Juin) afin de maximiser la production de biomasse et immédiatement séchés à l'air.

Au laboratoire les substrats secs ont été broyés au moyen d'un broyeur électrique, pour avoir des particules de dimensions inférieures ou égales au millimètre.

2. Matériel animal

Les animaux donneurs sont des bovins ayant un régime libre. Le jour du sacrifice à l'abattoir d'El Khroub (Constantine), le liquide ruminal est prélevé dans deux thermos préalablement aseptisés, tout ceci immédiatement après éviscération.

3. Etude de la composition chimique des substrats

3.1 Détermination de la matière sèche résiduelle

L'échantillon a été séché (1 g pour chaque répétition, 4 en total) dans une étuve (à vide) à une température de 105 °C jusqu'à obtention de variations de moins de 3 mg entre deux pesées consécutives effectuées à 2 heures d'intervalle à chaque fois (méthodes AOAC 1980). Les substrats ont été pesés dans des creusets en porcelaine préalablement tarés.

3.2 Détermination de la matière organique et de la matière minérale

Les échantillons séchés ont été soumis à une incinération à 550 °C pendant 12 h à 18 h, la matière organique se consume et la matière résiduelle constitue la matière minérale.

La teneur en matière organique (MO) représente le complément à 100 de la matière minérale (cendres) :

$$MO = 100 - \text{cendres}$$

3.3 Dosage de l'azote total

La détermination de l'azote total par la méthode de Kjeldahl (1883) a été effectuée en deux étapes. La première étape est une digestion en milieu acide qui transforme tous les composés organiques azotés en azote ammoniacal. Dans la seconde étape, les ions ammonium sont dosés par un système automatisé.

- La minéralisation se fait avec un échantillon de 0,2-1 g de matière sèche en présence d'un catalyseur 2 g (mélange de : sulfate de cuivre CuSO_4 :20 g, sulfate de potassium K_2SO_4 :80 g, 2 g de sélénium) et 20 ml d'acide sulfurique à 98 % (concentré à chaud à 420 °C pendant 4 h) Lors de cette étape l'azote se transforme en ion d'ammonium. L'unité de minéralisation utilisée est la K-424 (Büchi, Allemagne).
- Transformation de l'azote ammoniacal en ammoniaque : Dans un premier temps, les ions d'ammonium du minéralisa vont être déplacé sous forme de NH_3 (ammoniaque) en présence de la lessive de soude en excès (NaOH , 0,01 N), puis l'ammoniaque seul a été récupéré dans une solution d'acide borique H_3BO_3 : 10 ml avec un indicateur coloré :

rouge de méthyle et bleu de méthylène afin de le doser à l'aide d'une solution étalonnée d'acide fort (HCl 0,1 N). L'unité de distillation utilisée est la K-350 (Büchi, Allemagne).

La teneur en azote est calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Teneur en azote} = \frac{1,4 (V_1 - V_0) \times T}{m}$$

Où :

V_0 : volume en ml de la solution d'HCl 0,1 N utilisée pour l'essai à blanc,

V_1 : volume en ml de la solution d'HCl 0,1 N utilisée,

T : normalité de la solution d'HCl utilisée,

m : masse en grammes de la prise d'essai.

La teneur en protéines brutes (PB) est obtenue en multipliant la teneur en azote par 6,25.

3.4 Détermination de la concentration en sucres des différents substrats

La méthode de Dubois *et al.* (1956) permet de doser les oses en utilisant le phénol à 80 % et l'acide sulfurique concentré 95-97 %. En présence de ces deux réactifs, les oses donnent une couleur jaune-orange dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des glucides, la densité optique est déterminée à 488 nm.

Une quantité de 0,1 g de chaque substrat séché a été pesé excepté pour les résidus d'oranges qui ont été dilués 5 fois dans 100 ml d'eau bidistillée. 1 ml de chaque échantillon est ensuite dosé avec 1 ml de phénol 5 % et 5 ml d'acide sulfurique 95 %. Après agitation et repos pendant 10 minutes à température ambiante, les échantillons ont été incubés au bain-marie à 30 °C pendant 20 minutes. La lecture par spectrophotométrie a été faite à 488 nm contre un blanc de 1 ml d'eau distillée. Des solutions étalons ont été préparées, allant de 0 à 100 µg/ml à partir d'une solution mère de glucose dont la concentration est 1 g/l.

3.5 Détermination de la composition de la paroi végétale

Suivant la méthode de Van Soest *et al.* (1991), le taux des différentes fibres des substrats ont été déterminés. En effet, cette composante est très importante à connaître en rations alimentaire animale.

3.5.1 Estimation de la fraction NDF

Elle englobe les composants majeurs de la paroi végétale qui sont la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. La méthode consiste en la séparation des constituants fibreux des parois végétales qui sont : la cellulose, l'hémicellulose, la cutine, les constituants minéraux, du contenu cellulaire soluble représenté par les sucres, pectine, acides organiques, substances azotés, protéique et non protéique, lipides et sels minéraux solubles.

La fibre au détergent neutre est le résidu obtenu après le traitement hydrolytique de l'échantillon avec une solution d'un détergent neutre dans un environnement neutre.

Calcul :

$$\% \text{ NDF} = \frac{(P1 + PE) - P0}{PE \text{ corrigée} \times 100}$$

Où :

P0 : poids du creuset vide (g),

P1 : poids du creuset après traitement avec solution NDF et séchage (g),

PE : prise d'essai de l'échantillon,

PE corrigée : prise d'essai corrigée par rapport à la matière sèche.

3.5.2 Estimation de la fraction ADF

Elle contient la lignine et la cellulose. La solution ADF hydrolyse à chaud les constituants cytoplasmiques et les protéines.

Calcul:

$$\% \text{ ADF} = \frac{P1 - tare}{PE \text{ corrigée} \times 100}$$

Où:

P1: poids du creuset après traitement avec solution ADF (g),

PE corrigée : prise d'essai corrigée par rapport à la matière sèche.

3.5.3 Estimation de la fraction ADL

La lignine au détergent acide est le résidu qui est obtenu après traitement de l'ADF nette de cendres avec l'acide sulfurique à 72 %.

Dans le creuset contenant l'ADF (1 g) sont versés 25 ml d'acide sulfurique à 72 % de manière à recouvrir le résidu et au moyen d'une baguette en verre, le tout est mélangé jusqu'à l'obtention d'une masse homogène. Le creuset est mis dans un réservoir en verre de manière que l'acide ne soit pas perdu et dont le volume doit aussi être maintenu constant. Après 3 heures de contact avec l'acide (hydrolyse acide) le résidu est filtré sous un léger vide, lavé à l'eau distillée chaude jusqu'à disparition de la réaction acide (jusqu'à obtention du même pH de l'eau distillée utilisée). Le creuset est mis à l'étuve à 105 °C pendant 4 h et pesé (P2). Enfin, il est incinéré à 550 °C pendant 8 h et pesé (P3) après refroidissement.

Calcul

$$\% \text{ ADL} = \frac{P2 - P3}{PE \text{ corrigée} \times 100}$$

4. Elaboration de la cinétique de production de gaz *in vitro*

La mesure de la production de gaz *in vitro* est l'une des techniques appliquées pour évaluer la valeur énergétique et le potentiel de fermentation des substrats étudiés.

Après préparation du matériel et de la verrerie (aseptisation à l'autoclave), les trois principaux composants de la fermentation ont été préparés : les substrats, les milieux simplifiés et l'inoculum. Selon la méthode de Menke et *al.* (1988).

4.1 Préparation des substrats

Les résidus secs de tomates, les résidus d'oranges, les cardes et les chrysanthèmes ont été pesées (0,2 g) et introduit dans des seringues (figure 4) préalablement lavées, aseptisées et lubrifiées par la suite sous la hotte à flux laminaire et fermé à l'aide de bouchons en caoutchouc.

4.2 Préparation et réduction des milieux d'incubation

Les milieux de fermentation sont des solutions tampons comparables à la salive du ruminant mais qui contiennent différentes sources d'azotes en plus selon le tableau 6 dans l'Annexe 4. Nous avons choisi la concentration de 100 mg N/l de solution suivant Oosting et *al.* (1989). La dégradation maximale *in vitro* d'aliments de faible qualité requiert de 88 à 100 mg N/l. Pour préparer les milieux simplifiés d'incubation nous avons pesé la source d'azote dans de l'eau distillée. Le jour de l'inoculation le tampon bicarbonate (NaHCO₃) et la solution réductrice sont additionnés dans les milieux de fermentation simplifiés. Après barbotage avec du CO₂ ; le pH est ajusté grâce à la soude ou l'acide chlorhydrique pour être proche du pH du liquide ruminal (6,5 -

7). Par la présence de résazurine, le potentiel d'oxydo-réduction est vérifié par virage de la couleur des milieux du violet à l'incolore, ce qui indique que le milieu est réduit et que l'on est en condition d'anaérobiose.

4.3 Inoculation et incubation

Le liquide ruminal qui comprend le microbiote ruminal ou inoculum est prélevé de deux vaches laitières. L'incubation est répétée deux fois avec trois répétitions pour chaque mélange (substrat + mélange (liquide ruminal filtré : milieu simplifié)).

Le jour de l'abatage des bovins, le liquide ruminal est transféré dans des thermos puis filtré à travers deux couches de gaze à l'aide de l'entonnoir, il a été distribué dans les flacons des 5 milieux selon la proportion 1:9, liquide ruminal filtré : milieu simplifié (figure 4).

Ensuite, le système de distribution a été installé où chaque seringue (figure 5) a été remplie avec 20 ml du mélange (liquide ruminal filtré + milieux simplifié). Les seringues sont ensuite placées dans l'étuve à 39 °C pour une série de lectures chaque 2 heures jusqu'à 68 h et par la suite chaque 4 heures pendant 120 heures. Après 120 h de fermentation, le contenu de chaque seringue est vidé pour mesurer son pH final et sa dégradabilité apparente.



Figure 4: photo des milieux simplifiés dans le bain-marie sous flux de CO₂



Figure 5 : photo d'une seringue inoculée et fermée

4.4 Estimation du pourcentage de dégradabilité apparente

La dégradabilité apparente correspond à la quantité de substrat insoluble et non dégradé retenue dans des sachets en nylon, de porosité égale à 54 micromètres, après 120 h de fermentation *in vitro*. Après une période d'incubation de 120 h, nous filtrons le contenu de chaque seringue dans un sachet sec, aseptique et préalablement taré, après séchage à 70 °C pendant 72 h, le résidu sec obtenu sert pour déterminer le pourcentage de dégradabilité apparente selon la formule suivante :

$$\% \text{ dégradabilité apparente} = \frac{P1 - P0}{Pd} \times 100$$

Où :

Po: poids du sachet vide (tare),

P1: poids du sachet après séchage,

Pd: prise d'essai initiale (0,2 g).

5. Mesure du pH

Le pH est un indicateur important de l'activité microbienne. Il est conseillé de le mesurer dans toutes les composantes que ce soit le liquide ruminal ou le milieu simplifié et même pour les aliments testés. Car chacun contribue au pH du milieu ruminal.

6. Analyse statistique

L'analyse des résultats des deux incubations est réalisée à l'aide de logiciel SAS (Statistical Analysis System). Les valeurs de composition chimique des substrats ont été soumises à une analyse ANOVA de comparaison de moyennes. Les valeurs de production de gaz ont été soumises à une analyse à base du test T de Student selon le modèle exponentiel proposé par Dhanoa (1988) afin de simuler le profil fermentaire (macrocinétique) des substrats et déterminer les paramètres cinétiques de la fermentation. Ce modèle est monophasique, comme si le substrat est composé d'une seule fraction.

L'équation du modèle exponentiel est la suivante :

$$\text{Gaz (t)} = b (1 - e^{-c(t-\text{lag})})$$

Où :

Gaz (t) : volume cumulé de gaz au temps t (ml/0,2 g de MS),

t : temps d'incubation (h),

b : production potentielle de gaz pour un temps d'incubation infini (ml/0,2 g de MS),

c : constante de vitesse en % de b par heure (% b/h),

lag : temps de latence ou d'adaptation de la flore ruminale aux substrats,

t_{1/2}: temps (h) au bout duquel la demi- production (50 % de **b**) est obtenue ; déduit de l'équation du modèle $t_{1/2} = \text{Ln } 2/c$,

Les données expérimentales ont été superposées aux données fournies par le modèle exponentiel. La fiabilité du modèle se mesure grâce à la valeur de **st** (ou **resd** : residual error) présentée dans la figure, qui est définis comme la distance entre les valeurs mesurés (données expérimentales) et les valeurs simulés (du modèle exponentiel ainsi que le modèle logistique).

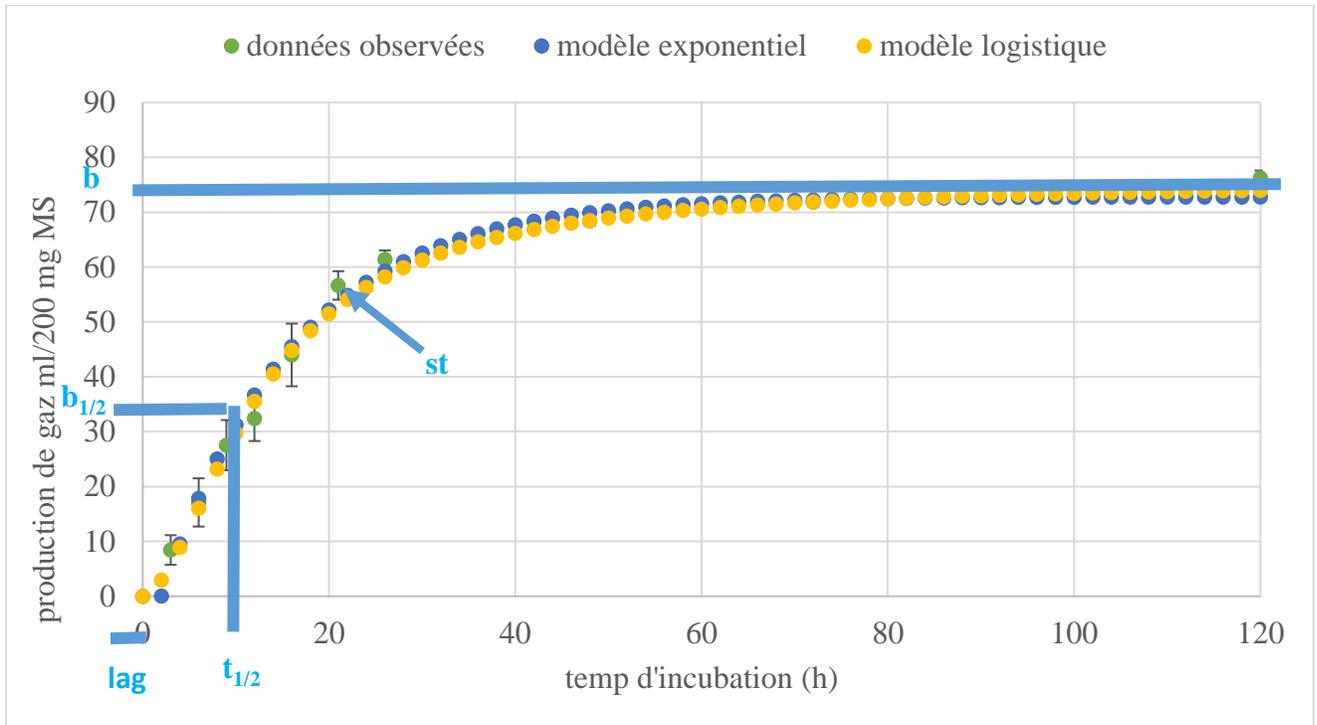


Figure 6 : Superposition des données expérimentales aux données modélisées

Une deuxième analyse des valeurs de production de gaz a été faite avec le modèle logistique de Groot et *al.* (1996). Ce modèle est différent du précédent où il simule la production de gaz à partir d'un substrat composé de deux fractions (diphase).

L'équation du modèle logistique est la suivante :

$$\text{Gaz (t)} = \frac{b_1}{1 + \frac{t^{c_1}}{t_{1/2}^{c_1}}}$$

Où :

Gaz (t) : volume cumulé de gaz au temps t (ml/0,2 g de MS),

t : temps d'incubation (h),

b₁ : production potentielle de gaz pour un temps d'incubation infini (ml/0,2 g de MS),

t_{1/2} : temps (h) au bout duquel la demi- production (50 % de **b₁**) est obtenue,

c₁: constante de courbure (sans unités).

La dérivée de la fonction (1) donne les paramètres suivants :

$$r_m = \frac{(C_1) \times t^{(c-1)}}{\dots}$$

$$t_{1/2 + t_1^c}$$

Où :

r_m : vitesse maximale de production de gaz (h^{-1}), le temps (t_m) au bout duquel cette vitesse maximale est calculé à partir de l'équation suivante :

$$t_m = t_{1/2} \times (c_1 - 1)^{1/c_1}$$

Expérience 2 : étude de la dégradabilité des résidus d'oranges et des cardes

L'étude a été menée dans le Ruminant Nutrition Laboratory (Animal, Dairy, and Veterinary Sciences Department, Utah State University, UT, USA) en deux répétitions indépendantes durant la période Mai-Juin 2016.

Deux substrats ont été incubés : un résidu agro-alimentaire : résidus d'oranges, et une plante fibreuse : les cardes (*Silybum marianum*) avec l'inoculum de deux vaches Holstein (Utah State University farm) après l'alimentation du matin dans trois milieux simplifiés qui diffèrent par leur source d'azote (milieu N1 : témoin sans azote ajouté, milieu N2 : bicarbonate d'ammonium, milieu N3 : glutamate de sodium).

Le but de ce travail consiste en :

- L'estimation de la dégradabilité de la matière sèche.
- L'estimation de l'azote ammoniacal.
- L'estimation des acides gras volatils totaux.
- L'estimation de la dégradabilité de la fraction de fibre insoluble dans le détergent neutre (NDF).

Afin d'évaluer la capacité de la flore ruminale bactérienne à dégrader ses deux substrats dans des milieux simplifiés contenant différentes sources d'azote.

1. Matériel végétal

Notre étude a porté sur l'utilisation des substrats suivants :

- Les résidus d'oranges (de la production industrielle de jus d'orange) prélevés de Ramdane Djamel (Skikda, Algérie).
- Les cardes (*Silybum marianum*), une plante fibreuse méditerranéenne provenant des prairies de la Sardaigne (Italie).

Tous les substrats ont été moulus pour passer à travers un tamis de porosité égale à 1 mm (standard model 4; Arthur H. Thomas Co., Swedesboro, NJ).

2. Matériel animal (inoculum)

Le liquide ruminal est récolté à partir de deux vaches Holstein équipées chirurgicalement d'une canule de rumen le matin de l'incubation (figure 7). Le pH est immédiatement mesuré puis le liquide ruminal est transféré dans des thermos conservés dans de l'eau tiède pour garder une température proche de 39 °C puis transportés au laboratoire de nutrition des ruminants.



Figure 7 : photo de vache équipée d'une cannule

3. Sources d'azote

Selon la disponibilité du substrat, nous avons choisi trois milieux contenant différentes sources d'azote avec la concentration de 200 mg N/L. Ces milieux sont : milieu N1 (témoin sans azote ajouté), milieu N2 (NH_4HCO_3 , bicarbonate d'ammonium, source d'azote minéral), milieu N3 (glutamate de sodium, source d'azote organique). La composition des milieux est dans l'Annexe 4 (tableau 7). Le jour de l'inoculation la solution réductrice a été préparé et nous avons ajouté 8 ml de NaOH 1 N dans chaque milieu pour compléter le volume final à 1 L.

4. Préparation des substrats

Les substrats séchés et moulus ont été pesé (0,7 g de chacun) dans des sachets Ankom (préalablement rincés avec l'acétone et séchés) scellés avec un scellant thermique puis mis dans des flacons étiquetés de 100 ml.

5. Inoculation et incubation

Le liquide ruminal de deux vaches a été mélangé puis filtré à travers 2 couches de gaze stériles. Sous flux continu de CO_2 , 200 ml de chaque milieu réduit a été ajouté. A la fin, la mixture (60 ml) a été transférée dans des flacons contenant les substrats et le tout incubé à 39 °C pendant 24 h.

6. Les analyses post fermentation

6.1 La dégradabilité de la matière sèche

Les sachets Ankom ont été transférés après 24 h d'incubation dans l'étuve à 55 °C pendant 24 h et le poids perdu a été mesuré.

Le calcul de la dégradabilité de la matière sèche a été fait selon l'équation suivante :

$$\text{Dégradabilité de la MS} = \frac{100 - (P3 - P1) * 100}{P2}$$

Où :

P1 : tare du sachet,

P2 : poids de l'échantillon,

P3 : poids sec du sachet avec le résidu après fermentation.

6.2 Azote ammoniacal

L'azote ammoniacal a été mesuré en utilisant la méthode du phénol/hypochlorite de Weatherburn (1967) avec le Dynatech MRX Microplate reader.

Une quantité de 1 ml 1 % H₂SO₄ a été ajouté à chaque échantillon puis conservé à - 40 °C.

Après décongélation des échantillons à température ambiante, ils ont été dilués à 1:6 selon Eun (2006) ce qui est typique du liquide ruminal.

Calcul:

$$\text{NH}_3 \text{ (mg/dl)} = \text{NH}_3 \text{ (mM)} \times 1,703$$

6.3 Analyse des acides gras volatils

Nous avons quantifié les acides gras volatils (en mM) qui sont : l'acide acétique, l'acide propionique, l'acide butyrique, l'acide valérique, l'acide isobutyrique, isovalérique et caproïque par HPLC (chromatographie liquide à haute performance).

Dans les circonstances normales, le liquide ruminal contient approximativement 100 mM d'acides gras volatiles totaux (près de 60 mM acide acétique, 30 mM propionique, 5 - 20 mM butyrique, et moins de 5 mM isobutyrique, valérique, isovalérique, et acide caproïque).

L'acide crotonique, ou acide *trans*-2-buténoïque, est employé comme standard interne. La préparation des solutions et réactifs mentionnés dans les prochains paragraphes (6.3.1 jusqu'à 6.3.5) a été faite.

6.3.1 Solutions stock des acides gras volatils

Les courbes standards sont élaborées pour couvrir un intervalle de 5 à 100 mM pour l'acide acétique, propionique et butyrique et de 0,5 à 10 mM pour les autres acides. Le standard interne est de 20 mM pour tous les échantillons.

Le tableau 8 (Annexe 5) présente les solutions stock avec concentration, poids de l'acide et volume des 7 AGV.

6.3.2 Les solutions standards servants pour la courbe

Huit flacons volumétriques ont été étiquetés (Standard AGV) ‘‘de A jusqu’à H’ (tableau 9, Annexe 5). Les solutions stock des AGV sont mises à température ambiante ensuite les volumes approximatifs sont versés dans les béchers étiquetés. A chaque flacon de A jusqu’à H est ajouté le volume correspondant des solutions stock. Le volume final est ajusté avec 100 ml d’eau distillée et bien mélangé puis stocké à 4 °C.

6.3.3 Les échantillons de contrôle de qualité (CQ)

Trois flacons volumétriques ont été étiquetés ‘‘AGV CQ-élevé (85 / 8,5 mM)’’, ‘‘AGV CQ-moyen (40/4,0 mm)’’, et ‘‘AGV CQ- bas (10/1,0 mM)’’. Le volume des solutions stock des AGV a été ajouté en plus de l’ajustement du volume final avec 100 ml d’eau distillée et bien homogénéisé puis stocké à 4 °C. (tableau 10, Annexe 5).

6.3.4 Mix des acides gras volatils (vérification de l’échantillon)

Un mélange standard d’AGV a été préparé en ajoutant 1 ml de l’échantillon à analyser à un flacon d’échantillonnage automatique contenant 0,2 ml de m-HPO₃ à 25 % et 0,2 ml d’acide crotonique 0,1 M (standard interne). Le mélange standard est fourni dans un flacon scellé. De petites quantités sont enlevées dans un flacon en verre de 2 dram (bouchon doublé en téflon) à l’aide d’une seringue de 3 ml. Le tout est stocké à 4 °C.

6.3.5 Solution d’acide crotonique

La solution d’acide crotonique contient : 0,1 M (standard interne), acide métaphosphorique 25 % (p/v) (m-HPO₃), courbe standard, CQ, et mix AGV.

Nous avons ajouté 1 ml de m-HPO₃ à 25 % à tous les échantillons puis conservé à - 40 °C.

6.4 Analyse de la fraction insoluble dans le détergent neutre

L’analyse du contenu NDF a été effectuée aux 2 temps de mesure 0 et 24 h en utilisant ANKOM²⁰⁰ Fiber analyzer (ANKOM Technology, Macedon, NY)

Calcul:

$$\% \text{NDF} = \frac{(P3 - P1) \times 100}{P2}$$

Où:

P1 : tare du sachet,

P2 : poids de l'échantillon,

P3 : Poids sec de l'échantillon avec la fibre après le processus d'extraction.

6.5 Analyse statistique

Les paramètres de fermentation après 24 h à 39 °C : la dégradabilité de la matière sèche, l'azote ammoniacal, la dégradabilité de l'NDF, le pH final, les concentrations d'AGV totaux, les concentrations d'AGV individuels (acide acétique, acide propionique, acide butyrique, valérate, acide isovalérique, acide isobutyrique) proportion acétate : propionate ont été soumis à une analyse statistique ANOVA pour comparer leur moyennes et les classer par un test post-hoc de Student-Newman-Keuls avec $p < 0,05$ en utilisant le logiciel SAS 9.4.

Chapitre V : Résultats et discussion

Expérience 1 : Etude de la fermentescibilité des résidus d'oranges, des résidus de tomates, des cardes et des chrysanthèmes

1. pH et dégradabilité des substrats

Dans notre travail nous avons utilisé les résidus d'oranges, les résidus de tomates, les cardes et les chrysanthèmes comme source d'énergie principale incubés dans les milieux simplifiés avec une source d'azote organique, une source d'azote inorganique et un autre milieu sans azote comme milieu de contrôle (blanc). Le tableau 2 montre les résultats de la composition chimique de ces substrats.

Tableau 2 : composition chimique des chrysanthèmes, cardes, résidus de tomates et résidus d'oranges (n = 2) moyennes (\pm écart-type) en % de MS

Substrat / composition	Plantes fibreuses		Résidus agro-alimentaires	
	Chrysanthèmes	Cardes	Résidus de tomates	Résidus d'oranges
MS, %	90,55 \pm 0,09	88,1 \pm 0,12	90,46 \pm 0,46	89,0 \pm 0,21
MO	94,42 \pm 0,15	87 \pm 0,02	77,09 \pm 0,14	97,4 \pm 0,04
PB	2,43 \pm 0,15	4,32 \pm 0,32	9,03 \pm 0,9	5,75 \pm 0,15
NDF	78,98 \pm 0,33	68,8 \pm 0,78	33,09 \pm 0,35	25,7 \pm 0,09
ADF	58,12 \pm 0,19	52,4 \pm 0,02	ND	11,7 \pm 0,13
ADL	10,18 \pm 0,49	8,56 \pm 0,09	ND	ND
MM	5,58 \pm 0,15	13,02 \pm 0,02	22,91 \pm 0,14	2,65 \pm 0,03
EE	0,63 \pm 0,01	0,62 \pm 0,002	ND	0,6 \pm 0,007
FB	54,39 \pm 0,28	45,4 \pm 0,29	ND	10,4 \pm 0,35
HNF	12,38 \pm 0,04	13,25 \pm 1,13	ND	75,33 \pm 0,28
ST	12,73 \pm 4,75	8,42 \pm 1,53	28,49 \pm 5,5	40,07 \pm 4,69

ADF: fibre insoluble dans le détergent acide; ADL: fraction insoluble dans l'acide sulfurique; EE: extrait à l'éther; FB: fibres brutes; HNF: hydrates de carbone non fibreux; MM: matière minérale; MO: matière organique; MS: matière sèche; ND: non déterminé; NDF: fibre insoluble dans le détergent neutre; PB: protéines brutes; ST: sucres totaux.

Le taux de matière sèche, matière organique, protéines brutes et matière minérale des substrats.

La teneur en matière sèche des substrats est similaire et élevée. Les chrysanthèmes ont la valeur la plus élevée (90,55 %) suivi par les résidus de tomates (90,46 %) puis par les résidus d'oranges (89,0 %) et enfin par les cardes (88,1 %). En ce qui concerne la matière organique, les résidus d'oranges et les chrysanthèmes présentent des valeurs assez élevées (97,4 % et 95,30 % respectivement) par rapport aux cardes et résidus de tomates (87,0 % et 77,09 % respectivement). La plus forte teneur en protéines brutes est notée pour les résidus de tomates (9,03 % MS) tandis que la plus faible teneur est observée chez les chrysanthèmes (2,43 % MS). Les résidus d'oranges et les cardes contiennent 5,75 % MS et 4,32 % MS respectivement. Les résidus de tomates enregistrent les valeurs les plus élevées en matière minérale (22,91 % MS) tandis que les plus faibles teneurs sont observées chez les résidus d'oranges (2,65 % MS). Les plantes fibreuses renferment des valeurs entre celles des résidus (13,02 % MS et 5,58 % MS) pour les cardes et les chrysanthèmes respectivement.

Le taux de la fraction de fibre insoluble dans le détergent neutre, fraction insoluble dans le détergent acide, la lignine, extrait à l'éther, hydrates de carbone non fibreux, sucres totaux des substrats.

La fraction NDF qui représente la cellulose, l'hémicellulose et la lignine est la plus élevée chez les chrysanthèmes (78,98 % MS) suivi par les cardes (68,8 % MS) puis par les résidus de tomates (33,09 % MS) et enfin par les résidus d'oranges (25,7 % MS). Concernant la fraction ADF qui comprend la cellulose et la lignine, la plus forte teneur est enregistrée chez les plantes fibreuses (58,12 % MS et 52,4 % MS) chez les chrysanthèmes et cardes respectivement alors que la teneur est très faible chez les résidus d'oranges (11,7 % MS). La lignine qui est la fraction la moins digestible a un taux de 10,18 % MS et 8,56 % MS chez les chrysanthèmes et cardes respectivement. Les chrysanthèmes contiennent 54,39 % MS de fibres brutes plus élevée que chez les cardes (45,4 % MS) et les résidus d'oranges (10,4 % MS). L'extrait à l'éther est sensiblement similaire chez les chrysanthèmes, cardes et résidus d'oranges (0,63, 0,62 et 0,6 % MS respectivement). La valeur la plus élevée en hydrates de carbone non fibreux est notée pour les résidus d'oranges (75,33 % MS) suivi des cardes et chrysanthèmes avec des valeurs assez proches (13,25 % MS et 12,38 % MS respectivement). La composition en sucres totaux est la plus élevée chez les résidus d'oranges

(40,07 % MS) suivi des résidus de tomates (28,49 % MS) ensuite des chrysanthèmes (12,37 % MS) et finalement des cardes (8,42 % MS).

Discussion.

Les résultats obtenus pour la matière sèche et la matière minérale sont plus élevées que ceux rapportés par Amokrane (2009) (88,77 % MS et 11,77 % MS respectivement) pour les résidus de tomates. Par contre, les teneurs en matière organique est inférieure à celle enregistrée par Amokrane (2009) 98,33 % MS. La teneur en protéines brutes des résidus de tomates est inférieure comparativement aux valeurs rapportées par Afshar *et al.* (2011) pour la tomate séchée d'Iran (26,40 % MS), par rapport à Songsak (2009) de Thaïlande (22,0 % MS) et par rapport à Amokrane (2009) d'Algérie (12,06 % MS).

Les résultats de la fraction NDF des résidus de tomates sont différents des données rapportées par Besharati *et al.*, 2008; Songsak, 2009 ; Amokrane, 2009; Afshar *et al.*, 2011.

Peixoto *et al.* (2015) ont rapporté les valeurs suivantes pour la pulpe d'agrumes du Brésil, MS : 86,0 %, MO : 94,2 % MS, PB : 60 g/kg MS ou 6 % MS, NDF : 18,3 % MS, ADF : 13,7 % MS, HNF : 69,5 % MS. De ces résultats nous remarquons que leurs résidus contiennent sensiblement plus de fibres et moins d'hydrates de carbone. Par ailleurs, les résidus d'oranges ont une teneur en pectines (25,0 % MS) supérieure comparativement aux valeurs de Bampidis et Robinson (2006) à 22,3 % MS et Miron *et al.* (2001) à 20,7 % MS.

Les teneurs en protéines brutes et en matière minérale des chrysanthèmes sont inférieures à celles reportées par Moujahed *et al.* (2013) à 14,0 % MS et 8,1 % MS respectivement. Alors que les fractions NDF, ADF et ADL sont supérieures à celles enregistrées chez Moujahed *et al.* (2013) à savoir 33,5 % MS et 25,7 % MS et 6,2 % MS respectivement pour des plantes d'une région semi-aride de Tunisie. La teneur en nitrates d'azote est dans les normes selon Tagliapietra *et al.* (2014) à 0,0305 % MS.

En comparaison avec les résultats de Valente *et al.* (2003), la composition chimique des chrysanthèmes est proche du stade de floraison précoce où la teneur en protéines brutes est de 5,8 % MS et NDF (490 g/kg de MS ou 49,0 % MS), ADF (447 g/mg de MS).

Tagliapietra *et al.* (2014) ont reporté que la teneur des nitrates d'azote dans les cardes est dans un niveau sur pour un fourrage 0,0328 % MS.

Par manque d'étude des cardes et chrysanthèmes, nous avons comparé leur composition chimique avec deux plantes fourragères *Aristida pulmosa* et *Danthonia forskhalii* apparentant à la famille des graminées.

Aristida pulmosa reporté par Arhab et al. (2009) présente une teneur de 84,66 % de MS, une teneur en MO de 88,54 % très proche de celle enregistré pour les cardes, et en PB proche des cardes et chrysanthèmes (7,44 % MS). Les valeurs reportées pour les fibres sont : NDF 74,79 % MS ADF 41,38 % MS et lignine 6,45 % MS de El-Oued une région aride d'Algérie. Les trois dernières valeurs se situent entre celles de nos deux plantes.

Du même auteur, *Danthonia forskhalii*, a une teneur en MS proche de celle des chrysanthèmes 89,98 % et une teneur en MO proche de celle des cardes 88,83 % MS. D'autre part les teneurs en PB (6,06 % MS) et NDF (82,44 % MS) sont supérieures aux nôtres. Elle renferme une teneur en ADF (56,23 % MS) et lignine (7,92 % MS) proches des nôtres pour les cardes et les chrysanthèmes. Les différences en composition chimique des cardes et chrysanthèmes sont associés au climat, stage de maturité, type de sol, saison de récolte et caractéristiques génotypiques (Ammar et al., 2004).

1.1 Les résidus d'oranges

La figure 8 montre les résultats du pH initial et du pH final de tous les milieux après 120 h d'incubation des résidus d'oranges. Globalement le pH final à diminué par rapport au pH initial sauf dans le milieu C (nitrates de potassium) où il a augmenté (de 6,99 à 7,04). Le pH le plus bas est enregistré pour le milieu E (témoin sans azote ajouté) (6,38) suivi du milieu A (bicarbonates d'ammonium) (6,82) puis le milieu D (extrait de levure) (6,84) ensuite le milieu B (glutamate de sodium) (6,88).

