

***République Algérienne Démocratique et Populaire***  
**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR**  
**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: 42/Ds/2019

N° de serie: 01/MB/2019



**THÈSE**

**Présentée à l'Université des Frères Mentouri pour l'obtention du diplôme**  
**de Doctorat en Sciences**  
**Option: Écologie Microbienne**

**Présentée par**  
**AMOKRANE Serine**

**Evaluation du potentiel nutritif et antiméthanogénique des**  
**plantes médicinales (*Asteraceae*) par des procédés**  
**phytochimiques, biologiques et moléculaires**

**Soutenue le : 27-02-2019**

**Devant le Jury**

**Président**

**Mr. HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid** Pr. Université des Frères Mentouri 1, Constantine

**Directeur de thèse :**

**Mr. ARHAB Rabah** Pr. Université Oum El Bouaghi

**Examineurs :**

**Mr. GRAMA Borhane Samir** M.C.A. Université Oum El Bouaghi

**Mr. DJABRI Belgacem** Pr. Université de Tébessa

**Mr. NECIB Youcef** Pr. Université des Frères Mentouri 1, Constantine

**Année universitaire : 2018-2019**

**JE REMERCIE**

**« ALLAH »**

**LE TOUT PUISSANT**

**POUR TOUT.....**

*Au terme de ce travail, je tiens à remercier mon maitre et directeur de thèse Monsieur ARHAB Rabah, professeur à l'Université de Oum El Bouaghi, pour m'avoir dirigé tout le long de la réalisation de ce travail. Votre compétence professionnelle incontestable, votre rigueur, votre droiture dans l'exercice de profession et surtout vos qualités humaines vous valent l'admiration et le respect de tous.*

*Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à mon enseignant Monsieur HAMEDCHI Abdelhafid, professeur à l'université des Frères Mentouri 1 Constantine, pour avoir accepté de juger ce travail et pour l'insigne honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de ma thèse. Je suis très reconnaissante de la spontanéité et de l'amabilité avec lesquelles vous avez accepté de juger mon travail.*

*Mes remerciements s'adressent également à mon enseignant Monsieur N'ECIB Youcef professeur à l'Université des Frères Mentouri 1 Constantine, je vous remercie vivement, monsieur de l'honneur que vous me faites en siégeant dans le jury de ma thèse. Merci infiniment.*

*J'exprime mes profonds remerciements à Monsieur DJABRI Belgacem, professeur à l'université de Tébessa, qui me fait l'honneur d'accepter de juger mon travail, et de faire partie de mon jury. Je vous en suis reconnaissante.*

*Mes sentiments de reconnaissance vont également à Monsieur GRAMA Borhane Samir maître de conférences à l'université de Oum El Bouaghi, d'avoir accepté de juger ce modeste travail. Qu'elle trouve ici mes sentiments de gratitude. Merci pour votre disponibilité.*

*Je suis consciente de l'honneur que m'ont fait Mr INSASCELLI Federico et Mme CALABRO Serina pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire des analyses alimentaires et de la nutrition animale, Napoli, Italie, et qui m'ont fait profiter de leurs nombreuses idées et précieux conseils. Que vous trouvez ici mes sentiments de gratitude.*

*Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à Mme TUDISCO Raffaella et ADDI Laura, leur expérience en biologie moléculaire, ses conseils précieux m'ont été grandement utiles. Je les remercie également de m'avoir fait partager durant mon séjour à Napoli. Merci infiniment pour les beaux moments partagés ensemble.*

*Je remercie également Monsieur BOUTAMENA Ali spécialiste en biologie végétale et directeur de l'association environnementale « EL-MABDOUA » à Ibn Ziad, Constantine pour la caractérisation botanique de mes plantes et pour les notions qu'il m'a communiquées particulièrement pour le choix des espèces. Sincères remerciements.*

*Je tiens à adresser mes plus profonds remerciements à l'ensemble des collègues qui j'ai eu la joie de travailler au CRBt ; M<sup>elle</sup> MESBAH Rokia, M<sup>me</sup> CHARAB Nora et Mme OUFROUKH Asma ingénieures attachées à la recherche, Merci pour tous, pour l'humour, la gentillesse, la rigueur, la formidable ambiance que vous savez toujours entretenir dans les laboratoires. Sincères gratitudes.*

*Je remercie mes très chers parents pour leur soutien indéfectible.*

*Je remercie mon mari, mes sœurs, frères, mes belles sœurs, mes beaux-frères pour leur soutien et leurs encouragements.*

*Je n'oublie pas de remercier également toute ma famille et tous mes amis.*

## *À MES TRÈS CHERS PARENTS*

*Aucune dédicace, ni remerciements ne sauraient exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être, je vous dédie avec fierté cette thèse qui reflète le fruit de l'éducation et de l'attention que vous m'avez tant réservée, je suis très reconnaissante et j'aurai tant aimé partager la joie de ma réussite avec vous. Puisse Dieu, le tout puissant, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.*

## *À MES TRÈS CHERS PETIT POUSSINS : Maher et Ayman*

*C'est à vous mes adorables anges, ma joie, mes petits trésor, que maman dédie ce travail pour vous dire que vous resterez pour toujours le rayon du soleil qui égaye ma vie. Je vous aime mes bébés et je vous souhaite tous le bonheur, la réussite, la sagesse, et la santé du monde.*

## *À MES CHERS ET ADORABLE FRÈRES ET SŒURS*

*En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès. Que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.*

## *À Mon mari*

*J'aimerais bien que tu trouves dans ce travail l'expression de mes sentiments de reconnaissance les plus sincères car grâce à ton aide et à ta patience avec moi que ce travail a pu voir le jour.*

## *À MES CHERS PETITS NEVEUX ET NIÈCES*

*Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.*

**« À TOUTES LES PERSONNES QUI ONT PARTICIPÉ À  
L'ÉLABORATION DE CE TRAVAIL À TOUS CEUX QUE J'AI OMIS  
DE CITER, »**

# PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

---

## Publications

### Articles publiés

Serine AMOKRANE, Rabah ARHAB, Raffaella TUDISCO, Hamza RAHAB, Federico INFASCELLI, Serina CALABRO (2016). Effect of *chamaemelum Nobile* and *chrysanthemum segetum* extracts on ruminal methanogenesis, *in vitro* degradability and methane forming population. **International Journal of Advanced Research, Volume 4, Issue 5, p. 141-151.**

Moufida AGGOUN, Amina BOUSAADA, Rabah ARHAB, Serine AMOKRANE, Malika BARKAT (2017). Effect of natural bioflavonoid on *in vitro* ruminal microbiota activity in sheep rumen liquor. **Journal of Biosciences and Biotechnologie** Volume 6, issue 1, p.31-35.

## Communications scientifiques

### Communications affichées dans des séminaires internationaux

S.AMOKRANE, R. ARHAB, H. ZITOUNI, A.CHENTLI, H.BOUSSEBOUA. Influence des contenus flavonoïques de *Taraxacum officinale* et d'*Anacyclus clavatus* sur la production ruminale de méthane en système batch. **Les septièmes journées scientifiques de la société tunisienne microbiologie. Hammamet, Tunisie, 25-27 Novembre 2011.**

S.AMOKRANE, R.ARHAB, R.TUDISCO, C.BENSOUICI, S.CALABRO. Comparaison of three *Asteraceae* species from Algeria for their antiméthanogenic effect. **Le premier colloque international d'écophysiologie animal et biodiversité (CIEAB). Alger, 22-23 Novembre 2016.**

### Communications orales dans des séminaires internationaux

Serine AMOKRANE, Moufida AGGOUN, Rabah ARHAB, Serena CALABRO, Raffaella TUDISCO. *In vitro* evaluation of three Algerian *Asteraceae* species potential as antimethanogenic feed additives for ruminants. **Treizièmes journées scientifiques de microbiologie. Hammamet, Tunisie 17-19 Novembre, 2017. (La présentation a été choisie comme meilleure communication).**

**Rabah ARHAB, Serine AMOKRANE, Raffaella TUDISCO, Chawki BENSOUICI, Serina CALABRO.** Effect of *chamaemelum Nobile* and *chrysanthemum segetum* extracts on ruminal methanogenesis, *in vitro* degradability and methane forming population. **10<sup>th</sup> Joint INRA-ROWETT Symposium on Gut Microbiology, Clermont-Ferrand, 20-23 June 2016.France.**

# TABLE DES MATIERE

Remerciements.....	i
Dédicaces.....	iii
Productions scientifiques.....	iv
Liste des figures.....	x
Liste des tableaux.....	xii
Liste des abréviations.....	xiv

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

## **Première partie : Synthèse Bibliographique**

### **Chapitre I : La famille des composées (*Asteraceae*) et les espèces *Chamaemelum nobile*, *Chrysanthemum segetum* et *Centaurea pulata***

1. Généralités.....	4
2. Description botanique.....	4
3. Origine et répartition géographique.....	5
4. Monographie des plantes étudiées.....	6
<b>4.1. <i>Chamaemelum nobile</i> L.</b>	
4.1.1. Présentation de la plante.....	6
4.1.2. Origine et répartition géographique.....	6
4.1.3. Place dans la systématique.....	7
4.1.4. Investigation phytochimique.....	7
<b>4.2. <i>Chrysanthemum segetum</i> L.</b>	
4.2.1. Présentation de la plante.....	8
4.2.2. Origine et répartition géographique.....	8
4.2.3. Place dans la systématique.....	9
4.2.4. Investigation phytochimique.....	9
<b>4.3. <i>Centaurea pulata</i> L.</b>	
4.3.1. Présentation de la plante.....	9
4.3.2. Origine et répartition géographique.....	10
4.3.3. Place dans la systématique.....	11
4.3.4. Investigation phytochimique.....	11

### **Chapitre II : Dynamique des aliments et du microbiote dans le rumen**

1. L'écosystème du rumen.....	14
<b>1.1. Paramètres abiotiques.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2. Paramètres biotiques.....</b>	<b>16</b>
1.2.1. Les bactéries.....	16
1.2.2. Les protozoaires.....	17
1.2.3. Les champignons.....	21
1.2.4. Les bactériophages.....	22

2. Biotransformation des constituants des aliments par le microbiote ruminal	
2.1. Le métabolisme ruminal des glucides.....	22
2.2. Le métabolisme ruminal de la matière azotée.....	26
2.3. Le métabolisme ruminal des lipides.....	29
3. Relations stœchiométriques .....	30

### **Chapitre III : Production et émission du méthane par les ruminants et sa contribution à l'effet de serre**

1. Gaz à effet de serre, cas de l'Algérie.....	33
2. Le méthane et l'effet de serre.....	35
3. Le méthane et les ruminants.....	37
4. La méthanogénèse ruminale et les microorganismes producteurs de méthane	
4.1. Le groupe des <i>Archaea</i> méthanogènes.....	38
4.2. Le métabolisme des <i>Archaea</i> méthanogènes.....	38
4.3. Les <i>Archaea</i> méthanogènes du rumen.....	40
5. Stratégies de réduction de la production de méthane entérique	
5.1. Stratégies actuels et projection.....	42
5.2. Les métabolites secondaires de plantes/ extraits de plantes.....	46
5.2.1. Les flavonoïdes.....	47
5.2.2. Les tanins .....	49
5.2.3. Les saponines.....	52

### **Deuxième partie : Matériel et Méthodes**

1. Matériel végétal.....	
1.1. Enquête et collecte des échantillons.....	57
1.2. Préparation des échantillons.....	57
2. Screening et analyses phytochimiques des plantes collectées.....	58
2.1. Préparation des extraits bruts par extraction solide-liquide (ESL).....	62
2.2. Analyse qualitative par CLHP.....	64
2.3. Analyse quantitative par spectrophotométrie UV-visible.....	65
3. Analyse comparée de la composition chimique et phytochimique des trois plantes fourragères et de l'aliment de référence.....	
3.1. Analyse fourragère	
3.1.1. Détermination de la teneur en matière sèche.....	68
3.1.2. Détermination de la teneur en matière organique et minérale.....	68
3.1.3. Détermination de la teneur en matière azotées totales .....	69
3.1.4. Détermination de la teneur en matières grasses .....	70
3.1.5. Détermination des composés de la paroi végétale.....	70
3.1.6. Détermination de valeur alimentaire relative.....	
3.2. Analyse phytochimique par colorimétrie	72
3.2.1. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux (FT).....	70
3.2.2. Détermination de la teneur en tanins condensés (TC).....	70
3.2.3. Détermination de la teneur en saponines totaux (ST).....	70

<b>4. Étude de la Fermentescibilité <i>in vitro</i> des substrats par le microbiote ruminal</b>	
4.2. Techniques de production de gaz <i>in vitro</i> .....	72
4.3. Description du système fermentaire de Theodorou.....	73
4.3.1. Préparation de l'inoculum.....	75
4.3.2. Préparation du milieu de culture.....	75
4.3.3. Inoculation et incubation.....	75
4.4. Analyse quantitative de la production du méthane par CPG.....	77
4.5. Stœchiométrie des fermentations.....	78
<b>5. Détermination des paramètres fermentaires</b>	
5.2. Mesure du pH.....	79
5.3. Dosage de l'azote ammoniacal (N-NH <sub>3</sub> ).....	79
5.4. Analyse qualitative et quantitative des acides gras volatils par CPG.....	80
<b>6. Étude de la digestibilité des substrats</b>	
6.2. Mesure de la digestibilité apparente de la matière organique.....	81
6.3. Estimation de l'énergie métabolisable.....	82
<b>7. Quantification de la population des méthanogènes et des protozoaires après fermentation <i>in vitro</i> par qPCR</b>	
7.2. Principe.....	82
7.3. Protocole expérimental.....	86
7.3.1. Extraction de l'ADN.....	86
7.3.2. Choix des marqueurs moléculaires.....	86
7.3.3. Conditions qPCR.....	87
<b>8. Analyse statistique.....</b>	<b>88</b>

## **Troisième partie : Résultats et Discussion**

### **Chapitre I : Caractéristiques chimiques et phytochimiques des plantes appartenant à la famille des *Asteraceae***

<b>1. Screening des plantes sélectionnées</b>	
1.1. Rendement d'extraction.....	89
1.2. Analyse qualitative des extraits par CLHP.....	89
1.3. Analyse quantitative des extraits par spectrophotométrie (UV-visible).....	91
<b>2. Analyse chimique et phytochimique des trois plantes fourragères et de l'aliment de référence</b>	
<b>2.1. Les constituants cytoplasmiques.....</b>	<b>93</b>
2.1.1. Teneurs en matières sèches.....	93
2.1.2. Teneurs en matières minérales.....	94
2.1.3. Teneurs en matières azotées totales.....	96
2.1.4. Teneurs en matières grasses.....	98
2.1.5. Teneurs en hydrates de carbone non fibreux.....	99
2.2. Les constituants pariétaux.....	100
2.3. Les composés secondaires.....	102
2.4. La valeur relative des substrats.....	105