La dégradabilité apparente comme montré dans la figure 9 est au-dessus de la moyenne pour tous les milieux simplifiés. Le milieu E (témoin sans azote ajouté) possède la valeur la plus élevée (94,58%) suivi par le milieu D (extrait de levure), A (bicarbonates d'ammonium), C (nitrates de

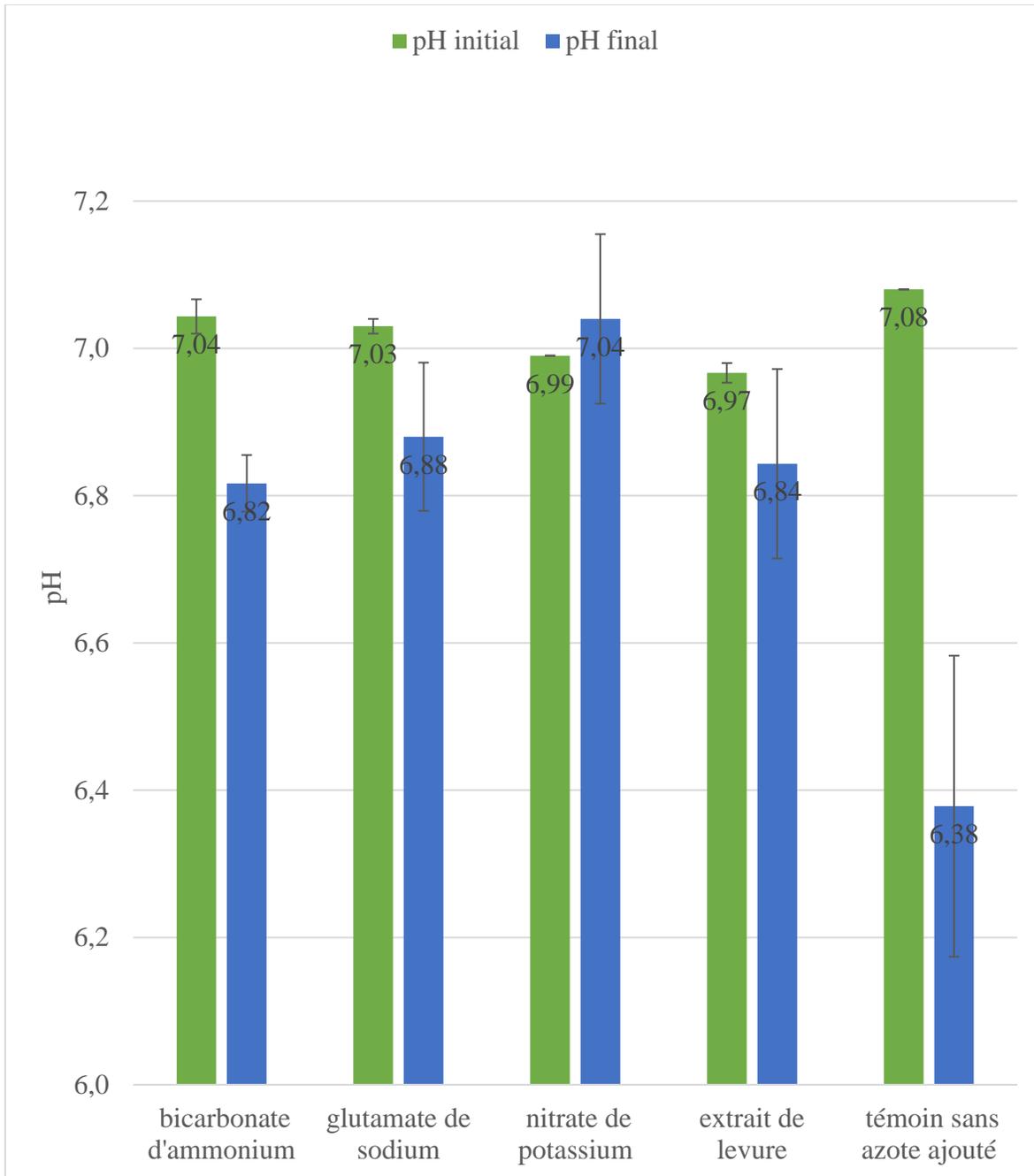


Figure 8 : pH initial et pH final moyens après 120 h de la fermentation des résidus d'oranges

potassium) et B (glutamate de sodium) (84,33 %, 83,63 %, 79,12 %; 78,41 % respectivement). La dégradabilité des résidus d'oranges est fortement corrélée au pH final ($r = -0,951$) (Annexe 7, figure 57).

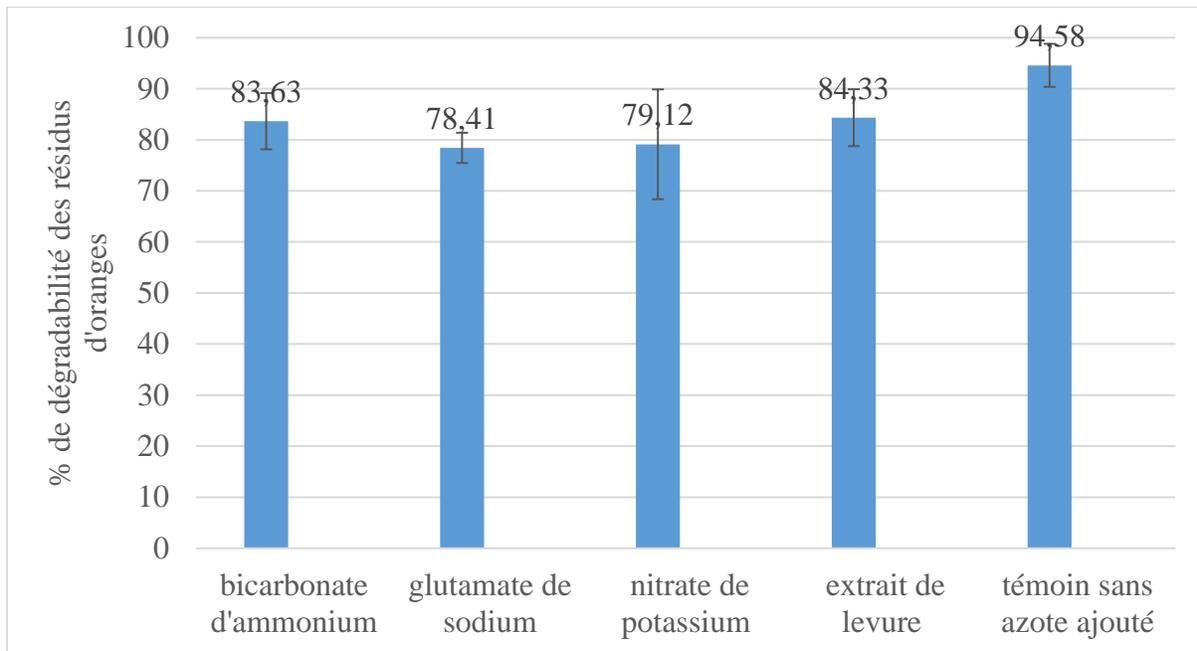


Figure 9 : pourcentage de dégradabilité moyen après 120 h de fermentation des résidus d'oranges avec les milieux simplifiés.

1.2 Les résidus de tomates

La figure 10 montre les résultats du pH initial et final des résidus de tomates incubés dans les cinq milieux simplifiés après 120 h de fermentation. L'examen de cette figure montre que les quatre milieux de source d'azote organique et inorganique ont subi une augmentation de pH après fermentation contrairement au milieu E témoin sans azote ajouté qui a diminué de 7,08 à 6,73.

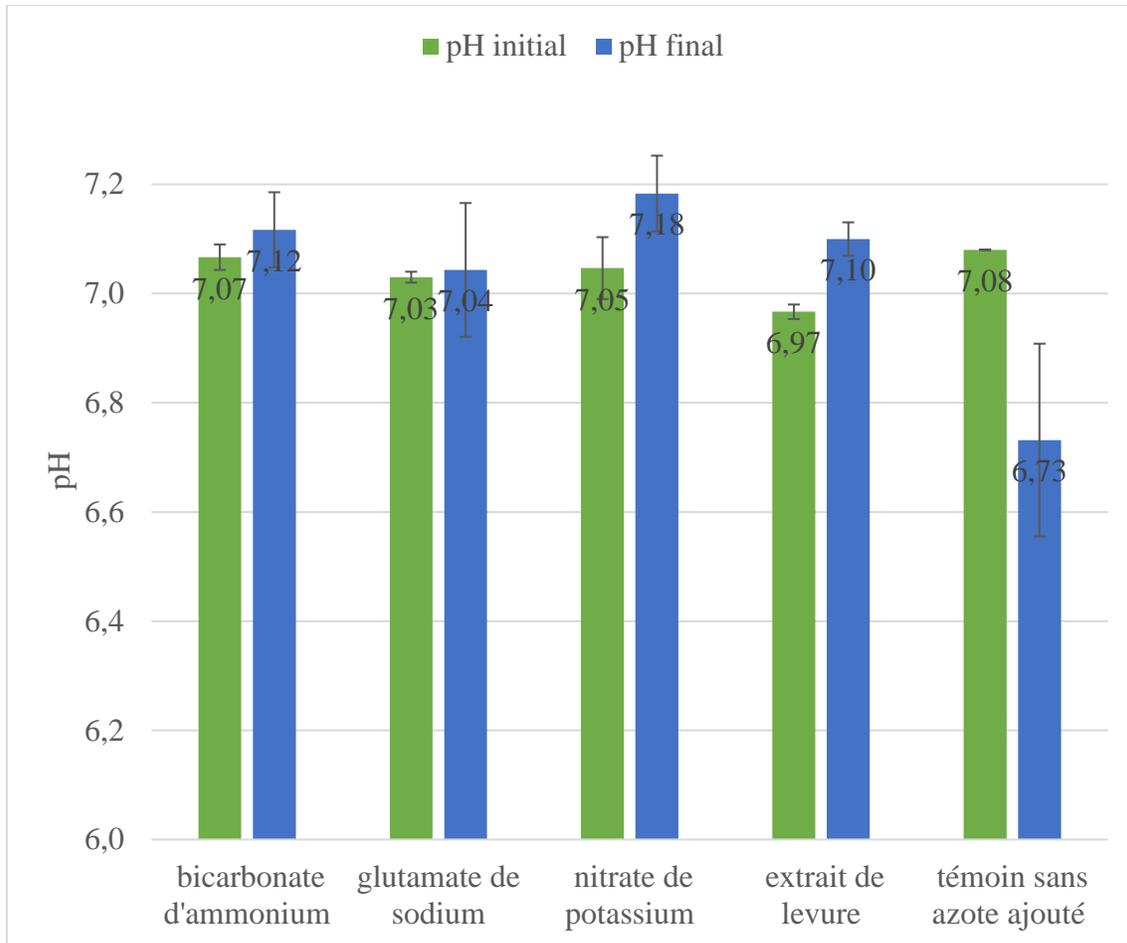


Figure 10 : pH initial et pH final moyens après 120 h de la fermentation des résidus de tomates

Concernant la dégradabilité apparente des résidus de tomates présenté dans la figure 11, on note une différence de 10 % environ entre la valeur la plus élevée pour le milieu A (bicarbonates d'ammonium) 84,57 % et la valeur la plus basse pour le milieu C (nitrates de potassium) 72,79 %. Entre ces deux milieux il y a le milieu B (glutamate de sodium) puis le milieu D (extrait de levure) puis le milieu E (témoin sans azote ajouté) et le milieu avec les valeurs suivantes 79,16 % ; 77,25 % et 72,79 % respectivement. La corrélation entre la dégradabilité des résidus de tomates et du pH final est très faible ($r = 0,157$) (Annexe 7, figure 58).

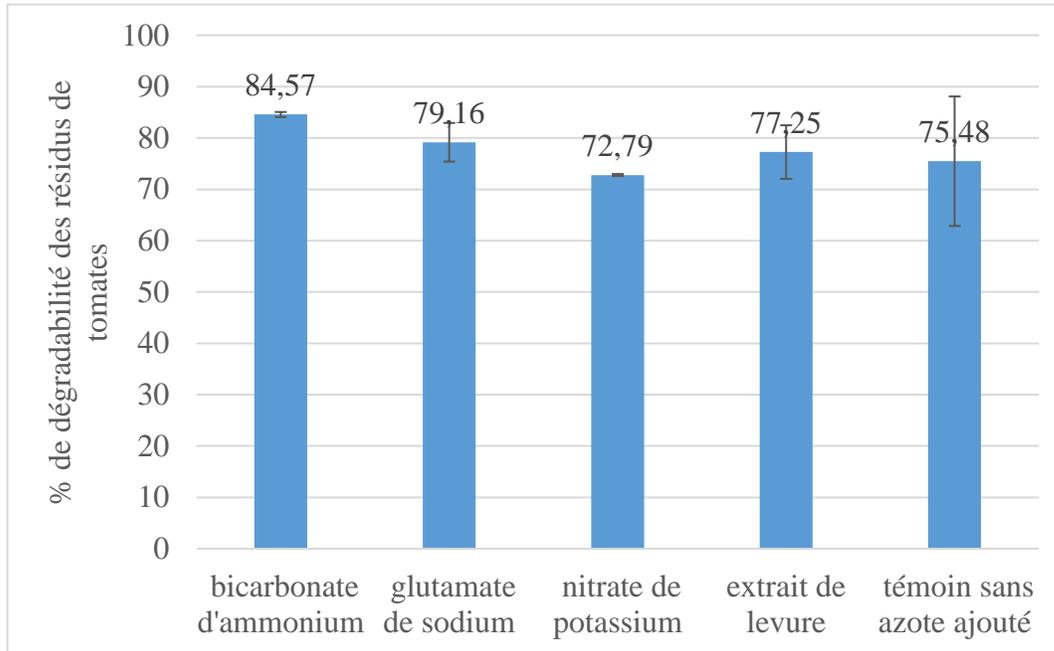


Figure 11 : pourcentage de dégradabilité moyen après 120 h de fermentation des résidus de tomates avec les milieux simplifiés.

1.3 Les cardes

La figure 12 représente les résultats du pH initial et du pH final des cardes incubés dans les cinq milieux de source d'azote différentes. Nous notons que le pH final est légèrement au-dessus du pH physiologique du rumen (5,5 - 7) et il est alcalin pour tous les milieux. L'ordre croissant des milieux d'incubation sur la base du pH final est: milieu E (témoin sans azote ajouté) (7,01), milieu B (glutamate de sodium) (7,17), milieu D (extrait de levure) (7,18), milieu A (bicarbonates d'ammonium) (7,24) et milieu C (nitrates de potassium) (7,28).

Le pH final s'éloigne de la valeur optimale de l'activité microbienne dans le rumen et le fait qu'il soit plus élevé que le pH initial pour tous les milieux démontre qu'il y a une lyse cellulaire donc une dénitrification et une présence probable d'ammoniaque ainsi que d'autres formes d'azote après 120 h de fermentation ou bien c'est dû au caractère alcalin de la plante elle-même.

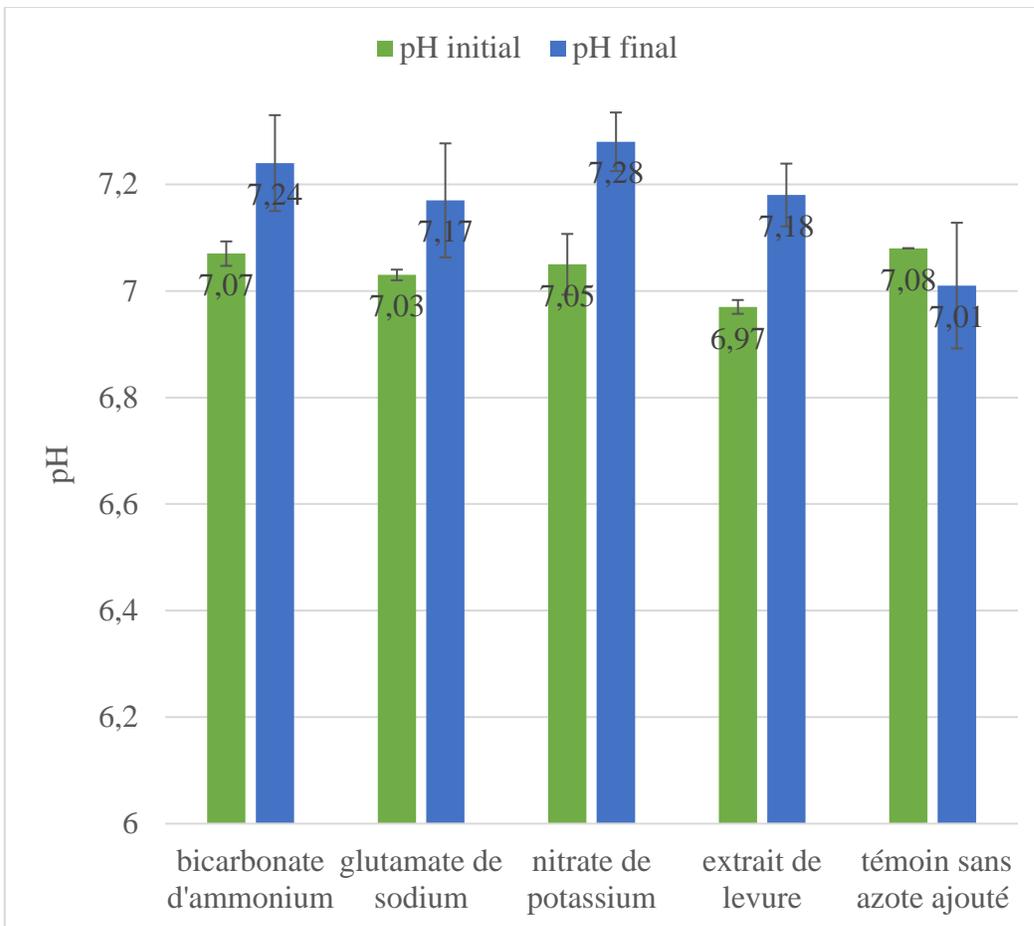


Figure 12 : pH initial et pH final moyens après 120 h de la fermentation des cardes

Les résultats de la dégradabilité apparente par la flore ruminale bovine des cardes incubés dans les cinq milieux simplifiés sont représentés graphiquement dans la figure 13. La valeur la plus élevée est observée chez le milieu C (nitrates de potassium) (68,3 %) tandis que la valeur la plus faible est notée chez le milieu E (50,68 %). Le milieu C (nitrates de potassium) est suivi du milieu A (bicarbonates d'ammonium) et D (extrait de levure) qui sont très proches (55,74 % et 54,62 % respectivement) puis par le milieu B (glutamate de sodium) (52,74 %). Donc nous constatons que les cardes se sont mieux dégradées dans les milieux d'azote inorganique par rapport aux milieux d'azote organique.

Il y a une forte corrélation positive entre la dégradabilité des cardes et le pH final ($r = 0,751$) (Annexe 7, figure 59).

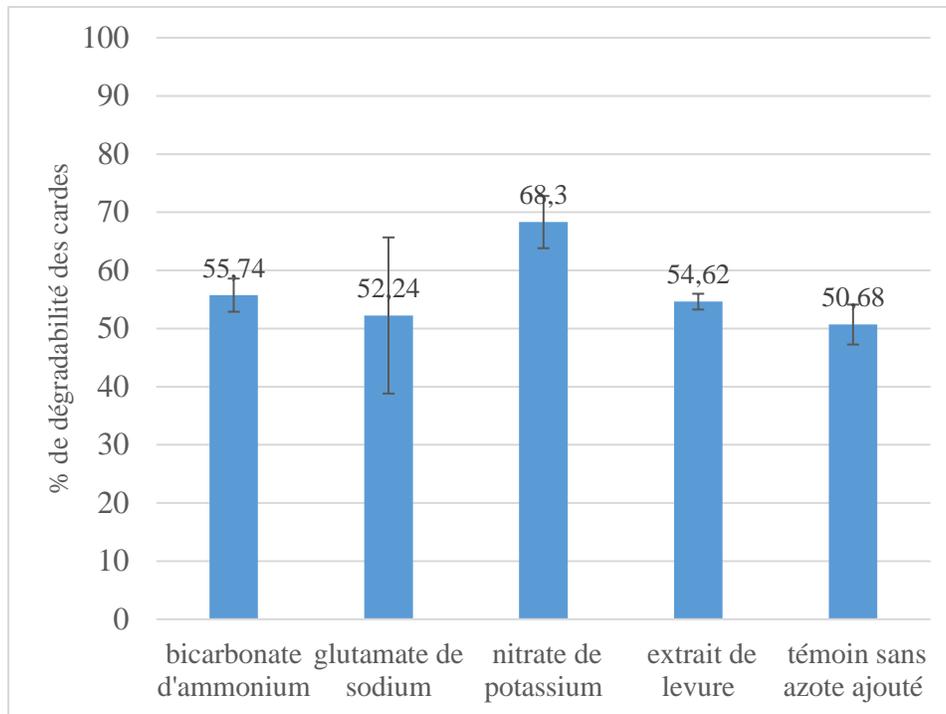


Figure 13 : pourcentage de dégradabilité moyen après 120 h de fermentation des cardes avec les milieux simplifiés.

En comparant nos résultats avec des plantes fourragères, le volume de gaz enregistré après 24 h est de 84,2 ml/g MS et 101,1 ml/g MS pour *A.plumosa* et *D.forskhalii* respectivement (milieu tamponné sans ajout d'azote). Tandis que la plante graminée *Aristida pungens* a produit après 24 h de fermentation 20 ml/0,2 g et dont la composition chimique est de :PB : 5,20 % MS, NDF 85,2 % MS, ADF 60,9 % MS selon Medjekal et al. (2011).

1.4 Les chrysanthèmes

Le pH final des chrysanthèmes incubés dans les milieux simplifiés est similaire à celui des cardes, il est légèrement supérieur au pH optimal pour l'activité microbienne dans le rumen. La plus grande valeur caractérise le milieu D (extrait de levure, 7,33) suivi par le milieu A (bicarbonates d'ammonium, 7,3) et puis par le milieu C (nitrates de potassium, 7,24), le milieu B (glutamate de sodium, 7,19) et enfin le milieu E (témoin sans azote ajouté, 7,08) (figure 14). La dégradabilité est moyenne pour le milieu A (bicarbonates d'ammonium, 51,91 %) suivi du milieu D (extrait de levure, 46,14 %) ensuite le milieu E (témoin sans azote ajouté, 44,28 %) puis le milieu

C (nitrates de potassium, 32,60 %) et enfin le milieu B (glutamate de sodium, 28,55 %) (figure 15).

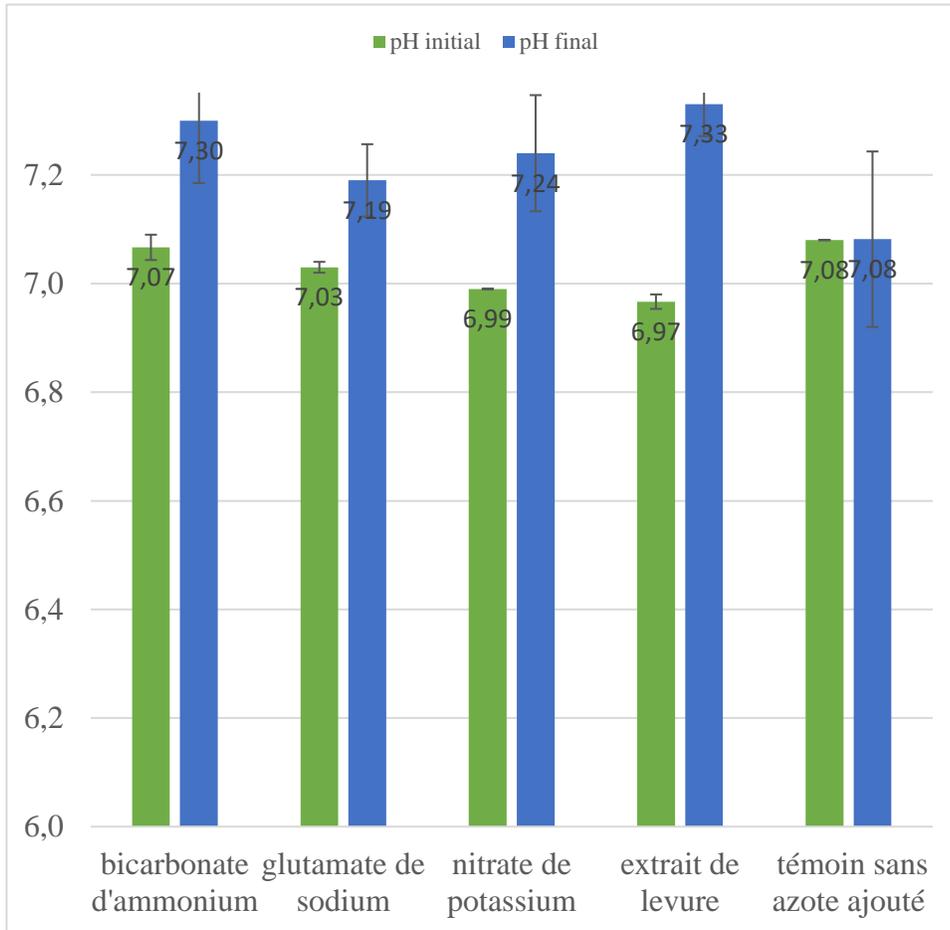


Figure 14 : pH initial et pH final moyens après 120 h de la fermentation des chrysanthèmes

Le coefficient de détermination est égal à 0,058 dans ce cas il n'y a pas de relation directe entre le pH final et la dégradabilité de cette plante fibreuse en utilisant différentes formes d'azote organique et inorganique.

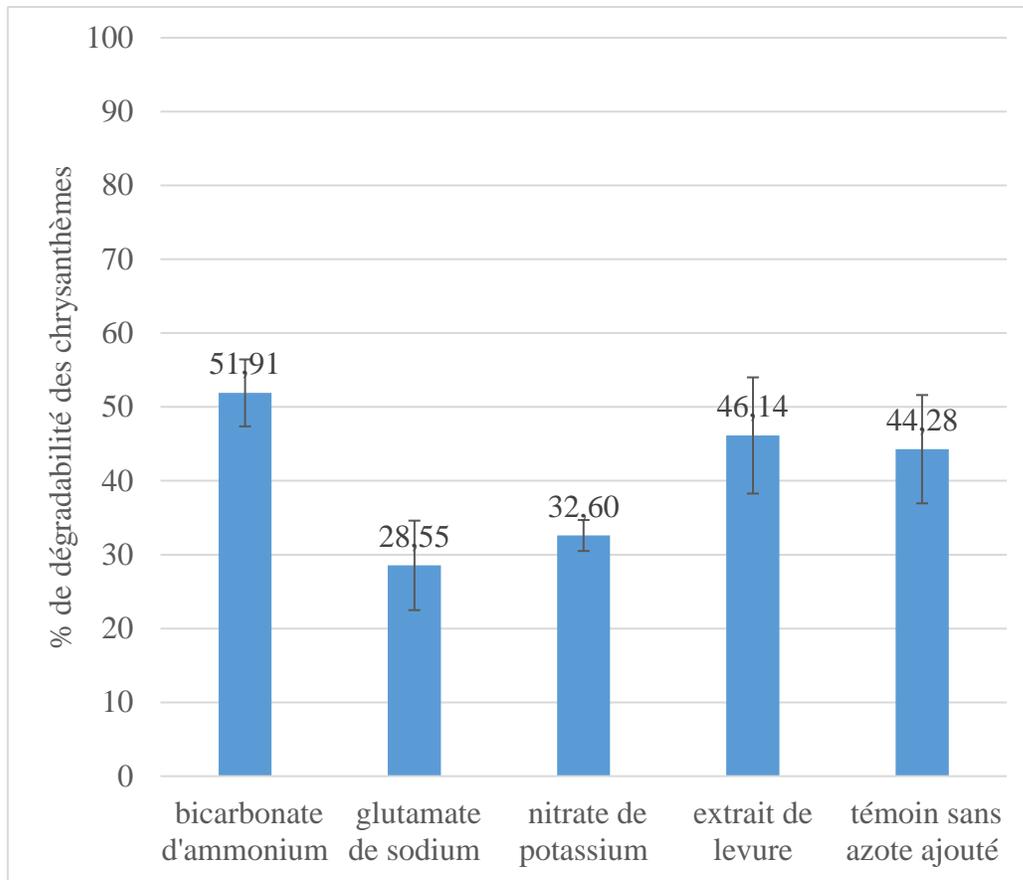


Figure 15 : pourcentage de dégradabilité moyen après 120 h de fermentation des chrysanthèmes avec les milieux simplifiés.

En 1999 Sulas et *al.* ont évalué *C coronarium* et ont trouvé une dégradabilité de la matière sèche assez importante 85,7 %. Sulas et Caredda (1997) en association avec des cultures fourragères traditionnelles, les chrysanthèmes peuvent apporter des teneurs élevées de matière sèche.

La digestibilité de la matière organique est de 0,47 selon Valente et *al.* (2003) alors qu'elle est la plus élevée (0,63) au stade du bouton précoce. D'une part Valente et *al.* (2003) a conclu que ce fourrage pourrait être utilisé comme alternative ou complément des fourrages Méditerranéen traditionnels. D'autre part Licitra G (1997) a reporté des résultats de composition chimique d'un pâturage naturel qui est *Chrysanthemum coronarium* à mi- floraison (Van Soest, 1994) où les teneurs en MS (31,4 %), NDF (50,8 % MS), ADF (35,1 % MS) et lignine (3,8 % MS) sont inférieurs aux nôtres.

2. Analyse des paramètres cinétiques de production de gaz des substrats

2.1 Analyse par le modèle logistique

2.1.1 : production potentielle de gaz pour un temps d'incubation infini (ml/200 mg MS) b_1

Le modèle logistique de Groot et *al.* (1996) nous permet d'obtenir différents paramètres dont le b_1 (production potentielle de gaz pour un temps d'incubation infinis ml/200 mg MS) qui est représenté dans la figure pour les quatre substrats : les résidus d'oranges, les résidus de tomates, les cardes et les chrysanthèmes incubés dans les milieux simplifiés : milieu au bicarbonate d'ammonium, milieu au glutamate de sodium, milieu au nitrate de potassium, milieu à l'extrait de levure et le milieu témoin sans azote ajouté.

Nous observons que la fermentescibilité des résidus agro-alimentaires est plus élevée que celle des plantes fibreuses. Ceci est probablement dû à la teneur en NDF (cellulose, hémicellulose et lignine) qui est plus élevée chez les chrysanthèmes (78,98 % MS) et cardes (68,8 % MS) par rapport aux résidus de tomates (33,09 % MS) et résidus d'oranges (25,7 % MS). En effet les bactéries du rumen attaquent tout d'abord la paroi végétale avant d'accéder aux autres composants tels que les sucres solubles.

Les résidus d'oranges enregistrent une production de gaz plus élevée que les résidus de tomates, ceci est probablement dû à la forte teneur en sucres totaux des résidus d'oranges (40,07 % MS) par rapport aux résidus de tomates (28,49 % MS) qui sont considérés comme source d'énergie et d'azote pour les bactéries du rumen afin de produire les principaux gaz qui sont le CO₂, CH₄ et H₂. Les résidus de tomates produisent environ la même quantité de gaz dans le milieu au bicarbonate d'ammonium que ceux rapportées par Amokrane en 2009 (46,88 ml/200 mg MS) en utilisant le milieu de Menke (Menke et Steingass, 1988) qui apporte plus d'oligoéléments et de sels minéraux au microbiote ruminal que notre milieu simplifié.

La production de gaz chez les chrysanthèmes dans le milieu témoin est proche de la valeur rapportée par Boufennara en 2012 par la plante fourragère *Artemisia campestris*.

La classification des milieux sur la base des résultats de production de gaz des résidus d'oranges après 120 h d'incubation est la suivante :

Le milieu témoin sans azote ajouté (83,34 ml) > milieu au glutamate de sodium (78,06 ml) > milieu au bicarbonate d'ammonium (75,58 ml) > milieu à l'extrait de levure (75,41 ml) > milieu au nitrate de potassium (60,76 ml).

La classification des milieux sur la base des résultats de production de gaz des résidus de tomates après 120 h d'incubation est la suivante :

Le milieu à l'extrait de levure (59,83 ml) > milieu au glutamate de sodium (58 ml) > milieu au bicarbonate d'ammonium (52,68 ml) > milieu témoin sans azote ajouté (46,07 ml) > milieu au nitrate de potassium (39,88 ml)

La classification des milieux selon la production de gaz en présence des cardes est la suivante :

Le milieu au glutamate de sodium (36,29 ml) > milieu à l'extrait de levure (33,12 ml) > milieu témoin sans azote ajouté (29,08 ml) > milieu au bicarbonate d'ammonium (26,19 ml) > milieu au nitrate de potassium (22,45 ml).

La classification des milieux selon la production de gaz en présence des chrysanthèmes est la suivante :

Le milieu témoin sans azote ajouté (44,89 ml) > milieu au bicarbonate d'ammonium (32,83 ml) > milieu à l'extrait de levure (31,47 ml) > milieu au glutamate de sodium (25,13 ml) > milieu au nitrate de potassium (11,22 ml).

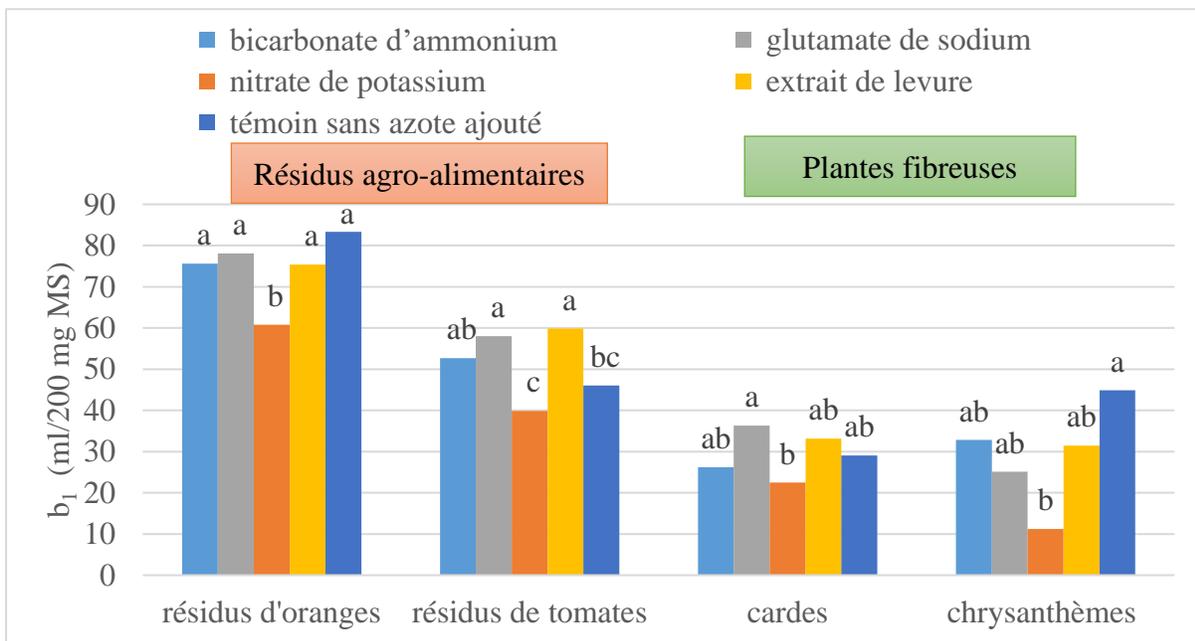


Figure 16 : production potentielle de gaz pour un temps d'incubation infini (b_1) (ml/200 mg de MS) des substrats dans les milieux de fermentation simplifiés selon le modèle logistique

2.1.2 : Constante de courbure c_1

La constante de courbure c_1 reflète l'aspect sigmoïdale de la courbe de cinétique de production de gaz. Elle est significativement ($p < 0,05$) la moins élevée dans le milieu au nitrate de potassium chez les résidus d'oranges (1,17) et chez les résidus de tomates (1,27) par rapport aux autres milieux (figure). Ceci confirme encore une fois le caractère inhibiteur de croissance bactérienne de cette source d'azote. Par contre chez les plantes fibreuses, les différences entre les milieux de fermentation simplifiés sont non significatives.

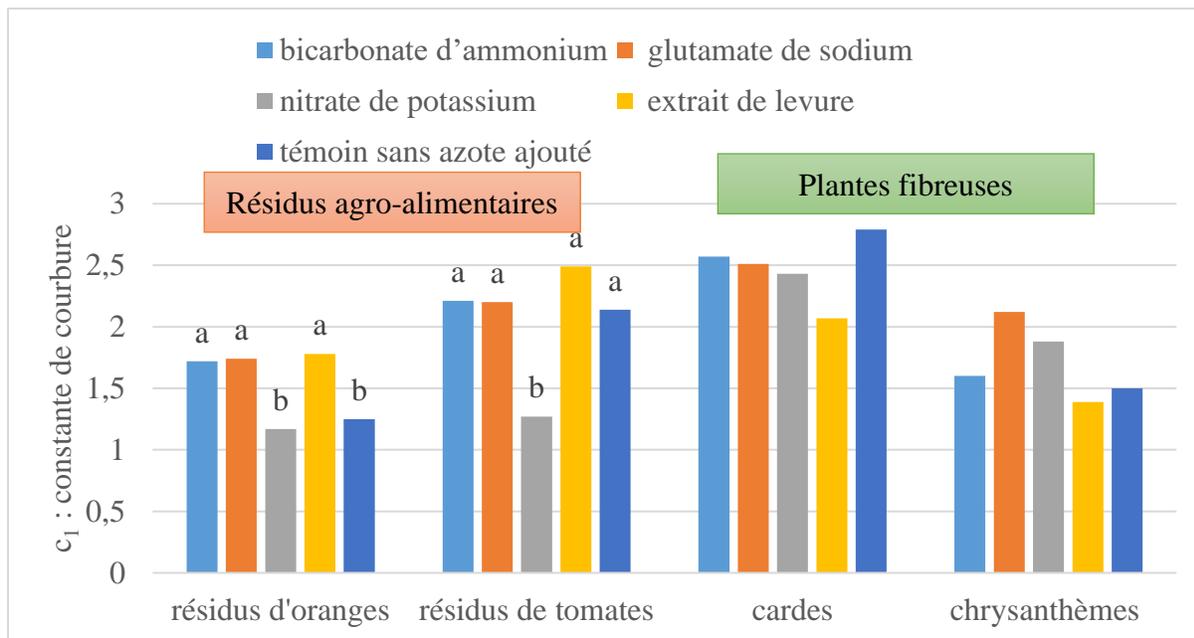


Figure 17 : constante de courbure des substrats (c_1) dans les milieux de fermentation simplifiés selon le modèle logistique

Les cinétiques de production de gaz *in vitro* des résidus d'oranges dans tous les milieux simplifiés sont illustrées dans les figures 18, 19, 20, 21, et 22.

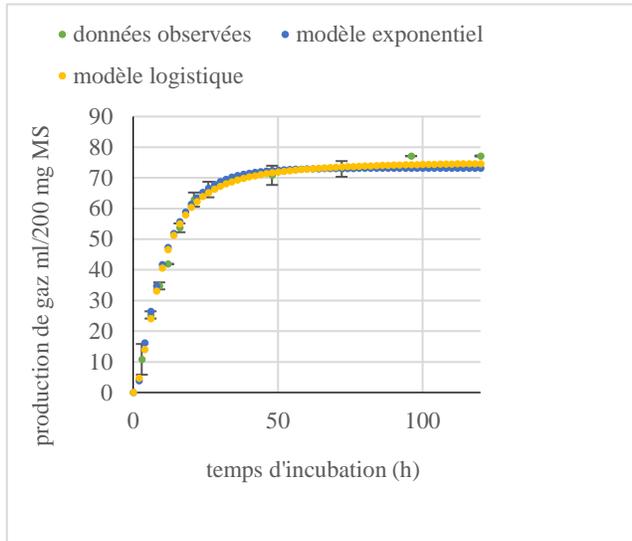


Figure 18 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus d'oranges dans le milieu au bicarbonate d'ammonium, après 120 h d'incubation

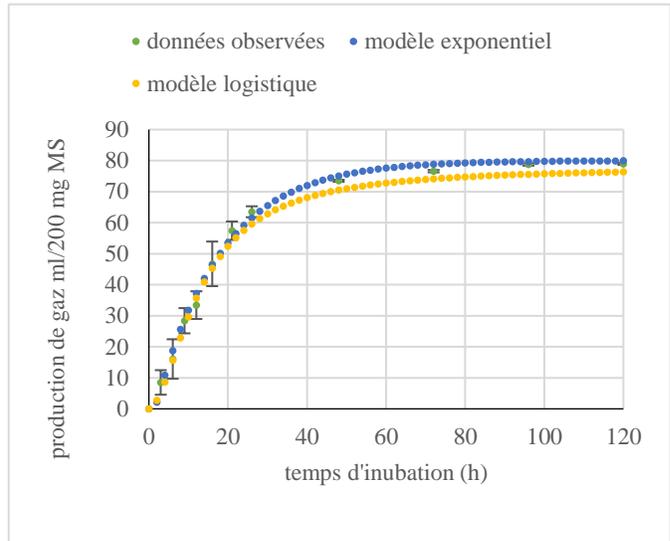


Figure 19 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus d'oranges dans le milieu au glutamate de sodium, après 120 h d'incubation

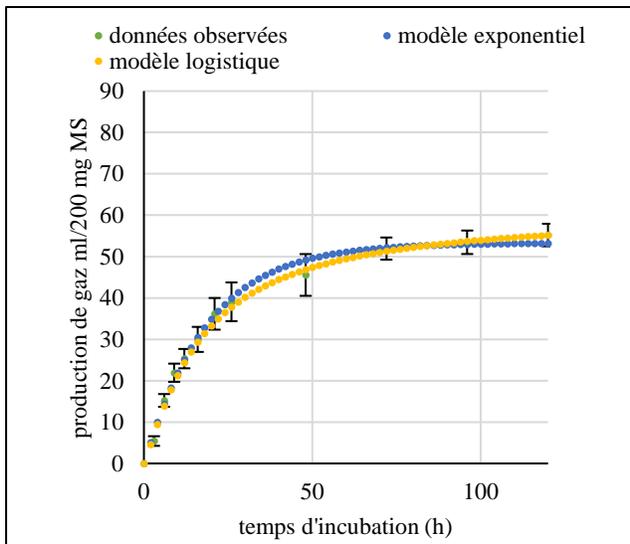


Figure 20 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus d'oranges dans le milieu au nitrate de potassium, après 120 h d'incubation

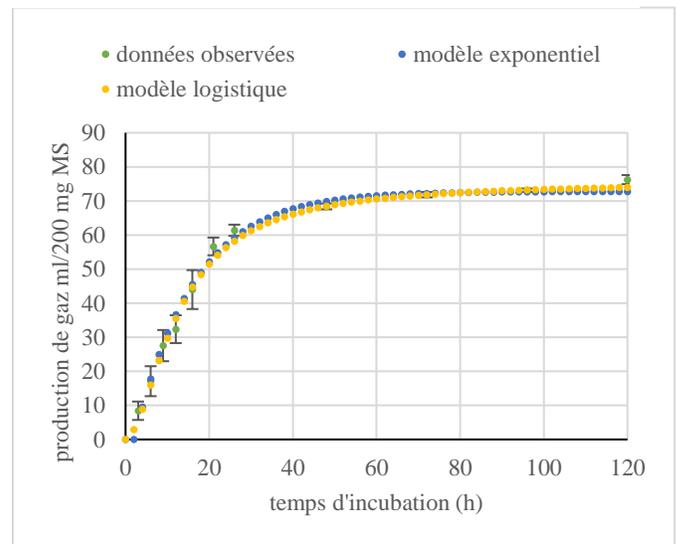


Figure 21 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus d'oranges dans le milieu à l'extrait de levure, après 120 h d'incubation

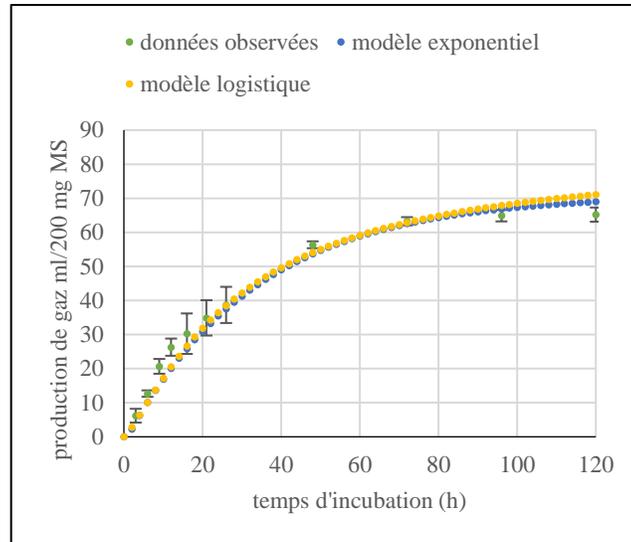


Figure 22 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus d'oranges dans le milieu sans azote, après 120 h d'incubation

Lors de cette étude et dans la figure 23, les résidus d'oranges se sont mieux dégradés dans le milieu au glutamate de sodium, milieu au bicarbonate d'ammonium et dans le milieu à l'extrait de levure. A partir de 6 h, la vitesse de dégradation a diminué dans les milieux au nitrate de potassium et le milieu témoin sans azote par rapport aux trois cités précédemment. Le milieu témoin sans azote ajouté a subi une autre accélération à partir de 28 h et sa courbe a suivi une allure plus proche de celle des milieux à l'extrait de levure, milieu au bicarbonate d'ammonium et au glutamate de sodium.

Les cinétiques de production de gaz des résidus de tomates sont présentées dans les figures 24, 25, 26, 27 et 28.

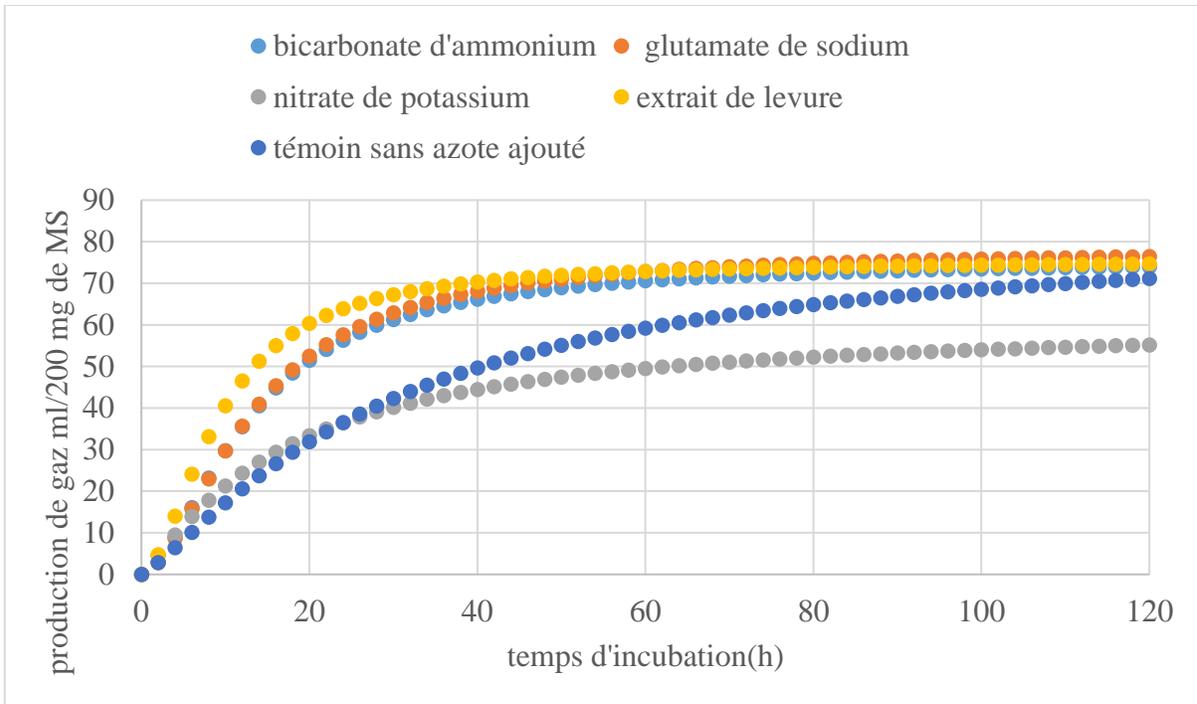


Figure 23 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec le modèle logistique) des résidus d'oranges dans les milieux simplifiés après 120 h d'incubation.

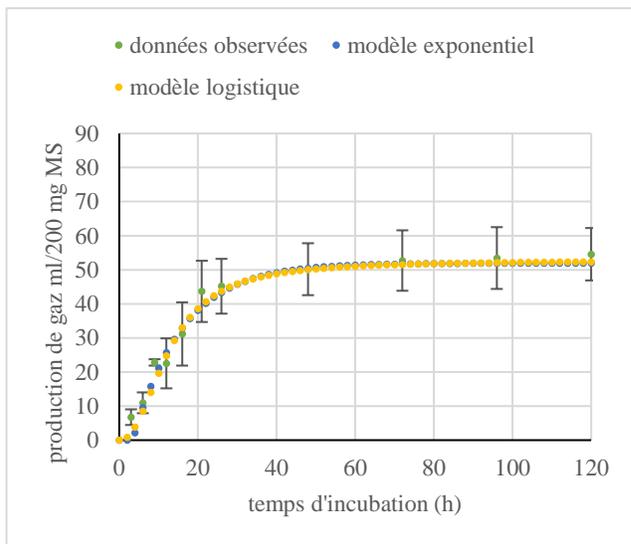


Figure 24 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus de tomates dans le milieu au bicarbonate d'ammonium, après 120 h d'incubation

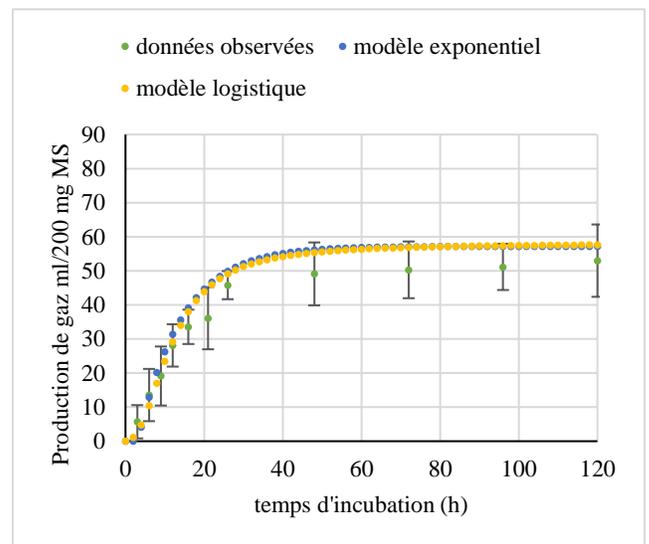


Figure 25 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus de tomates dans le milieu au glutamate de sodium, après 120 h d'incubation

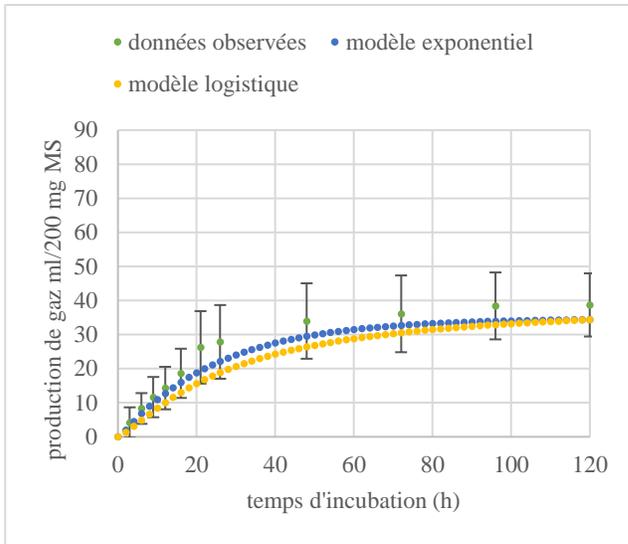


Figure 26 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus de tomates dans le milieu au nitrate de potassium, après 120 h d'incubation

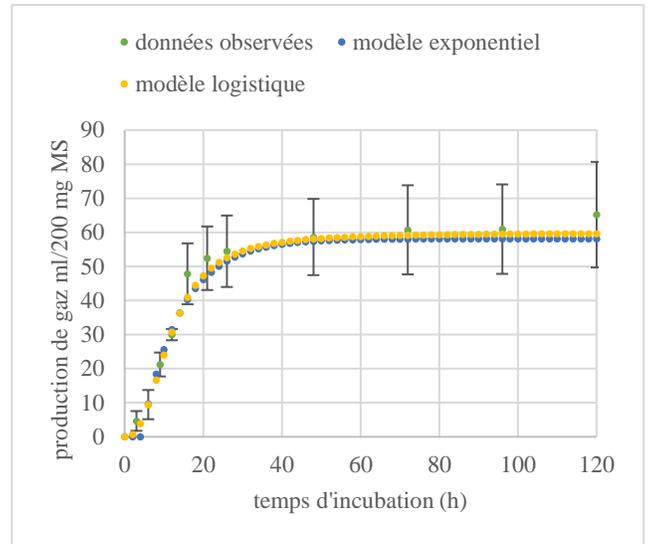


Figure 27 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus de tomates dans le milieu à l'extrait de levure, après 120 h d'incubation

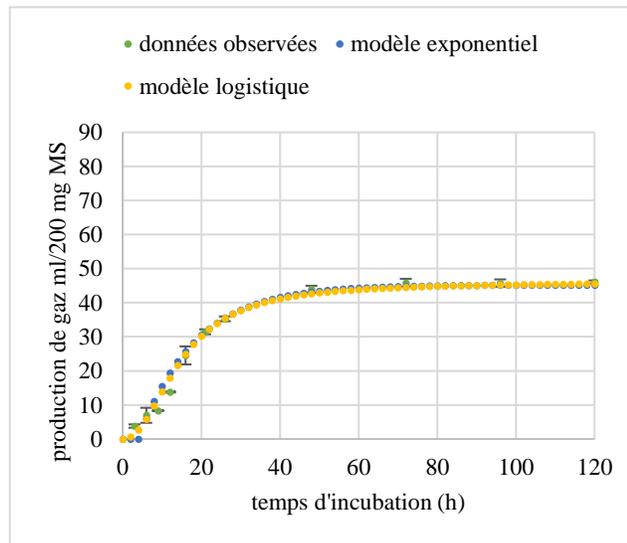


Figure 28 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des résidus de tomates dans le milieu sans azote, après 120 h d'incubation

Une analyse statistique des données de gaz observées de la fermentation *in vitro* des résidus de tomates par le modèle logistique est présentée dans la figure 29.

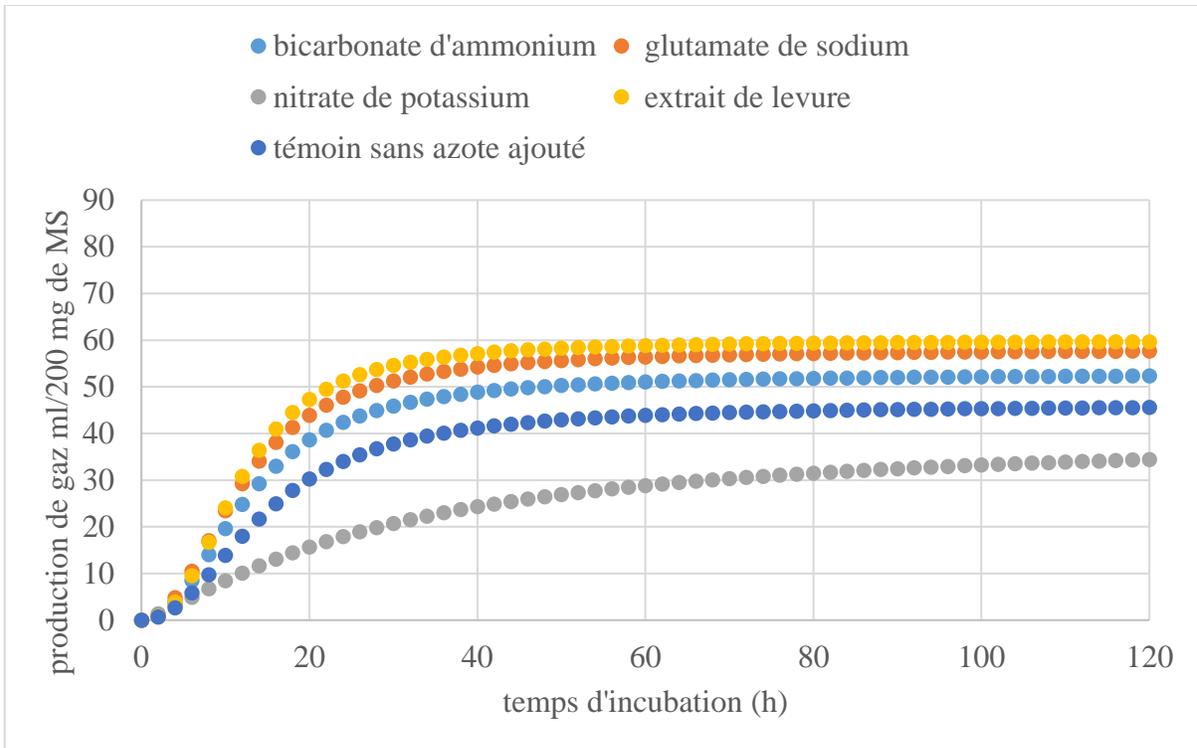


Figure 29 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec le modèle logistique) des résidus de tomates dans les milieux simplifiés après 120 h d'incubation.

L'analyse statistique des résultats observés lors de la production de gaz des cartes est présentée dans les figures 30, 31, 32, 33 et 34.

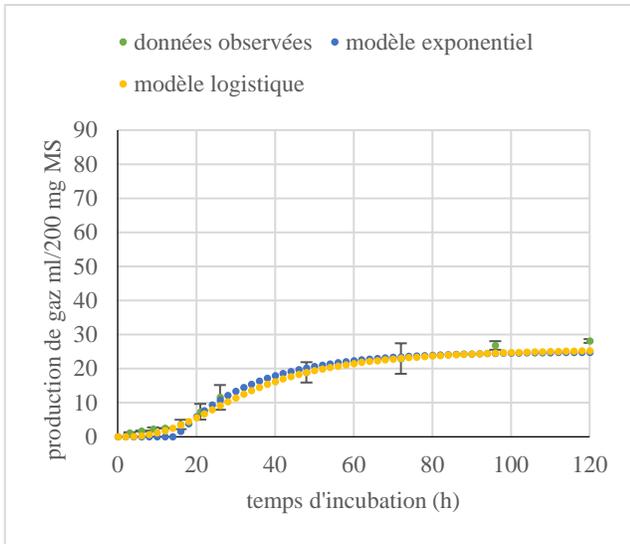


Figure 30 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des cartes dans le milieu au bicarbonate d'ammonium, après 120 h d'incubation

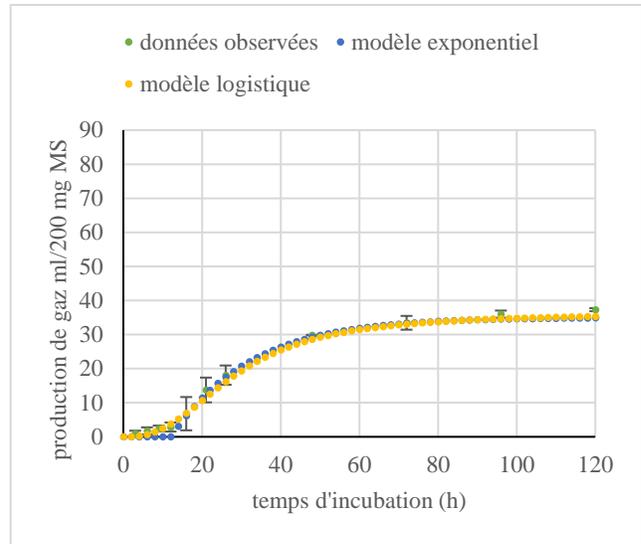


Figure 31 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des cartes dans le milieu au glutamate de sodium, après 120 h d'incubation

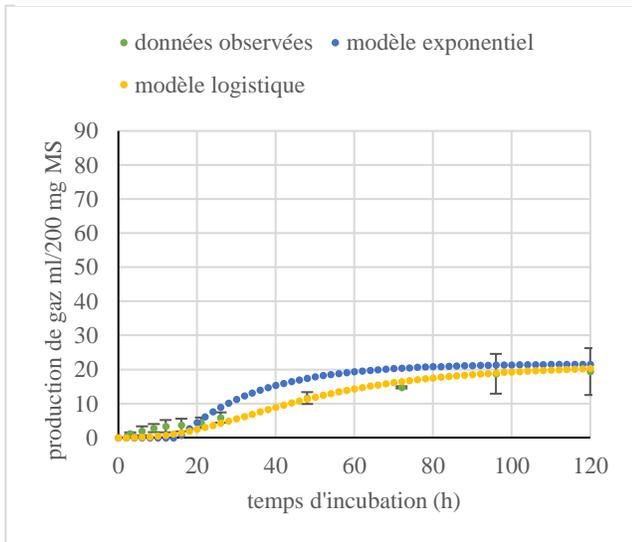


Figure 32 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des cartes dans le milieu au nitrate de potassium, après 120 h d'incubation

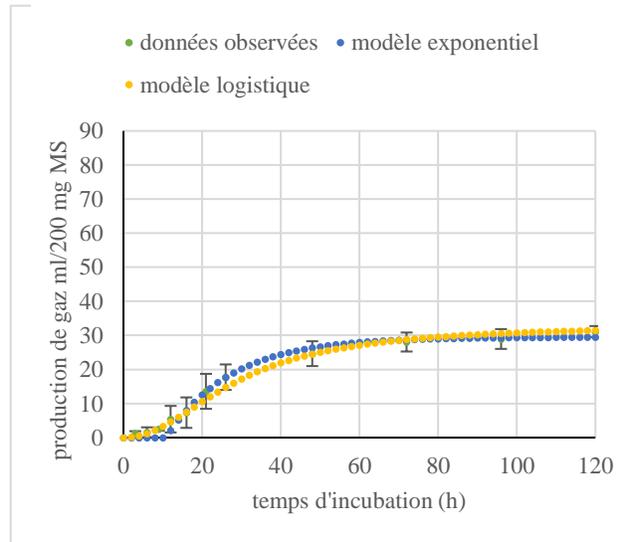


Figure 23 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des cartes dans le milieu à l'extrait de levure, après 120 h d'incubation

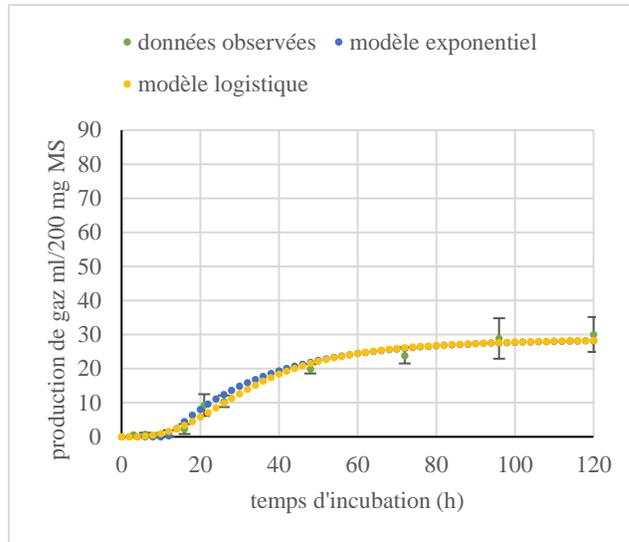


Figure 34 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des cardes dans le milieu sans azote, après 120 h d'incubation

Les résultats obtenus par l'analyse du modèle logistique de l'incubation des cardes dans les milieux simplifiés peuvent être comparés dans la figure 35. Les courbes de tous les milieux simplifiés ont une allure sigmoïdale, ce qui est caractéristique du modèle logistique (Schofield et *al.*, 1994). Arhab et *al.* (2006) ont reporté une production de gaz à 96 h inférieure par rapport à celle enregistré chez les milieux simplifiés de notre expérience. Nous constatons donc qu'il y a eu un effet positif sur la dégradabilité des cardes en ajoutant une source d'azote organique comme le glutamate de sodium et qui ne soit pas chère (Annexe 4 : prix du kg 609 euros).

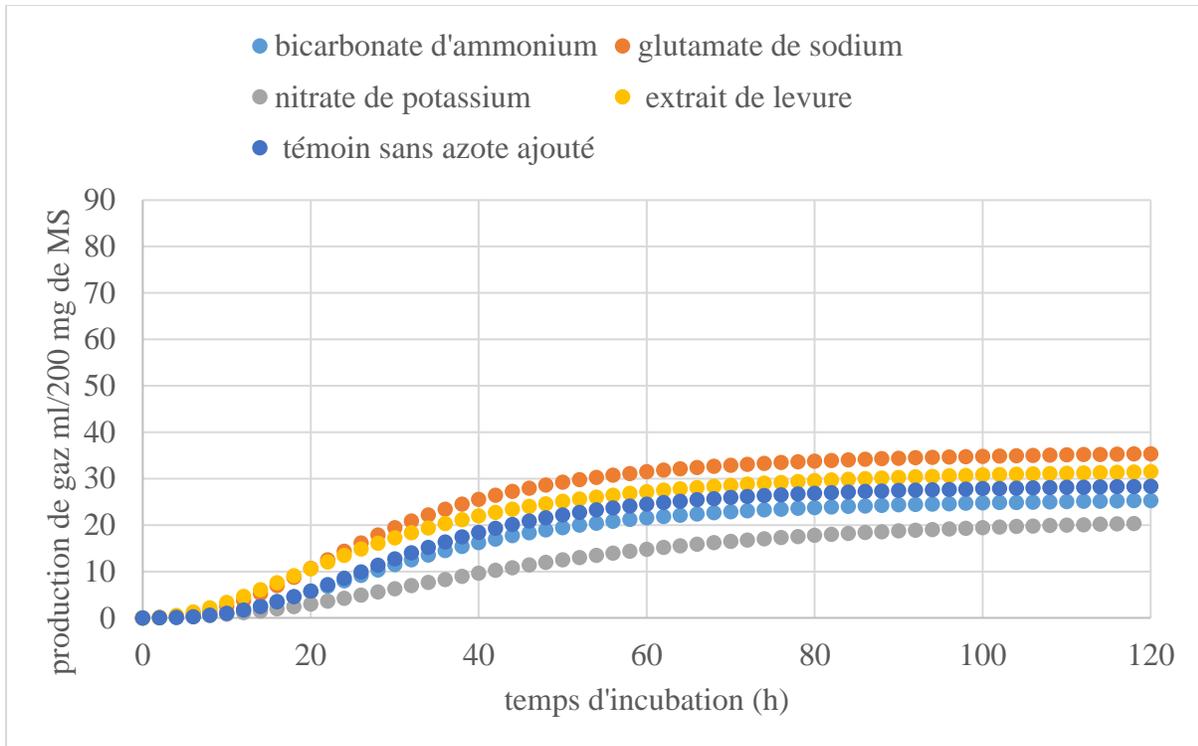


Figure 35 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec le modèle logistique) des cartes dans les milieux simplifiés après 120 h d'incubation.

Les figures suivantes 36, 37, 38, 39 et 40 représentent les cinétiques de production de gaz des chrysanthèmes dans les milieux simplifiés.