## **Chapitre II : Fermentation *in vitro* des plantes riches en composés phénoliques et de leurs extraits**

<b>1. Aspect nutritionnel</b>	
<b>1.1. Fermentation <i>in vitro</i> des plantes fourragères et de l'aliment de référence par le microbiote ruminal</b>	
1.1.1 Production de gaz <i>in vitro</i> .....	107
<b>1.2. Étude du profil fermentaire</b>	
1.2.1. Détermination du pH .....	111
1.2.2. Production d'azote ammoniacal (N-NH <sub>3</sub> ).....	113
1.2.3. Production des acides gras volatiles totaux (AGVt).....	116
<b>2. Aspect environnemental</b>	
2.1. Effet antiméthanogénique des substrats.....	122
2.2. Stœchiométrie des fermentations.....	131
<b>3. Étude de la digestibilité des substrats</b>	
3.1. Digestibilité apparente de la matière organique .....	135
3.2. Estimation de l'énergie métabolisable.....	140

## **Chapitre III : Analyse microbiologique de la flore et de la faune productrices de méthane par PCR en temps réel**

1. Impact des substrats étudiés sur la population des méthanogènes.....	141
2. Impact des substrats étudiés sur la population des protozoaires.....	145

## **Quatrième partie : Conclusion Générale et Perspectives** 148

Références bibliographiques.....	154
----------------------------------	-----

Annexe 01

Annexe 02

Annexe 03

Résumé

Abstract

ملخص

# LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 01</b>	Types de fleurs des <i>Asteraceae</i> .....	5
<b>Figure 02</b>	Répartition géographique mondial de <i>Chamaemelum nobile</i> .....	6
<b>Figure 03</b>	Répartition géographique mondial de <i>Chrysanthemum segetum</i> .....	8
<b>Figure 04</b>	Répartition géographique mondial de <i>Centaurea pulata (L.)</i> .....	10
<b>Figure 05</b>	Voies du métabolisme glucidique dans le rumen .....	24
<b>Figure 06</b>	Dégradation des matières azotées dans le réticulo-rumen.....	28
<b>Figure 07</b>	Schéma récapitulatif de la dégradation de la matière organique des aliments dans le réticulo-rumen.....	31
<b>Figure 08</b>	Principe de l'effet de serre .....	36
<b>Figure 09</b>	Phylogénie des <i>Archaea</i> .....	39
<b>Figure 10</b>	Voies métaboliques de la méthanogénèse .....	40
<b>Figure 11</b>	Squelette de base des flavonoïdes .....	47
<b>Figure 12</b>	Principales classes des flavonoïdes .....	48
<b>Figure 13</b>	Structure chimique des acides gallique (A) et éllagique (B).....	50
<b>Figure 14</b>	Structure chimique d'une saponine tri-terpenoïdes (l'acide médicagénique).....	53
<b>Figure 15</b>	Photos de plantes collectées du champ d'Ibn Ziad.....	60
<b>Figure 16</b>	Protocole de screening phytochimique des plantes collectées.....	62
<b>Figure 17</b>	Courbe étalon des phénols totaux (PT).....	64
<b>Figure 18</b>	Courbe étalon des flavonoïdes totaux (FT).....	71
<b>Figure 19</b>	Courbe étalon des tanins condensés (TC).....	71
<b>Figure 20</b>	Courbe étalon des saponines totaux (ST).....	72
<b>Figure 21</b>	Système de fermentation décrit par Theodureau <i>et al.</i> (1994).....	73
<b>Figure 22</b>	Mesure de la production du gaz en utilisant la méthode de Theodourou <i>et al.</i> (1994).....	74
<b>Figure 23</b>	Injection du volume de gaz dans la CPG via une microseringue étanche au gaz.....	77
<b>Figure 24</b>	Courbe étalon pour le dosage de l'azote ammoniacal.....	80
<b>Figure 25</b>	Système de détection de l'amplicon par le SYBR Green.....	83
<b>Figure 26</b>	Illustration d'analyse de la courbe de fusion.....	84
<b>Figure 27</b>	Différentes étapes de l'augmentation de la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel.....	84

<b>Figure 28</b>	variation du Ct en fonction du log de nombre de copies d'un gène cible en séries de dilutions. ....	<b>85</b>
<b>Figure 29</b>	comparaison des rendements d'extraction obtenus à partir de la technique de macération et de la sonication .....	<b>90</b>
<b>Figure 30</b>	Comparaison du contenu en composés phénoliques (g/kg) de sept plantes sélectionnées.....	<b>92</b>
<b>Figure 31</b>	Teneurs en facteurs antinutritionnels ( $\text{g.kg}^{-1}$ MS) des plantes étudiées.....	<b>103</b>
<b>Figure 32</b>	Production des AGV totaux et individuels à partir des substrats étudiés après 24 h de fermentation <i>in vitro</i> .....	<b>119</b>
<b>Figure 33</b>	Suivie de la production de méthane des substrats étudiés à différents temps d'incubation .....	<b>126</b>
<b>Figure 34</b>	Relation entre la proportion molaire de l'acétate et la production de méthane.....	<b>130</b>
<b>Figure 35</b>	Répartition quantitative <i>in vitro</i> du gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ) et du méthane ( $\text{CH}_4$ ) à l'issue de la fermentation des substrats étudiés .....	<b>132</b>
<b>Figure 36</b>	Relation entre la DAMO estimée à partir de la composition chimique et la DMO mesurée <i>in vitro</i> .....	<b>139</b>
<b>Figure 37</b>	Quantité (nombre de copies/ml) des <i>Archaea</i> méthanogènes évaluée par la qPCR en fonction des substrats incubés après 24 h d'incubation <i>in vitro</i> .....	<b>142</b>
<b>Figure 38</b>	Quantité (nombre de copies/ml) des protozoaires évaluée par la qPCR en fonction des substrats incubés après 24 h d'incubation <i>in vitro</i> .....	<b>146</b>

# LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 01</b>	Récapitulation des composants majoritaires isolés à partir des trois plantes étudiées.....	<b>12</b>
<b>Tableau 02</b>	Caractéristiques physico-chimiques du rumen .....	<b>15</b>
<b>Tableau 03</b>	Quelques caractéristiques des bactéries rencontrées dans le rumen .....	<b>18</b>
<b>Tableau 04</b>	Glycosyl hydrolases identifiées chez certaines espèces microbiennes ruminales cultivables.....	<b>25</b>
<b>Tableau 05</b>	Les principaux gaz à effet de serre.....	<b>34</b>
<b>Tableau 06</b>	Les émissions sectorielles de gaz à effet de serre en Algérie .....	<b>35</b>
<b>Tableau 07</b>	Stratégies actuellement étudiés pour réduire les émissions du CH <sub>4</sub> par les ruminants, mécanismes et limites .....	<b>44</b>
<b>Tableau 08</b>	Effet des plantes/extraits riches en flavonoïdes sur la méthanogénèse et la fermentation ruminale.....	<b>51</b>
<b>Tableau 09</b>	Effet des plantes/extraits riches en tanins condensés sur la méthanogénèse et la fermentation ruminale .....	<b>54</b>
<b>Tableau 10</b>	Effet des plantes/extraits riches en saponines sur la méthanogénèse et la fermentation ruminale.....	<b>56</b>
<b>Tableau 11</b>	Caractéristiques botaniques et phénotypiques de plantes fourragères collectées dans la région d'Ibn-Ziad.....	<b>59</b>
<b>Tableau 12</b>	Programme (temps, débit et gradient de solvants) de l'CLHP pour l'analyse qualitative des extraits.....	<b>63</b>
<b>Tableau 13</b>	Préparation des solutions de la salive artificielle selon Menke and Steingass (1988).....	<b>76</b>
<b>Tableau 14</b>	Composition de la salive artificielle selon Menke and Steingass (1988).....	<b>76</b>
<b>Tableau 15</b>	Composition des solutions A et B pour le dosage de l'azote ammoniacal.....	<b>80</b>
<b>Tableau 16</b>	Séquences nucléotidiques des amorces utilisées.....	<b>87</b>
<b>Tableau 17</b>	Volumes des réactifs utilisés pour la réalisation de la qPCR.....	<b>87</b>
<b>Tableau 18</b>	Paramètres des réactions de la qPCR.....	<b>88</b>
<b>Tableau 19</b>	Analyse chimique des plantes fourragères étudiées et de l'aliment de référence (g. kg <sup>-1</sup> MS).....	<b>95</b>
<b>Tableau 20</b>	Productions de gaz (mmol/g MO ; ml/g MO) à partir des substrats étudiés et de l'aliment de référence après 24h de fermentation <i>in vitro</i> .....	<b>109</b>
<b>Tableau 21</b>	Coefficient de Corrélations (r) entre les composants chimiques, phytochimiques et la production de gaz <i>in vitro</i> à partir des substrats étudiés après 24h de fermentation <i>in vitro</i> .....	<b>109</b>
<b>Tableau 22</b>	Mesure du pH, concentrations en azote ammoniacal, estimation de la biomasse microbienne et de l'ATP des substrats étudiés après 24h d'incubation <i>in vitro</i> .....	<b>112</b>

<b>Tableau 23</b>	Concentrations des acides gras volatils totaux (mmoles/g MO), proportions molaires des AGV individuels et ratio molaire des substrats étudiés après 24h d'incubation <i>in vitro</i> .....	<b>116</b>
<b>Tableau 24</b>	Coefficient de Corrélations entre les composants chimiques, phytochimiques et les paramètres fermentaires des substrats étudiées.....	<b>118</b>
<b>Tableau 25</b>	Production de méthane et estimation de l'effet antiméthanogénique des substrats étudiés après 24h d'incubation <i>in vitro</i> .....	<b>123</b>
<b>Tableau 26</b>	Coefficient de Corrélations (r) entre la production du méthane à différents temps d'incubation, le profil des acides gras volatils, quelques paramètres fermentaires et la composition chimique et phytochimique des substrats examinés.....	<b>125</b>
<b>Tableau 27</b>	Stœchiométrie de la production de gaz <i>in vitro</i> (mmol/ g MO) des substrats étudiés après 24 h de fermentation <i>in vitro</i> .....	<b>133</b>
<b>Tableau 28</b>	Détermination de la digestibilité apparente de la matière organique et prédiction de l'énergie métabolisable des substrats étudiés après 24 h de fermentation <i>in vitro</i> .....	<b>136</b>
<b>Tableau 29</b>	Coefficient de Corrélations (r) entre la digestibilité de la matière organique (DMO), l'énergie métabolisable estimée, la production du gaz, la méthanogénèse et la composition chimique et phytochimique des substrats examinés.....	<b>138</b>
<b>Tableau 30</b>	Effets des substrats étudiés sur la quantité (nombre de copies / ml) des <i>Archaea</i> méthanogènes et des protozoaires déterminés par la qPCR après 24 h d'incubation <i>in vitro</i> .....	<b>142</b>
<b>Tableau 31</b>	Coefficient de Corrélations (r) entre la quantité des <i>Archaea</i> méthanogènes et des protozoaires et la production des AGV, la production du gaz, du méthane, de l'ammoniac, la digestibilité de la matière organique (DAMO) et la composition chimique et phytochimique des substrats examinés.....	<b>144</b>

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

<b>ADF</b>	<b>Acid Detergent Fiber</b> (Fibre végétale résistante au détergent en milieu acide).
<b>ADL</b>	<b>Acid Detergent Lignin</b> (Lignine résistante au détergent en milieu très acide).
<b>ADN</b>	<b>Acide Désoxyribonucléique</b> .
<b>ADNr</b>	<b>Acide Désoxyribonucléique ribosomique</b> .
<b>ADS</b>	<b>Acid Detergent Solution</b> .
<b>AGV</b>	<b>Acides Gras Volatils</b> .
<b>ATP</b>	<b>Adénosine Triphosphates</b> .
<b>BM</b>	<b>Biomasse Microbienne</b> .
<b>BH</b>	<b>Bilan d'Hydrogène</b> .
<b>C<sub>2</sub></b>	Acide acétique/acétate.
<b>C<sub>3</sub></b>	Acide propionique/propionate.
<b>C<sub>4</sub></b>	Acide butyrique/butyrate.
<b>CH<sub>4</sub></b>	Méthane.
<b>CLHP</b>	<b>Chromatographie Liquide à Haute Performance</b> .
<b>CPG</b>	<b>Chromatographie Phase Gazeuse</b> .
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de carbone.
<b>DAMO</b>	<b>Digestibilité Apparente de la Matière Organique</b> .
<b>DAMOE</b>	<b>Digestibilité Apparente de la Matière Organique Estimée</b> .
<b>EE</b>	<b>Extrait Éthéré</b> .
<b>FAO</b>	<b>Food and Agriculture Organization of the United Nations</b> .
<b>FT</b>	<b>Flavonoïdes Totaux</b> .
<b>GES</b>	<b>Gaz à Effet de Serre</b> .
<b>GIEC</b>	<b>Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Évolution du Climat</b> .
<b>GT</b>	<b>Gaz Totale</b> .
<b>H<sub>2</sub></b>	Dihydrogène.
<b>MAT</b>	<b>Matières Azotées Totales</b> .
<b>MM</b>	<b>Matière Minérale</b> .
<b>MO</b>	<b>Matière Organique</b> .
<b>MS</b>	<b>Matière Sèche</b> .
<b>NDF</b>	<b>Neutral Detergent Fiber</b> (Fibre végétale résistante au détergent en milieu neutre).
<b>NDS</b>	<b>Neutral Detergent Solution</b> .
<b>NFC</b>	<b>Non Fibrous Carbohydrates</b> (carbohydrates non structuraux)
<b>NH<sub>3</sub></b>	Ammoniac.
<b>PB</b>	<b>Protéines Brutes</b> .
<b>PT</b>	<b>Phénols Totaux</b> .
<b>PCR</b>	<b>Polymerase Chain Reaction</b> (Réaction de polymérisation en chaîne).
<b>PF</b>	<b>Partitioning Factor</b> (facteur de cloisonnement).
<b>PRG</b>	<b>Potentiel de Réchauffement Global</b> .
<b>qPCR</b>	<b>Quantitative PCR</b> .
<b>RFV</b>	<b>Relative Feed Value</b> .
<b>ST</b>	<b>Saponines Totaux</b> .
<b>TC</b>	<b>Tanins Condensés</b> .

# Introduction générale

En Algérie, les cultures fourragères occupent une place marginale au niveau des productions végétales. Outre la faible superficie réservée à ces cultures, la diversité des espèces est très limitée et les cultures de la vesce-avoine, de l'orge et de l'avoine, destinées à la production du foin, constituent les principales cultures. De plus, la qualité des fourrages utilisés est souvent médiocre à cause du mauvais respect des itinéraires techniques et du choix inadéquat des variétés végétales utilisées. Le déficit de ces dernières en protéine, en vitamine et en minéraux, outre le faible niveau d'énergie seraient les facteurs limitants de la productivité du cheptel (Abdelguerfi *et al.*, 2008). Le diagnostic de la situation alimentaire du cheptel des ruminants locaux met en lumière la présence d'un large écart entre les besoins alimentaires exprimés par le bétail et les disponibilités fourragères, il est estimé à 56.06% (Merdjene et Yakhlef, 2016). Faire face à cette situation, les éleveurs locaux sont forcés de se rabattre sur les résidus et les sous-produits agricoles mais surtout sur les aliments concentrés qui se règlent à des prix exorbitants.