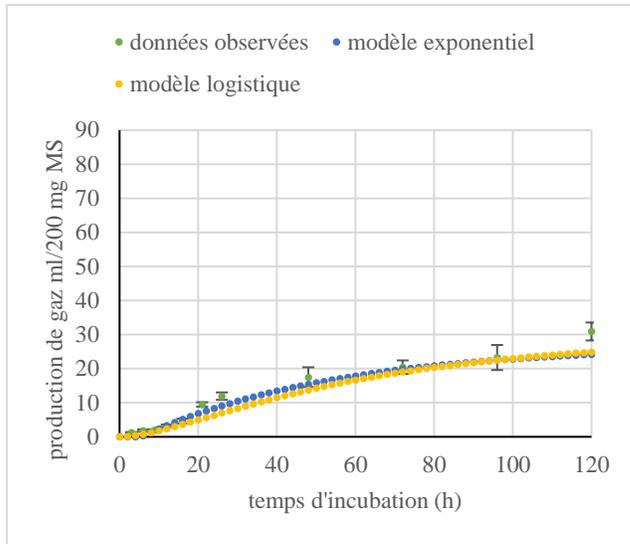


Figure 36 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des chrysanthèmes dans le milieu au bicarbonate d’ammonium, après 120 h

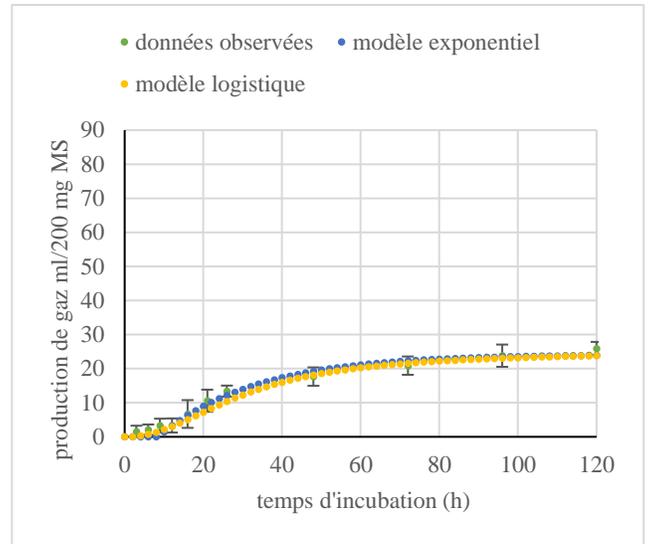


Figure 37 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des chrysanthèmes dans le milieu au glutamate de sodium, après 120 h d’incubation

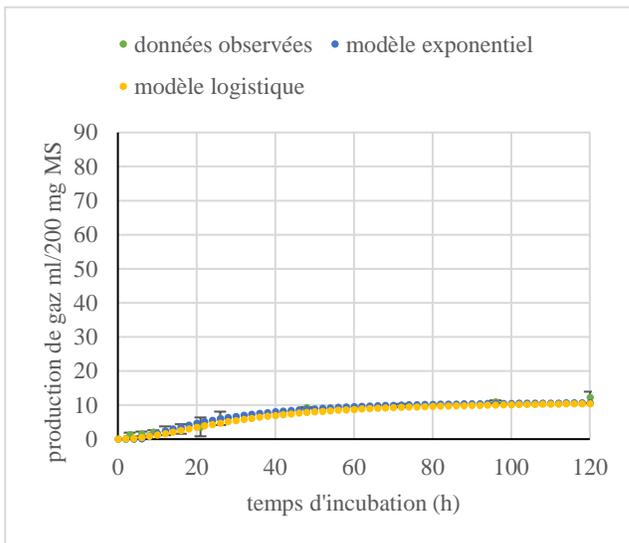


Figure 38 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des chrysanthèmes dans le milieu au nitrate de potassium, après 120 h d’incubation

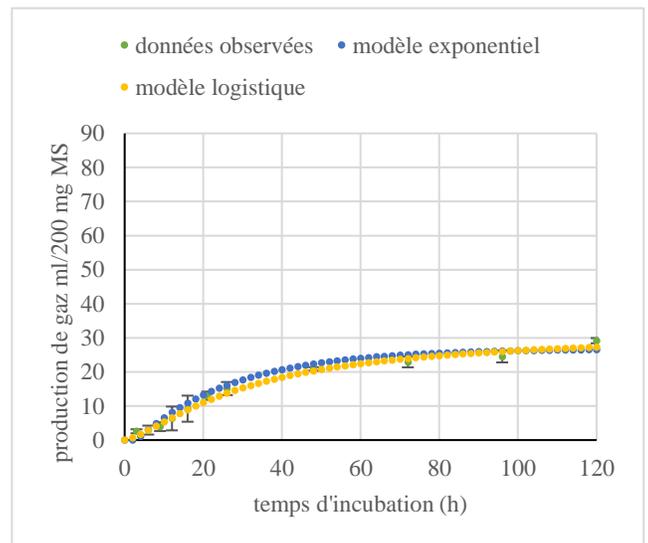


Figure 39 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des chrysanthèmes dans le milieu à l’extrait de levure, après 120 h d’incubation

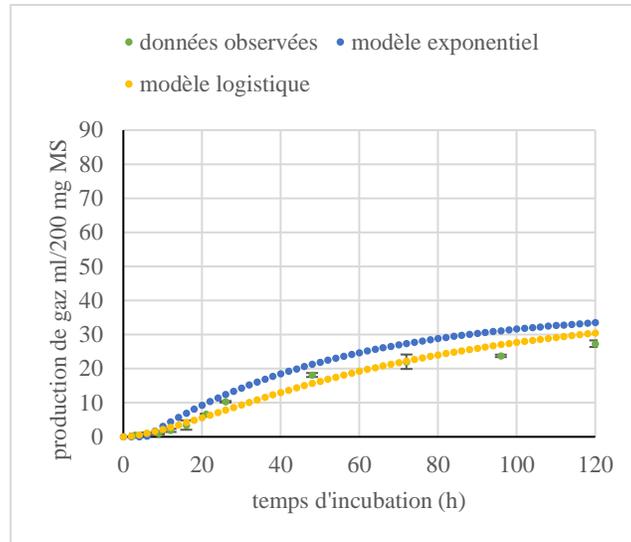


Figure 40 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec les modèles exponentiel et logistique) des chrysanthèmes dans le milieu sans azote, après 120 h d'incubation

Nous pouvons observer à partir des données de la figure 41 que les courbes des milieux au bicarbonate d'ammonium et à l'extrait de levure sont hyperboliques et celles des milieux au glutamate de sodium au nitrate de potassium et le milieu témoin sans azote ajouté sont sigmoïdales.

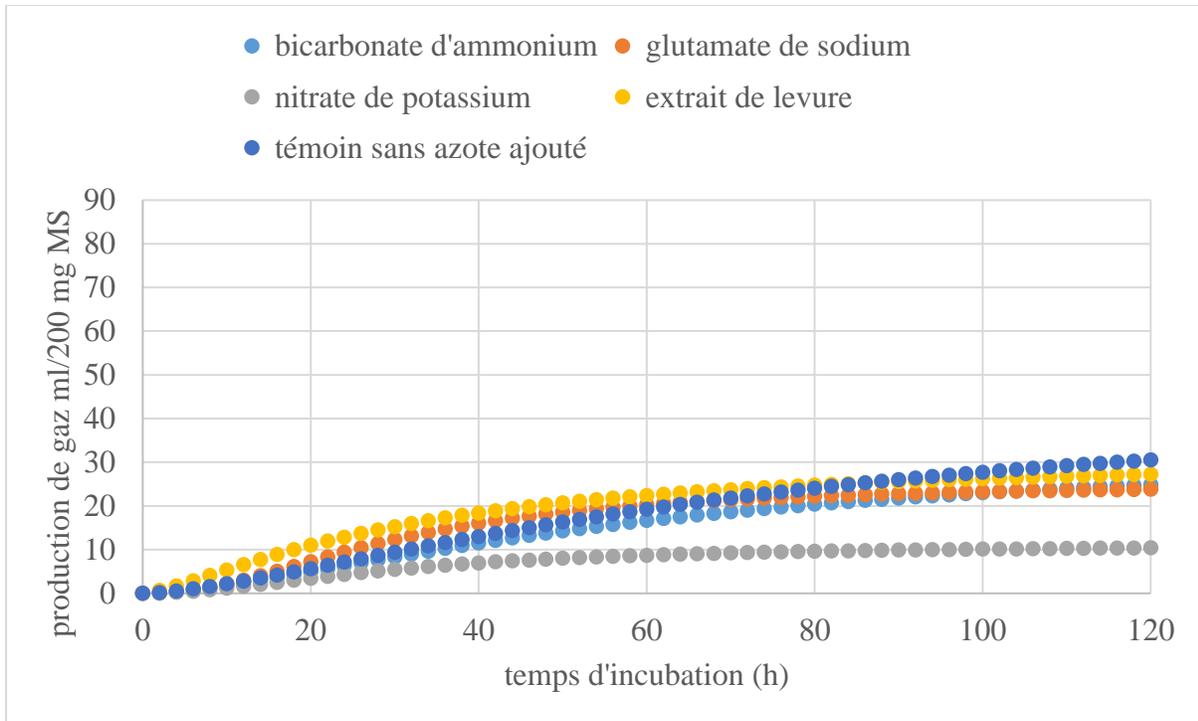


Figure 41 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec le modèle logistique) des chrysanthèmes dans les milieux simplifiés après 120 h d'incubation.

2.2 Analyse par le modèle exponentiel

2.2.1 Production potentielle de gaz pour un temps d'incubation infini (ml/200 mg MS) : **b**

La production potentielle de gaz est comme attendu plus élevée pour les résidus agro-alimentaires par rapport aux plantes fibreuses selon l'analyse par le modèle exponentiel de Dhanoa (1988) (figure 42). A l'intérieur du groupe de résidus agro-alimentaires c'est les résidus d'oranges qui ont une meilleure fermentescibilité. Tagliapietra et *al.* (2014) a utilisé le milieu de Menke où la production maximale de gaz des résidus d'oranges est de 325 ml/g MS donc proche des valeurs notées pour le milieu au bicarbonate d'ammonium (364 ml/g MS) et pour le milieu témoin sans azote (355 ml/g MS). Pour les résidus de tomates, la valeur de **b** (235 ml/g MS) est plus proche des milieux d'azote inorganique (milieu au bicarbonate d'ammonium : 259,7 ml/g MS) que les milieux d'azote organique (milieu à l'extrait de levure 290,5 ml/g MS).

La valeur de **b** est proche des constatations de Nagadi et *al.* (2000) qui a utilisé l'herbe du Kikuyu sèche qui est similaire en composition chimique aux cardes incubés dans les milieux d'azote organique. Cependant, les conclusions de la présente étude sont inférieures aux recherches de Moujahed et *al.* (2013) où le volume de gaz maximal est deux fois inférieur dans le milieu au

bicarbonate d'ammonium par rapport à la salive de Menke utilisée. Une explication possible pour cela pourrait être que la composition chimique en protéines brutes et en fibres est différente de la même espèce de chrysanthèmes (Algérienne et Tunisienne); en effet les PB de l'espèce Tunisienne sont de 14 % MS ; NDF : 33,5 % MS ; ADF : 25,7 % MS et ADL : 6,2 % MS.

La classification des milieux sur la base de la production de gaz des résidus d'oranges est la suivante :

Le milieu au glutamate de sodium (80,03 ml) > milieu à l'extrait de levure (73,13 ml) > milieu au bicarbonate d'ammonium (72,80 ml) > milieu témoin sans azote (71 ml) > milieu au nitrate de potassium (53,30 ml).

La classification des milieux sur la base des résultats de production de gaz des résidus de tomates après 120 h d'incubation est la suivante :

Milieu à l'extrait de levure (58,14 ml) > milieu au glutamate de sodium (57,21 ml) > milieu au bicarbonate d'ammonium (51,94 ml) > milieu témoin sans azote (45,23 ml) > milieu au nitrate de potassium (34,72 ml).

La classification des milieux selon la production de gaz en présence des cardes est la suivante :

Le milieu au glutamate de sodium (35,08 ml) > milieu à l'extrait de levure (29,52 ml) > milieu au bicarbonate d'ammonium (24,94 ml) > milieu témoin sans azote ajouté (28,61 ml) > milieu au nitrate de potassium (21,71 ml).

La classification des milieux sur la base des résultats de production de gaz des chrysanthèmes après 120 h d'incubation est la suivante :

Le milieu témoin sans azote ajouté (37,31 ml) > milieu au bicarbonate d'ammonium (26,93 ml) > milieu à l'extrait de levure (26,76 ml) > milieu au glutamate de sodium (24,22 ml) > milieu au nitrate de potassium (10,77 ml).

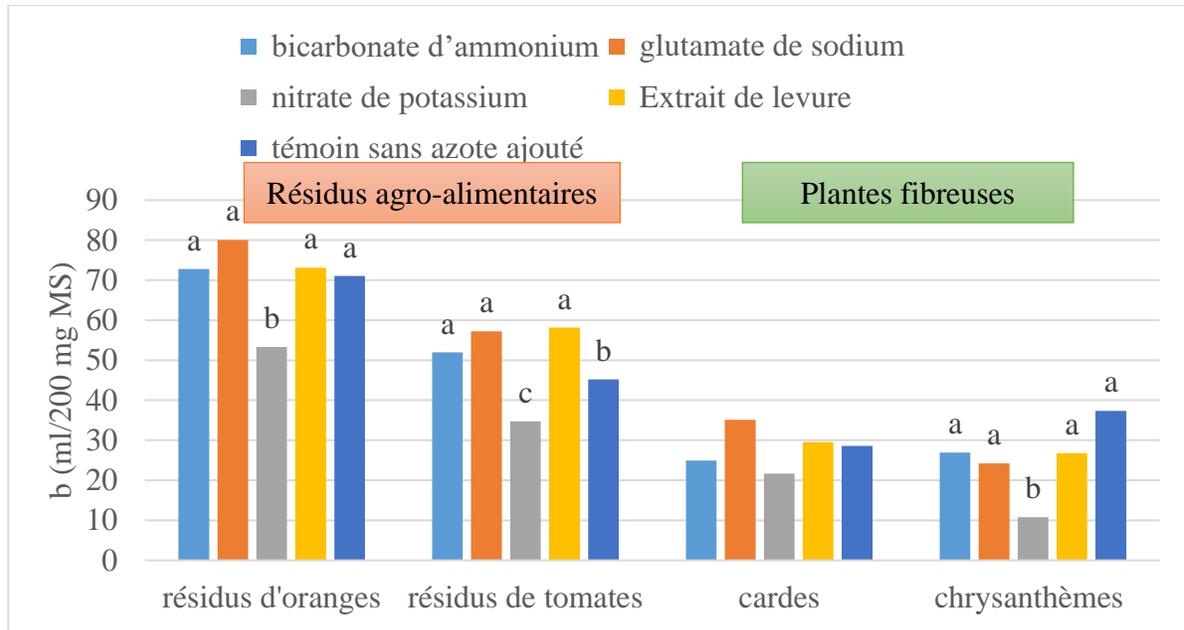


Figure 42 : production potentielle de gaz pour un temps d'incubation infini (**b**) (ml/200 mg de MS) des substrats dans les milieux de fermentation simplifiés selon le modèle exponentiel

2.2.1 Temps de latence ou d'adaptation de la flore ruminale aux substrats : lag

Le microbiote ruminal comme tout autre microbiote a besoin de préparer son matériel enzymatique afin de dégrader le substrat qui se trouve dans son milieu. D'un côté le temps de latence ou d'adaptation du microbiote au substrat varie selon la composition chimique de ce dernier (la nature et la quantité des polysides). D'un autre côté les bactéries du rumen travaillent en synergie, un genre bactérien peut dégrader la paroi végétale pour libérer le contenu de la cellule qui sera par la suite métabolisé par un autre genre bactérien. Selon les résultats attendus dans la figure 43, la fermentation met plus de temps chez les plantes fibreuses que chez les résidus agro-alimentaires. Elle peut aller jusqu'à 16 h chez les cardes et peut descendre jusqu'à moins de 2 h chez les résidus d'oranges ceci est probablement dû à la forte teneur en fibres des cardes (NDF : 68,8 % MS) et des chrysanthèmes (78,98 % MS) par rapport aux résidus d'oranges (25,07 % MS) et aux résidus de tomates (33,09 % MS). Moujahed *et al.* (2013) ont utilisé la salive artificielle de Menke et le liquide ruminal filtré selon la proportion 1 :1 et ont obtenu un lag de 0,18 h qui est plus court que le **lag** enregistré lors de notre étude et ceci avec toutes les sources d'azote (de 2,96 h à 8,43 h). Concernant les résultats du paramètre **lag** à l'intérieur de chaque substrat, les valeurs sont statistiquement comparables pour les plantes fibreuses.

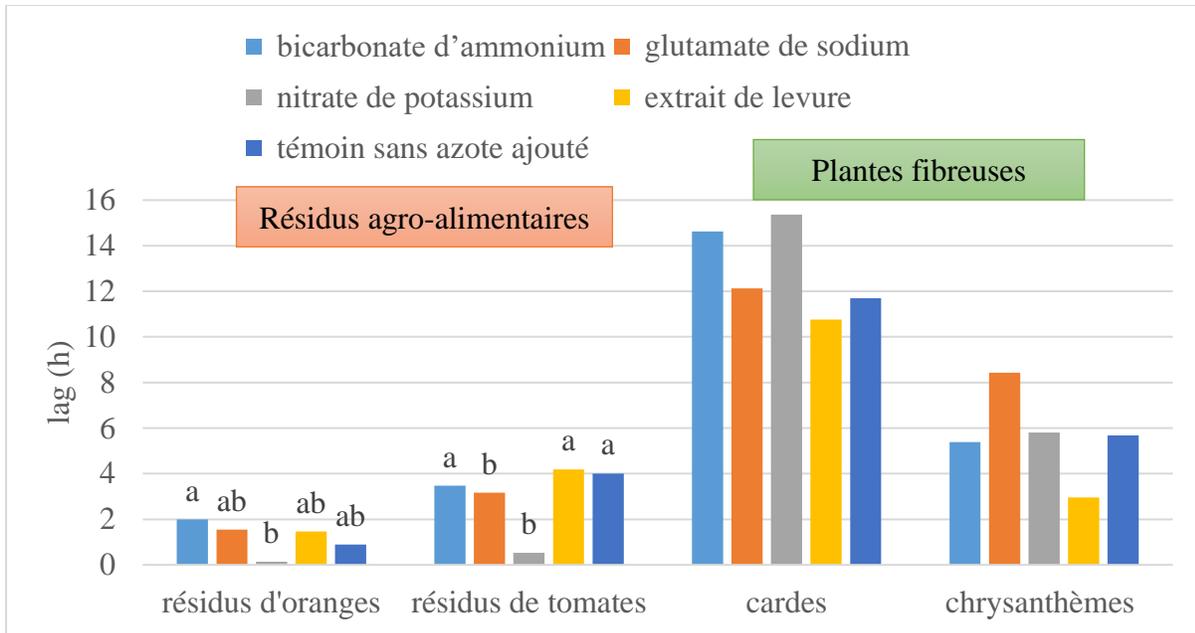


Figure 43 : temps de latence ou d'adaptation de la flore ruminale aux substrats (**lag**) dans les milieux de fermentation simplifiés selon le modèle exponentiel

La figure 44 représente les cinétiques de dégradation des résidus d'oranges dans les milieux simplifiés selon le modèle exponentiel. Nous observons que les milieux à l'extrait de levure et le milieu témoin sans azote ajouté sont les plus favorables à la dégradation jusqu'à 40 h où le milieu au glutamate de sodium a pris le dessus avec plus de 70 ml/200 mg MS. Les résidus d'oranges sont riches en pectines qui sont rapidement dégradables (Strobel and Russell, 1986) d'où la production de gaz élevée. Leur affinité avec les milieux de source d'azote organique signifie que les bactéries présentes disposent des enzymes nécessaires à l'utilisation du glutamate de sodium et des protéines de l'extrait de levure, de même que la source d'énergie disponible n'est pas limitante. Il est bien connu que cette même flore a la capacité de dégrader l'azote non protéique, ici c'est le bicarbonate d'ammonium.

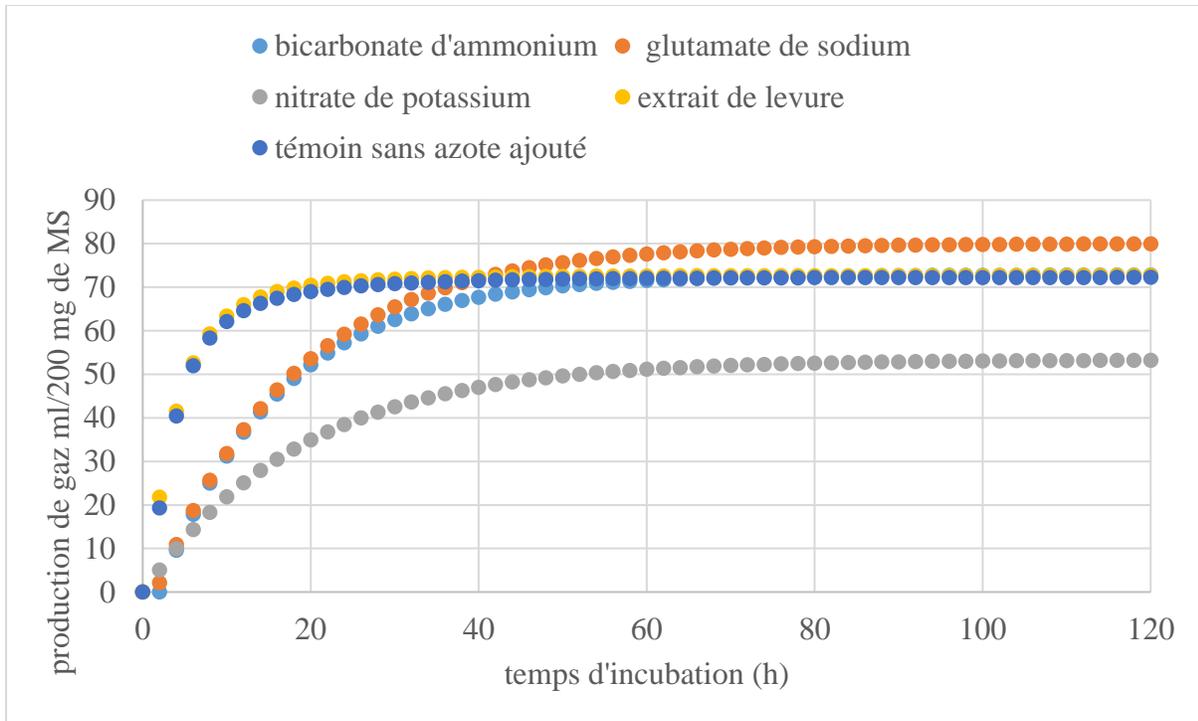


Figure 44 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec le modèle exponentiel) des résidus d'oranges dans les milieux simplifiés après 120 h d'incubation.

La figure 45 du modèle exponentiel, montre que les courbes du milieu au glutamate de sodium et du milieu à l'extrait de levure sont superposées pratiquement tout au long de la fermentation pour les résidus de tomates.

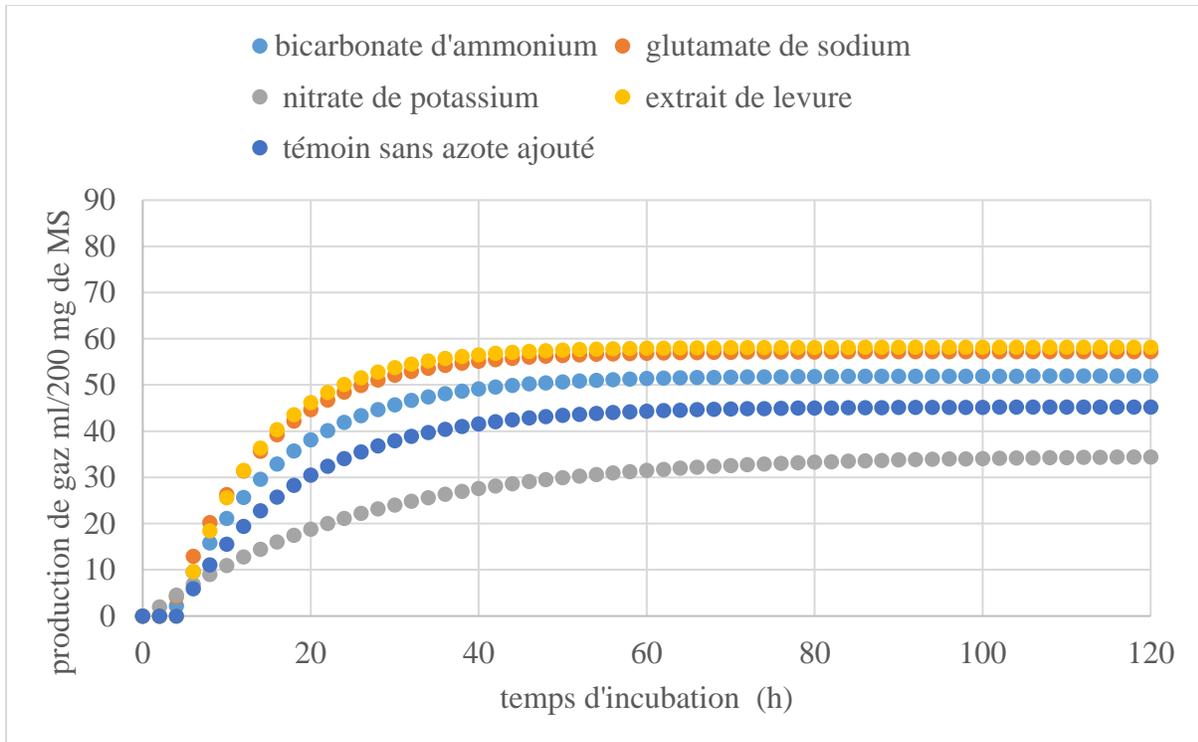


Figure 45 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec le modèle exponentiel) des résidus de tomates dans les milieux simplifiés après 120 h d'incubation.

Les résultats de la figure 46 montrent que dans tous les milieux et pour les cartes, il y a eu un temps de latence entre 11 h et 15 h. Les milieux contenant l'azote organique sont supérieurs aux milieux d'azote inorganique ce qui est logique vu la composition complexe de l'extrait de levure (différents types d'azote : protéique, acide aminé ...) qui demande plus de temps d'adaptation des bactéries pour le dégrader.

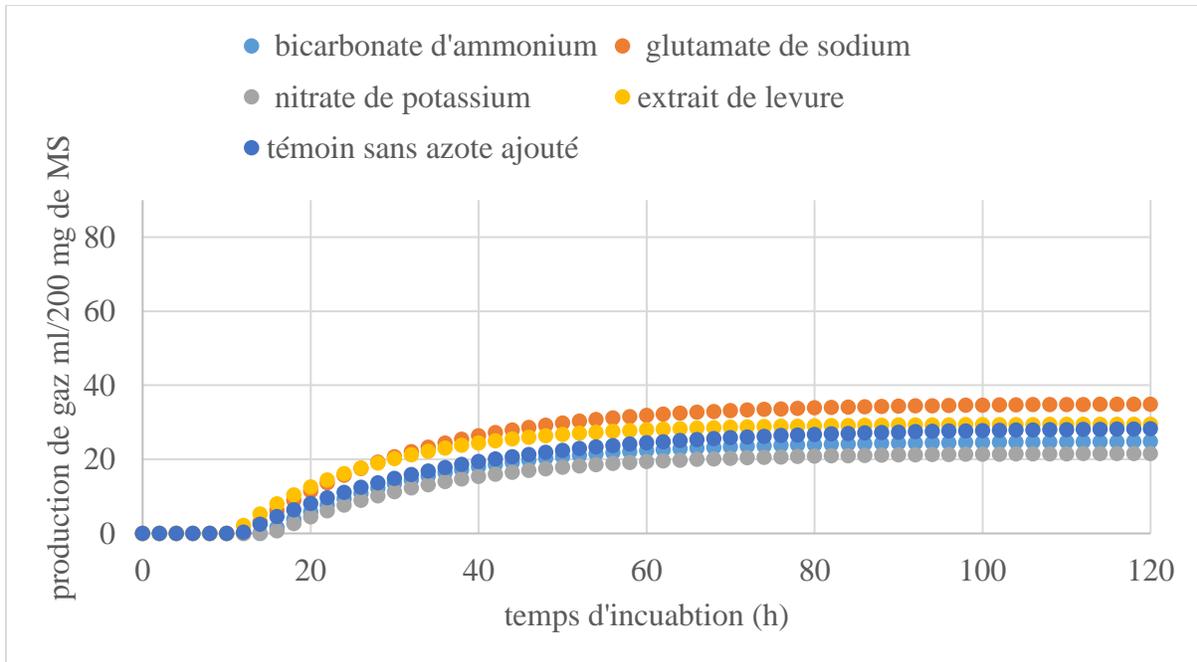


Figure 46 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec le modèle exponentiel) des cardes dans les milieux simplifiés après 120 h d'incubation.

La figure 47 montre les résultats de cinétiques de production de gaz des chrysanthèmes selon le modèle exponentiel qui n'est pas très différente du modèle logistique.

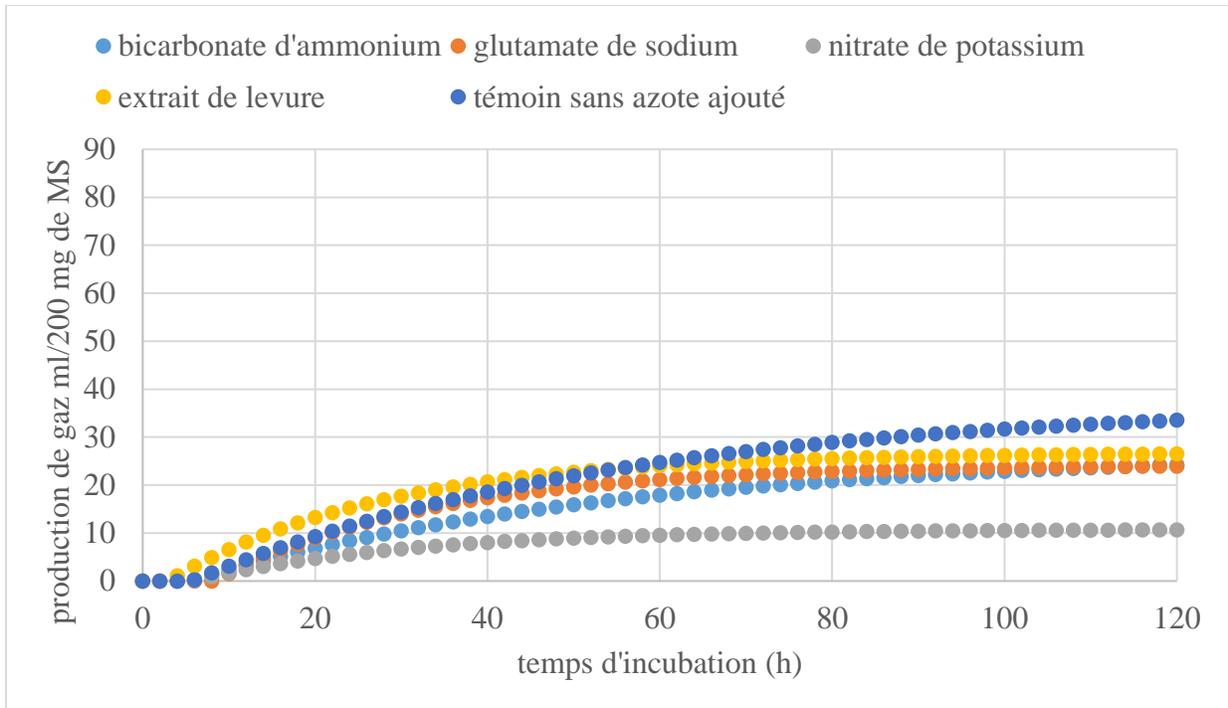


Figure 47 : cinétiques de production de gaz *in vitro* (ajustées avec le modèle exponentiel) des chrysanthèmes dans les milieux simplifiés après 120 h d'incubation.

Le tableau 3 montre que l'erreur (*st*) de la production de gaz des résidus d'oranges entre les milieux au bicarbonate d'ammonium, au glutamate de sodium, au nitrate de potassium et à l'extrait de levure analysé par le modèle logistique est statistiquement comparable et inférieure par rapport au milieu témoin sans azote ajouté. Par ailleurs, le modèle exponentiel a enregistré des valeurs statistiquement comparables pour tous les milieux.

Pour les résidus de tomates le modèle logistique enregistre des erreurs comparables pour tous les milieux ; en effet la plus grande erreur est de 1,9 dans le milieu à l'extrait de levure et la plus petite, 0,73 est observée dans le milieu témoin sans azote ajouté. Contrairement au modèle exponentiel qui enregistre une différence significative entre les deux milieux précédents.

Nous observons que l'erreur *st* est statistiquement comparable entre les milieux simplifiés pour les cardes et chrysanthèmes.

Tableau 3 : erreur (**st**) des deux modèles logistique et exponentiel pour les résidus d'oranges, résidus de tomates, cardes et chrysanthèmes dans les milieux simplifiés après 120 h de fermentation *in vitro*

Milieu simplifié	Résidus d'oranges (modèle logistique)	Résidus d'oranges (modèle exponentiel)	Résidus de tomates (modèle logistique)	Résidus de tomates (modèle exponentiel)	Cardes (modèle logistique)	Cardes (modèle exponentiel)	Chrysanthèmes (modèle logistique)	Chrysanthèmes (modèle exponentiel)
Bicarbonate d'ammonium	1,61 ^b	1,73	1,42	1,91 ^{ab}	1,1	0,99	1,16	1,17
Glutamate de sodium	1,53 ^b	3,1	1,45	2 ^{ab}	1,26	1,01	0,93	0,93
Nitrate de potassium	1,79 ^b	2,27	1,57	1,61 ^{ab}	1,16	0,79	0,71	0,7
Extrait de levure	1,56 ^b	1,32	1,9	2,11 ^a	1,45	0,96	0,93	0,94
Témoin sans azote ajouté	2,69 ^a	2,56	0,73	1,01 ^b	0,9	0,92	1,06	1,01

(^{a,b}) Les moyennes dans une colonne avec un exposant différent sont significativement différentes ($p < 0,05$).

3. Analyse des paramètres cinétiques de production de gaz par milieu

3.1. Analyse par le modèle logistique

3.1.1 Production potentielle de gaz pour un temps d'incubation infini (ml/200 mg MS) : b_1

La production de gaz maximale a été la plus élevée chez les sources d'azote organique (l'extrait de levure et le glutamate de sodium) que chez les sources d'azote inorganique (bicarbonate d'ammonium et nitrate de potassium) selon la figure 48. La valeur de b_1 est significativement ($p < 0,05$) faible chez le milieu au nitrate de potassium par rapport aux autres milieux et au témoin sans azote ajouté. En effet cette source d'azote (sels de nitrates) est connue en tant qu'inhibiteur de la méthanogenèse dans plusieurs systèmes anaérobies tel que le rumen (Allison and Reddy, 1984) donc inhibiteur de la production de gaz.

La classification des milieu simplifiés selon la production maximale de gaz est la suivante : milieu témoin sans azote ajouté 50,85 ml/200 mg MS > milieu à l'extrait de levure 49,96 ml/200 mg MS > milieu au glutamate de sodium 49,37 ml/200 mg MS > milieu au bicarbonate d'ammonium 46,82 ml/200 mg MS > milieu au nitrate de potassium 33,30 ml/200 mg MS.

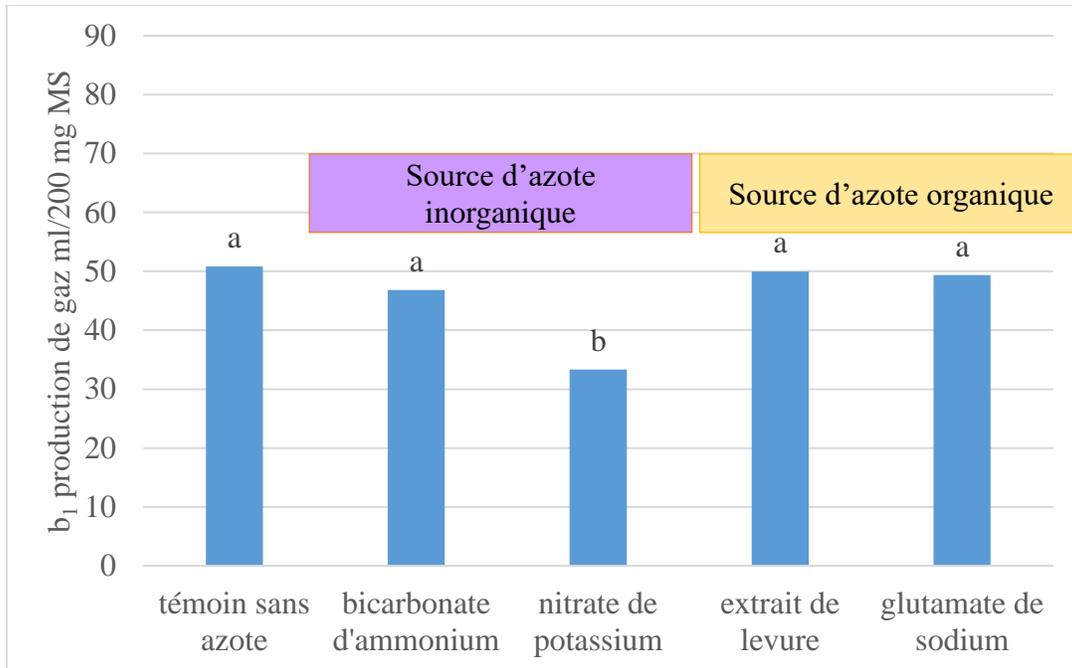


Figure 48 : production potentielle de gaz pour un temps d'incubation infini (b_1) (ml/200 mg de MS) des milieux simplifiés de fermentation selon le modèle logistique

3.1.2 Temps au bout duquel la demi production de b_1 est obtenue (h) : $t_{1/2}$

Le temps de demi production est significativement plus long chez le témoin, il a été d'une journée et demi, puis viennent les sources d'azote inorganique dépassant les 24 h (figure 49). Le glutamate de sodium et l'extrait de levure ont pris moins d'une journée pour obtenir la moitié de b_1 . Probablement ceci est dû à la disponibilité des enzymes nécessaires à la dégradation des sources d'azote organique chez la flore bactérienne ruminale (enzymes protéolytiques tel que : cystéine protéases, serine protéase, aspartate protéase et métalloprotéinases).

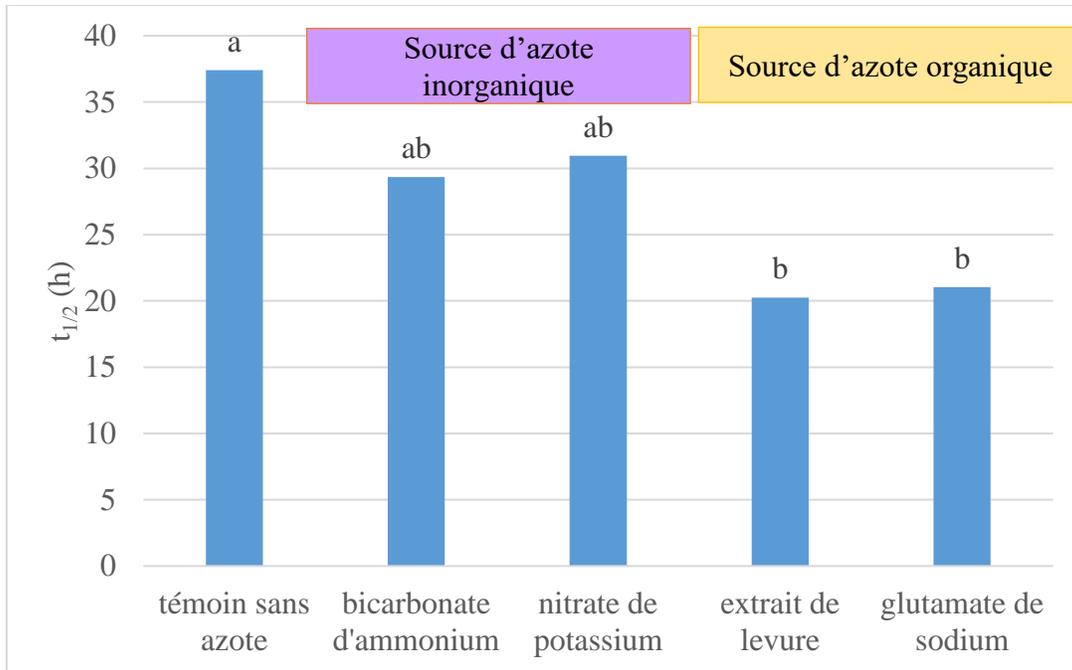


Figure 49 : temps ($t_{1/2}$) au bout duquel la demi-production de b_1 est obtenue dans les milieux simplifiés de fermentation selon le modèle logistique

3.2. Analyse par le modèle exponentiel

3.1.2: Production potentielle de gaz pour un temps d'incubation infini (ml/200 mg MS) : b

Dans la figure 50, la production maximale de gaz a été la plus élevée chez les sources d'azote organique que chez les sources d'azote inorganique donc la même tendance selon l'analyse par le modèle logistique.

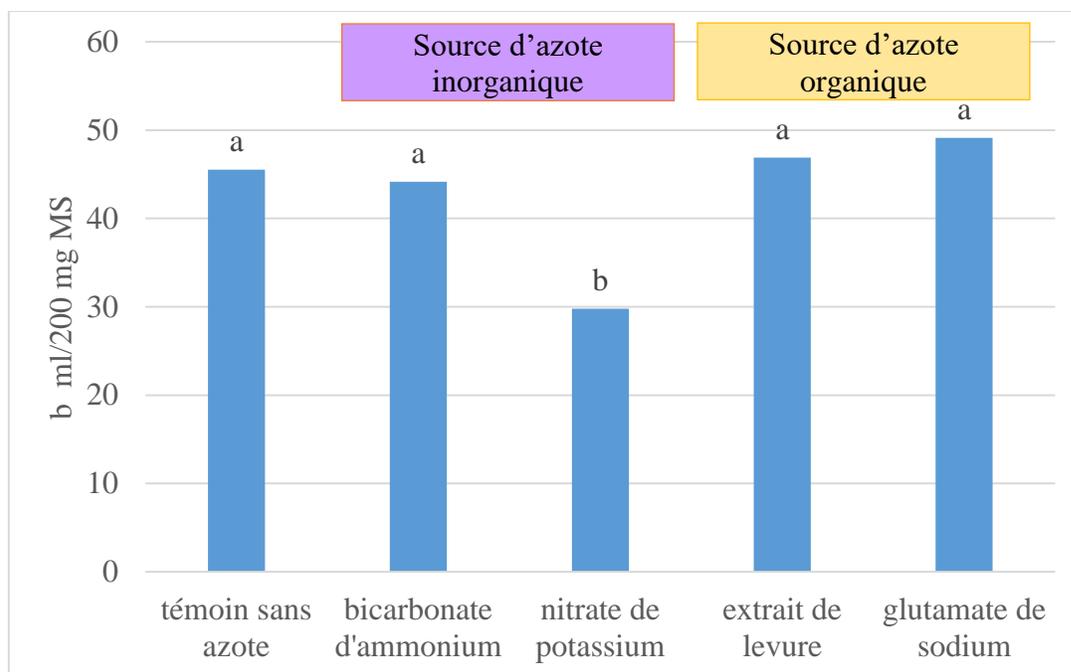


Figure 50 : production potentielle de gaz pour un temps d'incubation infini (**b**) (ml/200 mg de MS) des milieux de fermentation simplifiés selon le modèle exponentiel

3.1.2 Temps de latence ou d'adaptation de la flore ruminale aux substrats : lag

En regroupant les résultats par milieux de fermentation simplifiés, nous avons trouvé que le microbiote ruminal met entre 4,8 h et 6,3 h pour démarrer la fermentation. Les résultats sont significativement comparables ($p < 0,05$) pour toutes les sources d'azote et le témoin sans azote ajouté.

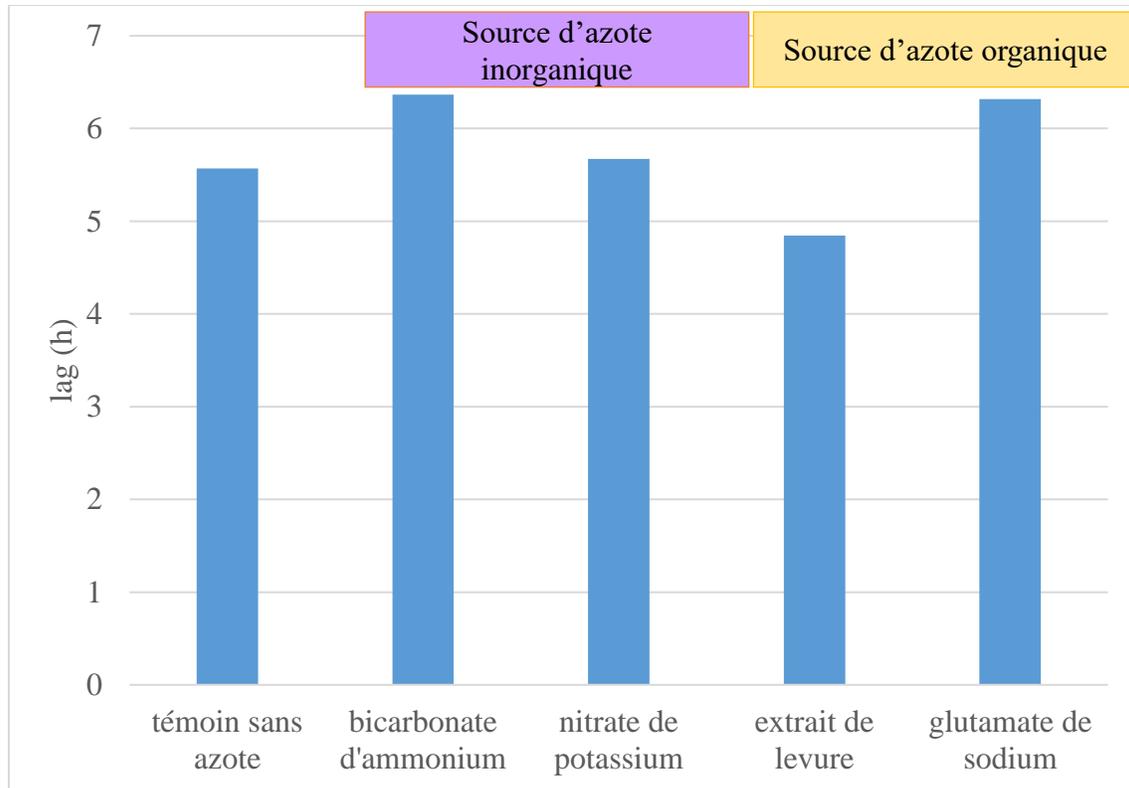


Figure 51: temps de latence ou d'adaptation de la flore ruminale aux substrats (**lag**) dans les milieux de fermentation simplifiés selon le modèle exponentiel

Conclusion :

Le fait d'avoir obtenu des résultats statistiquement comparables et pas très significatifs est probablement due au nombre d'échantillons (animaux donneurs : doit être supérieur à 3) limité.

4. Cinétiques de dégradation des sources d'énergie en présence de différentes sources d'azote (Azzouz, 2017)

4.1 Sources d'azote comme source d'énergie

Les résultats reportés par Azzouz (2017) montrent que les microorganismes du rumen ont produit du gaz en présence des sources d'azote seul (figure 52).

Les milieux contenant une source d'azote organique sont plus favorables à l'inoculum épuisé en tant que source d'énergie principale. L'extrait de levure a produit 9,6 ml/10 mg d'azote suivis du glutamate de sodium avec 6,6 ml/10 mg d'azote. Le bicarbonate d'ammonium a produit très peu

de gaz (2,4 ml/10 mg d'azote) et le dernier milieu qu'est le nitrate de potassium a produit 1,5 ml/10 mg d'azote.

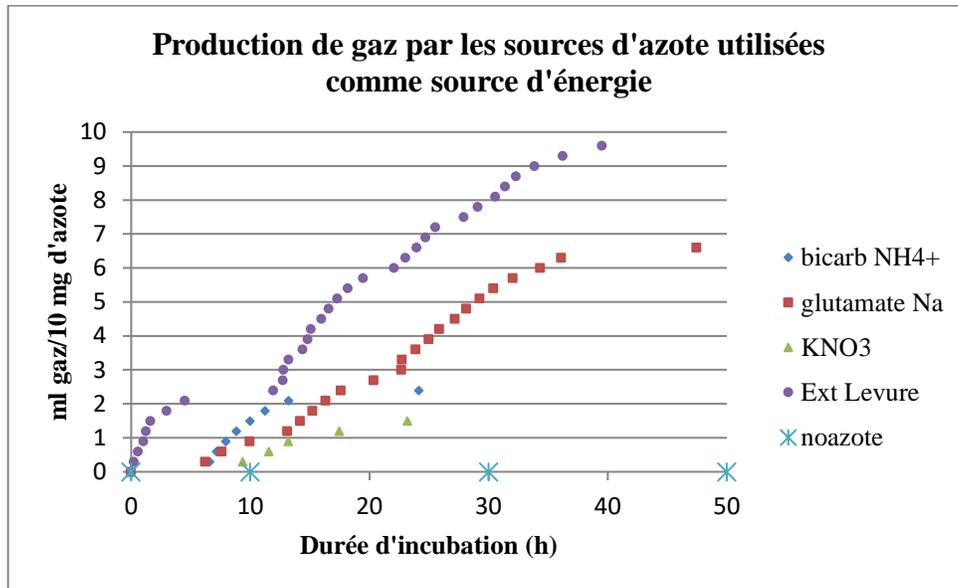


Figure 52 : production de gaz par les sources d'azote (10 mg/100 ml de milieu tamponné réduit inoculé épuisé) (Azzouz, 2017)

4.2 Résidus d'oranges comme source d'énergie

Par la suite, nous pouvons observer dans la figure 53 que la dégradation des résidus d'oranges avec l'inoculum épuisé est plus favorable avec les milieux contenant l'extrait de levure, glutamate de sodium suivis du bicarbonate d'ammonium puis des nitrates de potassium avec une production similaire entre les nitrates de potassium et les résidus d'oranges sans azote (18,8 ml/100 mg). Dans le milieu sans azote, la production de gaz est nulle et ceci grâce à l'étape d'épuisement de l'inoculum bovin durant 24 h à 39 °C en présence du cellobiose comme source d'énergie (Azzouz, 2017).

La classification des milieux sur la base des résultats de production de gaz des résidus d'oranges après 96 h d'incubation est la suivante :

Extrait de levure (42 ml) > glutamate de sodium (33,3 ml) > bicarbonates d'ammonium (27,3 ml) > nitrates de potassium (18,3 ml) > résidus d'oranges sans azote.

Cette classification est un peu différente par rapport aux données observées dans l'expérience 1 où le glutamate de sodium se classe avant l'extrait de levure.

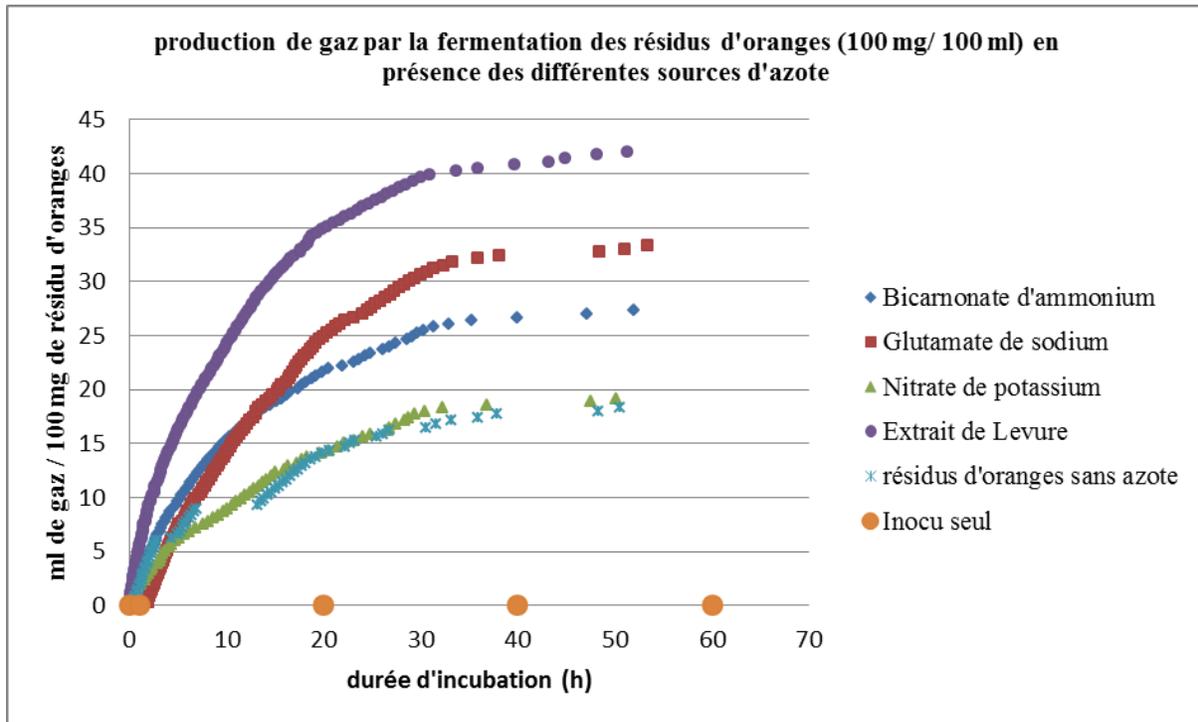


Figure 53 : production de gaz par la fermentation des résidus d'oranges (100 mg/100 ml) en présence de différentes sources d'azote (Azzouz, 2017)

4.3 Cardes comme source d'énergie

La figure 54 montre les résultats de production de gaz par l'inoculum épuisé en présence des différentes sources d'azote et les cartes comme source d'énergie (Azzouz, 2017). Nous observons une tendance similaire chez les milieux d'azote organique (extrait de levure et glutamate de sodium) comme pour les résidus d'oranges par contre les courbes des milieux d'azote inorganique (bicarbonates d'ammonium et nitrates de potassium) sont superposées avec les cartes seules (production de gaz maximale : 23,7 ml/100 mg MS). Durant les premières 24 h de fermentation, les cartes incubés avec les nitrates de potassium ont un temps de latence court (0,04 h) suivis des cartes seules (0,16 h) et enfin des cartes incubées avec les bicarbontes d'ammonium (2,10 h) (Latreche, 2017).

La classification des milieux sur la base des résultats de production de gaz des cartes après 96 h d'incubation est la suivante :

Extrait de levure (51,3 ml) > glutamate de sodium (33,3 ml) > bicarbonates d'ammonium (23,1 ml) > nitrates de potassium (23,4 ml) > cartes seules.

Il y a une différence de classification par rapport aux cartes dans l'expérience 1 sans épuisement de l'azote où la classification est la suivante :

Glutamate de sodium > extrait de levure > milieu sans azote > bicarbonates d'ammonium > nitrates de potassium.

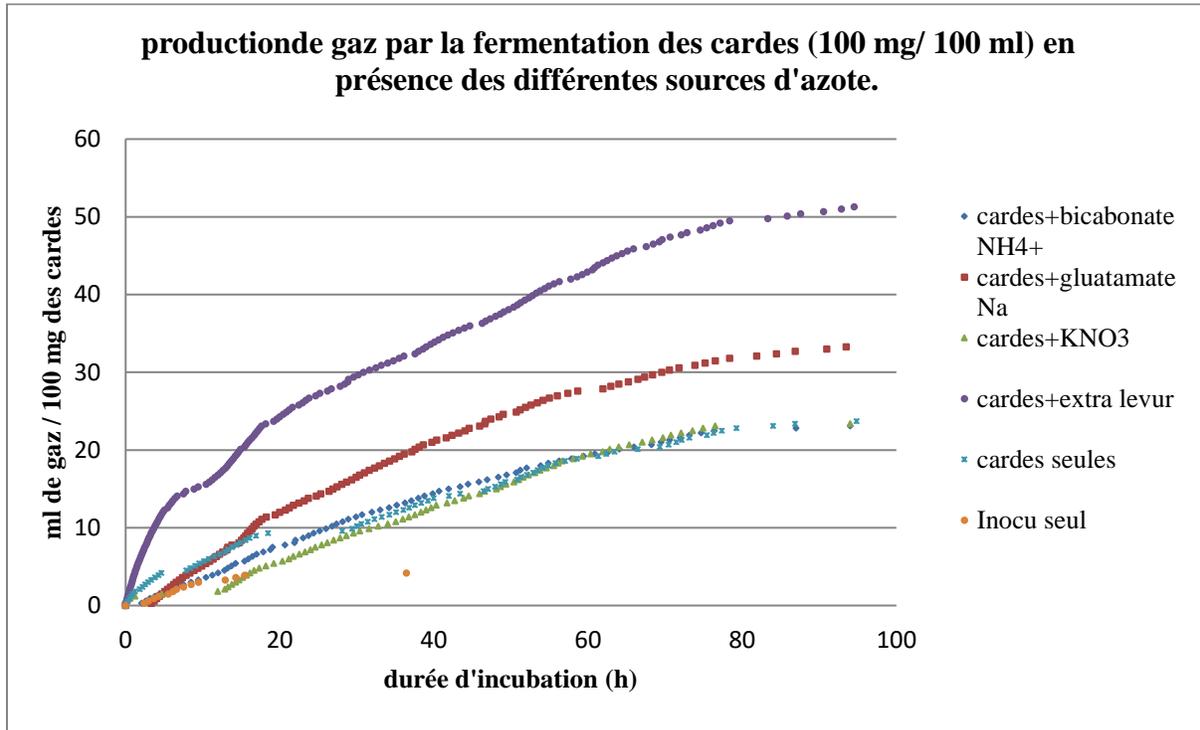


Figure 54 : production de gaz par la fermentation des cartes (100 mg/100 ml) en présence de différentes sources d'azote (Azzouz, 2017)

Expérience 2 : Etude de la dégradabilité des résidus d'oranges et des cardes

Dans cette section, nous allons présenter les caractéristiques de la fermentation *in vitro* de 24 h des résidus d'oranges et des cardes dans le milieu N1 sans azote ajouté comparé aux milieux N2 d'azote inorganique (bicarbonate d'ammonium) et le milieu N3 d'azote organique (glutamate de sodium).

1. Evaluation des paramètres de fermentation des résidus d'oranges après 24 h

Nous observons du tableau 4 que les valeurs du pH final après 24 h de fermentation sont dans l'intervalle optimal ; entre 6 et 7 selon Thivend (1985). L'addition de sources d'azote organique et inorganique a augmenté significativement ($p < 0,01$) la dégradabilité de la MS des résidus d'oranges. Elle est statistiquement comparable chez le milieu N2 (bicarbonates d'ammonium) et N3 (glutamate de sodium) (64,5 % et 64,4 % respectivement) et inférieure chez le milieu N1 (témoin sans azote ajouté) (59,8 %).

Le pH final et la production d'AGV sont significativement influencés par l'addition du glutamate de Sodium (milieu N3), en effet le pH final est le plus bas dans ce dernier (6,74) suivi en ordre croissant par le milieu N2 (bicarbonates d'ammonium) (6,57) et le milieu N1 (témoin sans azote ajouté) (6,61). De plus la plus forte production d'AGV est notée pour le milieu N3 (glutamate de sodium) suivi par le milieu N1 (témoin sans azote ajouté) et le milieu N2 (bicarbonates d'ammonium) (66,7 mM, 49,6 mM et 40,2 mM respectivement). Par conséquent la relation entre le pH final et la dégradabilité de la MS est fortement négative ($r = -0,708$). L'utilisation des bicarbonates est importante dans les études de fermentation *in vitro* (Goering and Van Soest, 1970) car elles jouent le rôle de tampon du pH ruminal (Erdman, 1988) et des milieux d'incubation et dès lors que le pH est au-dessus de 6,0, la plupart des acides gras volatils sont dissociés (acétate, butyrate, propionate qui sont des acides faibles), par conséquent ces acides aussi jouent le rôle de tampon (Moharrery, 2007). Le milieu N2 contient lui aussi une source de tampon : les bicarbonates d'ammonium. La dégradabilité de l'NDF est comparable entre les trois milieux.

La concentration en $\text{NH}_3\text{-N}$ a augmenté dans le milieu N3 qu'avec le milieu N2 (13,6 et 5,23 mg/100 ml respectivement). Cette augmentation peut s'expliquer par la dégradation des protéines et la désamination des acides aminés en NH_3 extracellulaire en plus des AGV et des gaz (Hungate, 1966). Blümmel et Lebzien (2001) ont reporté que l'addition d'azote dans le milieu de fermentation augmente la production d'acides gras à courte chaîne avec tous les rations testées

(des parties égales de concentrés et fourrages). L'addition d'ammoniaque augmente l'activité des bactéries cellulolytiques, qui après la fermentation des composants de la paroi cellulaire produisent des AGV et des gaz (principalement CO₂ et méthane) (Hungate, 1966).

La proportion d'acétate produite en présence des résidus d'oranges est un peu plus élevée avec le milieu N3 qu'avec le milieu N2 (48 et 40 mol/100 mol respectivement). Elle a diminué lorsqu'on ajoute une source d'azote comparé au control N1. Les trois principaux AGV : acétate, propionate et butyrate suivent la même tendance avec tous les milieux, la proportion d'acétate est toujours supérieure à celle du propionate puis le butyrate vient en dernier. Grings et *al.* (2005) ont reporté des résultats similaires pour le pourcentage d'acétate des acides gras à courtes chaînes totaux, qui augmente dans le milieu riche en azote (bicarbonate d'ammonium) et comme conclu par Blümmel et *al.* (1999), les productions molaires des AGV dépendent de la nature de l'aliment.

Dans le milieu N2, la production du propionate a été associée à la capacité tampon des acides gras à courte chaîne avec les bicarbonates d'ammonium (en plus du bicarbonate de sodium) pour libérer le CO₂ (Blümmel et Ørskov, 1993). Tandis que la production du butyrate est associée à la dégradation des sucres solubles qui sont élevés dans les résidus d'oranges (48,26 % MS).

Tableau 4 : caractéristiques de fermentation des résidus d'oranges dans les milieux N1, N2 et N3 après 24 h

Paramètres	Sources d'azote ¹			SEM ²	P
	N1	N2	N3		
pH final	6,61 ^a	6,57 ^a	6,47 ^b	0,021	< 0,01
Dégradabilité MS, %	59,8 ^b	64,5 ^a	64,4 ^a	0,83	< 0,01
Dégradabilité NDF %	33,79	35,71	34,98	0,735	0,62
NH ₃ -N, mg/100 mL	0,003 ^c	5,23 ^b	13,6 ^a	1,72	< 0,01
AGV totaux, mM	49,6 ^b	40,2 ^b	66,7 ^a	4,21	0,01
AGV individuels, mol/100 mol					
Acétate (A)	56,7 ^a	40 ^a	48 ^{ab}	2,6	0,01
Propionate (P)	27,4 ^b	35 ^a	28,1 ^b	1,34	0,02
Butyrate	11,5 ^b	17,9 ^a	16,5 ^a	1,01	< 0,01
Valérate	2,72 ^b	4,73 ^a	3,42 ^b	0,316	0,01
Isobutyrate (IB)	0,61 ^c	0,84 ^b	1,16 ^a	0,079	< 0,01
Isovalérate (IV)	0,96 ^b	1,26 ^b	2,29 ^a	0,182	< 0,01
IB + IV	1,57 ^b	2,10 ^b	3,45 ^a	0,258	< 0,01
A:P	2,07 ^a	1,14 ^b	1,81 ^a	0,161	0,03

^{a-c} Les moyennes dans une ligne avec un exposant différent sont différentes ($p < 0,05$)

¹N1 : témoin sans azote ajouté (blanc) ; N2 : bicarbonate de sodium ; N3 : glutamate de sodium ; ²SEM : erreur type de la moyenne.

2. Evaluation des paramètres de fermentation des cartes après 24 h

Les résultats du tableau 5 enregistrent la valeur la plus élevée pour le milieu N3 où la dégradabilité de la matière sèche est significativement différente et légèrement plus élevée de celle enregistrée pour le milieu N2 (bicarbonates d'ammonium) et le milieu N1 (témoin sans azote ajouté) (34,9 %, 30,6 % et 24,7 %). Ces résultats supportent l'idée de Maeng *et al.* (1976) qui a reporté le remplacement de sources d'azote non protéique (dans notre étude c'est le remplacement

de N2 par N3) avec 18 acides aminés a augmenté la dégradation du substrat. Le pH final après 24 h de fermentation est stable et n'as pas diminué en dessous du seuil approprié pour une bonne activité microbienne. Le pH est neutre et noté pour le milieu sans azote ajouté (7, 03) suivi du milieu contenant l'azote inorganique (N2 : bicarbonates d'ammonium ; 6,98) et finalement le milieu contenant l'azote inorganique N3 (glutamate de sodium ; 6,82). Ces valeurs sont en accordance avec la production d'acides gras volatils où elles ont significativement ($p < 0, 01$) augmenté dans le milieu N3 (66,9 mM), une double production par rapport au milieu N2 (bicarbonates d'ammonium) (32,7 mM) et plus élevée contrairement au milieu N1 (témoin sans azote ajouté) (29,8 mM). Il y a une forte corrélation négative entre le pH final et le % de dégradabilité de la MS ($r = - 0,995$), plus le pH diminue plus la dégradabilité de la MS augmente.

Tableau 5 : caractéristiques de fermentation des cardes dans les milieux N1, N2 et N3

après 24 h

Paramètres	Sources d'azote ¹			SEM ²	P
	N1	N2	N3		
pH final	7,03 ^a	6,89 ^b	6,82 ^c	0,027	< 0,01
Dégradabilité MS, %	24,7 ^c	30,6 ^b	34,9 ^a	1,35	< 0,01
Dégradabilité NDF %	71,91	70,43	71,9	0,398	0,289
NH ₃ -N, mg/100 mL	3,07 ^c	9,88 ^b	18,6 ^a	1,963	< 0,01
AGV totaux, mM	29,8 ^b	32,7 ^b	66,9 ^a	5,12	< 0,01
AGV individuels, mol/100					
mol					
Acétate (A)	71,1 ^a	68,2 ^b	63,7 ^c	0,97	< 0,01
Propionate (P)	13 ^b	17,6 ^a	17,9 ^a	0,72	< 0,01
Butyrate	8,29	8,95	12,2	0,53	0,32
Valérate	2,04	1,75	1,7	0,094	0,32
Isobutyrate (IB)	1,8 ^a	1,07 ^c	1,4 ^b	0,103	< 0,01
Isovalerate (IV)	3,05 ^a	2,07 ^b	2,76 ^a	0,148	< 0,01
IB + IV	4,84 ^a	3,14 ^b	4,16 ^a	0,245	< 0,01
A:P	5,51 ^a	3,88 ^b	3,55 ^b	0,271	< 0,01

^{a-c} Les moyennes dans une ligne avec un exposant différent sont différentes ($p < 0,05$)

¹N1 : témoin sans azote ajouté (blanc) ; N2 : bicarbonate de sodium ; N3 : glutamate de sodium ; ²SEM : erreur type de la moyenne.

Conclusion

Le but de notre étude est d'évaluer la dégradation de deux résidus agro-alimentaires abondants en Algérie ainsi que deux plantes fibreuses endémiques par la flore ruminale bovine lors d'une fermentation *in vitro* en présence de sources d'azote organiques et inorganiques différentes.

D'une manière générale, la flore ruminale bovine a utilisé toutes les sources d'azote sous forme organique et inorganique mais différemment selon la nature du substrat. Pour les résidus agro-alimentaires, la production de gaz est largement plus élevée qu'avec les plantes fibreuses. Pour les résidus de tomates la meilleure combinaison est avec les sources d'azote organiques : milieu au glutamate de sodium (299,15 ml/g MS) et milieu à l'extrait de levure (290 ml/g MS) par l'analyse des données de la production de gaz après 120 h d'incubation selon le modèle logistique. Le milieu au glutamate de sodium a permis d'avoir une meilleure fermentescibilité pour les cardes et selon l'analyse par le modèle logistique (181,45 ml/g MS). D'un autre côté les résidus d'oranges et les chrysanthèmes ont présenté des résultats statistiquement comparables pour les sources d'azote organique et inorganique. L'analyse statistique des cinétiques de fermentations des substrats avec le modèle logistique est moins éloignée de la production de gaz observée que l'est le modèle exponentiel selon le paramètre *st*.

Dans la deuxième expérience nous avons essayé de déterminer l'effet des sources d'azote organiques et inorganiques sur la dégradation *in vitro* des résidus d'oranges et des cardes à travers l'analyse des paramètres de fermentation. Les valeurs du pH final ont été notées dans l'intervalle optimal entre 6 et 7 malgré le fait que les résidus d'oranges. La combinaison des résidus d'oranges avec le milieu au bicarbonate d'ammonium a donné les meilleurs résultats (pour la synthèse de protéines bactériennes), sans effets négatifs sur les conditions du rumen (pH dans les normes ce qui écarte le risque d'acidose, AGV). Quoique les valeurs de $\text{NH}_3\text{-N}$ sont au-dessus de l'optimal. Ce qui suggère la possibilité de perte d'énergie pour la production de biomasse microbienne. La combinaison entre les résidus d'oranges avec des fourrages à forte teneur en azote tel que l'ensilage d'avoine (12,9 % PB), l'ensilage d'orge ou en grain (12 % MS) est conseillée dans le futur.

La combinaison entre les résidus de tomates avec le milieu à l'extrait de levure a donné la meilleure dégradation. La fermentation des cardes avec les sources d'azote organique et inorganique a aussi pour conséquence l'augmentation du taux d'AGV et de $\text{NH}_3\text{-N}$.

En conclusion, nous conseillons d'augmenter le taux d' $\text{NH}_3\text{-N}$ au départ de la fermentation en plus des milieux simplifiés au bicarbonate d'ammonium et au glutamate de sodium qui sont les moins chers afin d'optimiser la dégradation des résidus agro-alimentaires et évaluer par la suite l'efficacité de la production de protéines microbiennes.

Références bibliographiques

- Abdelguerfi A et Abdelguerfi-Laouar M., 2004.** Les ressources génétiques d'intérêt fourrager et / ou pastoral : Diversité, collecte et valorisation au niveau méditerranéen. *Ciheam*. 41(62): 29–41.
- Abeddou S, Riwhi S, Iñiguez L, Zaklouta M, Hess H.D, Kreuzer M., 2011.** Ruminal degradability, digestibility, energy content, and influence on nitrogen turnover of various Mediterranean by-products in fat-tailed Awassi sheep. *Anim. Feed. Sci. and Tech.* 163 (2-4) : 99-110.
- Abouزيد Sameh F, Shao-nongChen, James B Mcalpine, J Brent Friesen, Pauli Guido F., 2016.** Fitoterapia Silybum marianum pericarp yields enhanced silymarin products *Fitoterapia*. 112: 136–143.
- Addis M, Spada S, Cabiddu A, Molle G, Piredda G., 2002.** Effect of different forages on fatty acid composition and CLA content in sheep. Proc. 26th IDF World Dairy Congress, Paris. 24–27 September.
- Afshar Mirzaei-Aghsaghali, Naser Maheri-sis, Hormoz Mansouri, Mohammad Ebrahim Razeghi, Amir Reza Safaei, Abolfazl Aghajanzadeh-Golshani and Kamel Alipoor.,2011.** Estimation of the nutritive of tomato pomace for ruminant using *in vitro* gas production technique. *African J of Biotech.* 10 (33): 6251-6256.
- Aghajanzadeh-Golshani A, N.Maheri-sis., 2010.** Comparison of nutritional value of tomato pomace and brewer's grain for ruminants using *in vitro* gas production technique. *Asian J. of Anim. and Vet. Adv.* 5 (1) :43-51.
- Alemardan A, Karkanis A, Salehi R., 2013.** Breeding objectives and selection criteria for milk yield in the thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] Improvement. *Not Bon. Horti. Agrobo.* 41 (2): 340-347.
- Allison M.J, Reddy C.A, Cook H.M., 1984.** The effects of nitrate and nitrite on VFA and CH₄ production by rumen microbes. *J. of Anim. Sci.* 53: 391-399.