L'Algérie, par la diversité de ses milieux et de ses terroirs, constitue un immense réservoir de plantes diverses en particulier d'intérêt fourrager. Une redynamisation de la production fourragère nationale (quantitativement et qualitativement) est envisagée par le ministère de l'Agriculture et du Développement rural et de la Pêche via des mécanismes et des dispositifs de soutien au profit des agriculteurs et des professionnels du secteur. L'absence de diversification des espèces végétales à valoriser et à planter est notée, parmi les contraintes liées au développement du tel système. Quand au choix des espèces végétales à exploiter et en mesure de répondre à cet engagement économique, nous avons choisir de prospecter quelques espèces de la famille des Astéracées en raison de son importance et sa place dans le régime des végétaux, et sa richesse énorme en plantes dicotylédones.

Ces dernières années, le réchauffement de la planète par effet de serre a pris de l'ampleur et devenu, par ainsi une véritable préoccupation gouvernementale et scientifique. Une pareille situation est due à l'accumulation de gaz dans l'atmosphère caractérisés par leur pouvoir d'absorption des rayonnements infrarouge. Il s'agit particulièrement du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), du méthane (CH<sub>4</sub>), des chlorofluorocarbures (CFC) et des oxydes d'azote (NO<sub>2</sub>) dont les contributions à l'effet de serre ont été estimées à 49, 18, 14 et 06 % respectivement (Rodhe, 1990). Comparativement au CO<sub>2</sub>, l'activité du méthane ne reflète pas sa concentration dans l'atmosphère qui est 200 fois plus faible que celle du CO<sub>2</sub> (Demeyer et Fievez, 2000). En revanche, sa capacité à absorber le rayonnement infrarouge serait 30 fois

plus élevée que celle du CO<sub>2</sub>. Le méthane s'accumule ainsi dans l'air presque vingt fois plus vite qu'au début des années 2000, pour atteindre une concentration de 1834 ppm en 2015. C'est plus du double qu'au début de l'ère industrielle, où sa concentration était autour de 730 ppb (Saunois *et al.*, 2016). Compte tenu de ces caractéristiques, le méthane serait un excellent élément pouvant faire l'objet d'une surveillance particulière.

Un rapport d'analyse de la FAO décrivant les émissions de différents gaz à effet de serre émanant de différents secteurs rapporte que, d'un côté, la filière de l'élevage émettrait plus de gaz à effet de serre que le secteur du transport. Elle émet 9% du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) mondial à cause de l'extension des surfaces agricoles qui détruit les surfaces forestières, 37% de méthane (CH<sub>4</sub>) provenant du système digestif des ruminants et 65 % d'hémioxyde d'azote émanant du fumier, ayant respectivement, un potentiel de réchauffement global 23 et 296 fois plus élevé que le CO<sub>2</sub> (Tubiello *et al.*, 2014). D'autre côté, le même rapport signale que les émissions du méthane provenant de la fermentation entérique des ruminants ont augmenté de 11% entre 2000 et 2011, passant de 1,858 Mt éq CO<sub>2</sub> à 2,071 Mt éq CO<sub>2</sub> (Tubiello *et al.*, 2014). Tenant compte de ce constat, et de l'accroissement démographique et de l'augmentation des demandes mondiales en viande et en lait d'ici 2050, les émissions du méthane entérique, selon le même rapport, devraient augmenter de 18% et 30% en 2030 et 2050, respectivement. De ce fait, la forte croissance de la filière de l'élevage a des répercussions environnementales très négatives.

Pour preuve de son engagement indéfectible en faveur du climat, l'Algérie était parmi les premiers pays en développement à soumettre sa contribution au secrétariat de la Convention-cadre des nations unies sur les changements climatiques (CCNUCC). Son engagement s'est débuté par son intégration dans le protocole de Kyoto en 17 Mai 2005, à l'issue duquel un décret exhaustif N° 06-138 du 16 Rabie el-Aouel 1427 correspondant au 15 avril 2006 décrète 19 articles est publié réglementant, par ainsi les rejets atmosphériques de gaz, de fumées, de vapeurs, de particules liquides ou solides, ainsi que les conditions dans lesquels s'exercent leur contrôle. Plus récemment, l'Algérie a procédé, par un autre décret présidentiel signé le jeudi 13 octobre 2016 (N° 16-262 du 11 Moharram 1438 correspondant au 13 octobre 2016 décrète 29 articles), à la ratification de l'accord de Paris sur le climat adopté fin 2015, à la 21ème Conférence des parties à la Convention-cadre des Nations Unies sur les changements climatiques (COP 21). L'Algérie prévoit dans ce cadre, d'ici 2030, une réduction inconditionnelle des rejets nationaux de GES de 7%, et de 22% dans le cas où il bénéficie d'un

accompagnement technologique et financier adéquat et d'investissements de la part de ses partenaires au développement.

Dans le cadre des recherches menées universellement pour limiter les émissions de gaz à effet de serre par les ruminants, plusieurs stratégies ont été expérimentées à cette fin comme l'utilisation d'antibiotiques, la défaunation, l'ajout de probiotiques, vaccination vis-à-vis des bactéries méthanogènes du rumen...etc. Mais toutes ces voies répondent peu ou pas aux objectifs assignés, particulièrement en matière de leurs efficacités à long terme, leurs sécurités pour l'animal et l'homme, coût...etc. Cette situation a intensifié la recherche d'alternatives reposant essentiellement sur des produits d'origine naturelle possédant la capacité de moduler positivement la fermentation ruminale, en diminuant la production de méthane sans pour autant nuire à la fois au métabolisme du microbiote ruminal et au bilan énergétique global de la ration alimentaire. Les plantes et/ou leurs extraits ont montré des effets significatifs en ce domaine. L'utilisation de plantes riches en métabolites secondaires semble être actuellement une approche très appréciable car l'origine naturelle de ces composés permet une meilleure acceptation vis à vis des consommateurs, accentuée par leur action positive sur l'environnement.

L'objectif primordial attribué à cette thèse est la formulation de régimes alimentaires à base de plantes et/ou de leurs extraits pour améliorer la qualité et la productivité du cheptel local. La valorisation des ressources fourragères locales comme des alternatives alimentaires est réalisée à travers deux approches différentes, une **approche nutritionnelle** via la détermination du potentiel nutritif de plantes/ extraits appartenant à la famille des *Asteraceae* en basant sur des analyses chimiques, phytochimiques et fermentaires, et une **approche environnementale** à travers la détermination de leurs pouvoirs antiméthanogéniques en appuyant sur l'outil de la biologie moléculaire. L'effet de leur contenu en substances bioactifs sur la fermentescibilité, la digestibilité ainsi que l'activité du microbiote ruminal *in vitro* est également investigué. La multidisciplinarité offerte à notre étude par le couplage de ces deux approches est fondamentale afin d'essayer d'offrir des alternatives alimentaires locaux dont la fiche descriptif est de loin exhaustive.

**Première partie**

**Synthèse Bibliographique**

## CHAPITRE I

### La famille des composées (*Asteraceae*) et les espèces *Chamaemelum nobile*, *Chrysanthemum segetum* et *Centaurea pulata*

#### **1. Généralités**

Le mot « Aster » du grec signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur. C'est la plus vaste famille des spermatophytes avec près de 17 tribus, 1000 genres et au moins 25 000 espèces répandues à travers le monde (Gaussen et Leroy, 1982) ce qui représente environ 8 à 10% de toutes les plantes à fleurs. Les genres les plus importants du point de vue nombre d'espèces sont : *Senecio* (1500 espèces), *Vernonia* (1000 espèces), *Cousinia* (600 espèces) et *Centaurea* (600 espèces) (Guignard, 1994).

Cette vaste famille est économiquement importante, elle fournit des plantes alimentaires: La laitue (*Lactuca*) est la plante la plus cultivée de la famille, suivie de l'artichaut (*Cynara*), de l'endive, du salsifis (*Trapogon*) de la chicorée (*Chicorium*), de l'estragon et du tournesol. De nombreuses autres espèces ont une utilisation ornementale, telle que la marguerite, le dahlia, le zinnia, le cosmos, le chrysanthème et l'aster (Paulian de Felice, 1967).

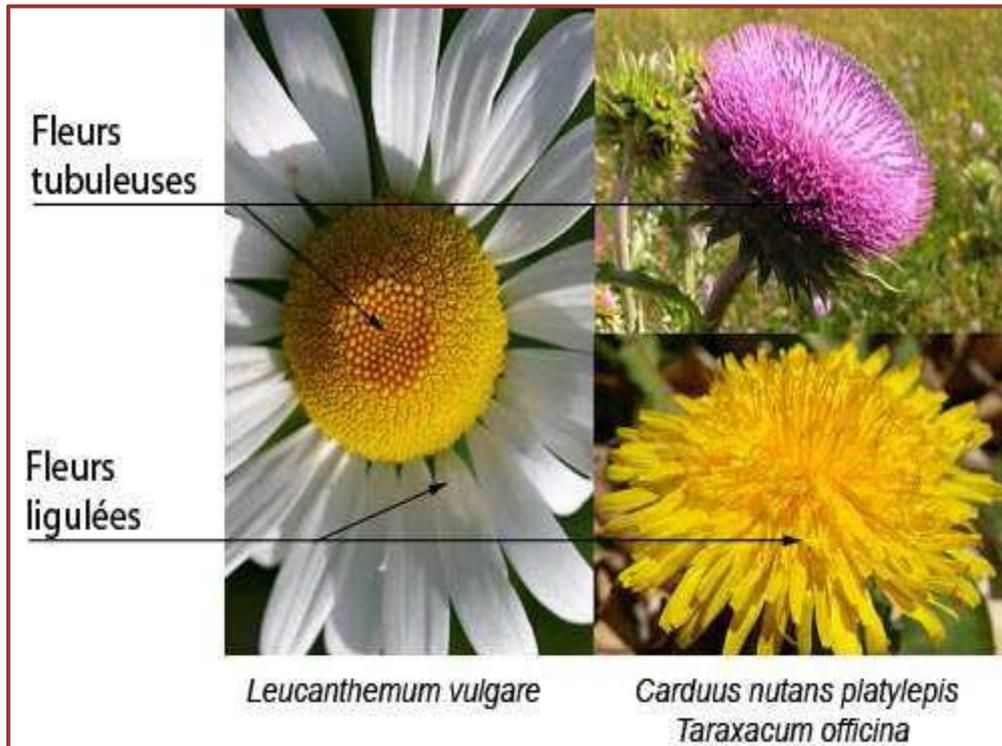
Plusieurs espèces sont utilisées en cosmétiques et en pharmacie: l'armoise (*Artemisia vulgaris*), l'arnica (*Arnica montana*), la camomille (*Matricaria chamomilla* L.) et *Anthemis nobilis* L.), la grande aunée ou inule (*Inula helenium*), le souci des jardins (*Calendula officinalis*), le millefeuille (*Achillea millefolium*), le pissenlit (*Taraxacum officinale*), camomille puante (*Anthemis cotula*), le pied de chat (*Antenaria Dioca Gartn*), et le tussilage (*Tussilago farfara* L.) (Paulian de Felice, 1967).

#### **2. Description botanique**

La famille des Astéracées (synonyme : Composées) est une importante famille de plantes dicotylédones. Elle est principalement des plantes herbacées ou vivaces, mais aussi des arbustes ou sous arbrisseaux, parfois des arbres, rarement des plantes aquatiques ou des plantes grimpantes ou encore des épiphytes (Guignard, 1994).

Les feuilles sont le plus souvent alternes mais aussi opposées, radiales, simples ou ex-stipulées (Macheix *et al.*, 2005). Les fleurs des composées sont toujours groupées en une inflorescence (groupe de fleurs sur la même tige) appelée tête ou capitule qui fonctionne comme une fleur unique. Les composées sont réparties, selon la forme de leurs fleurs, en deux types : l'un ayant des fleurs à corolles ligulées et l'autre à corolles tubulées (Figure 01).

Chez la moitié des espèces, les petites fleurs centrales sont tubuleuses, en forme de minuscules disques, alors que celles de la périphérie ont des corolles en forme de languettes évasées vers l'extérieur, comme autant de pétales, qui attirent les insectes pollinisateurs. Les corolles sont entourées à la base de bractées. Le calice (ou pappus) de chacune des fleurs du capitule est formé d'écaillés ou de longs poils favorisant la dispersion des graines (Ozenda, 1991 ; Guignard, 1994).



**Figure 01:** Types de fleurs des *Asteraceae* (Barkely *et al.*, 2006)

Pour déterminer la plupart des plantes de cette famille, il est nécessaire de récolter des capitules défleuris, portant des fruits mûrs ou au moins déjà bien formés. L'observation des bractées de l'involucre est également très importante.

### 3. *Origine et répartition géographique*

Les composées connaissent une distribution géographique mondiale à l'exception de l'Antarctique. Elles s'acclimatent bien aux régions tropicales et subtropicales semi-arides, à la toundra alpine et arctique et aux régions tempérées. Elles sont, en revanche, peu présentes dans la forêt tropicale (Macheix *et al.*, 2005). En Algérie elle compte environ 109 genres et plus de 408 espèces (Quezel *et al.*, 1962).

#### 4. Monographie des plantes étudiées

##### 4.1. *Chamaemelum nobile* L.

###### 4.1.1. Présentation de la plante

*Chamaemelum nobile* L. est le nom scientifique retenu aujourd'hui pour la plante. Elle est cependant plus connue par son synonyme *Anthemis nobilis*, attribué par Linné. Autres synonymes nomenclaturaux : *Ormenis nobilis* L. et *Chamomilla nobilis* L. sont aussi reconnus.

C'est une plante herbacée vivace de 10 à 30 cm de hauteur. Elles se terminent par des capitules floraux odorants et solitaires. De couleur vert blanchâtre, ses feuilles sont finement divisées en lobes courts et étroits. Le capitule est formé de fleurons ligulés blancs se recouvrant les uns les autres entourant un disque de fleurons tubulés jaunes. Les fruits sont des akènes jaunâtres, petits et côtelés. Elle se trouve, généralement dans les sols secs et sableux riches en silices. (Julve, 1998 ; Dupont and Guignard, 2012).

###### 4.1.2. Origine et répartition géographique

La camomille noble est indigène en Europe de l'ouest (Portugal, Espagne, France, Royaume-Uni et Irlande) et en Afrique du Nord (Maroc et Algérie). Elle a été introduite et s'est naturalisée en Europe central et de l'est, en Australie et Nouvelle-Zélande et dans certaines régions de l'Amérique du Nord (Nayar, 2006) (Figure 02).

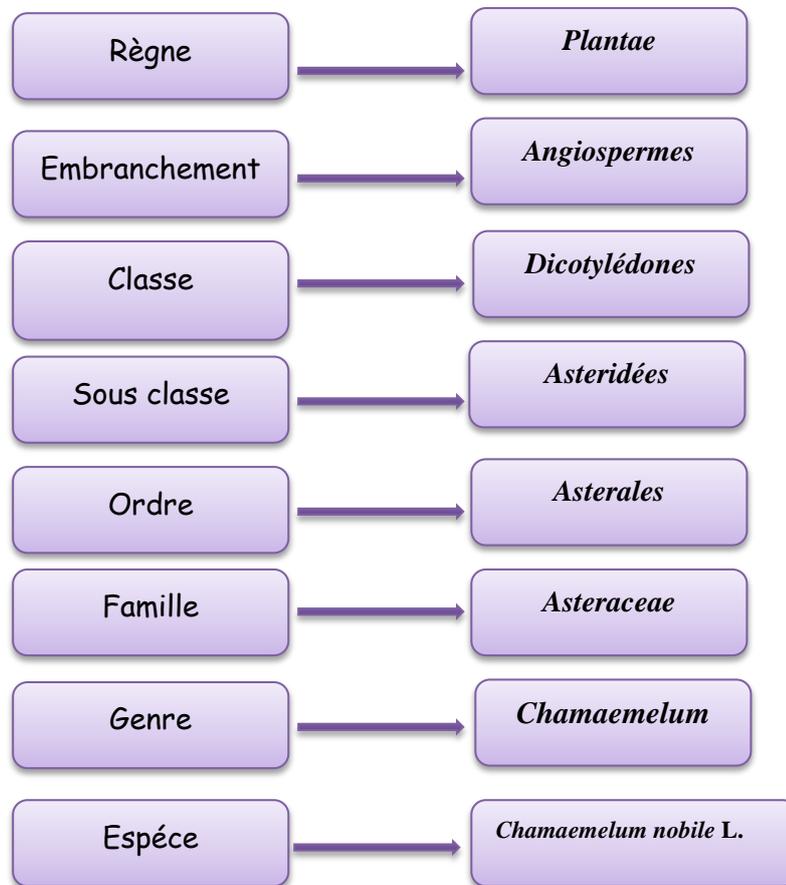


■ *Chamaemelum nobile*

**Figure 02** : Répartition géographique mondiale de *Chamaemelum nobile* L.  
([www.discoverlife.org/Chamaemelum+nobile](http://www.discoverlife.org/Chamaemelum+nobile))

#### 4.1.3. Place dans la systématique

D'après Quezel and Santa (1963) et Dupont and Guignard (2012), la systématique de *Chamaemelum nobile* L. est la suivante :



#### 4.1.4. Investigation phytochimique

Plus de 120 composants ont été identifiés dans les fleurs de la camomille noble. La majeure partie des métabolites secondaires de cette plante est représentée par des polyphénols, ils appartiennent à deux classes chimiques différentes: les flavonoïdes et les coumarines (McKay *et al.*, 2006). Les coumarines comme: l'herniarine, l'ombelliférone et l'esculétine. Quant aux flavonoides, ils sont principalement l'apigénine, la lutéoline et la quercétine et leurs dérivés glycosidés. Les sesquiterpenes constituent également une partie de cette plante. Enfin, les tanins ne constituent que 1% des composants de la camomille (Khenouf *et al.*, 2013) (tableau 01).

## 4.2. *Chrysanthemum segetum* L.

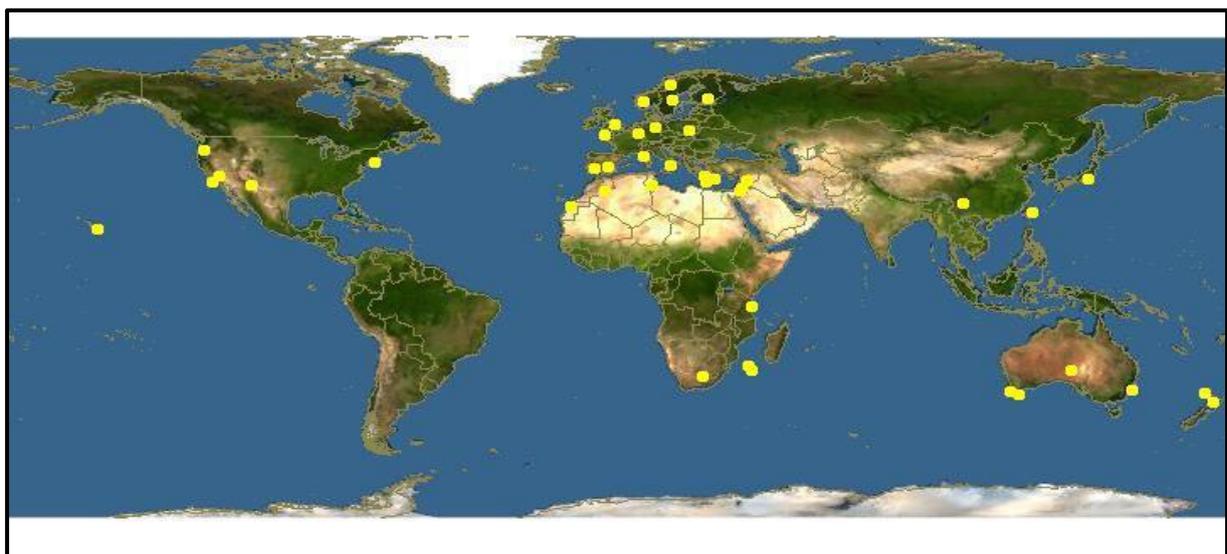
### 4.2.1. Présentation de la plante

Plusieurs synonymes de l'espèce *Chrysanthemum segetum* L. sont disponibles, (*Glebionis segetum* L.), (*Matricaria segetum* L.) et (*Leucanthemum segetum* L.).

Les chrysanthèmes sont des plantes annuelles vivaces de 20 à 60 cm de haut, à tiges ascendantes ou dressées, simples ou ramifiées. Les feuilles sont divisées en lanières étroites un peu charnues, les capitules sont à fleurs tubuleuses jaunes, à ligules jaune d'or, allongées et rayonnantes. L'involucre de bractée possède des écailles à marge membraneuses très larges, à chaînes de deux sortes, les extrêmes différentes de celles du centre du capitule. Les fruits sont des akènes de 2-3 mm munis de 5- 10 côtes (Boutaghanae, 2013).

### 4.2.2. Origine et répartition géographique

*Chrysanthemum segetum* L. est une plante originaire de la région méditerranéenne (Chevalier, 1997), elle est largement distribuée en Europe, introduit en Amérique du nord, en Australie, en Afrique du nord et du sud, en Nouvelle-Zélande, en Asie mineure et en Asie de l'ouest (Gaussen et Leroy, 1982) (Figure 03). **En Algérie**, on peut rencontrer principalement les espèces suivantes: *C. clausonis* (Pomel) Batt., *C. coronarium* L., *C. deserticum* (Murb.) Batt. et Trab., *C. fontanesii* (Boiss. et Reut.), *C. fuscatum* Desf., *C. grandiflorum* L., Batt., *C. gyanum*, *C. macrocarpum* Coss., *C. macrotum* (D. R.) Ball., *C. maesii*, *C. multicaulis*, *C. myconis* L., *C. segetum* L., *C. trifurcatum* (Desf.) Batt. et Trab., *C. viscido-hirtum*.



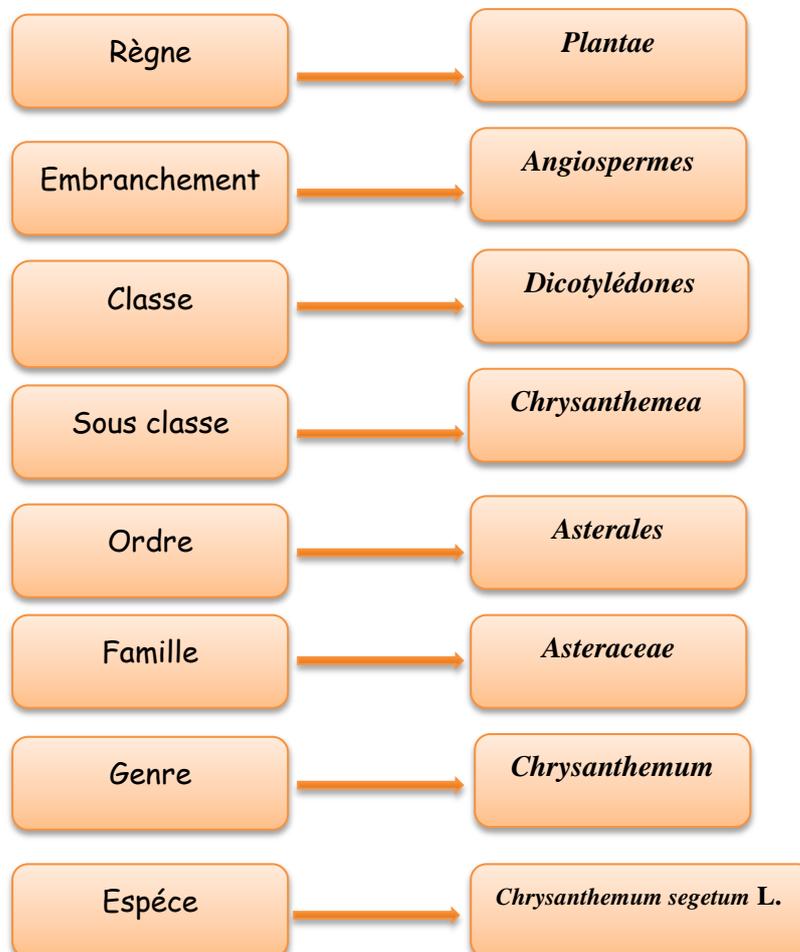
■ *Chrysanthemum segetum*

**Figure 03** : Répartition géographique mondiale de *Chrysanthemum segetum* L.

([www.discoverlife.org/Chrysanthemum+segetum](http://www.discoverlife.org/Chrysanthemum+segetum))

### 4.2.3. Place dans la systématique

Selon Quezel and Santa (1963), la position systématique de *Chrysanthemum segetum* L. est représentée comme suit :



### 4.2.4. Investigation phytochimique

Une recherche bibliographique sur l'espèce *C.segetum* a montré qu'il n'existe, en fait que très peu de travaux phytochimiques antérieurs concernant cette plante. Les produits isolés sont essentiellement, des flavonoïdes, des coumarines, des polyacétylènes et quelques acides phénoliques dont nous avons cité quelques exemples de composés isolés dans le tableau 01. (Ochocka *et al.*, 1995 ; Kumar *et al.*, 2005 ; Kennouche *et al.*, 2016).

## 4.3. *Centaurea pulata* L.

### 4.3.1. Présentation de la plante

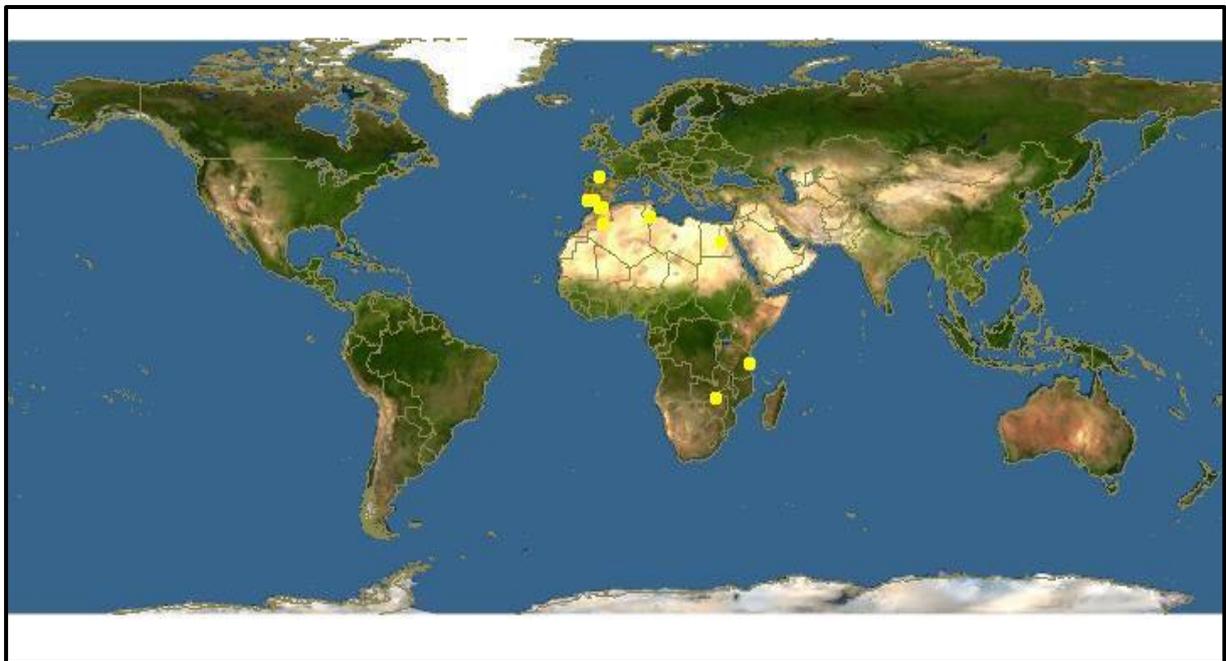
Selon Beniston (1984) le nom de *C. pullata* est dû aux bordures noires des bractées. Parmi ses synonymes: *Melanoloma pullatum* L. (Davis *et al.*, 1988).

*Centaurea pullata* L. est une plante annuelle (rarement biannuelle) ou herbacée, comme toutes les espèces des *Asteraceae*, leurs fleurs sont disposées en capitule constitué de fleurs centrales tubulaires hermaphrodites plus ou moins irrégulières ou de fleurs périphériques stériles. Leurs couleurs varient le plus souvent entre le rose, le pourpre et le violet.

L'involucre peut être ovoïde ou globuleux à bractées inégales imbriquées sur plusieurs rangs par fois surmontées par un appendice. Le réceptacle est garni de soie abondante. Les anthères sont soudées à la base, le style est à branches courtes, si les aigrettes sont présentes elles peuvent être persistantes ou caduques (Quezel and Santa, 1963).

#### 4.3.2. Origine et rapatrions géographique

Cette espèce est répartie en région méditerranéenne, elle est rencontrée au Nord-Africain, en Europe, en Espagne et en France (Davis *et al.*, 1988) (Figure 04). Quezel and Santa (1963) ainsi que Beniston (1984) notent que *C. pullata* est répondeue en Algérie dans la région du Tell, elle se rencontre souvent dans les lieux frais, les pâturages, les talus herbeux et au bord des routes du littoral.