- Alvares-Castellanos Pino P, Chris D Bishop, Maria J Pascual-Villalobos., 2001.** Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry*. 57, 99-102.
- Ammar S, López S, Gonzáles J.S, Ranilla M.J., 2004.** Seasonal variations in the chemical composition and *in vitro* digestibility of some Spanish leguminous shrub species. *Anim. Feed. Sci. and Tech.* 115: 327-340.
- Ammerman C.B, and Henry P.R., 1991.** Citrus and vegetable products for ruminant animals. Pages 103–110 in Proceedings, Alternative Feeds for Dairy and Beef Cattle, National Invitational Symposium, St. Louis, MO.
- Amokrane Sérine., 2009.** Etude des prétraitements microbiologiques des résidus agroalimentaires lignocellulosiques en vue de leur valorisation en alimentation animale. Magister. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Département de biochimie et de microbiologie. Université Mentouri Constantine.
- Anderson P.L, Brundage R.C, Kakuda T.N and Fletcher C.V., 2003.** Response is correlated with peak plasma concentrations of indinavir in adults with undetectable human immunodeficiency virus ribonucleic acid. *Clinical pharmacokinetics*. 71 : 280-285.
- ANSES.** Table CIQUAL 2008. French Food Composition Table. Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
- AOAC.** Official Methods of Analysis. (13 th Ed). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.1980.
- Arhab R, Macheboeuf D, Aggoun M, Bousseboua H, Viala D, Besle J.M., 2009.** Effect of polyethylene glycol on *in vitro* gas production and digestibility of tannin containing feedstuffs from North African arid zone. *Trop. and Subtrop. Agroecosystems*. 10 (3): 475-486.
- Arhab R, Macheboeuf D, Doreau M, Boussebouad H., 2006.** Nutritive value of date palm leaves and *Aristida pungens* estimated by chemical, *in vitro* and *in situ* methods. *Trop. and Subtrop. Agroecology*. 6 (3) : 167-175.
- Azzouz Amira., 2017.** Comparaison entre azote organique et inorganique portant sur la dégradation *in vitro* des sources d'énergie alternatives par la microflore ruminale : cas des sources d'azote. Mémoire de Master. Université des Frères Mentouri Constantine. p51.
- Bach A.S Calsamiglia, and Stern M.D., 2004.** Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 88 E. suppl.

- Bakshi M.P.S, Kaur J & Wadhwa M., 2012.** Nutritional evaluation of sun-dried tomato pomace as livestock feed. *Indian J. Anim. Nutr.* 29.
- Bampidis V.A, Robinson P.H., 2006.** Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Anim. Feed Sci. Tech.* 128:175–217.
- Barrios-Urdaneta A, Fondevilla M, Castrillo C., 2003.** Effect of supplementation with different proportions of barely grain or citrus pulp on the digestive utilization of ammonia-treated straw by sheep. *Anim. Sci.* 76, 309-317.
- Bean C., 2007.** Element stewardship abstract for *Silybum marianum*. The nature conservancy. 1985.
- Belbis Hervé Guillaume., 2010.** Flore du rumen : origine, évolution, composition, conséquences physiopathologiques. Thèse de doctorat vétérinaire. pp 13 - 47.
- Belibasakis N.G., 1990.** The effect of dried tomato pomace on milk yield and its composition and on some blood plasma biochemical components in the cow. *World. Rev. Anim. Prod.* 25: 39.
- Belury M.A., 2002.** Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action. *J. Nutr.* 132: 2995–2998.
- Ben-Ghedalia D, Yosef E and Miron J., 1989.** The effect of starch and pectin-rich diets on quantitative aspects of digestion in sheep. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 24: 289-298.
- Besharati Maghsoud, Taghizadeh Akbar, Jammohammadi Hossein and Moghadam Gholam Ali., 2008.** Evaluation of some by-products using in situ and *in vitro* gas production techniques. *American. J. of Anim. and Vet. Sci.* 3 (1), 7-12.
- Bessam Fatima Zohra and Mehdadi Zoheir., 2014.** Evaluation of the Antibacterial and Antifongigal activity of different extracts of flavonoïques *Silybum marianum L.* *Adv. Environ. Biol.* 8 (17): 1-9.
- Betania Sebastián, Alejandro M Urzúa and Marcela Vines., 2006.** Analysis of surface and volatile compounds of flower heads of introduced plants of *Chrysanthemum coronarium L.* growing wild in Chile. *Flavour and Fragrance Journal.* 21: 783-785.
- Beuvink J.M.W and Spoelstra S.F., 1992.** Interactions between substrate, fermentation and products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed microorganisms *in vitro.* *Appl. Microbiol. and Biotech* 37: 505-509.
- Blackburn T.H and Hobson P.N., 1960.** Isolation of proteolytic bacteria from the sheep rumen. *J. Gen. Microbiol.* 22: 282-289.

- Bladen H.A, Bryant M.P and Doetsh R.N., 1961.** A study of bacterial species from the rumen which produce ammonia from protein hydrolysate. *Appl. Microbiol.* 9: 175-180.
- Blair R., 2011.** Chapter 3 Elements of cattle Nutrition in Nutrition and Feeding of Organic Cattle. 29-31.
- Blümmel M and Ørskov E.R., 1993.** Comparaison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 40 : 109-119.
- Blümmel M, Aiple K.P, Steingäß H, Becker K., 1999.** A note on the stoichiometrical relationship of short chain fatty acid production and gas formation *in vitro* in feedstuffs of widely differing quality. *J. Physiol and Anim. Nutr.* 81: 157-167.
- Blümmel M, Lebzien P., 2001.** Predicting ruminal microbial efficiencies of dairy rations by *in vitro* techniques. *Livestock Prod. Sci.* 68 : 107-117.
- Boufennara S., 2012.** Effet des tanins sur la fermentescibilité *in vitro* et la digestibilité *in sacco* de végétaux et de sous-produits de l'agronomie des zones arides. Essai de modélisation des fermentations du microbiote ruminal. Faculté des sciences de la nature et de la vie, département de biochimie et de microbiologie. Thèse de doctorat en sciences. Université Mentouri de Constantine.
- Boulacel M, Bousmid A, Benlaribi M., 2015.** Diversité florale des astéracées de la région de Constantine (Algérie). *European Sci. J.* 11 (18): 162-173.
- Brock Frances M, Forsberg Cecil W, and Buchanan-Smith G Jock., 1982.** Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. *App and Enviro Microbiol.* 44 (3) : 561-569.
- Buckner, R.C, Powell J.B, and Frakes RODV., 1979.** Historical development. *In* Tall Fescue. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. 1-8.
- Bush L and Buckner R.C., 1973.** Tall fescue toxicity. *In* Anti-Quality Components of Forages. Crop Science Society of America, Inc, Madison, WI. 99-112.
- Caluya R.R, Sair R.R, Recta G.M.R, Baleng B.B., 2003.** Tomato pomace as feed for livestock and poultry. Mariano Marco State University.

- Carro M.D, Lebzien P and Rohr K., 1992.** Effects of yeast culture on rumen fermentation, digestibility and duodenal flow in dairy cows fed a silage-based diet. *Livest. Prod. Sci.* 32: 219-229.
- Chambreau Dennis, Patricia A. Maclaren., 2007.** Meeting the Challenge: Invasive Plants in Pacific Northwest Ecosystems. Timothy B. Harrington and Sarah H. Reichard. Got Milk thistle? an adaptive management approach eradicating milk thistle on dairies in king county, Washington State. 83-84
- Chapman H.L, Ammerman C.B, Baker F.S, Hentges J.F, Hayes B.W, and Cunha T.J., 1983.** Citrus feeds for beef cattle. Univ. Florida, Gainesville Bull. 751:1-34.
- Chaucheyras, F, Fonty G, Bertin G and Gouet P., 1995.** Effects of live *Saccharomyces cerevisiae* cells on zoospore germination, growth, and cellulolytic activity of the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis* MCH3. *Curr. Microbiol.* 31:201.
- Chikunya S, Newbold C.J, Rode L, Chen X.B and Wallace R.J., 1996.** Influence of dietary rumen-degradable protein on bacterial growth in the rumen of sheep receiving different energy sources. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 63: 333-340.
- Christians N., 2004.** Cool-Season Grasses. in Fundamentals of Turfgrass Management. John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ. Pp 31-58.
- Church D.C., 1979.** Digestive physiology and nutrition of ruminants. Vol I second edition O.S.U. Book stores Inc. Corvallis, OR, USA.
- Clarke R.T.J., 1977.** Methods for studying gut microbes, 140-195, In Clarke R.T.J and Bauchop T (eds), Microbial Ecology of the Gut. Academic Press, London.
- Cone J.W, Antoine H van Gelder, Gert J.W Visscher, Leen Oudshoorn., 1996.** Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated times related gas production apparatus. *Anim. Feed. Sci. and Tech.* 61: 113-128.
- Cotta M.A and Russell J.B., 1982.** Effect of Peptides and Amino Acids on Efficiency of Rumen Bacterial Protein Synthesis in Continuous Culture. *J. Dairy Sci.* 65:226-23
- Czerkawski J.W., 1986.** An introduction to rumen studies. Chapter 8: Synthetic Processes in the Rumen. Copyright Elsevier Ltd. 127-149.
- D'Urso G, Avondo M and Biondi L., 1993.** Effect of supplementary feeding on grazing behaviour of Comisana ewes in a Mediterranean semi-extensive production system. *Anim. Feed. Sci. and Tech.* 42: 259-272.

- Dehority B.A., 2003.** Rumen microbiology. Nottingham Univ. Press, Nottingham, UK.
- Dhanoa M.S., 1988.** On the analysis of the dacron bag data for low degradability feeds. *Grass Forage Sci.* 43: 441-444.
- Dryhurst N, Wood C.D., 1998.** The effect of nitrogen source and concentration on in vitro gas production using rumen micro-organisms. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 71:131-143.
- Dubois M, Gilles K.A, Hamilton J.K, Rebers P.A, and Fred Smith., 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chem.* 28 (3): 350-356.
- Erdman R.A., 1988. Dietary buffering requirements of the lactating dairy cow: A review. *J. Dairy Sci.* 71: 3246-3266.
- Erfle J.D, Sauer F.D, and Mahadevan S., 1977.** Effect of Ammonia Concentration on Activity of Enzymes of Ammonia Assimilation and on Synthesis of Amino Acids by Mixed Rumen Bacteria in Continuous Culture. *J. of Dairy Sci.* 60: 1064–1072.
- Eun J-S., 2006.** Ammonia (Phenol/Hypochlorite method) standard operating procedure. Animal Dairy and Veterinary Sciences. Utah State University. USA.
- FAO, FAOSTAT., 2011. 2017.** Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Follet J.M., 1990.** Mitsuba and Shungiku-two traditional Japanese vegetables. *Horticulture in New Zealand.* 2: 22-25.
- Fondevilla M, Guada J.A, Gasa J and Castrillo C., 1994.** Tomato pomace as a protein supplement for growing lambs. *Small Ruminant Res.* 13: 117.
- Fonty G, Forano E, Gaudet G, Komisarczuk S et Gouet Ph., 1988.** Données nouvelles sur les bactéries cellulolytiques. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 28 : 19-32.
- Fonty G, Jouany J.P, Forano E, Ph Gouet., 1995.** Chapitre 8: l'écosystème microbien du réticulo- rumen dans : Nutrition des ruminants domestiques: Ingestion et digestion Par Robert Jarrige. 299.Editions Quaeen ligne google livres.
- Getachew G, Blümmel M, Makkar H.P.S, Becker K., 1998.** *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 72: 261-281.
- Giger-Reverdin S, Duvaux-Ponter, Sauvant D, Martin O, Nunes I and Muller R., 2002.** Intrinsic buffering capacity of feedstuffs. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 96: 83-102.
- Goering H.K and Van Soest J.P., 1970.** Forage fiber analysis.U.S.D.A. Handbook No. 6. 293. John Wiley and Sons, New York.

- Goering H.K, and Van Soest P.J., 1970.** Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures and some applications). Agric. Handbook No. 379. ARS-USDA, Washington, DC.
- Grant W.D, Pinch G, Harris J.E, DeRosa M, and Gambacorta A., 1985.** Polar lipids in methanogen taxonomy. *J Gen. Microbiol.* 131: 3277.
- Grasser L.A, Fadel J.G, Garnett I, DePeters E.J., 1995.** Quantity and importance of nine selected by-products used in California dairy rations. *J Dairy Sci.* 78: 962-971.
- Grigoars Cristina-Gabriela., 2012.** Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs. Sciences agricoles. Université d'Orléans. Français. <NNT : 2012ORLE2029>. <tel-00772304> 2013;p24.
- Grings E.E, Blümmel M, Sudekum K.H., 2005.** Methodological considerations in using gas production techniques for estimating ruminal microbial efficiencies for silage-based diets. *Anim. Feed Sci. Tech.* 123-124: 527-545.
- Griswold K.E, Hoover W.H, Miller T.K and Thayne W.V., 1996.** Effect of form of nitrogen on growth of ruminal microbes in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 74: 483–491.
- Groot J.C.J, Cone J.W, Williams B.A, Debersaques F.M.A, Lantinga E.A., 1996.** Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 64 (1) : 77-89.
- Harifoot C.G, Hazelwood G.P., 1997.** Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson PN, Stewart CS (Eds). *The Rumen Microbial Ecosystem*. Chapman and Hall, London. 383-426.
- Hofmann R.R., 1988.** Anatomy of the gastrointestinal tract In: the ruminant animal, digestive physiology and nutrition, Edited by D.C.Church. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ. USA. 14-43.
- Hook S.E, Wright A.D.G, and McBride B.W., 2010.** Methanogens: Methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*, article 945785 (1–11).
- Hoover W.H and Stokes S.R., 1991.** Balancing Carbohydrates and Proteins for Optimum Rumen Microbial Yield. *J. Dairy Sci.* 74: 3630-3644.
- Hungate R.E., 1957.** Micro-organisms in the rumen of cattle fed a constant ration. *Canadian J. of Microbiol.* 3: 289-311.

- Hungate R.E., 1944.** Studies on cellulose fermentation. I. The culture and physiology of an anaerobic cellulose digesting bacterium. *J. of Bacterio.* 48: 499-513.
- Hungate R.E., 1950.** The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 14: 1-49.
- Hungate R.E., 1966.** The rumen and its microbes. Academic Press, New York.
- Ismail E.G, Fadia El-Sherif, Salah Khattab, Walid W. Mohamed., 2014.** Effect of Manure and Bio-fertilizers on Growth, Yield, Silymarin content, and protein expression profile of *Silybum marianum*. *Adv Agric Biol.* 2 (1) :36-44.
- Jouany J.P., 1978.** Contribution à l'étude des protozoaires ciliés du rumen : leur dynamique, leur rôle dans la digestion et leur intérêt pour le Ruminant. Th. Etat. Univ. Clermont-Ferrand 11. 256 (2): 195 pp.
- Jouany J.P., 1996.** Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *J.of Nutr.* 126: 1335S-46S.
- Johnson K.A, Johnson D.E., 1995.** Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 2483–2492.
- Kajikawa H, Mitsumori M, Ohmomo S., 2002.** Stimulatory and inhibitory effects of protein amino acids on growth rate and efficiency of mixed ruminal bacteria. *J. Dairy Sci.* 58: 2015-2022.
- Kali S, Benidir M, Ait Kaci K., Belkheir B., Benyoucef M.T., 2011.** Situation de la filière lait en Algérie : Approche analytique d'amont en aval. *LRRD.* 23(8).
- Karim Hosni, Imed Hassen, Houcine Sebei, Hervé Casabianca., 2013.** Secondary metabolites from *Chrysanthemum coronarium* (Garland) flowerheads: chemical composition and biological activities. *Industrial Crops and Products.* 44: 263-271.
- Kasperbauer M.J., 1990.** Biotechnology in tall fescue improvement. CRC Press, Inc Taylor and Francis Group. P 2.
- Kjeldahl J., 1883.** Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Z. Anal. Chem.* 22: 366-382.
- Krause D.O, Nagaraja T.G, Wright A.D.G, Callaway T.R., 2013.** Board-invited review: Rumen microbiology: Leading the way in microbial ecology. *J. of Anim. Sci.* 91 (1): 331-341.
- Kumar A, Singh S.P, Bhakuni R.S., 2005.** Secondary metabolites of *Chrysanthemum* genus and their biological activities, current science. 89: 1489.
- Kung L, Kreck Jr. E.M, Tung R.S., 1997.** Effects of a live yeast culture and enzymes on *in vitro* ruminal fermentation and milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80: 2045-2051.

- Latreche Nawel., 2017.** Comparaison entre azote organique et inorganique portant sur la dégradation *in vitro* des sources alternatives d'énergie par la microflore ruminale : cas d'une plante fibreuse : *Silybum marianum*. Mémoire de Master. Université des Frères Mentouri Constantine. p29, 43-44
- Leahy S.C, Kelly W.J, Altermann E, Ronimus R.S, Yeoman C.J, Pacheco D.M, Li D, Kong Z, S McTavish S, Sang C, Lambie S.C, Janssen P.H, Dey D and Attwood G.T., 2010.** The genome sequence of the rumen methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions. *PLoS ONE*. 5:8926-8943.
- Lee I. Chiba., 2014.** Animal nutrition handbook Section 3: rumen microbiology and fermentation. 57-81
- Leng R.A and Nolan J.V., 1984.** Nitrogen metabolism in the rumen. Symposium: protein nutrition of the lactating dairy cow. *J. Dairy Sci.* 67: 1072-1089.
- Leng R.A., 2008.** The potential of feeding nitrate to reduce enteric methane production in ruminants. A Report to The Department of Climate Change Commonwealth Government of Australia, Canberra, ACT, Australia.
- Li Ribert W, Connor, Erin E, Li Congjun, Baldwin Vi Ransom L., 2012.** Sparks Michael E. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools *Environmental Microbiology*. 14 (1): 129-139.
- Licitra G, Carpino S, Schadt I, Avondo M, Barresi S., 1997.** Forage quality of native pastures in a Mediterranean area. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 69: 315-328.
- Lynch H.A and Martin S.A., 2002.** Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces* live cells on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation. *J.Dairy.Sci.* 85: 2603-2608.
- MADR., 2013 et 2018.** Ministère de l'agriculture, du Développement Rural et de la pêche. Séries statistiques agricoles A et B.
- Maeng W.J, Van Nevel C.J, Baldwin R.L, Morris J.G., 1976.** Rumen microbial growth rates and yields: effect of amino acids and protein. *J. Dairy Sci.* 59: 68-79.
- Makkar H.P.S, Blümmel M, Becker K., 1995.** Formation of complexes between poly vinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and their implication in gas production and true digestibility *in vitro* techniques. *British J. Nutri.* 73: 897-913.

- Martin C, Millet L, Fonty G, Michalet-Doreau B., 2001.** Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial community with rumen solid digesta. *Reprod. Nutr. Dev.* 41: 413-424.
- Martini Valentina., 2009.** Cinetica di degradazione microbica di residui agro-industriali mediante tecnica GP (gas production). Facolta' di agraria e medicina veterinaria dipartimento di scienze animali. Università degli studi di Padova. p29.
- McDonald P, Edwards R, Greenhalgh J. F. D, Morgan C.A, Sinclair L, Wilkinson R.G., 2011.** Part 2: The digestion and metabolism of nutrients. Digestion: Microbial digestion in ruminants and other herbivores In *Animal Nutrition*. Pearson. 173
- Medjekal S, Arhab R, Bousseboua H., 2011.** Nutritive value assessment of some desert by-product by gas production and rumen fermentation *in vitro*. *LRRD*. 23 (3).
- Mehrez A.Z, Orskov E.R, and McDonald I.W., 1977.** Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *Brit. J. Nutr.* 38:437.
- Menke K.H. and Steingäß H., 1988.** Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. and Dev.* 28: 7-55.
- Menke K.H, Raab L, Salewski A, Steingäß H, Fritz D, Schneider W., 1979.** The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from gas production when they are incubated with rumen liquor. *J. of Agri. Sci.* 93: 217–222.
- Michalet-Doreau B, Fernandez I, Peyron C, Millet L., 2001.** Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reprod. Nutr. Dev.* 41:187-194.
- Miller-Webster T, Hoover W.H, Holt M, Nocek J.E., 2002.** Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. *J. Dairy. Sci.* 85: 2009-2014.
- Miron J, Yosef Edith, Ben-Ghedalia Daniel., 2001.** Composition and *in vitro* digestibility of monosaccharide constituents of selected by product feeds. *J. of Agri. and Food Chemi.* 49 (5): 2322-2326.
- Miron J, Yosef E, Ben-Ghedalia D, Chase L.E, Bauman D.E, Solomon R., 2002.** Digestibility by Dairy Cows of Monosaccharide Constituents in Total Mixed Rations Containing Citrus Pulp. *J. Dairy Sci.* 85: 89–94.

- Moharrery A., 2007.** The Determination of Buffering Capacity of Some Ruminants Feedstuffs and their Cumulative Effects on TMR Ration. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 2(4): 72-78.
- Morrison M, Daugherty S.C, Nelson W.C, Davidsen T, and Nelson K.E., 2010.** The FibRumBa database: A resource for biologists with interests in gastrointestinal microbial ecology, plant biomass degradation, and anaerobic microbiology. *Microbial Ecol.* 59: 212– 213.
- Morrison M, Nelson K.E, Antonopoulos D, Cheng B, Devillard E, Goodheart D.E, Jun H.S, Parisi V, Park J.S, Qi S.M, Reveneau C, Cann I.K.O, Daugherty S, Forsberg C.W, Hance I, Mackie R.I, Nelson W.C, Russell J.B, White B.A and Wilson D.B., 2003.** New and emerging approaches to improve herbivore nutrition: Rumen microbiology in the genomics era. In: *Proc.s 6th Intl. Symp. Nutr. Herbivores*, Merida, Mexico. 6:309–320.
- Moujahed N, Darej C, Taghouti M, Bouaziz Y, Ben Mustapha Ch and Kayouli Ch., 2013.** Chemical composition and *in vitro* fermentation characteristics of range species growing in Central Tunisia. *Options Méditerranéennes*, a A no. 107, feeding and management strategies to improve livestock productivity, welfare and product quality under climate change.
- Nagadi S, Herrero M, Jessop N.S., 2000.** The effect of fermentable nitrogen availability on *in vitro* gas production and degradability of NDF. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 87 : 241-251.
- Newbold C.J, Williams P.E.V, Mckaln N, Walker A and Wallace R.J., 1990.** The effects of yeast culture on yeast numbers and fermentation in the rumen of sheep. *Proc. Nutr. Soc.* 49: 47.
- Newbold C.J., 1990.** Probiotics as feed additives in ruminant diets. *51th Minnesota Nutrition Conference.* 102-118.
- Nocek J.E, and Tamminga S., 1991.** Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.* 74:3598–3629.
- Nolan J.V, Dobos R.C., 2005.** Quantitative aspects of Ruminant Digestion and Metabolism, 2 nd edition (eds Dijkstra J, Forbes JM and France J). *CAB International.* 177-206.
- Nolan J.V., 1975.** Quantitative models of nitrogen metabolism. Page 416 in *Digestion and metabolism in the ruminant.* McDonald IW and Warner ACI, ed. Univ. New England Publ. Unit, Armidale, Australia.

- Noviandi C.T, Neal K, Eun J-S, Peel M.D, Waldron B.L, ZoBell D.R and Min B.R., 2014.** Comparaison of alfalfa, birdsfoot trefoil, and cicer milkvetch in combination with 25, 50, or 75 % tall fescue in a continuous-culture system. *Prof. Anim Sci.* 30: 23-32.
- Noviandi C.T, Waldron B.L, Eun J-S, ZoBell D.R, Stott R.D, Peel M.D., 2012.** Growth performance, ruminal fermentation profiles, and carcass characteristics of beef steers grazing tall fescue without or with nitrogen fertilization. *Prof. Anim. Sci.* 28: 519-527.
- NRC., 2001.** Nutrient composition of feed. In: *Nutrient Requirements of Dairy Cattle: 7th revised ed.* Washington, DC, USA: The National Academic Press.
- Oosting S.J, Verdonk J.M.J.H, Spinhoven G.G.B., 1989.** Effect of supplementary urea, glucose and minerals on the in vitro degradation of low-quality feeds. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2: 583–590.
- Opperman R.A, Nelson W.O, and Brown R.E., 1957.** In vitro studies on methanogenic rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 40, 770-788.
- Orpin C.G., 1975.** Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J. Gen.Microbiol.* 91, 249-262.
- Ørskov E.R, McDonald P., 1979.** The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. *J. of Agri. Sci. Cambridge.* 92: 499–503.
- Palomino Olga., 2015.** Assessment report on *Silybum marianum* (L.) Gaertn, fructus. EMA/HMPC/294188/2013 p4.
- Parodi P.W., 1999.** Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *J. Dairy. Sci.* 82: 1339–1349.
- Payne W.J., 1973.** Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriol Rev.* 37: 409-452.
- Peixoto E.L.T, Morenz M.J.F, Da Fonseca C.E.M, Dos Santos Moura E, De Lima K.R, Lopes F.C.F, Da Silva Cabral L., 2015.** Citrus pulp in lamb diets; Intake, digestibility, and ruminal parameters. *Semina : Ciências Agrárias*, Londrina. 36: 3421-3430.
- Pell A.N, Schofield P., 1993.** Computerised monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *J. Dairy Sci.* 76:1063-1073.

- Pfeffer E and Hristov A.N., 2005.** Interactions between Cattle and the Environment: a General Introduction. *CAB International*. Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle (eds). 1-12.
- Pisulewski P, Okome A.J, Buttery P.J, Haresign R and Lewis D., 1981.** Ammonia concentrations and protein synthesis in the rumen. *J. Sci. Agri.* 32: 759.
- Pittman K.A and Bryant M.P., 1964.** Peptides and other nitrogen sources for growth of *Bacteroides rumenicola*. *J. Bacteriol.* 88: 401-410.
- Pittman K.A, Lakshmanan S and Bryant M.P., 1967.** Oligopeptide uptake by *Bacteroides rumenicola*. *J. Bacteriol.* 93 : 1499-1508.
- Quézel P, Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale, Tome II. Paris, France : Centre National de la Recherche Scientifique.
- Rahbarpur A, Taghizadeh A and Mehmannaavaz Y., 2013.** Determination of nutritive value of tomato pomace using in vitro gas production technique. *Online J of Anim and Feed Research.* 3 (1): 20-22.
- Robledo A, Correal E and Ríos S., 1989.** Palatability of the main fodder and pasture species present in S.E. Spain: II. Herbaceous species. In Proc. *XVI Int. Grassland Congress*, Nice, France. 1533-1534.
- Roesch L.F, Fulthorpe R.R, Riva A, Casella G, Hadwin A.K.M, Kent A.D, Daroub S.H, Camargo FAO, Farmerie W.G, and Triplett E.W., 2007.** Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.* 1:283–290.
- Russell James B., 2002.** Ruminant microbiology and its role in ruminant nutrition. Ithaca New York. pp 26-27, pp 32; pp 54.
- Satter L.D and Slyter L.L., 1974.** Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 32: 199–208.
- Sauer F.D, Erfle J.D and Mahadevan S., 1975.** Amino acid biosynthesis in mixed rumen cultures. *Biochem J.* 150: 357-372.
- Schofield P, Pitt R.E, Pell A.N., 1994.** Kinetics of fibre digestion from *in vitro* gas production. *J.Anim.Sci.* 72 : 2980-2991.
- Sebastian B, Urzua A.M, Vines M., 2006.** Analysis of surface and volatile compounds of flower heads of introduced plants of *Chrysanthemum coronarium* L. growing wild in Chile. *Flavour Fragr J.* 21: 783-785.

- Shah H.N and Collins D.M., 1990.** *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaminogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32: 271-274.
- Shane B.S, Gouws L and Kistner A., 1969. Cellulolytic bacteria occurring in the rumen of sheep conditioned to low-protein teff hay. *J. of Gen. Microbiol.* 55: 445-457.
- Sharpe M.E, and Dellaglio F., 1977.** Deoxyribonucleic acid homology in anaerobic lactobacilli and in possible related species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27: 19-21.
- Sindel B.M., 1991.** A review of the ecology and control of thistles in Australia. *Weed Res.* 31:189–201.
- Smith P.H, Hungate R.E., 1985.** The isolation and characterization of *Methanobacterium ruminantium* N sp. *J. Bacteriol.* 75: 713-718.
- Sogi D.S and Bawa A.S., 1998.** Studies on dehydration of tomato processing waste. *Indian Food Packer.* 52 (2), 26-29.
- Solomon R, Chase L.E, Ben-Ghedalia D, and Bauman D.E., 2000.** The effect of nonstructural carbohydrate and addition of full fat extruded soybeans on the concentration of conjugated linoleic acid in the milk fat of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:1322–1329.
- Songsak Chumpawadee., 2009.** Degradation characteristic of tomato pomace, soybean hull and peanut pod in the rumen using nylon bag technique. *Pakistan J. of Nutr.* 8 (11), 1717-1721.
- Sotto E.C, Khelil H, Carro M.D, Yañez-Ruiz D.R and Molina-Alcaide E., 2015.** Use of tomato and cucumber waste fruits in goat diet: effects on rumen fermentation and microbial communities in batch and continuous cultures. *J.Agric.Sci.* 153: 343-352.
- Stanton T.L., 2014.** Feed composition for cattle and sheep. In *livestock series/ management*.
- Strobel H.J, Russell J.B., 1986.** Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate limited cultures of mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 69: 2941–2947.
- Sulas L, Caredda., 1997.** Introduzione in coltura di nuove specie foraggere: produttività e composizione bromatologica di *Chrysanthemum coronarium* L. (crisantemo) sottoposto a pascolamento simulato. *Riv.Di.Agron.* 31:1019-1026. (En Italien)
- Sulas L, Re G.A, Molle G, Ligios S., 1999.** *Chrysanthemum coronarium* L. a new pasture species for Mediterranean forage systems, In: Etienne M. (ed.). Dynamics and sustainability of Mediterranean pastoral systems. Zaragoza: CIHEAM. *Cahiers Options Méditerranéennes.* 39: 38-86.

- Taghizadeh A, Safamehr A, Palangi V and Mehamannavaz Y., 2008.** The determination of metabolizable protein of some feedstuffs used in *Ruminant Research J. of Bio. Sci.* 3 (7), 804-806.
- Tagliapietra F, Cattani M, Guadagnin M, Haddi M.L, Sulas L, Muresu R, Squartini A, Schiavon S, Bailoni L., 2014.** Associative effects of poor-quality forages combined with food industry byproducts determined *in vitro* with an automated gas-production system. *Anim. Prod. Sci.*
- Takenaka Makiko, Tadahiro Nagata and Mitsuru Yoshida., 2000.** Stability and bioavailability of antioxidants in Garland (*Chrysanthemum coronarium L.*). *Bioscience Biotech and Biochem.* 64 (12): 2689-2691.
- Theodorou M.K and Lowe S.E., 1988.** The fermentative characteristics of anaerobic rumen fungi. *Biosystems.* 21: 371-376.
- Theodorou M.K, Williams B.A, Dhanoa M.S, McAllan A.B, France J., 1994.** A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:185-197.
- Thivend P, Fonty G, Jouany J.P, Durand M, Gouet P., 1985.** Le fermenteur rumen. *Reproduction, Nutrition et Développement.* 25: 729-753.
- Thorne P.J, Hengsdijk H, Janssen S, Louhichi K, Van Keulen H, Thornton P.K., 2009.** System for Environmental and Agricultural Modelling; Linking European Science and Society Modelling Livestock Component in *FSSIM*. p12.
- Tilley J.M.A, Terry R.A., 1963.** A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grssl. Soc.* 18: 104-111.
- Trehane P., 1995.** Proposal to conserve *Chrysanthemum L* with a conserved type (Compositae). *Taxon* 44, 439-441.
- Ungerfeld E.M, Kohn R.A., 2006.** The role of thermodynamics in the control of rumen fermentation. In 'Ruminant physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress'. (Eds Sejrsen K, Hvelplund T, Nielsen M.O). pp 55–85. (Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands).
- Valente M.E, Borreani G, Caredda S, Cavallarin I, Sulas L., 2003.** Ensiling forage Garland (*Chrysanthemum coronarium L.*) at two stages of maturity and at different wilting levels. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 108: 181-190.

- Van Gylswyk N.O and van der Toom J.J.T.K., 1985.** *Eubacterium uniforme* sp.nov.and *Eubacterium xylanophilum* sp. nov., fiber-ingesting bacteria from the rumina of sheep fed corn stover. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35:323-326.
- Van Gylswyk N.O, Morris E.J and Els H.J., 1980.** Sporulation and cell wall structure of *Clostridium polysaccharolyticum* comb. Nov. (formerly *Fusobacterium polysaccharolyticum*). *J. of Gen. Microbiol.* 121: 491-493.
- Van Soest P.J, Robertson J.B, Lewis B.A., 1991.** Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. of Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Van Soest P.J., 1994.** Nutritional ecology of the *ruminant* 2nd Ed. Cornell University Press. 476.
- Ventura M.R, Pieltn M.C and Castanon J.I.R., 2009.** Evaluation of tomato crop by-products as feed for goats. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 154: 271–275.
- Wadhwa M, Bakshi M.P.S, Makkar Harinder P.S., 2013.** Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value-added products. FAO, RAP publications 2013/04. E-ISBN 978-92-5-107632-3 (PDF).
- Waghorn G, Stafford K., 1993.** Gas production and nitrogen digestion by rumen microbes from deer and sheep. *New Zeal J. Agr. Res.* 36 (4): 493-497.
- Wallace R.J and Brammall M.L., 1985.** The role of different species of bacteria in the hydrolysis of protein in the rumen. *J. Gen. Microbiol.* 131: 821-832.
- Wallace R.J, Onodera R, Cotta M.A, Hobson P.N, Stewart C.S, 1997.** editors. *The rumen microbial ecosystem.* 2nd ed. London. Chapman and Hall. 7 Metabolism of nitrogen-containing compounds; 283-328.
- Walter Roger, Andrew Ponter., 2012.** Alimentation de la vache laitière. Editions France Agricole ISBN: 978-2-85557-243-7. p47.
- Wang H, Ye K.Y and Ng T.B., 2001.** Putrifaction of chrysancorin, a novel antifungal protein with mitogenic activity from garland chrysnathemum seeds. *Biol. Chem.* 382: 947-951.
- Weatherburn M.W., 1976.** Phenol hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39: 971–974.
- Williams P.E.V, Tait C.A.G, Innes G.M and Newbold C.J., 1991.** Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of cows on milk

yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of sheep and steers. *J. Anim. Sci.* 69: 3016-3026.

Wing J.M, Van Horn H.H, Sklare S.D, Harris Junior B., 1988. Effects of citrus molasses, distillers solubles and molasses on rumen parameters and lactation. *J. Dairy Sci.* Champaign. 71 (2): 414-420.

Woese C.R, Kandler O, Wheelis M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 4576-4579.

Wolin M.J and Miller T.L., 1988. Microbe-Microbe interactions. In: *Hobson P.N.* The rumen microbial ecosystem. Elsevier Science Publishers Ltd. 343-459.

Wolin M.J., 1975. Interactions between the bacterial species in the rumen. Pages 134–148 in *Digestion and Metabolism in the Ruminant.* McDonald I.W and Warner A.C.I, ed. Univ. New Eng. Publ. Unit, Armidale, Australia.

Yoshikawa M, Morikawa T, Toguchida I, Harima S, Matsuda H., 2000. Inhibitors of nitric oxide production and absolute stereostructures of five new germacrane-type, sesquiterpenes, Kikkanols D.D, Monoacetate E.F and Monoacetate F from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L. *Chem Pharm Bull.* 48: 651-656.

Yuan Xianjun, Yu Chengqun, Shimojo M, Shao Tao., 2012. Improvement of fermentation and nutritive quality of straw-grass silage by inclusion of wet hulless-barley distillers grains in Tibet. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 25 (4): 479-485.

Liens Internet

<https://agriculture.gouv.fr/algerie> consulté le 09/05/2018

http://www.minagri.dz/pdf/BMI/ITELV/Bulletin_Infos_Elevage_n06.pdf consulté le 18/10/2017

<http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/counprof/algeria/algerie.htm#4> consulté le 18/10/2017

<https://www.mesbienfaits.com/plantes/chardon-marie-plante-medicinale/> consulté le 21/11 /2018

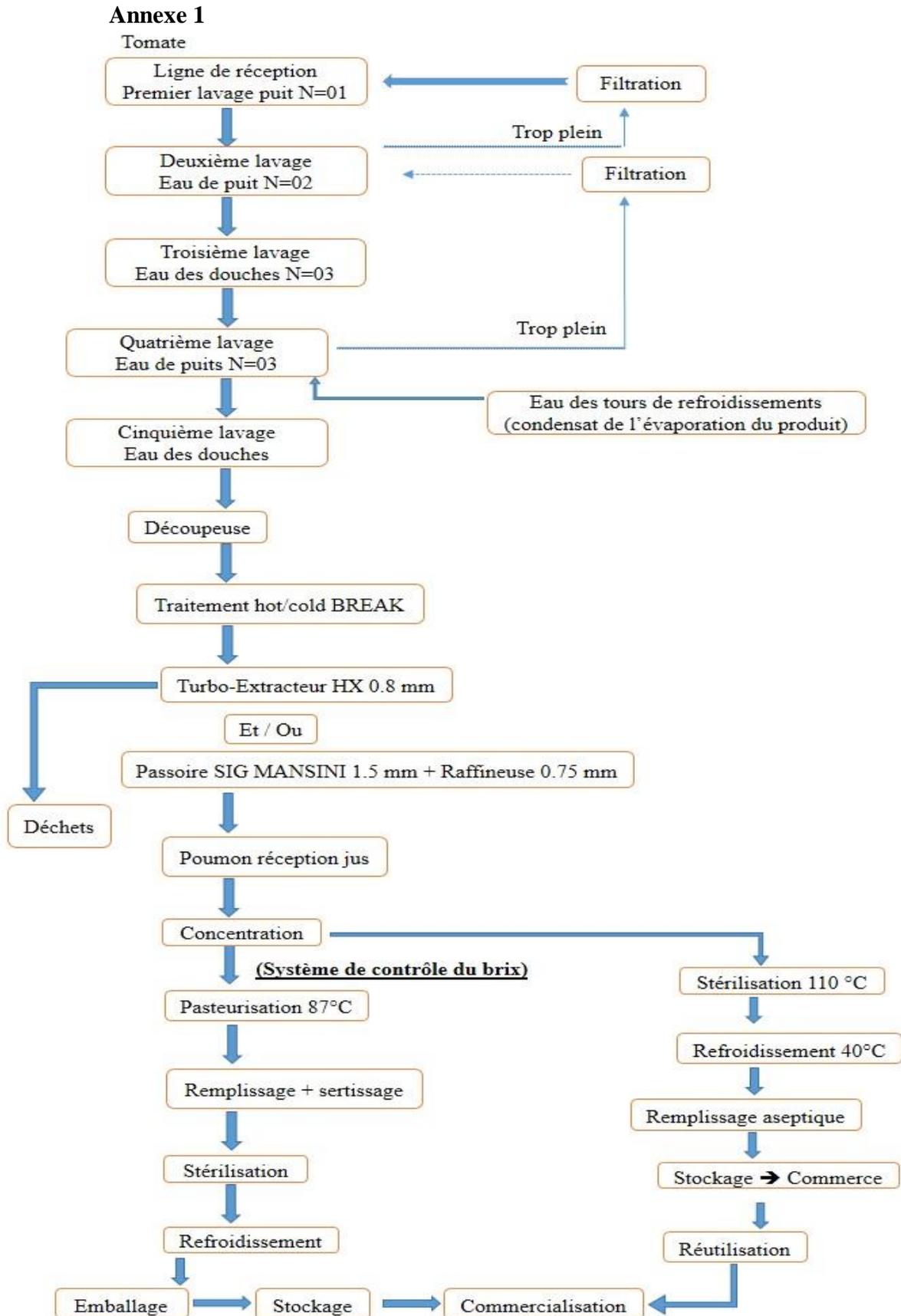


Figure 54 : diagramme de fabrication de conserve de tomate

Annexe 2

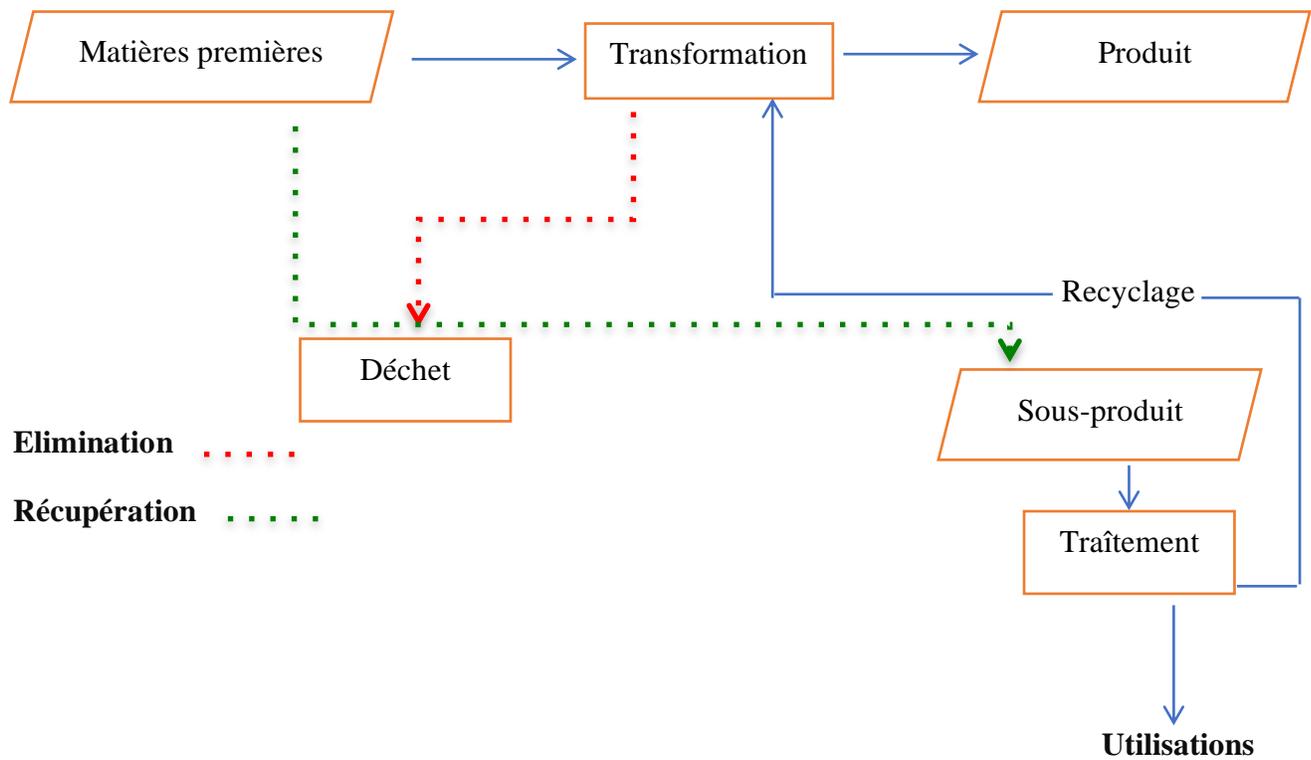


Figure 56 : Schéma illustrant la production de déchets et de sous-produits (Grigoras,2013)

Annexe 3

Matériel de fermentation

Les milieux d'incubation (A, B, C, D, E), substrats secs et moulus

5 fioles de stérilisation des milieux

Seringues en verre de 100 ml

Bouchons seringues

Pipettes graduées de 25 ml

Pinces tuyaux

Tuyaux de transfert

2 Thermos aseptisés

Spatule

Mousseline

Entonnoir

Bécher de 100 ml

Fiole de 50 ml, fiole de 100 ml

Embouts et micropipette de 1000 μ l

Eau distillée stérile

Papier aluminium et papier absorbant

Solution NaOH 5N

Solution NaOH 1 N

Solution HCl 5 N

Lames

Sachets de dégradabilités

Boîtes de Pétri en verre (MS du liquide ruminal)

Bain Marie à 39 °C

Flacons pour capacité tampon

Vaseline

Sabots de pesée en aluminium, balance de précision, étuve à 39 °C

Annexe 4

Tableau 6 : Composition, quantité pour 500 ml, mg d'azote par L de milieu, prix en euro par kg des milieux de fermentation simplifiés (expérience 1)

Source d'azote	Composition du milieu simplifié	Quantité pour 500 ml	mg d'azote par litre de milieu simplifié	Prix en euro par kg
Vel 1137 Ammonium hydrogénocarbonate Masse molaire : $79,0553 \pm 0,0023$ g/mol	NH_4HCO_3	628,0 mg	100 mg	24
	NaHCO_3	5 g		
	Eau distillée	*480 ml		
	Résazurine	0,62 ml		
	NaOH 1N	4 ml		
	Solution réductrice			
	$\text{Na}_2\text{S} \times 10 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g		
	Eau distillée	20 ml		
L-Glutamate-Na 1 H_2O Masse molaire : 188,13 g/mol (Merck)	NaHCO_3	5 g	100 mg	609
	Eau distillée	480 ml		
	Résazurine	0,62 ml		
	NaOH 1N	4 ml		
	Solution réductrice			
	$\text{Na}_2\text{S} \times 10 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g		
	Eau distillée	20 ml		

<p>Nitrate de potassium : Biochem chemopharma 316141000</p> <p>Masse molaire : 101,1 g/mol</p> <p>CAS: 7757_79_1</p> <p>EINELS:231_818_8</p> <p>Batch N°: B7757_79_1_0508_011</p>	KNO ₃	765,92 mg	100 mg	23,7
	NaHCO ₃	5 g		
	Eau distillée	480 ml		
	Résazurine	0,62 ml		
	NaOH 1N	4 ml		
	Solution réductrice			
	Na ₂ S ×10 H ₂ O	0,2 g		
<p>Extrait de levure: Fluka Biochemika (500 g)</p> <p>Lot and Filling code 1230367 44205070</p> <p>pH (2 % in water) 7,0 ± 0,2</p>	Eau distillée	20 ml	100 mg	276
	Extrait de levure	882,2 mg		
	NaHCO ₃	5 g		
	Eau distillée	480 ml		
	Résazurine	0,62 ml		
	NaOH 1N	4 ml		
	Solution réductrice			
	Na ₂ S ×10 H ₂ O	0,2 g		
	Eau distillée	20 ml		
<p>Témoin sans azote ajouté</p>	NaHCO ₃	5 g	0 mg	
	Eau distillée	480 ml		
	Résazurine	0,62 ml		
	NaOH 1N	4 ml		

	Solution réductrice			
	Na ₂ S ×10 H ₂ O	0,2 g		
	Eau distillée	20 ml		

- Si le milieu est réduit, remplacez 20 ml de solution réductrice par l'eau distillée

Tableau 7 : Composition des milieux d'incubation simplifiés (expérience 2)

Source d'azote	Composition du milieu simplifié	Quantité pour 1L	Quantité d'N par 1L de milieu	Prix en Euro par kg
N1: Témoin sans azote ajouté	NaHCO ₃ Eau distillée Résazurine NaOH 1N Solution réductrice Na ₂ S ×10 H ₂ O Eau distillée	10 g 920 ml 1,24 ml 8 ml 0,4 g 40 ml	0 mg	
N2: NH ₄ HCO ₃ (Bicarbonate d'ammonium) Azote minéral (NH ₄ ⁺) Sigma Aldrich	NH ₄ HCO ₃ NaHCO ₃ Eau distillée Résazurine NaOH 1N Solution réductrice Na ₂ S ×10 H ₂ O Eau distillée	564,97 mg 10 g 920 ml 1,24 ml 8 ml 0,4 g 40 ml	200 mg	24
N3: Na-glutamate Azote organique (sel d'acide aminé)	Na-glutamate NaHCO ₃ Eau distillée	1336,89 mg 10 g 920 ml	200 mg	609

Résazurine	1,24 ml		
NaOH 1N	8 ml		
Solution réductrice			
Na ₂ S × 10 H ₂ O	0,4 g		
Eau distillée	40 ml		

Annexe 5

Tableau 8 : solutions stocks

#	Stock	Concentration (M)	Poids acide (g)	Volume acide	
1	Acide acétique	1,0	6,00	5,742 ml	5 ml + 742 µl
2	Acide propionique	1,0	7,40	7,498 ml	7 ml + 498 µl
3	Acide isobutyrique	0,1	0,88	936,86 µl	930 µl + 6,86 µl
4	Acide butyrique	1,0	8,80	9,232 ml	9 ml + 232 µl
5	Acide isovalérique	0,1	1,02	1,115 ml	1 ml + 115 µl
6	Acide valérique	0,1	1,02	1,099 ml	1 ml + 99 µl
7	Acide capronique	0,05	0,58	629,72 µl	620 µl + 9,72 µl

Tableau 9: composition des solutions standards de l'HPLC

Stock solution	Solution standard							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	0 ml	0,5 ml	0,75 ml	1,0 ml	2,5 ml	5,0 ml	7,5 ml	10,0 ml
2	0 ml	0,5 ml	0,75 ml	1,0 ml	2,5 ml	5,0 ml	7,5 ml	10,0 ml
3	0 ml	0,5 ml	0,75 ml	1,0 ml	2,5 ml	5,0 ml	7,5 ml	10,0 ml
4	0 ml	0,5 ml	0,75 ml	1,0 ml	2,5 ml	5,0 ml	7,5 ml	10,0 ml
5	0 ml	0,5 ml	0,75 ml	1,0 ml	2,5 ml	5,0 ml	7,5 ml	10,0 ml
6	0 ml	0,5 ml	0,75 ml	1,0 ml	2,5 ml	5,0 ml	7,5 ml	10,0 ml
7	0 ml	1,0 ml	1,5 ml	2,0 ml	5,0 ml	10,0 ml	15,0 ml	20,0 ml
mM	0/ 0	5/ 0,5	7,5 / 0,75	10 / 1,0	25 / 2,5	50/ 5,0	75 / 7,5	100 / 10

** Refaire les solutions standards quand elles ne passent pas au test de qualité dans la feuille Excel des

Tableau 10 : composition des solutions de control de qualité pour le dosage des AGV

Solution stock	Solution standard		
	AGV CQ-élevé	AGV CQ-moyen	AGV CQ-bas
1	8,5 ml	4,0 ml	1,0 ml
2	8,5 ml	4,0 ml	1,0 ml
3	8,5 ml	4,0 ml	1,0 ml
4	8,5 ml	4,0 ml	1,0 ml
5	8,5 ml	4,0 ml	1,0 ml
6	8,5 ml	4,0 ml	1,0 ml
7	17,0 ml	8,0 ml	2,0 ml
mM	85 / 8,5	40 / 4,0	10 / 1,0

CQ : contrôle de qualité

Préparation de la solution d'acide crotonique 0,1 M

- Peser 0,86 g d'acide crotonique dans un flacon de 100 ml. Ajouter l'eau distillée et mélanger à température ambiante jusqu'à dissolution.
- Ajuster le volume final à 100 ml avec l'eau distillée, bien mélanger. Conserver à 4°C.

Préparation de l'acide métaphosphorique 25 % (précautions d'utilisation car risque de brulure)

- Peser 25 g de m-HPO₃ dans un flacon de 100 ml. Ajouter l'eau distillée et mélanger à température ambiante jusqu'à dissolution.
- Ajuster le volume final à 100 ml avec l'eau distillée, bien mélanger. Conserver à 4°C.

Préparation des courbes de standard, CQ, et les échantillons du Mix AGV

- Une portion de 1,0 ml de chaque standard (A jusqu'à H), CQ 9eleve, moyen, et bas en triplicata) et le mix AGV est transféré dans un flacon d'échantillonnage automatique.
- Ajouter 0,2 ml (200 µl) de m-HPO₃ 25 % suivie de 0,2 ml (200 µl) d'acide crotonique. Fermer et vortexer les tubes. Conserver à 4°C.

Préparation des échantillons

Le liquide ruminal ou extrait d'ensilage contiennent généralement 5 parties du liquide plus 1 partie de m-HPO₃ a 25 % bien homogénéisées et conservés à - 40°C. Les échantillons sont décongelés durant la nuit à 4°C (l'acide peut être ajouté juste à l'échantillon ou après décongélation).

Echantillons d'ensilage ou liquide ruminal et les standards du liquide ruminal !

- Remplir les tubes de micro-centrifugation avec l'échantillon en utilisant une pipette jetable (une nouvelle pour chaque échantillon). Fermer les tubes et faire tourner à 12000 tpm pendant 2 min dans la micro-centrifugeuse.
- Pipetter 750 µl (ou 1,2 ml) aliquote du surnageant dans un tube de micro-centrifugation étiqueté.
- Ajouter 125 µl (ou 200 µl) d'acide crotonique. Fermer les tubes vortexer et laisser-les à température ambiante pendant 30 minutes.
- Centrifuger à 12000 tpm pendant 10 minutes.
- En utilisant une pipette Pasteur prélever le surnageant dans un flacon d'échantillonnage automatique en prenant soin de ne pas y mettre le pellet. Si le surnageant apparait turbide la centrifugation doit être répétée.

Les blancs d'eau:

- 6 flacons d'échantillonnage automatiques sont remplis avec de l'eau distillée puis fermés. Ils sont utilisés pour baliser les trois sets des échantillons de CQ qui sont placés à parties égales dans les sets d'échantillons.

Annexe 6

Analyse des fibres NDF

Définition : cette méthode détermine la fibre insoluble dans le détergent neutre. Les résidus de fibres prédominants sont les hémicelluloses, la cellulose et la lignine.

Objectif :

Cette méthode est applicable aux graines, aliments, fourrages et tous les matériaux contenant des fibres.

Echantillons :

Ils doivent être séchés à 60 °C et moulus à travers 1 mm. Exécuter en duplicata. Faites une pré-extraction des échantillons contenant des produits de soybean ou > 5 % de gras : placez les sachets avec les échantillons dans un container fermé. Mettez assez d'acétone dans le container pour couvrir les sachets et sécuriser le dessus. Agiter le container 10 fois pour mouiller les sachets pendant 10 minutes. Répétez avec de l'acétone frais. Déversez l'acétone et placez les sachets sur un wire screen pour sécher à l'air libre.

Pesée des échantillons:

- 1- Etiquetez les sachets de filtration et enregistrez le poids, tarez.
- 2- Pesez 0,5 g (0,4995-0,5005) de l'échantillon et enregistrez le poids (duplicata).
- 3- Scellez les sachets avec un dispositif de thermoscellage en s'assurant que la fermeture est à 4 mm du bord ouvert. **laisser le sachet sur le dispositif pendant 1 minute avant de l'enlever et être sûr qu'il est bien scellé**

Procédure pour la nouvelle machine :

- 1- Placez 20 - 24 sachets dans le bag suspendre (Si vous analysez moins de 20 sachets, lisez la procédure originale de la procédure ANKOM pour les notes sur combien de solution NDF à utiliser).

****Placez trois sachets par plateau et tournez les de sorte que les encoches se verrouillent ensembles****

2- Allumez la machine

3- Sélectionnez l’NDF en utilisant les boutons fléchés.

4- Appuyez deux fois sur enter

5- Appuyez sur start

6- Ajoutez un peu plus de 2000 ml de solution NDF

****Remplissez avec la solution NDF jusqu’à ce que ça touche le laser pour commencer l’agitation****

7- Démarrez la minuterie pour 75 minutes (cette machine garde une trace du temps elle-même)

8- Ajoutez 4 ml de alpha amylase

9- Quand la température atteint 70 °C, ajoutez 20 g de sulfite de sodium.

10- Fermez le couvercle

11- Utilisez les pichets en métal au-dessus des extracteurs pour commencer le chauffage de l’eau de rinçage (eau distillée) pendant que vos échantillons sont en cours d’analyse (un pichet par rinçage et peut un extra au cas où).

12- la machine va vidanger dans son évier.

**** Ne soyez pas près de l’évier pendant qu’elle vidange car elle peut éclabousser****

13- Une fois que la machine dit rinçage, alors il est bon de l’ouvrir.

14- Ajoutez suffisamment d’eau de rinçage pour commencer l’agitation

15- Ajoutez 4 ml d’alpha amylase et démarrez le chronométrage pour 5 minutes

16- Assurez-vous de fermer le couvercle ou ça va déborder par bouillonnement

17- Après 5 minutes la machine va vidanger et répéter les étapes 12-15

18- Après 5 minutes la machine va vidanger et répéter les étapes 12-15 mais n'ajoutez pas l'alpha amylase (3 rinçages au total)

19- Vidangez et préparer le rinçage à l'acétone.

** cette machine va faire 4 rinçages alors éteignez la après le 3 ème**

Procédure de l'ancienne machine

1- Placez 20 - 24 sachets dans le bag suspendre (Si vous analysez moins de 20 sachets, lisez la procédure originale de la procédure ANKOM pour les notes sur combien de solution NDF à utiliser).

Placez trois sachets par plateau et tournez les de sorte que les encoches se verrouillent ensembles

** Assurez-vous que la soupape d'échappement est fermée avant d'ajouter la solution**

2- Ajoutez 2000 ml de solution NDF

3- Allumez l'agitation et le chauffage

4- Ajoutez 4 ml de alpha amylase

5- Démarrez la minuterie pour 75 minutes

6- Quand la température atteint 70 °C, ajoutez 20 g de sulfite de sodium.

7- Fermez le couvercle (assurez-vous que c'est fermé pour qu'il n'y ai pas fuite de la solution)

8- Utilisez les pichets en métal au-dessus des extracteurs pour commencer le chauffage de l'eau de rinçage (eau distillée) pendant que vos échantillons sont en cours d'analyse (un pichet par rinçage et peut un extra au cas où).

9- Après extraction, éteignez le chauffage et l'agitation.

10- Ouvrez la soupape d'échappement lentement, puis complètement avant d'ouvrir le couvercle (le contenu est sous pression)

- 11- Fermez la soupape d'échappement et ajoutez suffisamment d'eau de rinçage pour couvrir vos échantillons. Ajoutez 4 ml d'alpha amylase et agitez les échantillons pendant 5 minutes (le couvercle n'as pas besoin d'être fermé)
- 12- Vidangez l'eau de rinçage et répétez l'étape 11.
- 13- Vidanger l'eau de rinçage. Ajoutez suffisamment d'eau de rinçage pour couvrir vos échantillons (pas d'alpha amylase), rincez pendant 5 minutes.
- 14- Vidangez l'eau de rinçage (3 rinçages au total) et préparer le rinçage à l'acétone.

Le rinçage à l'acétone:

- 1- Enlevez les échantillons et placez-les dans une passoire, extirpez l'excès d'eau des échantillons
- 2- Placez les sachets dans un bécher de 500 ml (utilisez un poids pour les retenir) et couvrir avec l'acétone. Trempez pendant 3-5 minutes.
- 3- L'acétone utilisée doit être placé dans le container de déchet d'acétone. Extirpez l'excès d'acétone des sachets et séchez à l'air dans la hotte
- 4- Assurez-vous que l'acétone s'est évaporé (environs 30 minutes, dans la hotte) et placez les échantillons dans l'étuve a 105 ° C pendant 2-4 heures
- 5- Placez les échantillons dans le dessiccateur pendant environ 30 minutes avant de peser les échantillons séchés
- 6- Gardez vos échantillons pour une éventuelle analyse ADF.

** gardez les échantillons dans la même machine pour réduire la variabilité puisque nous avons des duplicata** (Eun, 2014)

Annexe 7

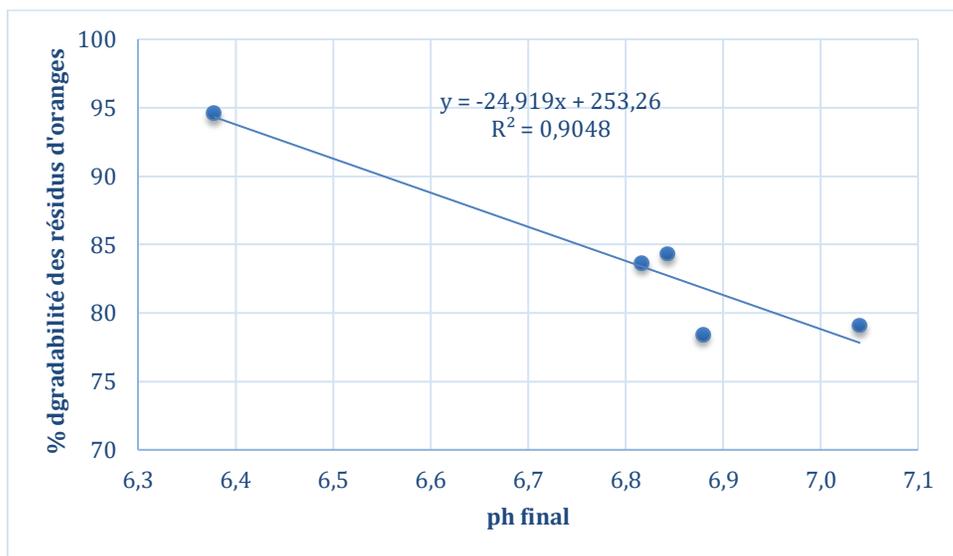


Figure 57 : courbe de corrélation entre la dégradabilité des résidus d'oranges et le pH final

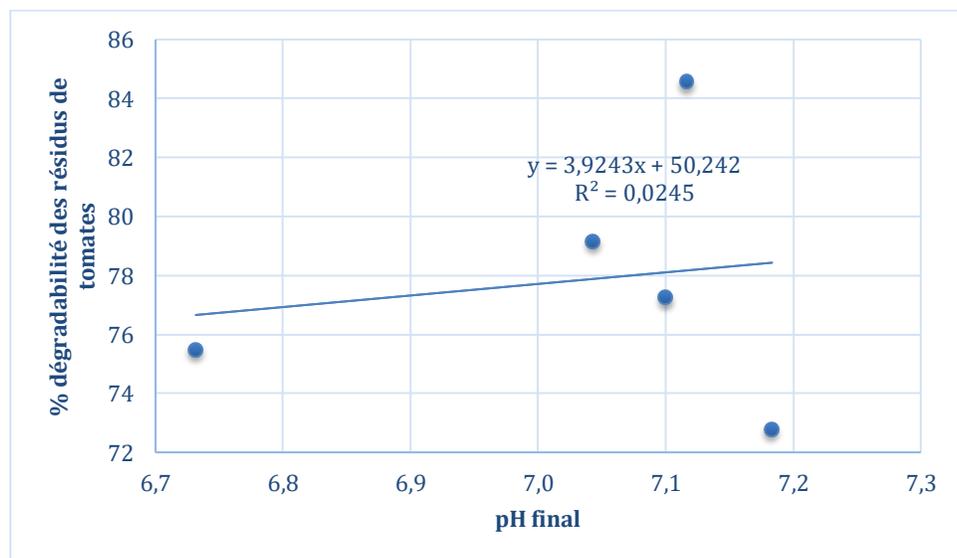


Figure 58 : courbe de corrélation entre la dégradabilité des résidus de tomates et le pH final

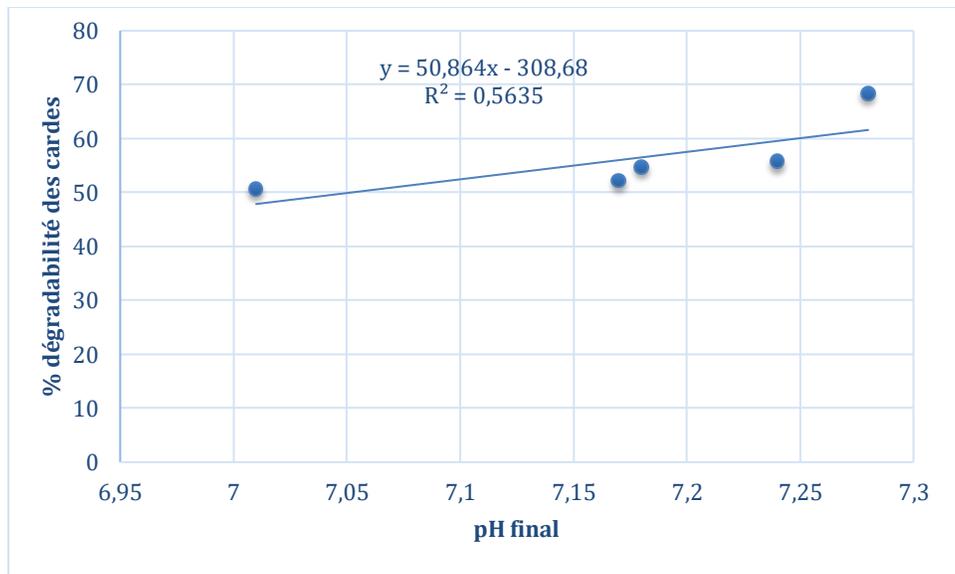


Figure 59 : courbe de corrélation entre la dégradabilité des cartes et le pH final

Effects of organic and inorganic nitrogen sources on in vitro degradability of citrus byproduct and milk thistle

Asma AGGOUN^{1*}, Mohamed Laid HADDI¹, Si-Yong YANG², Jong-Su EUN², Andrea SQUARTINI³

¹Department of Microbiology, University of Mentouri, Constantine, Algeria

²Department of Animal, Dairy, and Veterinary Sciences, Utah State University, Logan, Utah, USA

³Department of Agronomy, Food, Natural Resources, Animals, and Environment (DAFNAE), University of Padua, Legnaro, Padua, Italy

Received: 11.10.2017 • Accepted/Published Online: 20.01.2018 • Final Version: 16.02.2018

Abstract: In order to evaluate rumen microbial activity, the effects of two nitrogen sources (organic and inorganic) were analyzed in vitro by inoculating dairy cow rumen fluid and using citrus byproduct (CBP) and milk thistle (*Silybum marianum*, MT) as energy source substrates. The experimental design was 2 × 3 where we used three different nitrogen sources (N1: no nitrogen added, N2: ammonium bicarbonate, N3: sodium glutamate) with a basic concentration of nitrogen (100 mg/1 L). Culture pH, dry matter degradability %, ammonia-N (NH₃-N), total volatile fatty acids (TVFAs), individual volatile fatty acid proportions, and acetate propionate ratio (A:P) were measured after 24 h of fermentation. Culture pH values were in the optimal range with CBP and MT in all media. Supplementing nitrogen sources had similar tendencies to increase dry matter degradability (P < 0.01) and NH₃-N production in N2 and N3 with MT and CBP. Glutamate significantly (P < 0.01) increased TVFAs, which were twice as high than in N1 and N2 with MT. These results show that N supplementation had minor effects on in vitro rumen microbiota activity compared to N1; however, it could be proposed to improve microbial biomass production in mixed rations of agricultural byproducts with local forages.

Key words: Ammonia-N, citrus byproducts, milk thistle, nitrogen sources, volatile fatty acids

1. Introduction

Many countries in North Africa are trying to find a balanced diet in the ruminant nutrition field by considering animal needs. The lack of good quality forage resources is a major constraint to the development of livestock production. The use of agroindustrial byproducts or even herbaceous plants as complementary feedstuffs could be a sustainable solution. Algeria has many semiarid and arid lands, which affects and limits the livestock food. Moreover, there are some herbaceous plants like milk thistle (MT, *Silybum marianum* L.) Gaertn., which belongs to the family Asteraceae and has nutritional properties worthy of attention (1). It is distributed in the high steppe plateau, south of the Saharan Atlas, and in sandy pastures and low wet areas in Algeria (2). It is naturalized in the western United States, South Africa, and Australia (3), while in Italy it is mostly found in the south of the Tuscan region and Liguria, and sporadically in the Po valley (4).

Citrus byproduct (CBP) contains a high amount of energy, mainly as pectin, which is rapidly degradable (5), and it has been introduced in ruminant feed to replace

starch and corn. It is also known for its easily digestible neutral detergent fiber (NDF) fraction (6). One of the benefits of this byproduct as reported (7) is that there is no risk of acidosis, as acetic acid is the main end product from pectin fermentation rather than lactic acid (8).

In order to evaluate feedstuff degradability for ruminants, in vitro incubation is a widely recommended method, being cheaper and faster than in vivo methods (9). One major aspect in these techniques is the choice of the medium that plays the role of artificial saliva to provide the right environment for ruminal microorganism growth and metabolism. Ammonia is the most important nitrogen source used by rumen bacteria (10). Glutamine and glutamate are the most abundant amino acids in milk and play important roles in neonatal development and growth. It was reported that the minimum nitrogen concentration in the medium is 80 mg N/L according to Dryhurst and Wood (11). Starting from this, our experimental approach focused on the in vitro supplementation of ammonium bicarbonate and Na-glutamate as nitrogen sources for rumen microbiota to assimilate NH₃-N when fed with two

* Correspondence: aggoun.asma@gmail.com

substrates differing in their energy source contents: CBP and MT. The aim was to evaluate the effects of nitrogen sources on in vitro ruminal degradation of CBP and MT as energy sources.

2. Materials and methods

2.1. Plant material, inoculum, and nitrogen sources

The first substrate used was agricultural CBP (from orange juice production), mainly as an energy source. The second material tested was MT (*Silybum marianum*), a fibrous Mediterranean plant also used as energy source. Samples were ground to pass through a 1-mm screen (standard model 4; Arthur H. Thomas Co., Swedesboro, NJ, USA). The rumen fluid was taken from two Holstein cows surgically fitted with rumen cannulae in the morning of the incubation day. The pH was immediately measured and then the rumen fluid was put into prewarmed flasks and transported to the ruminant nutrition laboratory. Three different media were set up, containing two nitrogen sources: medium N2 (NH_4HCO_3 , ammonium bicarbonate, a mineral nitrogen source), medium N3 (Na-glutamate, an organic nitrogen source), and medium N1 (blank control with no nitrogen source).

2.2. Mixed rumen fermentation

The ground and dried substrates were weighed (700 mg of each) in ANKOM bags previously washed with acetone and dried and then sealed with a heat sealer and put into 100-mL rubber-capped bottles. The substrates were incubated for 24 h with 60 mL of incubation medium N1 consisting of 2.4 mL of rumen fluid, a reducing solution ($\text{Na}_2\text{S} \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ NaOH), resazurin, and sodium bicarbonate buffer (57.6 mL); moreover, medium N2 contained hydrogen carbonate ammonium (NH_4HCO_3) and medium N3 contained Na-glutamate as nitrogen sources in addition to what was mentioned for N1 as content. On the day of inoculation the reducing solution was prepared and 8 mL of 1 N NaOH was added to every medium. The two rumen fluid sources were mixed, filtered through 2 layers of cheese cloth, and added to each reduced medium under continuous flow of CO_2 . Then the mixture (60 mL) was transferred to bottles containing the substrates, which were placed in an oven at 39 °C for 24 h.