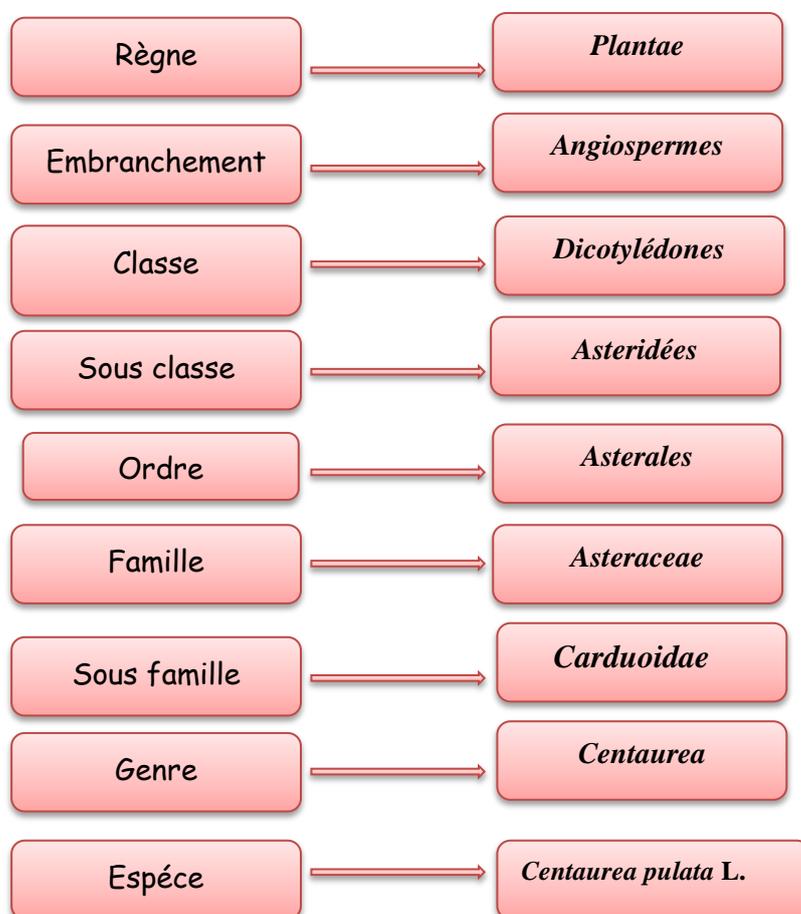


**Figure 04** : Répartition géographique mondiale de *Centaurea pulata* L.

([www.discoverlife.org.Centaurea+pulata](http://www.discoverlife.org/Centaurea+pulata))

### 4.3.3. Place dans la systématique

Selon Dostál (1973); Romashchenko *et al.* (2004) la position systématique de *Centaurea pulata* L. est représentée comme suit :



### 4.3.4. Investigation phytochimique

*C.pulata* est reconnue pour produire des lactones sesquiterpènes du groupe germacranolides et des guainolides. Des composés flavonoidiques ont été isolés à partir des feuilles, des parties aériennes et parfois des racines, et identifiés comme des flavonols, 6-hydroxyflavones et leurs *O* et *C*-glycosides. Les travaux ont également révélés la présence des lignanes et des huiles essentielles (Khammar and Djeddi, 2012) (tableau 01).

Tableau 01 : Récapitulation des composants majoritaires isolés à partir des trois plantes étudiées.

Plante	Familles	Composants	sources	Auteurs
<i>Chrysanthemum segetum</i>	Flavonoides	-Gossypetine (8-hydroxyquercetine) ; - Quercetine 7-O- glucosides.	Extrait de pétale	Stick <i>et al.</i> , 1997
	Coumarins	-Herniarine ; -Coumarine ; -Umbelliferone ; - Esculetine ; -Dihydrocoumarine ; - L'acide coumarinique ; - 4-hydroxycoumarine.	Racines et extrait de la partie aérienne	Ochocka <i>et al.</i> , 1995
	Flavonoides	-Apigénine-7-glucoside ; -Gossypetine 7-glucoside.	Feuilles, disques et rayons	Harbone <i>et al.</i> , 1970
	Coumarins	-Herniarine ; -Umbelliferone ; -Seopoletine.		
	Flavonoides et acides phénoliques	-Lutéoline ; -Kaempferol ; -Quercetine-7-O-glucoside ; -L'acide chlorogénique.	Extraits de feuilles et de tiges	Vetschera <i>et al.</i> , 2003
	Flavonoides et acides phénoliques	-Gossypetine 7-glucoside ; - L'acide chlorogénique ; -L'acide isochlorogénique ; -Quercetine-7-O-glucoside.	Pétales	Geissman and Steelink, 1957
<i>Chamaemelum nobile</i>	Flavonoides et acides phénoliques	-Luteoline-7-glucoside ; -Apigénine-7-glucoside ; -Chamaemeloside ; -Luteoline ; -Apigénine ; -L'acide néochlorogénique ; - L'acide chlorogénique ; -L'acide caféique ; -L'acide 3,5-di-O-cafféoylquinique ; -Dérivés de l'acide caféique.	Infusion des feuilles	Carnat <i>et al.</i> , 2004
	Flavonoides et acides phénoliques	-Quercetagine-7-O-β-D glucopyranoside ; - Luteoline-7- O-β-D glucoside ; - Apigénine-7- O-β-D -glucoside ; - Chamaemeloside ; - Apigénine-7-O-(6"-O-acetyl- β-D glucopyranoside) ; - Apigénine ; - L'acide chlorogénique.	Fleurs	Avula <i>et al.</i> , 2014
	Flavonoides et acides phénoliques	- L'acide 3-O-Cafféoylquinique ; -L'acide 5-O-Cafféoylquinique-hexoside ; - L'acide protocatechuique ; - Cafféol-hexosidémethylglutarate ; - Apigénine 6-C-glucose-8-C-glucose - Cafféoyl-hexosidémethylglutarate ; - Dérivés de l'acide Caféique ; - Myricetine 3-O-glucoside ; - Dérivés de l'apigénine ; - Quercetine 3-O-glucuronide ; -Apigénine O-glucuronylhexoside ; -Kaempferol O-pentosylhexoside ; -Luteoline O-rutinoside ; - Dérivés de l'apigénine ; -Luteoline O-pentosylhexoside ; -Luteoline O-glucuronide ; -Luteoline O-rhamnosylhexoside ; -Luteoline O-hexoside ; - Quercetine 7-O-malonylhexoside ; -Quercetine O-acetylhexoside ; -Apigénine O-glucuronide ; - Dérivés de l'apigénine ; -Luteoline O-acetylhexoside ; -Apigénine O-glucuronide.	Decoction et infusion	Guimarães <i>et al.</i> , 2013

<b><i>Centaurea pulata</i></b>	<b><i>Sesquiterpenes lactones</i></b>	<p>11<math>\beta</math>, 13-dihydrocnicine  11<math>\beta</math>, 13-dihydro-19 desoxycnicine  11<math>\beta</math>, 13-dihydrosalonitenolide  melitensine  8<math>\alpha</math>-<i>O</i>-(4-hydrxy-2methylene-  butanoyloxy) melitensine  8<math>\alpha</math>-hydroxy-11<math>\beta</math>, 13-dihydro-  sonchucarpolide  8<math>\alpha</math>-hydroxy-11<math>\beta</math>, 13-dihydro-  onopordaldehyde  8<math>\alpha</math>-<i>O</i>-(4-acetoxo-5-hydroxy-angeloyl)-  11<math>\beta</math>, 13-dihydrocnicine  8<math>\alpha</math>-<i>O</i>-(4-acetoxo-2-hydroxyméthyl-  butenoyloxy)- 11<math>\beta</math>, 13-  dihydroschucarpolide  8<math>\alpha</math>-<i>O</i>-(4-acetoxo-2-hydroxyméthyl-  butenoyloxy)- 11<math>\beta</math>, 13-dihydro-4-  <i>epi</i>-sonchucarpolide</p>	Extraits méthanolique	Djeddi <i>et al.</i> , 2008 (b)
	<b><i>Flavonoïdes</i></b>	<p>hispiduline, jaceosidine,  desméthoxycentaureidine, 6, 7, 3', 4'-  tétraméthoxyflavone.</p>		

## Chapitre II

### Dynamique des aliments et du microbiote dans le rumen

#### 1. L'écosystème du rumen

Le réticulo-rumen est un écosystème complexe en raison de la grande diversité des microorganismes qui y vivent, des substrats qu'il contient, des voies métaboliques qui s'y mettent en place. Il réunit des conditions physico-chimiques particulières permettant l'existence et le fonctionnement d'un microbiote spécifique. Cette symbiose offre aux ruminants la possibilité de tirer parti des constituants lignocellulosiques des parois végétales (Sautet, 1995).

##### 1.1. Paramètres abiotiques

Les facteurs abiotiques du rumen représentent l'ensemble des facteurs physicochimiques influençant la flore et la faune microbienne (Tableau 02).

##### ➤ *pH et pouvoir tampon*

Le pH a un rôle prédominant dans la sélection des microorganismes du rumen et dans l'orientation des fermentations. Le pH du milieu ruminal doit être compris entre 6 et 7 pour assurer une bonne prolifération des microorganismes. Le pH ruminal est la résultante de différents éléments : production d'acides, leur absorption, leur sortie avec les digesta et effet de tampons contenus dans la salive et dans la ration. La principale source de variation du pH est la fermentation des aliments qui conduit à la formation d'acides (AGV et acide lactique). Cette chute de pH est compensée par une sécrétion salivaire à pouvoir tampon élevé par sa teneur en bicarbonates et en phosphates, estimée à 100 à 190 L par jour pour la vache et 6 à 15 L par jour pour le mouton (Sautet, 1995). Les aliments de la ration ont également une valeur tampon intrinsèque (Giger-Reverdin *et al.*, 2002).

##### ➤ *La température*

La température du milieu ruminal est constante et est comprise entre 38 et 40°C (Clarke, 1977). Cette température peut varier avec l'intensité des fermentations et peut monter jusqu'à 41°C. Seul l'abreuvement (eau froide) ou l'ingestion de fourrage gelé peut faire chuter la température de 5 à 10°C. Il faut près de une à deux heures pour qu'elle retrouve sa valeur initiale. Les protozoaires ne peuvent pas survivre à une température supérieure à 40°C, surtout lorsque de telles températures sont maintenues pendant une longue période. (Fonty and Chaucheyras-Durand, 2007).

**Tableau 02:** Caractéristiques physico-chimiques du rumen (Fonty and Chaucheyras-Durand, 2007).

Paramètres mesurés	Caractéristiques
pH	.7-7.3
Potentiel d'oxydoréduction	-0.35V
Température	38-41°C
Osmolarité	< 400 mOsmol.Kg <sup>-1</sup>
Phase gazeuse, %	CO <sub>2</sub> :65 ; CH <sub>4</sub> : 27 ; N <sub>2</sub> : 7 ; O <sub>2</sub> : 0.6 ; H <sub>2</sub> : 0.2 ; H <sub>2</sub> S : 0.01.
Matière sèche	10-18%.
Acides gras volatils (AGV), mmol	Ac. formique, < 0.02 ; Ac. Acétique, 66 ; Ac propionique, 23 ; Ac. Butyrique, 20 ; Ac mineurs (C4-C6), 2
Acide lactique, mmol	< 7
Acide succinique, mmol	0.002 à 0.004
Ethanol, mmol	Non détectable
Ammoniac, mmol	< 92
Acides aminés	< 48meqM.
Minéraux (mg/kg)	Na, 1.5-3.0 ; K, 0.6-2.3 ; Ca, 0.1-0.2 ; Mg, 0.1 ; P, 0.3 ; PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> , 1.9;HCO <sub>3</sub> <sup>-3</sup> ,1.3.
Oligoéléments	Fe, Mn, Co, Mo, Zn, Se, etc.

#### ➤ Anaérobiose et potentiel d'oxydo-réduction

Le rumen est caractérisé par des conditions d'anaérobiose. Néanmoins, de très faibles quantités d'oxygène peuvent entrer dans le milieu via l'alimentation, l'ingestion d'eau ou par diffusion à partir du sang. Dans des conditions normales de fonctionnement du rumen, le potentiel d'oxydo-réduction est négatif et varie de -150 à - 250 mV lorsqu'il est mesuré par rapport à l'électrode standard à hydrogène. L'activité microbienne est capable de corriger les écarts de potentiel redox et de maintenir le milieu très réducteur (Marden *et al.*, 2005)

Le potentiel redox augmente après le repas et ensuite diminue. Le potentiel redox est généralement lié négativement au pH ruminal, néanmoins cette relation n'est pas toujours significative (Julien *et al.*, 2010).

#### ➤ Humidité et pression osmotique

La teneur en eau du contenu ruminal est en moyenne de 85 %. Cette valeur n'est cependant pas homogène dans l'ensemble du rumen. Les apports en eau se réalisent par l'abreuvement, la salivation et dans une moindre mesure par l'alimentation. La pression osmotique du jus de rumen est proche ou plus élevée que celle du sang, ce qui favorise les échanges d'eau et de molécules à travers la paroi du rumen. La pression osmotique varie avec l'ingestion et l'abreuvement (Giger-Reverdin *et al.*, 1997). Elle est en moyenne de 250 mOsm/L avant l'ingestion d'un repas et peut atteindre 350 à 400 mOsm / L dans les 30 à 90 minutes suivant

le repas. En effet, il a été montré que la dissolution des minéraux des aliments ingérés et la production d'AGV par fermentation microbienne étaient les principaux facteurs déterminant l'augmentation de la pression osmotique (Rémond *et al.*, 1995).

### **1.2. Paramètres biotiques**

Le microbiote ruminal se caractérise par son extrême diversité, le nombre d'espèces bactériennes colonisant le rumen étant important et présentant des activités enzymatiques variées. On y trouve bactéries, protozoaires, champignons et bactériophage.

#### **1.2.1. Les bactéries**

La population bactérienne est de loin la plus active, la plus complexe et la plus dense (de l'ordre de 10 milliards de bactéries par millilitre du contenu du rumen), elles représentent la moitié de la biomasse microbienne (Yu *et al.*, 2006 ; Guillaume, 2007). La majorité est constituée d'anaérobies stricts, mais il existe également des anaérobies facultatifs qui représentent  $10^7$ - $10^8$  cellules/g du contenu du rumen. La taille des bactéries du rumen est généralement de 0.5 à 10  $\mu m$ . Les bactéries Gram<sup>-</sup> sont les prédominantes, les Gram<sup>+</sup> sont ainsi présentes, et joue des rôles très importants (Kamra, 2005) (Tableau 03).

La flore ruminale se caractérise par son extrême diversité. Environ 350 espèces ont été isolées dont une trentaine spécifique du rumen, présentant des activités enzymatiques variées. Hungate (1966) a proposé une classification fonctionnelle aux bactéries ruminales : bactéries cellulolytiques, pectinolytiques, amylolytiques, hémicellulolytiques, saccharolytiques, protéolytiques, lipolytiques, uréolytiques et utilisatrices d'acides. Les bactéries peuvent également être classifiées selon leur localisation dans le rumen : bactéries libres présentes dans la phase liquide, associées à des particules alimentaires solides, attachées à la surface des protozoaires ou encore associées à l'épithélium ruminal (McAllister *et al.*, 1994). Les bactéries associées aux particules alimentaires sont numériquement supérieures aux autres catégories (Koike *et al.*, 2003). Elles représentent jusqu'à 75 % de la population microbienne totale, elles sont responsables de la majorité de l'activité enzymatique dans le rumen (Miron *et al.*, 2001).

La population bactérienne du rumen a fait l'objet de nombreuses études au cours des 40 dernières années. Plusieurs études ont décrit l'isolement et l'identification d'un nombre important de souches bactériennes provenant de ruminants d'âge, de statut sanitaire, de

localisation géographiques et soumis à des régimes différents. Néanmoins, ces descriptions ne permettent pas de refléter la distribution des espèces bactériennes dans le rumen. Les méthodes de culture bactériennes ne permettant l'isolement que d'une faible fraction d'espèces ruminales. L'introduction de nouvelles techniques offre des perspectives d'études intéressantes. L'analyse des séquences des ARN ribosomiaux (ARNr) 16S permet d'améliorer la description de la diversité génétique et des relations phylogénétiques (Case *et al.*, 2007). Le développement de la métagénomique, qui consiste à séquencer l'ensemble des génomes microbiens d'un échantillon, offre des perspectives pour identifier de nouveaux gènes codant pour des enzymes ou avoir accès à des bactéries qu'on était jusqu'alors incapable de mettre en culture (Singh *et al.*, 2008).