2.3. Chemical analysis

Following the AOAC methods (12), all feeds were analyzed in triplicate for dry matter (DM), organic matter (OM), ether extract (EE), and ash. Crude protein (CP) was determined by a macro-Kjeldahl method analyzer (Kjel-Foss Automatic, Model 16210, Foss Food Technology Corp., Hilleroed, Denmark). NDF content of feeds was determined according to Mertens (13). The amylase-treated NDF (aNDF) was measured by means of an ANKOM220 Fiber Analyzer (ANKOM Technology,

Macedon, NY, USA). Acid detergent fiber (ADF), inclusive of residual ash, was analyzed after NDF and finally acid detergent lignin (ADL) was measured by the method described by Robertson (14). Nonfiber carbohydrates (NFCs) were computed as $100 - \text{CP} - \text{NDF} - \text{EE} - \text{crude ash}$. After incubation, ANKOM bags were dried in an oven at 55 °C for 24 h and the weight loss was calculated. $\text{NH}_3\text{-N}$ ammonia was measured using the phenol/hypochlorite method of Weatherburn (15) utilizing a Dynatech MRX Microplate reader. To each sample, 1 mL of 1% H_2SO_4 was added, and then samples were stored at -40 °C. After thawing the samples at room temperature, they were diluted at the 1:6 ratio that is typical for rumen fluid. Volatile fatty acids (VFAs) were quantified, which included acetic, propionic, isobutyric, butyric, iso-valeric, valeric, and caproic acids, using a gas chromatograph (Model 5890, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) with a capillary column (30 m \times 0.32 mm i.d., 1 μm phase thickness, Zebtron ZB-FAAP, Phenomenex, Torrance, CA, USA) and flame-ionization detection. The oven temperature was 170 °C, held for 4 min, which was then increased by 5 °C/min to 185 °C and then by 3 °C/min to 220 °C and held at this temperature for 1 min. The injector temperature was 225 °C, the detector temperature was 225 °C, and the carrier gas was helium (16). To all samples, 1 mL of 25% m- HPO_3 was added, and they were subsequently stored at -40 °C.

2.4. Statistical analysis

The chemical composition of substrates was indicated by standard deviation. One-way ANOVA was used to compare the means and the classification of fermentation parameters was done by Student–Newman–Keuls post hoc test for $P < 0.05$ using SAS 9.4 (17).

3. Results

Table 1 shows the composition of MT and CBP (% DM basis). MT was higher in NDF and ADF (68.79% compared to 15.67% and 52.37% compared to 11.72% DM, respectively), while it was lower in CP and NFC in comparison with the CBP (4.32 versus 5.75 and 13.25 versus 75.33 g/kg DM). Total sugars content was higher in CBP (48.26% DM) than in MT (8.5% DM).

The results obtained from the batch culture of CBP are shown in Table 2. The N3 medium significantly ($P < 0.01$) decreased the pH after 24 h of incubation compared to the control. DM degradability and total VFA concentrations increased significantly ($P < 0.01$) in the N3 medium compared to the control, N1. The concentration of $\text{NH}_3\text{-N}$ was consistently higher ($P < 0.05$) for the organic nitrogen-supplemented medium than the inorganic nitrogen-supplemented one (13.6 vs 5.23 mg/100 mL). The three main VFAs, acetate, propionate, and butyrate, followed the same tendency with all media: the acetate proportion was

Table 1. Chemical composition (% DM) of the substrates (n = 2).

Item ¹	Milk thistle	Citrus byproduct
DM, %	88.1 ± 0.12	89.0 ± 0.21
OM	87.0 ± 0.02	97.4 ± 0.04
CP	4.32 ± 0.318	5.75 ± 0.153
NDF	68.8 ± 0.78	15.7 ± 0.09
ADF	52.4 ± 0.02	11.7 ± 0.13
ADL	8.56 ± 0.086	ND ³
AIA	0.19 ± 0.015	ND
EE	0.62 ± 0.002	0.60 ± 0.007
CF	45.4 ± 0.29	10.4 ± 0.35
NFC ²	13.25 ± 1.13	75.33 ± 0.28

¹DM = Dry matter; NDF = neutral detergent fiber; CP = crude protein; OM = organic matter; ADF = acid detergent fiber; ADL = acid detergent lignin; AIA = acid insoluble ash; EE = ether extract; CF = crude fiber.

²Nonfiber carbohydrates = 100 - CP - NDF - EE - crude ash.

³Not determined.

Table 2. Ruminal fermentation characteristics in batch culture with citrus byproduct (24 h).

Item	Nitrogen sources ¹			SEM	P-value
	N1	N2	N3		
Culture pH	6.61 ^a	6.57 ^a	6.47 ^b	0.021	<0.01
DM degradability, %	59.8 ^b	64.5 ^a	64.4 ^a	0.83	<0.01
NH ₃ -N, ² mg/100 mL	0.003 ^c	5.23 ^b	13.6 ^a	1.720	<0.01
Total VFAs, mM	49.6 ^b	40.2 ^b	66.7 ^a	4.21	0.01
Individual VFAs, mol/100 mol					
Acetate (A)	56.7 ^a	40.0 ^a	48.0 ^{ab}	2.60	0.01
Propionate (P)	27.4 ^b	35.0 ^a	28.1 ^b	1.34	0.02
Butyrate	11.5 ^b	17.9 ^a	16.5 ^a	1.01	<0.01
Valerate	2.72 ^b	4.73 ^a	3.42 ^b	0.316	0.01
Isobutyrate (IB)	0.61 ^c	0.84 ^b	1.16 ^a	0.079	<0.01
Isovalerate (IV)	0.96 ^b	1.26 ^b	2.29 ^a	0.182	<0.01
IB + IV	1.57 ^b	2.10 ^b	3.45 ^a	0.258	<0.01
A:P	2.07 ^a	1.14 ^b	1.81 ^a	0.161	0.03

^{a-c}Means within a row with different superscripts differ significantly (P < 0.05).

¹N1 = No nitrogen added (control); N2 = ammonium bicarbonate; N3 = Na-glutamate.

²NH₃-N = ammonia-N.

always higher than that of propionate, followed by butyrate. Interestingly, the propionate proportion was significantly ($P < 0.02$) higher in the N2 medium compared to N1 and N3.

Table 3 provides the results obtained from the ruminal fermentation experiment *in vitro* with MT after 24 h. The present study found that TVFA, DM degradability, and propionate followed the same trend with both N-supplemented media; they significantly ($P < 0.01$) increased compared to the control, N1. The ammonia nitrogen produced showed statistically different results ($P < 0.01$). Another important finding was that the acetate propionate ratio decreased significantly ($P < 0.01$) when supplementing nitrogen sources.

As Table 4 shows, the two substrates were significantly different in all metabolic parameters when the nitrogen source was ammonium bicarbonate (N2).

4. Discussion

In our study, we incubated CBP and MT as energy and nitrogen sources in supplemented media with inorganic nitrogen and organic nitrogen sources. A recent study by Peixoto et al. (18) reported higher values for CP (6.0), NDF (18.3), and ADF (13.7% DM) in citrus pulp, whereas the OM content of our CBP was higher than that reported

by Miron et al. (6), 91.2% DM. In earlier research both the NRC (19) and Miron et al. (6) found different contents of CP (6.9%, 6.70%), NDF (24%, 21.6%), and ADF (22.2%, 21.2%) in % DM basis. CBP contains 25.0% DM in pectin content, which is higher than reported by Bampidis and Robinson (7) at 22.3% and Miron et al. (6) at 20.7% DM. Taglipietra et al. (20) reported that the nitrate-N content in MT was at a safe level as a forage (305 mg/kg DM), while CBP had no nitrate-N. The different compositions of CBP in previous reports could be explained by the environmental and climatic conditions of the citrus harvest. On the other hand, MT and CBP are two distinct substrates; while CBP is rich in soluble sugars and pectin, MT is a poor quality forage rich in fiber.

In Tables 2 and 3, pH values are in the optimal range of 6 to 7 according to Thivend et al. (21). As can be seen from Table 2, supplementation of an organic nitrogen source led to a significant ($P < 0.01$) increase in DM degradability and TVFAs while pH decreased significantly ($P < 0.01$) with N3 compared to N1, which may be explained by the improved rumen bacterial activity (cellulolytic and proteolytic ammonia-producing bacteria and VFAs) in the presence of ammonia (besides VFAs and peptides as growth factors).

Table 3. Ruminal fermentation characteristics in batch culture with milk thistle (24 h).

Item	Nitrogen sources ¹			SEM	P-value
	N1	N2	N3		
Culture pH	7.03 ^a	6.89 ^b	6.82 ^c	0.027	<0.01
DM degradability, %	24.7 ^c	30.6 ^b	34.9 ^a	1.35	<0.01
NH ₃ -N, ² mg/100 mL	3.07 ^c	9.88 ^b	18.6 ^a	1.963	<0.01
Total VFAs, mM	29.8 ^b	32.7 ^b	66.9 ^a	5.12	<0.01
Individual VFAs, mol/100 mol					
Acetate (A)	71.1 ^a	68.2 ^b	63.7 ^c	0.97	<0.01
Propionate (P)	13.0 ^b	17.6 ^a	17.9 ^a	0.72	<0.01
Butyrate	8.29	8.95	12.2	0.53	0.32
Valerate	2.04	1.75	1.70	0.094	0.32
Isobutyrate (IB)	1.80 ^a	1.07 ^c	1.40 ^b	0.103	<0.01
Isovalerate (IV)	3.05 ^a	2.07 ^b	2.76 ^a	0.148	<0.01
IB + IV	4.84 ^a	3.14 ^b	4.16 ^a	0.245	<0.01
A:P	5.51 ^a	3.88 ^b	3.55 ^b	0.271	<0.01

^{a-c}Means within a row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

¹N1 = No nitrogen added (control); N2 = ammonium bicarbonate; N3 = Na-glutamate.

²NH₃-N = ammonia-N.

Table 4. Comparison of metabolic characteristics between milk thistle and citrus byproduct.

Item	Nitrogen sources ¹		
	N1	N2	N3
	P-value	P-value	P-value
Culture pH	<0.0001	<0.0001	<0.0001
DM degradability, %	<0.0001	<0.0001	<0.0001
NH ₃ -N, ² mg/100 mL	<0.0001	<0.0001	0.02
Total VFA, mM	<0.0001	0.0136	0.98
Individual VFA, mol/100 mol			
Acetate (A)	0.0001	<0.0001	0.02
Propionate (P)	<0.0001	<0.0001	0.01
Butyrate	0.02	<0.0001	0.04
Valerate	0.27	<0.0001	0.004
Isobutyrate (IB)	0.0005	<0.0001	0.10
Isovalerate (IV)	0.0002	<0.0001	0.04
IB + IV	0.0002	<0.0001	0.06
A:P	<0.0001	<0.0001	0.003

¹N1 = No nitrogen added (control); N2 = ammonium bicarbonate; N3 = Na-glutamate.

²NH₃-N = ammonia-N.

The tendency of increased NH₃-N was presumably linked to the degradation of proteins by proteolytic enzymes and the deamination of amino acids into extracellular NH₃ plus VFAs and gas production (22). Blümmel and Lebzién (23) reported that supplementing N in the fermentation medium increased SCFA production with all diets tested (even or equal parts of roughage and concentrates). As mentioned earlier, supplementation with ammonia enhances the activity of cellulolytic bacteria, which after fermentation of cell wall constituents produces VFAs and gases (mainly CO₂ and CH₄) (22). Grings et al. (24) reported similar results for acetate percentage of total SCFAs, which increased in the N-rich medium (ammonium bicarbonate), and, as concluded by Blümmel et al. (25), molar production of VFAs depends on the nature of the feed. With the N2 medium, propionate production was associated with the buffering of SCFAs with ammonium bicarbonate (in addition to sodium bicarbonate) to release CO₂ (26).

Turning now to the experiment with MT in Table 3, these findings further support the idea of Maeng et al. (27), who reported that replacement of a source of nonprotein nitrogen (NPN, in our experiment replacing N2 by

N3) like urea with 18 amino acids increased substrate disappearance. Moreover, they noted an increase in microbial dry matter, RNA, and DNA, which was a sign of higher fermentation rates to increase intake of low energy rations, like in this study, where MT could be used as potential feedstuff (13.25 NFC% DM) for the ruminant.

With the presence of the NPN source in the N2 medium (NH₄HCO₃), only 9.88 mg/100 mL of NH₃-N was released with little VFA production at 32.7 mM compared to the control, N1, at 29.8 mM. On the other hand, double the NH₃-N was released with the N3 medium (organic nitrogen) (18.6 mg/100 mL). These findings could be explained by the limited microbial growth by N, which resulted in an energetic uncoupling (28) where there was an increase in TVFA production in N2.

The highest acetate proportion remained in the control medium (71.1 mol/100 mol) and was significantly different ($P < 0.01$) from N2 and N3 (68.2 and 63.7 mol/100 mol, respectively). The acetate production came from the degradation of the cell wall (NDF fraction in MT) (29), which the rumen bacteria used as the main source of energy and protein in the absence of other supplemented nitrogen sources.

This findings of the present study were consistent with those of Kajikawa et al, (30), who found that incubating individual amino acids caused a positive effect on the growth rate of mixed ruminal bacteria with glutamic acid and glutamine ($P < 0.01$) compared to the control, where ammonium sulfate was added as a nitrogen source.

Comparing the two substrates in Table 4, the DM degradability of CBP was significantly higher ($P < 0.001$) than that of MT, along with pH, TVFAs, propionate, and valerate proportions. With the N1 and N2 media all results were different, which was likely due to the chemical composition of the two substrates, a concentrate feedstuff and a fibrous plant. The latter has low DM degradability (29% approximately) compared to CBP (62% approximately).

In conclusion, the present study was designed to determine the effects of organic and inorganic nitrogen sources on the in vitro degradation of MT and CBP through the analysis of fermentation parameters. There was stable pH in the average optimal physiological conditions in the

rumen even though CBP is high in soluble carbohydrates. Using feeds of this composition, there would be no risk of acidosis in spite of the fact that TVFA production increased significantly with both substrates, CBP and MT. However, $\text{NH}_3\text{-N}$ increased above the optimal values. This is an important issue for future research, suggesting that the same experiments should be performed with mixtures of conventional feedstuff like oats and barley in all forms, which are the main forage corps in Algeria, plus CBP, with caution for the CP optimal concentration to maximize microbial biomass production and consequently microbial protein synthesis. Strong evidence is presented that MT degradability is an asset for future trials with this endemic forage in ruminant diets.

Acknowledgment

The assistance of Franco Tagliapietra, Il Dong, Sara Sharp, Sydney Blaser, and Cody McCary and their support of this project is acknowledged.

References

- Palomino O. Assessment Report on *Silybum marianum* (L.) Gaertn., Fructus. London, UK: European Medicines Agency; 2015.
- Quézel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale, Tome II. Paris, France: Centre National de la Recherche Scientifique; 1963 (in French).
- Sindel BM. A review of the ecology and control of thistles in Australia. *Weed Res* 1991; 31: 189-201.
- Martini V. Cinetica di degradazione microbica di residui agro-industriali mediante tecnica GP (gas production). Thesis, University of Padua, Padua, Italy, 2009 (in Italian).
- Strobel HJ, Russell JB. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. *J Dairy Sci* 1986; 69: 2941-2947.
- Miron J, Yosef E, Ben-Ghedalia D. Composition and in vitro digestibility of monosaccharide constituents of selected byproduct feeds. *J Agr Food Chem* 2001; 49: 2322-2326.
- Bampidis VA, Robinson PH. Citrus by-products as ruminant feeds: a review. *Anim Feed Sci Tech* 2006; 128: 175-217.
- Wing JM, Van Horn HH, Sklare SD, Harris B Jr. Effects of citrus molasses, distillers solubles and molasses on rumen parameters and lactation. *J Dairy Sci* 1988; 71: 414-420.
- Getachew G, Blümmel M, Makkar HPS, Becker K. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim Feed Sci Tech* 1998; 72: 261-281.
- Leng RA, Nolan JV. Nitrogen metabolism in the rumen. *J Dairy Sci* 1984; 67: 1072-1089.
- Dryhurst N, Wood CD. The effect of nitrogen source and concentration on in vitro gas production using rumen micro-organisms. *Anim Feed Sci Tech* 1998; 71: 131-143.
- AOAC. Official Methods of Analysis. 17th ed. Gaithersburg, MD, USA: Association of Official Agricultural Chemists; 2003.
- Mertens DR. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *J AOAC Int* 2002; 85: 1217-1240.
- Robertson JB. The detergent system of fiber analysis. In: Spiller GA, editor. *Topics in Dietary Fiber Research*. New York, NY, USA: Plenum Press; 1978. pp. 18-32.
- Weatherburn MW. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem* 1967; 39: 971-974.
- Eun JS, Beauchemin KA. Enhancing in vitro degradation of alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. *J Dairy Sci* 2007; 90: 2839-2851.
- SAS Inc. SAS Statistic Software. Cary, NC, USA: SAS; 2007.
- Peixoto ELT, Morenz MJF, Da Fonseca CEM, Dos Santos Moura E, De Lima KR, Lopes FCF, Da Silva Cabral L. Citrus pulp in lamb diets: intake, digestibility, and ruminal parameters. *Semina Ciências Agrárias Londrina* 2015; 36: 3421-3430.
- NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle: 7th Revised Edition. Washington, DC, USA: National Academic Press; 2001.
- Tagliapietra F, Cattani M, Guadagnin M, Haddi ML, Sulas L, Muresu R, Squartini A, Schiavon S, Bailoni L. Associative effects of poor-quality forages combined with food industry byproducts determined in vitro with an automated gas-production system. *Anim Prod Sci* 2015; 55: 1117-1122.

21. Thivend P, Fonty G, Jouany JP, Durand M, Gouet P. Le fermenteur rumen. *Reproduction, Nutrition et Développement* 1985; 25: 729-753 (in French).
22. Hungate RE. *The Rumen and its Microbes*. New York, NY, USA: Academic Press; 1966.
23. Blümmel M, Lebzien P. Predicting ruminal microbial efficiencies of dairy rations by in vitro techniques. *Livestock Prod Sci* 2001; 68: 107-117.
24. Grings EE, Blümmel M, Sudekum KH. Methodological considerations in using gas production techniques for estimating ruminal microbial efficiencies for silage-based diets. *Anim Feed Sci Tech* 2005; 123-124: 527-545.
25. Blümmel M, Aiple KP, Steingäß H, Becker K. A note on the stoichiometrical relationship of short chain fatty acid production and gas formation *in vitro* in feedstuffs of widely differing quality. *J Anim Physiol An N* 1999; 81: 157-167.
26. Blümmel M, Orskov ER. Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim Feed Sci Tech* 1993; 40: 109-119.
27. Maeng WJ, Van Nevel CJ, Baldwin RL, Morris JG. Rumen microbial growth rates and yields: effect of amino acids and protein. *J Dairy Sci* 1976; 59: 86-79.
28. Russell JB, Cook GM. Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol Rev* 1995; 59: 48-62.
29. Tamminga S, Hof G. Feeding system for dairy cows. In: Theodorou MK, France J, editors. *Feeding Systems and Feed Evaluation Models*. Wallingford, UK: CAB International; 2000. pp. 109-123.
30. Kajikawa H, Mitsumori M, Ohmomo S. Stimulatory and inhibitory effects of protein amino acids on growth rate and efficiency of mixed ruminal bacteria. *J Dairy Sci* 2002; 58: 2015-2022.

Résumé

Cinq milieux de fermentations simplifiés ont été utilisés dans ce travail. Il s'agit du milieu de source d'azote inorganique (bicarbonate d'ammonium) ; le milieu de source d'azote organique (glutamate de sodium) ; le milieu de source d'azote inorganique (nitrate de potassium) ; le milieu de source d'azote organique (extrait de levure) et le milieu sans azote ajouté (témoin). En plus des bicarbonates de sodium comme tampon principal dans tous les milieux. Ceci afin de mesurer la fermentescibilité *in vitro* de quatre substrats : résidus d'oranges, résidus de tomates, cardes (*Silybum marianum*) et chrysanthèmes (*Chrysanthemum coronarium*) par la microflore ruminale bovine.

Lors d'une première expérience, nous avons évalué la composition chimique des substrats tel que : la matière sèche, matière organique, matière minérale, protéines brutes, composants de la paroi végétale, sucres totaux. Ainsi que les profils de fermentation de 120 h des substrats cités précédemment. Tandis que lors d'une seconde expérience, nous avons analysé la dégradabilité de la matière sèche, de la fraction insoluble dans le détergent neutre, le taux d'azote ammoniacal et la production d'acides gras volatils après une fermentation de 24 h des résidus d'oranges et des cardes dans les milieux N1 (sans azote), N2 (bicarbonate d'ammonium comme source d'azote inorganique) et N3 (glutamate de sodium comme source d'azote organique).

Ainsi la composition chimique montre que les résidus de tomates contiennent la plus forte teneur en protéines brutes ($9,03 \pm 0,9$ % MS) et la plus faible teneur a été enregistrée chez les chrysanthèmes ($2,43 \pm 0,15$ % MS). De plus, les plantes contiennent des valeurs supérieures en fibres insoluble dans le détergent neutre par rapports aux résidus agroalimentaires, nous avons noté $78,98 \pm 0,33$ % MS chez les chrysanthèmes et $68,8 \pm 0,78$ % MS chez les cardes alors que les résidus d'oranges contiennent $15,7 \pm 0,09$ % MS et les résidus de tomates $33,09 \pm 0,35$ % MS. Les résidus d'oranges et les résidus de tomates contiennent plus de sucres totaux ($40,07 \pm 4,69$ et $28,49 \pm 5,5$ % MS respectivement) que les plantes fibreuses ($8,42 \pm 1,53$ et $12,73 \pm 4,75$ % MS chez les cardes et les chrysanthèmes respectivement).

Après 120 h de fermentation, le pH final des mélanges (substrat + milieu simplifié) est dans l'intervalle optimale 6,38 – 7,28. Les résidus de tomates et les cardes ont une fermentescibilité

plus élevée significativement ($p < 0,05$) dans les milieux contenant une source d'azote organique ; autrement dit le milieu au glutamate de sodium et le milieu à l'extrait de levure.

La dégradabilité des résidus d'oranges et des résidus de tomates est plus élevée que celle des cardes et chrysanthèmes dans tous les milieux simplifiés à cause de leur composition chimique où il y a une forte teneur en hydrates de carbone non fibreux et faible en fibres, ce qui a permis aux bactéries du rumen de facilement et rapidement dégrader les résidus agro-alimentaires. Toutefois, nous observons que les résidus d'oranges sont statistiquement ($p < 0,05$) les plus favorables à la dégradation dans tous les milieux comparés aux autres substrats. L'analyse de la fermentation *in vitro* des substrats est similaire avec les deux modèles statistiques, mais il est conseillé d'utiliser le modèle logistique qui est plus proche des résultats expérimentaux.

D'après les résultats de la seconde expérience, les résidus d'oranges et les cardes sont favorables pour les ruminants et ne causeront aucun risque d'acidose en dépit de la production élevée des acides gras volatils dans le milieu N3 (glutamate de sodium) par rapport au contrôle N1.

Mots clés : résidus agro-alimentaires, microflore ruminale, source d'azote, chrysanthèmes, cardes.

Abstract

Five fermentation media supplemented with different nitrogen sources have been used in this work in order to study their effect on the fermentation of two by products from the agri-food industry and two fibrous plants. The first medium is a simplified medium that contains ammonium bicarbonate (source of inorganic nitrogen); the second medium contains sodium glutamate (source of organic nitrogen); the third medium contains potassium nitrate (source of inorganic nitrogen), the fourth medium contains yeast extract (source of organic nitrogen) and the fifth medium is a control without nitrogen. In addition to sodium bicarbonates as the main buffer in all media. Our objective is to measure the *in vitro* fermentability of four substrates: orange residues, tomato residues, milk thistle (*Silybum marianum*) and chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) by the bacterial microbiota of dairy cows.

In a first experiment, we evaluated the chemical composition of the four substrates such as: dry matter, organic matter, mineral matter, crude protein, plant wall components, total sugars. As well as the fermentation profiles during 120 h long. While in a second experiment, we analyzed the degradability of dry matter, the degradability of neutral detergent fiber fraction, the production of ammonia nitrogen and the production of volatile fatty acids after a 24-hour incubation of orange residues and milk thistle in three different media from the nitrogen source, the first one is used as a control N1 (without nitrogen), the second medium contains ammonium bicarbonate, N2 and the third medium contains sodium glutamate, N3.

Thus the chemical composition shows that tomato residues contain the highest crude protein content ($9,03 \pm 0,9$ % DM) and the lowest amount was recorded in chrysanthemum ($2,43 \pm 0,15$ % DM). In addition, the plants contain higher values in NDF compared to by products, we observed $78,98 \pm 0,33$ % DM in chrysanthemum and $68,8 \pm 0,78$ % DM in milk thistle while in orange residues it was $15,7 \pm 0,09$ % DM and tomato residues $33,09 \pm 0,35$ % DM. The orange residues and tomato residues have more total sugars ($40,07 \pm 4,69$ and $28,49 \pm 5,5$ % DM, respectively) than fibrous plants ($8,42 \pm 1,53$ and $12,73 \pm 4,75$ % DM in milk thistle and chrysanthemum respectively).

After 120 h of fermentation, the final pH of mixtures (substrate + incubation medium) is in the optimal range 6,38-7,28. Tomato residues and milk thistle have the significantly ($p < 0,05$) highest

fermentability in the media containing an organic nitrogen source: sodium glutamate and yeast extract.

The degradability of orange residues and tomato residues is higher than the degradability of milk thistle and chrysanthemum in all media because of their chemical composition where there is a high content of non fibrous carbohydrates and low fiber content, which allowed rumen bacteria to easily and rapidly degrade by products. However, we notice that orange residues are statistically ($p < 0,05$) most favorable for degradation in all media compared to other substrates. *In vitro* fermentation analysis of substrates is similar with both statistical models, but it is advisable to use the logistic model which is closer to the experimental results.

According to the results of the second experiment, orange residues and milk thistle are favorable for ruminants and will not cause any risk of acidosis despite the high production of volatile fatty acids in N3 media (sodium glutamate) relative to the control N1.

Key words: agri-food by product, ruminal microflora, nitrogen source, chrysanthemum, milk thistle.

ملخص

تم استخدام خمسة وسائل تخمير مبسطة في هذا العمل. الوسط الأول مصدر نيتروجين غير عضوي (بيكربونات الأمونيوم)، الوسط الثاني مصدر نيتروجين عضوي (غلوتامات الصوديوم)، الوسط الثالث مصدر نيتروجين غير عضوي (نترات البوتاسيوم)، الوسط الرابع مصدر نيتروجين عضوي (مستخلص الخميرة)، الوسط الخامس دون نيتروجين مضاف كشاهد. بالإضافة إلى بيكربونات الصوديوم كمحلول منظم للأس الهيدروجيني الأساسي. الهدف هو قياس تحلل خلال حضانة في المختبر لأربعة مواد: بقايا البرتقال، بقايا الطماطم، السلبين المريمي (*Silybum marianum*)، الأقحوان (*Chrynsathemum coronarium*) من طرف بكتيريا الكرش البقري.

في التجربة الأولى قمنا بتقييم التركيبة الكيميائية للمواد الأربعة مثل: المادة الجافة، المادة العضوية، المادة المعدنية، البروتين الخام، مكونات الجدار الخلوي، السكريات الكلية. فضلا عن تخمر المواد المذكورة أعلاه مدة 120 ساعة. بينما في تجربة ثانية، قمنا بدراسة تحلل المادة الجافة، وجزء الألياف غير القابلة للذوبان في المنظفات المحايدة، و محتوى نيتروجين الأمونيا و إنتاج الأحماض الدهنية المتطايرة بعد تخمر 24 ساعة من بقايا البرتقال و السلبين المريمي في وسائط N1 (دون نيتروجين)، N2 (بيكربونات الأمونيوم كمصدر للنيتروجين)، N3 (غلوتامات الصوديوم مصدر للنيتروجين).

تظهر التركيبة الكيميائية أن مخلفات الطماطم تحتوي على أعلى محتوى بروتين خام (مادة جافة % $9,03 \pm 0,9$) وسجلت أدنى نسبة في الأقحوان (مادة جافة % $2,43 \pm 0,15$). بالإضافة إلى ذلك، تحتوي النباتات على قيم أعلى في NDF مقارنة مع مخلفات الأغذية الزراعية، وسجلنا مادة جافة % $78,98 \pm 0,33$ في الأقحوان ومادة جافة % $68,8 \pm 0,78$ في السلبين المريمي بينما بقايا البرتقال تحتوي على مادة جافة % $15,7 \pm 0,09$ وبقايا الطماطم على مادة جافة % $33,09 \pm 0,35$. تحتوي بقايا البرتقال وبقايا الطماطم على كميات أكبر من السكريات (مادة جافة % $40,07 \pm 4,69$ and $28,49 \pm 5,5$) مقارنة بالنباتات في السلبين المريمي والأقحوان (مادة جافة % $8,42 \pm 1,53$ and $12,73 \pm 4,75$) على التوالي.

بعد 120 ساعة تخمر، درجة الحموضة النهائية للمخاليط (ركازة + وسط)، في النطاق الأمثل 6,38-7,28. كانت بقايا الطماطم و السلبين المريمي ذات كفاءة أكبر ($p < 0,05$) في التخمر في الوسط الذي يحتوي على مصدر النيتروجين العضوي، بعبارة أخرى وسط غلوتامات الصوديوم و وسط مستخلص الخميرة.

ان تحلل بقايا البرتقال وبقايا الطماطم أعلى من السلبين المريمي والأقحوان في جميع الوسائط المبسطة بسبب تركيبها الكيميائية التي يوجد فيها تركيز عالي من ومنخفضة في الألياف، والتي سمحت لبكتيريا الكرش بتحليل سريع وسهل لبقايا الأغذية الزراعية. ومع ذلك نلاحظ أن بقايا البرتقال هي إحصائيا ($p < 0,05$) الأكثر ملائمة للتحلل في جميع الأوساط مقارنة

مع الركائز الأخرى. يتشابه تحليل التخمر المخبري مع كلا النموذجين الإحصائيين، ولكن من المستحسن استخدام النموذج اللوجستي الأقرب إلى النتائج التجريبية.

ووفقا لنتائج التجربة الثانية، فإن مخلفات البرتقال والسلبين المريمي ملائمة للمجترات ولا تسبب أي خطر حماض بالرغم من الإنتاج المرتفع للأحماض الدهنية المتطايرة في N3 (غلوتامات الصوديوم) ومقارنة مع N1.

الكلمات المفتاحية: بقايا الأغذية الزراعية، ميكروفلورا الكرش، مصدر النيتروجين، الأبقان، السلبين المريمي.

Intitulé Etude des cinétiques de dégradation des résidus agro-alimentaires par la flore bactérienne ruminale, *in vitro*, en présence de différentes sources d'azote

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat

Résumé

Cinq milieux de fermentations simplifiés ont été utilisés dans ce travail. Il s'agit du milieu de source d'azote inorganique (bicarbonate d'ammonium) ; le milieu de source d'azote organique (glutamate de sodium) ; le milieu de source d'azote inorganique (nitrate de potassium) ; le milieu de source d'azote organique (extrait de levure) et le milieu sans azote ajouté (témoin). En plus des bicarbonates de sodium comme tampon principal dans tous les milieux. Ceci afin de mesurer la fermentescibilité *in vitro* de quatre substrats : résidus d'oranges, résidus de tomates, cardes (*Silybum marianum*) et chrysanthèmes (*Chrysanthemum coronarium*) par la microflore ruminale bovine.

Lors d'une première expérience, nous avons évalué la composition chimique des substrats tel que : la matière sèche, matière organique, matière minérale, protéines brutes, composants de la paroi végétale, sucres totaux. Ainsi que les profils de fermentation de 120 h des substrats cités précédemment. Tandis que lors d'une seconde expérience, nous avons analysé la dégradabilité de la matière sèche, de la fraction insoluble dans le détergent neutre, le taux d'azote ammoniacal et la production d'acides gras volatils après une fermentation de 24 h des résidus d'oranges et des cardes dans les milieux N1 (sans azote), N2 (bicarbonate d'ammonium comme source d'azote inorganique) et N3 (glutamate de sodium comme source d'azote organique).

Ainsi la composition chimique montre que les résidus de tomates contiennent la plus forte teneur en protéines brutes ($9,03 \pm 0,9$ % MS) et la plus faible teneur a été enregistrée chez les chrysanthèmes ($2,43 \pm 0,15$ % MS). De plus, les plantes contiennent des valeurs supérieures en fibres insoluble dans le détergent neutre par rapports aux résidus agroalimentaires, nous avons noté $78,98 \pm 0,33$ % MS chez les chrysanthèmes et $68,8 \pm 0,78$ % MS chez les cardes alors que les résidus d'oranges contiennent $15,7 \pm 0,09$ % MS et les résidus de tomates $33,09 \pm 0,35$ % MS. Les résidus d'oranges et les résidus de tomates contiennent plus de sucres totaux ($40,07 \pm 4,69$ et $28,49 \pm 5,5$ % MS respectivement) que les plantes fibreuses ($8,42 \pm 1,53$ et $12,73 \pm 4,75$ % MS chez les cardes et les chrysanthèmes respectivement).

Après 120 h de fermentation, le pH final des mélanges (substrat + milieu simplifié) est dans l'intervalle optimale 6,38 – 7,28. Les résidus de tomates et les cardes ont une fermentescibilité plus élevée significativement ($p < 0,05$) dans les milieux contenant une source d'azote organique ; autrement dit le milieu au glutamate de sodium et le milieu à l'extrait de levure.

La dégradabilité des résidus d'oranges et des résidus de tomates est plus élevée que celle des cardes et chrysanthèmes dans tous les milieux simplifiés à cause de leur composition chimique où il y a une forte teneur en hydrates de carbone non fibreux et faible en fibres, ce qui a permis aux bactéries du rumen de facilement et rapidement dégrader les résidus agro-alimentaires. Toutefois, nous observons que les résidus d'oranges sont statistiquement ($p < 0,05$) les plus favorables à la dégradation dans tous les milieux comparés aux autres substrats. L'analyse de la fermentation *in vitro* des substrats est similaire avec les deux modèles statistiques, mais il est conseillé d'utiliser le modèle logistique qui est plus proche des résultats expérimentaux.

D'après les résultats de la seconde expérience, les résidus d'oranges et les cardes sont favorables pour les ruminants et ne causeront aucun risque d'acidose en dépit de la production élevée des acides gras volatils dans le milieu N3 (glutamate de sodium) par rapport au contrôle N1.

Mots clés : résidus agro-alimentaires, microflore ruminale, source d'azote, chrysanthèmes, cardes.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne

Membres du jury :

Président : Prof. Boulahrouf Abderrahmane (Université FM, Constantine 1)

Rapporteur : Prof. Haddi Mohamed Laid (Université FM, Constantine 1)

Examineur : Prof. Mihoubi Djeddar Ilhem (Université FM, Constantine 1)

Examineur : Prof. Arhab Rabah (Université Larbi Ben M'hidi d'Oum El Bouaghi)

Examineur : Prof. Mehennaoui Smail (Université Hadj Lakhdar, Batna 1)