Cette population bactérienne joue donc un rôle de pivot dans la digestion des aliments dans le rumen, leur dynamique de colonisation pouvant impacter la dynamique de digestion. Néanmoins, même si la colonisation des particules alimentaires par les bactéries est centrale dans les processus de dégradation des aliments, la dynamique de ce processus n'est pas complètement connue (Edwards *et al.*, 2007). De nombreux facteurs peuvent affecter l'adhésion bactérienne aux particules alimentaires: facteurs liés aux bactéries (âge, condition du glycocalyx, compétition bactérienne), liés au substrat (surface, hydratation, charge ionique...) et liés à l'environnement (pH, température, oxygénation, ...) (Miron *et al.*, 2001).

### 1.2.2. **Les protozoaires**

Les protozoaires sont des organismes eucaryotes unicellulaires et mobiles dont on distingue deux types : les flagellés et les ciliés. Les ciliés représentent le groupe majoritaire avec une concentration varie de  $10^4$  à  $10^6$  cellules /ml. La concentration des flagellés est plus faible ( $10^3$  à  $10^4$ /ml) leur rôle est, cependant mal connu (Jouany and Ushida, 1999). Les ciliés dont la tailles est importante (50 à 300  $\mu\text{m}$ ) sont divisés en deux groupes : Les holotriches, dont on distingue les genres *Isotricha* et *Dasytricha* et les entodiniomorphes (Kamra, 2005). Les ciliés sont 20 à 100 fois plus grands en taille que les bactéries mais ils sont  $10^4$  fois moins nombreux (Jouany and Ushida, 1988), ils représentent entre 20 et 50% de la biomasse microbienne (Fonty and Chaucheyras-Durand, 2007).

**Tableau 03:** Quelques caractéristiques des bactéries rencontrées dans le rumen (Keiji and Soichi, 1981).

Type de Gram	Genre	Espèce	Forme et dimensions	Type de substrat dégradé
<b>Cocci Gram<sup>-</sup></b>	<i>Veillonella</i>	<i>V. parvula</i>	Cocci de 0.3-0.5 $\mu\text{m}$ de diamètre ; isolé, en diplocoques ou en chaînes courtes	<b>Utilisatrice des acides (lactate)</b>
	<i>Megasphaera</i>	<i>M. elsdenii</i>	Cocci de 2.5-3.0 $\mu\text{m}$ de diamètre, isolés, en paires ou occasionnellement en chaînes.	<b>Utilisatrice des acides (lactate) et hydrolyse l'urée</b>
	<i>Lampropedia</i>	<i>L. hyalina</i>	Se présente sous forme de feuillets de 0.8-1.0 $\mu\text{m}$ de diamètre	<b>nd</b>
	<i>Oscillospira</i>	<i>O. guillermondi</i>	Bactéries larges de 5.0-9.0 $\mu\text{m}$ de diamètre.	<b>nd</b>
<b>Cocci Gram<sup>+</sup></b>	<i>Ruminococcus</i>	<i>R. albus</i> <i>R. flavefaciens</i>	Cocci sphérique de dimensions : 0.8-1.5 $\times$ 0.7-1.8 $\mu\text{m}$ ; isolés, en paires ou en chaînes.	<b>Cellulose et hémicellulose</b>
	<i>Streptococcus</i>	<i>S. bovis</i>	Cellules sphériques ou ovoïdes ; de 0.5-2.0 $\mu\text{m}$ en paires ou en chaînes.	<b>Amidon, Pectine, Sucres</b>
	<i>Sarcina</i>	<i>S. ventriculi</i>	Cocci sphériques de 1.8-2.4 $\mu\text{m}$ en paires ou en tétrades	<b>nd</b>
	<i>Methanosarcina</i>	<i>M. barkeri</i>	Cocci sphériques de <b>4-10 <math>\mu\text{m}</math></b> ; isolés ou en agrégat.	<b>CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, Formate (Archea méthanogènes)</b>
<b>Bacilles Gram<sup>-</sup></b>	<i>Anaerovibrio</i>	<i>A. lipolytica</i>	Bacilles <b>légèrement incurvés</b> , 1.2-1.8 $\mu\text{m}$ de long.	<b>Lipides</b>
	<i>Prevotella</i>	<i>P. ruminicola</i>	Bacilles de 0.1-1.0 $\times$ 0.8-8.0 $\mu\text{m}$ ; isolés ou en courtes chaînes	<b>Hémicellulose, protéines, amidon</b>
	<i>Butyrivibrio</i>	<i>B. fibrisolvans</i>	<b>Bacilles incurvés</b> , dimensions : 0.4-0.6 $\times$ 2.5 $\mu\text{m}$	<b>Cellulose, hémicellulose, amidon</b>
	<i>Lachnospira</i>	<i>L. multiparus</i>	<b>Bacilles incurvés</b> , dimensions : <b>0.4-0.6 <math>\times</math> 2.0-4.0 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>Pectine</b>

	<i>Fibrobacter</i>	<i>F. succinogenes</i>	Bacilles ovoïdes, isolés : $0.4-0.8 \times 0.8-2.0 \mu m$ ou en chaînes courtes et même sous forme de rosettes.	Cellulose. amidon
	<i>Selenomonas</i>	<i>S. ruminantium</i> <i>S. lactilytica</i>	Bacilles incurvés, $0.9-1.1 \times 1.0-3.0 \mu m$ ; isolés ou en courtes chaînes	Amidon, sucres. lactate
	<i>Ruminobacter</i>	<i>R. amylophilus</i>	Bacilles ovales ou courts : $0.9-1.2 \times 1.0-3.0 \mu m$	Amidon, protéines
	<i>Vibrio</i>	<i>V. succinogenes</i>	Bacilles incurvés, en hélice ou droits : $0.5-1.0 \times 2-6 \mu m$	Acides
	<i>Treponema</i>	<i>T. bryanii</i>	Bactéries sous forme d'une hélice avec un diamètre de $3.0-6.0 \mu m$	Sucres, pectine et amidon
	<i>Clostridium</i>	<i>A. cellobioparum</i> <i>C. lochheadii</i>	Bacilles de $0.3-2.0 \times 1.2-2.5 \mu m$	Cellulose
<b>Bacilles Gram<sup>+</sup></b>	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. ruminis</i> <i>L. vitulinus</i> <i>L. acidophilus</i>	Cellules de formes bacillaires régulières : $0.5-0.7 \mu m$ de diamètre	Amidon et sucres
	<i>Eubacterium</i>	<i>E. cellulosolvans</i> <i>E. xylanophilum</i> <i>E. uniformis</i>	Bacilles longs, en paires, en chaînes ou séparés : $0.2-2.0 \times 0.3-10 \mu m$	Cellulose, hémicellulose.
	<i>Succinovibrio</i>	<i>S. dextrinosolvans</i>	Bacilles incurvés ou en hélice, $0.4-0.6 \times 1.0-2.0 \mu m$	Amidon, sucres
	<i>Methanobacterium</i>	<i>M. bryanii</i> <i>M. formicium</i>	Bacilles incurvés, $0.5-1.0 \mu m$ de long	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , Formate (Archea méthanogènes)
	<i>Methanobrevibacter</i>	<i>M. ruminantium</i>	Bacilles ovales ou bacilles courts, en chaînes ou en paires, $0.6 \mu m$ de large ; $0.8-2.0 \mu m$ de long.	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , Formate (Archea méthanogènes)

nd : non déterminé

Les entodiniomorphes ont de fortes capacités à ingérer des particules solides en suspension (grains d'amidon, chloroplastes, fibres cellulosiques) à l'aide de leurs cils. Ces particules sont alors transportées à travers le vestibule jusqu'au cytostome. Les holotriches sont plutôt spécialisés dans l'absorption de composés solubles tels que les sucres solubles (Ushida and Jouany, 1991).

Ainsi, certains protozoaires (notamment les holotriches) dégradent rapidement l'amidon et les sucres solubles. Certains entodiniomorphes sont particulièrement efficaces pour digérer la cellulose : (Fonty and Forano, 1999). Parmi les protozoaires ciliés modérément cellulosiques, on note : *Eudiplodinium maggu*, *Epidinium eaudatum*, *Ostracodinium bovis*, *Ophryoscolex caudatus* et *Polyplastron multivesiculatum*. *Diplodinium pentacanthum* est considéré comme faiblement cellulolytique (Fonty and Forano, 1999).

Les ciliés du rumen ont une activité protéolytique moins efficace que les bactéries, mais contrairement à ces dernières, ils dégradent en majorité des protéines insolubles. Ils ont également une activité de désamination importante. Les protozoaires peuvent éliminer les bactéries et récupérer les acides aminés, les peptides et les acides nucléiques bactériens pour les incorporer dans leur propre organisme (Ushida and Jouany, 1991).

Les interactions avec d'autres microorganismes sont nombreuses : les protozoaires ingèrent les bactéries endogènes ou exogènes comme source de protéines pour leur synthèse cellulaire. Une partie des protozoaires est également liée aux *Archaea* méthanogènes. En effet, Tokura *et al.* (1999a) ont montré que *Isotricha* spp., *Polyplastron multivesiculatum*, *Ophryoscolex caudatus* et *Entodinium* spp., isolés de rumen, sont associés à des *Archaea* méthanogènes (mis en évidence par autofluorescence) ; *O. caudatus* et *Isotricha* montrent l'association la plus importante. Dans une autre étude, Tokura *et al.* (1997) ont conclu que les *Archaea* méthanogènes ruminales associées aux ciliés sont phylogénétiquement distinctes des *Archaea* méthanogènes vivant seules. D'autres études indiquent que les *Archaea* méthanogènes appartenant à la famille des *Methanobacteriaceae* s'associent fréquemment aux protozoaires ruminiaux. Selon Tokura *et al.* (1999b) le groupe d'*Archaea* méthanogènes phylogénétiquement proche de *Methanobrevibacter smithii* semble former le groupe dominant des *Archaea* méthanogènes associées aux ciliés issus de rumen de moutons.

La présence quantitative des protozoaires varie rapidement avec le repas. La nourriture influence leur population quantitativement et qualitativement. Le changement alimentaire doit

être progressif au risque d'entraîner la mort des ciliés, sensibles aux pH acides. Les protozoaires sont de forts producteurs de H<sub>2</sub>, quand leur nombre diminue, il y a forcément moins de H<sub>2</sub> et donc moins de substrat pour former du CH<sub>4</sub> (Guyader *et al.*, 2014). Le rôle et la nécessité des protozoaires restent controversés : ils améliorent la digestion des glucides, diminuent l'efficacité d'utilisation de l'azote mais ils ne sont pas indispensables au fonctionnement du rumen.

### 1.2.3. Les champignons

Les champignons trouvés dans le rumen sont anaérobies stricts, ce qui est assez rare pour le groupe des champignons. Ils ne possèdent pas de mitochondries, ni de cytochromes. On décrit trois genres : un pluri-flagellé, *Neocallimastix* et deux uniflagellés, *Piromonas* et *Caecomyces*. Leur concentration est estimée à 10<sup>3</sup> à 10<sup>4</sup> zoospores / ml du contenu ruminal, soit de l'ordre de 8 % de la biomasse microbienne du rumen (Jouany, 1994).

Ils produisent une large gamme de polyosidases qui leur permettent de dépolymériser la cellulose, les hémicelluloses et d'hydrolyser les oligosaccharides libérés. Les enzymes nécessaires sont extracellulaires (Akin and Benner, 1988). Les produits terminaux générés par la fermentation des glucides sont identiques quelle que soit l'espèce. Il s'agit du formate, de l'acétate, du lactate, de l'éthanol, du CO<sub>2</sub> et de l'H<sub>2</sub> (Bauchop, 1981).

Ils colonisent, également les tissus lignifiés qui restent dans le rumen, diminuent la taille des particules, cassent les structures et dégradent des tissus mêmes très lignifiés. Certaines souches sont capables de dégrader l'amidon et possèdent une activité protéolytique assurée par des métalloprotéases (Wallace and Joblin, 1985; Wallace and Munro, 1986). *In vivo* leur contribution à la dégradation des protéines alimentaires est vraisemblablement limitée.

Les champignons apparaissent 8 à 10 jours après la naissance chez l'agneau, donc avant l'ingestion de nourriture solide. L'élimination de ces microorganismes du rumen diminue la digestibilité *in situ* de la matière sèche de la paille et contribue à augmenter la proportion d'acide propionique (Ford *et al.*, 1987). Les agneaux gnotobiotiques ne contiennent, au sein de leur rumen, que des champignons comme microorganismes cellulolytiques. Il a été montré que la dégradation *in situ* de la cellulose de la paille de blé et du foin de ray-grass était respectivement de 25 et 36% (Fonty *et al.*, 1988).

#### 1.2.4. Les bactériophages

La mise en évidence des bactériophages au sein du rumen a été réalisée depuis longtemps (Tarakanov, 1971; Orpin and Munn, 1974). Cependant, jusqu'à présent, peu d'études ont été effectuées sur ces microorganismes. Vingt-six types morphologiques différents ont été observés. Les bactériophages sont capables de lyser les bactéries notamment les bactéries cellulolytiques du rumen (Klieve *et al.*, 2004). Une activité lytique a été mise en évidence à l'égard de *Streptococcus bovis* et *Bifidobacterium thermophilum*. Des phages filamenteux tempérés ont été mis en évidence dans diverses souches de *Butyrivibrio fibrisolvens*. (Klieve *et al.*, 1988). De ce fait, cette lyse peut altérer la dégradation des fibres, donc, conduire à une diminution de l'efficacité de la dégradation des aliments.

## **2. Biotransformation des constituants des aliments par le microbiote ruminal**

Au sein du rumen, les aliments ingérés par l'animal sont colonisés, dégradés puis fermentés par les microorganismes. Cette dégradation dans le rumen par les microorganismes est conditionnée par l'adhésion des microorganismes aux particules, l'accessibilité aux substrats et par les activités enzymatiques réalisées.

### **2.1. Le métabolisme ruminal des glucides**

#### ➤ *Les glucides des végétaux*

Les glucides peuvent se classer en deux catégories selon leur répartition dans la cellule végétale. La première catégorie correspond aux glucides cytoplasmiques : ils sont représentés par les glucides hydrosolubles et les glucides de réserve (l'amidon). La seconde correspond aux glucides pariétaux qui ne sont retrouvés que dans les aliments d'origine végétale, ils sont les constituants de la paroi végétale : la cellulose, l'hémicellulose, la lignine et la pectine (Jarrige *et al.*, 1995 ; Sauvant *et al.*, 1995).

#### ➤ *L'hydrolyse extracellulaire*

Les bactéries fibrolytiques, les champignons et certains protozoaires sont impliqués, leur action est, cependant facilitée par un pH supérieur à 6,5. Les bactéries vont tout d'abord se fixer aux fibres alimentaires. Les tissus facilement dégradables (ex : parenchyme) sont rapidement colonisés par les bactéries tandis que les tissus peu dégradables (ex : sclérenchyme) le sont moins. Certains protozoaires ingèrent des petites particules alimentaires en suspension (Forano *et al.*, 1996). Les champignons utilisent leur rhizoïde pour pénétrer en

profondeur des fragments végétaux ; ils coloniseraient préférentiellement les tissus lignifiés (Ford *et al.*, 1987 ; Bernalier *et al.*, 1991).

Les micro-organismes sécrètent de nombreuses hydrolases dans le milieu ruminal (Tableau 04). Trois types de cellulases agissent en synergie : une endo  $\beta$  1-4 glucanase, une cellobiosidase et une  $\beta$  -glucosidase. La première attaque la cellulose au hasard pour former des cellooligosaccharides ; la deuxième attaque l'extrémité non réductrice de la cellulose pour donner des unités de cellobiose et la troisième hydrolyse la cellobiose et les cellooligosaccharides de faible degré de polymérisation pour donner du glucose (Morrison, 1979 ; Tomme *et al.*, 1995). Concernant les hémicelluloses, des xylanases sont retrouvées chez un grand nombre d'espèces bactériennes (Forano *et al.*, 1996). Les protozoaires et les champignons sécrètent également des hemicellulases et des cellulases. Pour ce qui est de l'hydrolyse des pectines, des enzymes pectinolytiques ont été identifiées chez des bactéries et des protozoaires (Guillaume, 2007), mais pas chez les champignons (Williams and Withers, 1981).

Les bactéries amylolytiques et les protozoaires sont impliqués dans l'hydrolyse de l'amidon (Chevalier, 2001). Les bactéries amylolytiques sont favorisées par un pH ruminal inférieur à 6. Les protozoaires vont ingérer des grains d'amidons. Les microorganismes sécrètent des amylases extracellulaires, qui vont s'attaquer aux liaisons  $\alpha$ -glucosidiques de façon aléatoire. Le produit final de cette hydrolyse est le glucose (Fonty and Chaucheyras-Durand, 2007).

#### ➤ *Voies métaboliques de la fermentation des glucides par les bactéries ruminales*

Les sucres libérés par hydrolyse vont être absorbés et ensuite fermentés en pyruvate par les voies d'Emden-Meyerhof et des pentoses phosphates. Le pyruvate est un intermédiaire qui est rapidement utilisé. Il est catabolisé en AGV ( $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$  et une faible proportion d'AGV mineurs), dans certains cas en acide lactique, et en gaz (dioxyde de carbone, dihydrogène et méthane). L'énergie libérée sous forme d'adénosine tri-phosphate (ATP) permettra la croissance microbienne (Offner and Sauvant, 2006) (Figure 05).

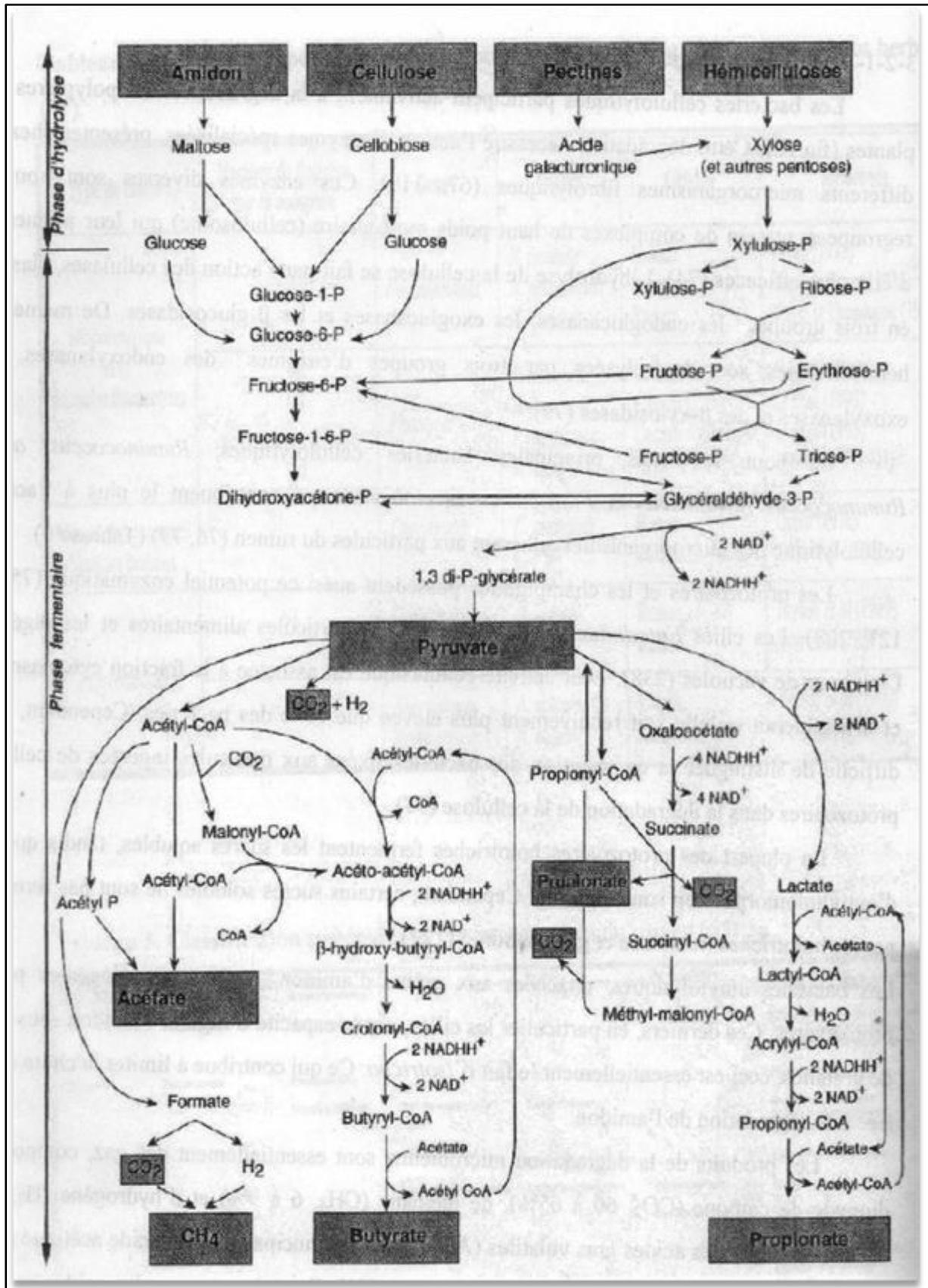


Figure 05 : Voies du métabolisme glucidique dans le rumen (Jouany, 1994).

**Tableau 04:** Glycosyl hydrolases identifiées chez certaines espèces microbiennes ruminales cultivables (Fonty and Chaucheyras-Durand, 2007).

Espèce microbienne	Endocellulase	Exocellulase	B-glucosidase	Endoxylanase	B-xylosidase	Lichenase	Mannanase
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	×		×	×	×		
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	×			×		×	
<i>Ruminococcus Albus</i>	×		×	×			
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	×			×			
<i>Neocallimastix frontalis</i>	×			×			
<i>Neocallimastix patrciarum</i>	×	×		×			
<i>Orpinomyces Joyonii</i>	×	×					
<i>Piromyces rhizinflata</i>	×	×	×				
<i>Prevotella ruminocola</i>	×			×	×		×

➤ **Produits terminaux et principaux facteurs de variation**

Chez les ruminants, les AGV contribuent à environ 70 % des besoins en énergie des animaux. La plupart des AGV sont absorbés au niveau de la paroi ruminale. Le propionate est dirigé vers le foie où il constitue le principal substrat de la néoglucogenèse quand sa disponibilité n'est pas limitante (Bobe *et al.*, 2004). L'acétate et le  $\beta$ -hydroxybutyrate (issu de l'oxydation du butyrate dans l'épithélium ruminal) sont moins métabolisés par le foie que

le propionate. Ils sont des précurseurs de la synthèse *de novo* des AG du lait ou du tissu adipeux, et constituent par ailleurs des substrats préférentiels dans les tissus en substitution du glucose (Nozière *et al.*, 2011). Le CO<sub>2</sub> et l' H<sub>2</sub> ne s'accumulent pas dans le rumen car ces produits sont très rapidement utilisés par les microorganismes hydrogénotrophes pour la formation du méthane.

Les proportions respectives en AGV dépendent de la nature de la ration. Une augmentation des teneurs en fibres provoque une augmentation de la proportion de C<sub>2</sub> ruminal car les bactéries fibrolytiques utilisent plutôt la voie du C<sub>2</sub>. Une forte teneur en amidon (par exemple avec une forte proportion de céréales dans la ration) va favoriser la production de C<sub>3</sub> au détriment de celle du C<sub>2</sub>. La présence de glucides solubles (saccharose, lactose, inuline) va augmenter la proportion de C<sub>4</sub> (Russell and Wallace, 1988). La quantité d'AGV dans le rumen dépend de la vitesse de dégradation du substrat : plus ce substrat est dégradé rapidement, plus la quantité d'AGV produite est importante. Les fibres sont moins rapidement digérées que l'amidon. Ainsi de fortes proportions d'amidon dans la ration entraînent une forte production d'AGV ruminiaux (Guillaume, 2007).

Le pH ruminal a également un effet sur les proportions d'AGV : sachant que les bactéries fibrolytiques se développent mieux à un pH supérieur à 6,5 et que les bactéries amylolytiques préfèrent un pH inférieur à 6, un pH bas engendrera des proportions de C<sub>3</sub> plus élevées tandis qu'un pH haut provoquera de plus grandes proportions de C<sub>2</sub> (Sauvant *et al.*, 1994).

## **2.2. Le métabolisme ruminal de la matière azotée**

### **➤ Nature de l'azote alimentaire**

Les matières azotées alimentaires peuvent être séparées en deux catégories : **les protéines**, qui peuvent être solubles ou non, et **l'azote non protéique (ANP)**. En effet, l'ANP regroupe des amides et des acides aminés libres (50% environ), ainsi que des bases azotées, des amines, de l'NH<sub>3</sub>, de l'urée et des nitrates (Clément, 2014).

Dans les plantes fourragères, 75 à 85% de l'azote est sous forme de protéines, 15 à 25% sous forme d'ANP. Une majeure proportion de l'ANP arrivant dans le rumen est représentée par l'urée, directement incorporée dans la ration ou contenue dans les sécrétions salivaires du ruminant (Clément, 2014).

➤ **La protéolyse**

La protéolyse est principalement réalisée par les bactéries et les protozoaires. Les champignons interviennent dans une moindre mesure. Ces microorganismes ruminiaux dégradent une fraction des protéines alimentaires, cette dégradation engendre tout d'abord des peptides puis des acides aminés et enfin de l'ammoniac. L'ANP est quant à lui rapidement dégradé en  $\text{NH}_3$  (Blain, 2002) (Figure 06).

La première étape de la dégradation des protéines résulte de l'activité des protéases bactériennes localisées sur la face externe des membranes bactériennes. C'est principalement les bactéries amylolytiques qui interviennent dans la protéolyse : elles dégradent principalement les protéines solubles. Les protozoaires participent plutôt à la dégradation des protéines insolubles incluses dans des particules de taille appropriée telles que des chloroplastes ou des bactéries qu'ils ingèrent (Bach *et al.*, 2005).

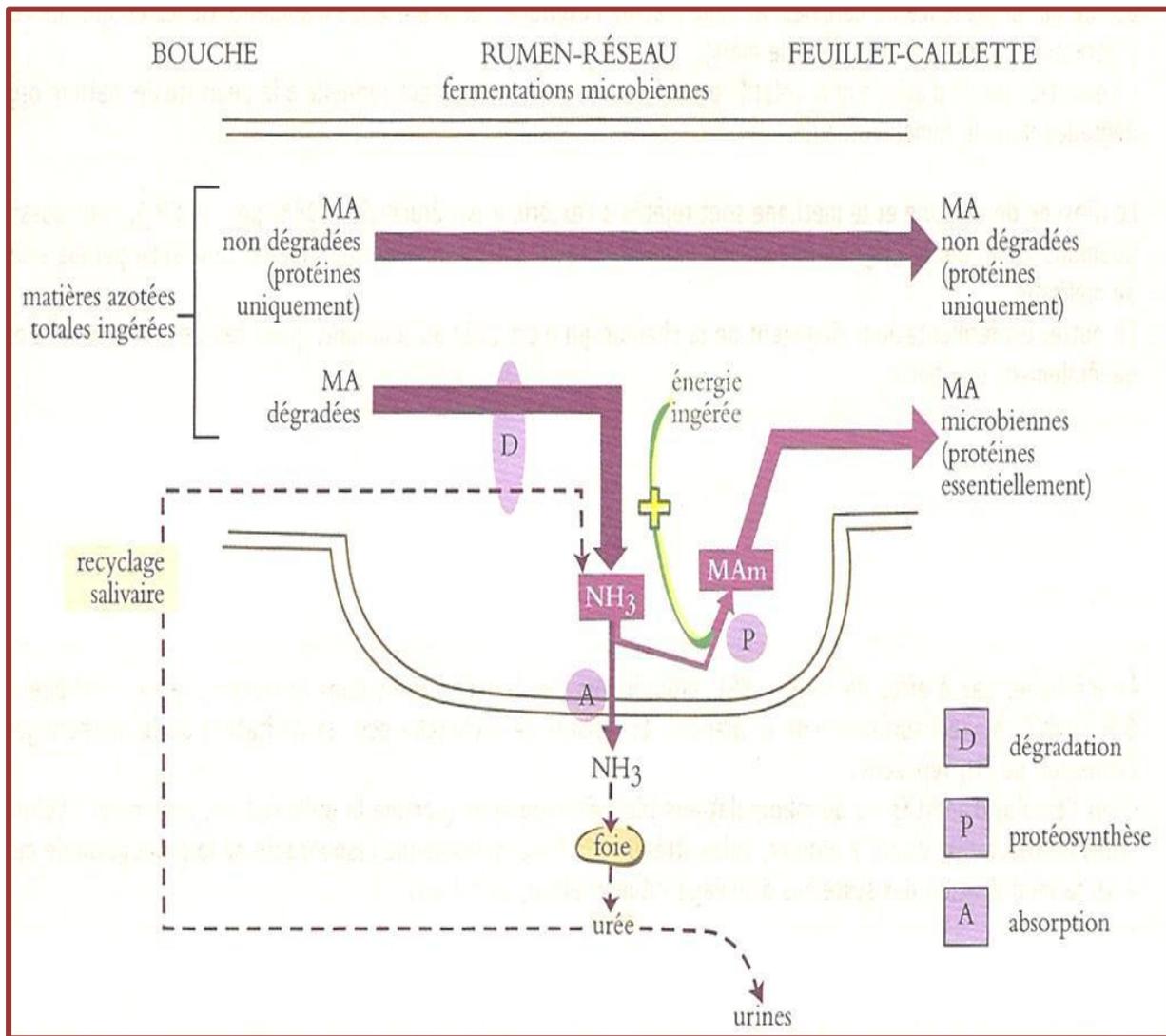
Il est également essentiel que les protéines soient accessibles car de nombreuses protéines végétales sont incluses dans une matrice de fibres, la protéolyse dépend alors de l'activité fibrolytique. Une fraction variable de protéines échappe à la dégradation ruminale et se compose principalement de protéines insolubles (Clémont, 2014).

➤ **Hydrolyse des peptides**

Les peptides sont rapidement hydrolysés, ils sont donc peu accumulés. Les peptides de grande taille subissent une hydrolyse par des peptidases liées à la membrane extracellulaire des bactéries, cela produit alors des oligopeptides, des di-peptides, des tri-peptides et des acides aminés qui seront, ensuite absorbés par les bactéries. De plus, les bactéries, ayant la capacité d'assimiler des peptides de petite taille, vont les dégrader en acides aminées à l'aide d'enzymes intracellulaires (Jouany *et al.*, 1995).

➤ **Dégradation des acides aminés**

Les acides aminés d'origine alimentaire ou produits de l'hydrolyse des protéines sont, soit désaminés en  $\text{NH}_3$  et en AGV, soit incorporés dans les protéines bactériennes (Bach *et al.*, 2005). Ainsi, la dégradation des matières azotées entraîne la production de l' $\text{NH}_3$ , ce dernier sera utilisé par le microbiote pour la synthèse de nouveaux acides aminés. Quand la production d'ammoniac est supérieure à son utilisation, il peut alors être absorbé par la paroi du rumen et transformé dans le foie en urée, qui sera à son tour, recyclée par la salive ou la paroi du rumen. Par ailleurs, une partie de l'urée est excrétée dans l'urine et le lait (Jouany *et al.*, 1995).



**Figure 06 :** Dégradation des matières azotées dans le réticulo-rumen (Delteil *et al.*, 2012).

➤ **Synthèse microbienne des protéines (protéosynthèse)**

Seule une petite fraction des acides aminés est directement incorporée dans les protéines microbiennes (chez les protozoaires et quelques espèces bactériennes). La plus grande partie des acides aminés bactériens est synthétisée à partir de l' $\text{NH}_3$ . Chez les bactéries, l' $\text{NH}_3$  traverse la membrane plasmique par diffusion passive sous forme non ionisée ou par transport actif sous forme ionisée. Il est ensuite incorporé dans une chaîne hydrogénéocarbonée pour former un acide aminé. Les protozoaires incorporent les acides aminés principalement par la prédation de bactéries (Clémont, 2014).

De plus, il est important de noter que les synthèses microbiennes à partir de l' $\text{NH}_3$  nécessitent de l'énergie sous forme d'ATP, énergie provenant directement de la fermentation des glucides. Ces deux métabolismes sont donc étroitement liés.

La croissance des bactéries non protéolytiques dépend donc de la production de l' $\text{NH}_3$  par les bactéries protéolytiques. Il s'agit là d'une illustration des interdépendances nutritionnelles qui permettent le bon fonctionnement du microbiote ruminal. Notons que les bactéries fibrolytiques sont très dépendantes car elles ont majoritairement une action protéolytique faible. Les protéines d'origine microbienne ainsi que les protéines alimentaires non dégradées dans le rumen seront ensuite évacuées vers le reste du tube digestif. Leur digestion dans le reste du tube digestif est similaire à celle rencontrée chez les monogastriques (Fonty and Chaucheyras-Durand, 2007).

### **2.3. Le métabolisme ruminal des lipides**

#### **➤ *Nature des constituants lipidiques***

En général, la ration des ruminants ne contient que 3 à 6% de lipides dans la matière sèche ingérée et, très exceptionnellement, plus de 10 % MS. Malgré leur faible quantité dans la ration, ils sont importants car ce sont des sources très intéressantes d'énergie, d'acides gras essentiels, de vitamines liposolubles et de pigments, ce qui leur confère un rôle nutritionnel important. Ils sont principalement composés de triglycérides et d'acides gras libres en proportion équivalente (Cuvelier *et al.*, 2005).

#### **➤ *Digestion des lipides***

Dans le rumen, ils subissent la lipolyse microbienne au cours de laquelle les triglycérides sont hydrolysés en acides gras et glycérol qui rejoint le circuit des sucres.

Les acides gras sont soit fixés aux particules alimentaires et suivent le transit digestif, soit repris par les bactéries pour leur propre synthèse d'acides gras longs saturés (Delteil *et al.*, 2012). Les phospholipides représentent 10% à 15% des lipides qui quittent le rumen (Jenkins *et al.*, 2008).

La population microbienne se charge de la saturation des acides gras libres. Les acides gras longs produits par les bactéries sont les produits terminaux de la digestion lipidique. L'hydrolyse ruminale des lipides est quasi complète de 85% à 95%. La flore microbienne synthétise à partir des AGV, des acides gras à longue chaînes en C15, C16, C17, C18. Ces acides gras ne sont pas absorbés par l'épithélium ruminal mais en quasi-totalité dans l'intestin grêle. Les acides gras ont tendance à s'attacher aux microbes et à gêner la fermentation des glucides, c'est pourquoi un excès de lipides entraîne en général une diminution de production de lait et une baisse du taux butyreux (TB) (Lourenço *et al.*, 2010).

Les bactéries responsables de la biohydrogénation peuvent être classées en deux groupes : les bactéries dont la croissance est inhibée par l'acide linoléique (dose inférieure à 200 µg / ml) et ayant une activité butyrate-kinase supérieure à 600 U / mg de protéines (*Butyrivibrio proteoclasticus* et *Butyrivibrio hungatei*) et les bactéries non inhibées par l'acide linoléique et ayant une activité butyrate-kinase inférieure à 40 U / mg de protéines (*Butyrivibrio fibrisolvens* et *Pseudobutyrvibrio spp.*) (Lourenço *et al.*, 2010).

Un schéma récapitulatif de la dégradation de différents constituants alimentaires (glucides, protéines et matières grasses) est illustré dans la figure 07.

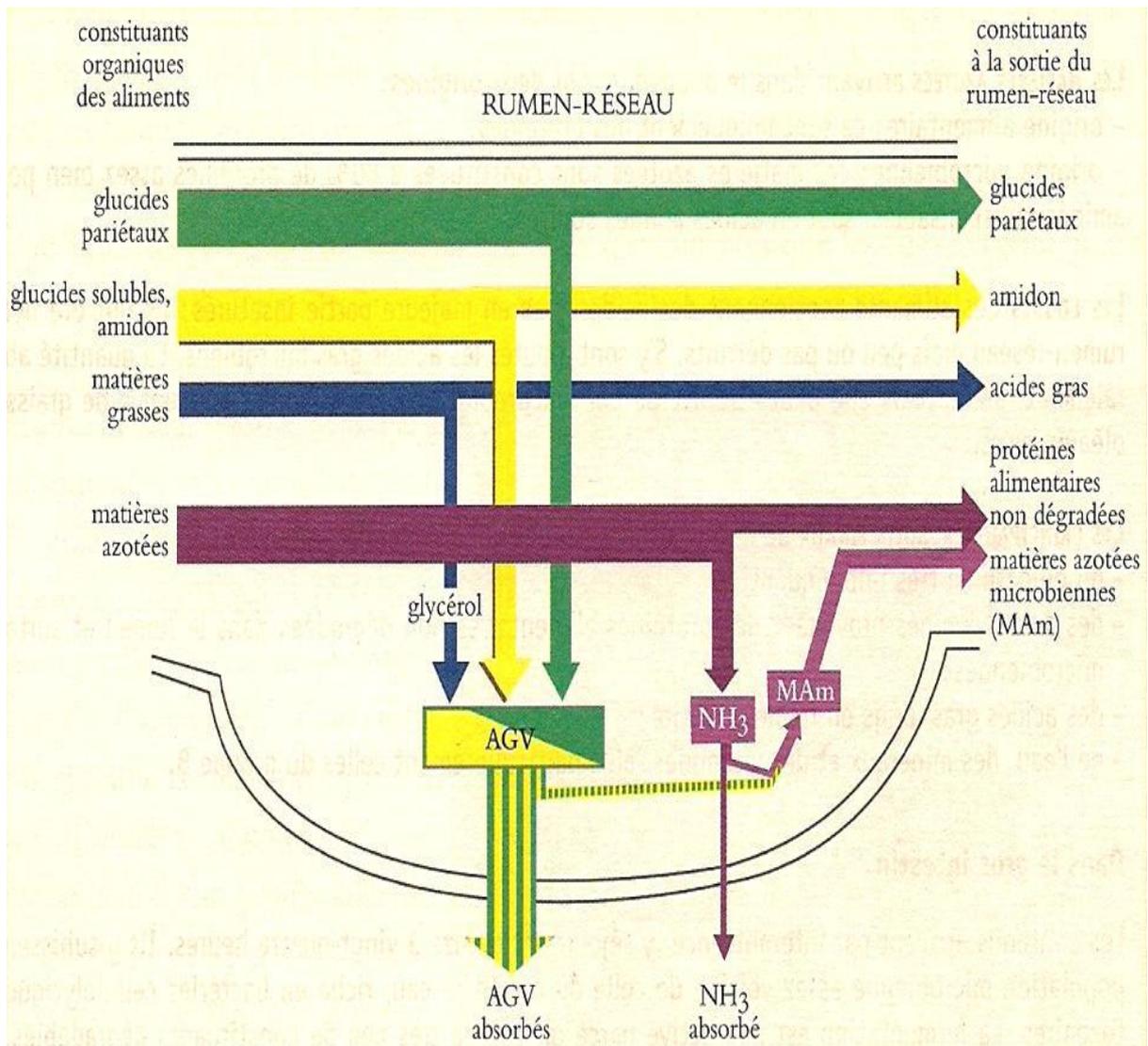
### 3. Relations stœchiométriques

Vermorel (1995) a présenté un exemple des relations stœchiométriques correspondant à la fermentation dans le rumen d'une ration de 20 kg de matière sèche, soit environ 18 kg de matière organique ingérée par une vache de 600 kg en lactation. De cette ration, 8.1 kg de matière organique seront dégradés dans le complexe réticulo-rumen, ce qui correspond à environ 50 moles d'équivalent de glucose anhydre (CHO). Le bilan de cette dégradation est le suivant :



Cette relation peut être aussi exprimée en terme d'énergie comme suit :

$$34.0 \text{ Mcal} = 12.3 \text{ Mcal} + 8.4 \text{ Mcal} + 4.7 \text{ Mcal} + 0 \text{ Mcal} + 5.1 \text{ Mcal} + 1.7 \text{ Mcal} + 1.7 \text{ Mcal}$$



**Figure 07 :** Schéma récapitulatif de la dégradation de la matière organique des aliments dans le réticulo-rumen (Delteil *et al.*, 2012).

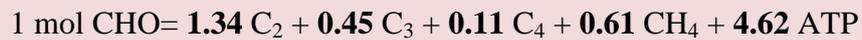
Les pertes sous forme de CH<sub>4</sub> représentent environ 15% de l'énergie des équivalents CHO fermentés, soit 10.5% de l'énergie digestible ou 6.7% de l'énergie brute (Vermorel, 1995).

Le model stœchiométrique développé par Demeyer (1991) illustre les relations entre les équivalents des produits terminaux des fermentations (AGV et CH<sub>4</sub>) et permet de quantifier la récupération de l'hydrogène. En admettant une récupération moyenne de 90%, cette relation permet de relier les productions molaires de CH<sub>4</sub> à celles des AGV.

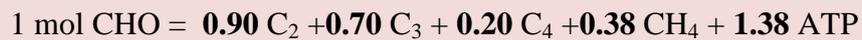


Clairement, cette équation indique que le pourcentage molaire des AGV influence la production de CH<sub>4</sub> dans le rumen, Beever (1993), quant à lui, a comparé le bilan de fermentation d'une ration riche en fourrages à celui d'une ration riche en concentrés, les relations stœchiométriques pour ces deux régimes s'établissent comme suit :

**Fourrages**



**Concentrés**



L'acétate et le butyrate promeuvent la production de CH<sub>4</sub>, tandis que l'on peut considérer la production du propionate comme une voie compétitrice pour l'utilisation de l'hydrogène dans le rumen. Les production de CH<sub>4</sub> et de l'acétate ne sont pas corrélés ( $R^2 = 0.029$ ), mais il existe des corrélations négatives entre la production du CH<sub>4</sub> et la production du propionate ( $R^2 = 0.774$ ), le ratio C<sub>2</sub>/C<sub>3</sub> ( $R^2 = 0.772$ ) et le ratio C<sub>2</sub> + C<sub>4</sub> / C<sub>3</sub> ( $R^2 = 0.778$ ) (Moss *et al.*, 2000).

## Chapitre III

### Production et émission du méthane par les ruminants et sa contribution à l'effet de serre

#### 1. Gaz à effet de serre, cas de l'Algérie

L'effet de serre désigne un phénomène d'échauffement de la surface de la terre et des couches basses de l'atmosphère, dû au fait que certains gaz de l'atmosphère absorbent et renvoient une partie du rayonnement infrarouge émis par la terre, ce dernier compensant le rayonnement solaire qu'elle absorbe elle-même (Figure 08). On estime que sans GES, la température à la surface du globe serait de  $-18^{\circ}\text{C}$ . Cependant, l'effet de serre existait indépendamment des activités humaines (naturel), et était dû essentiellement à la vapeur d'eau et au gaz carbonique et à un degré moindre au méthane. Néanmoins les activités humaines ont fortement accru l'effet de serre dès le début de l'époque industrielle (mi- 19ème siècle) ou la concentration de  $\text{CO}_2$  dans l'atmosphère a augmenté de 30 %, alors que la température moyenne du globe a augmenté de 0,6 % (IPCC, 2007)

Les gaz à effet de serre sont des gaz qui absorbent une partie des rayons solaires en les redistribuant sous forme de radiations au sein de l'atmosphère terrestre. Les gaz à effet de serre traités dans le protocole de Kyoto sont (Tableau 05):

- ❖ Le gaz carbonique ou dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) provenant essentiellement de la combustion des énergies fossiles et de la déforestation ;
- ❖ Le méthane ( $\text{CH}_4$ ) qui a pour origine principale l'élevage des ruminants, la culture du riz, les décharges d'ordures ménagères et les exploitations pétrolières et gazières;
- ❖ Les halocarbures qui sont des gaz réfrigérants utilisés dans les systèmes de climatisation et la production de froid et les gaz propulseurs des aérosols;
- ❖ Le protoxyde d'azote ou oxyde nitreux ( $\text{N}_2\text{O}$ ) provient de l'utilisation des engrais azotés et de certains procédés chimiques;
- ❖ L'hexafluorure de soufre ( $\text{SF}_6$ ) utilisé par exemple dans les transformateurs électriques.

**En Algérie**, les émissions de gaz à effet de serre sont estimées à 75 870 Gg de  $\text{CO}_2$ , 914 Gg de  $\text{CH}_4$  et 31 Gg de  $\text{N}_2\text{O}$ . La séquestration de  $\text{CO}_2$  par les forêts est estimée à 4 331 Gg (FARAH Abdelhafid, 2014).

Tableau 05 : Les principaux gaz à effet de serre (GIEC, 2007)			
Gaz à effet de serre	Durée de vie dans l'atmosphère	Sources	PRG/ 100 ans
Dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> )	100 ans	Combustion combustibles fossiles, modification de l'affectation des terres, production de ciment	1
Méthane (CH <sub>4</sub> )	12 ans	Combustibles fossiles, rizières, décharge de déchets, bétail	25
Oxyde nitreux (N <sub>2</sub> O)	120 ans	Fertilisants, processus industriels, Combustion des Combustibles fossiles	298
Chlorofluorocarbures (CFC)	Jusqu'à 50 000 ans	Réfrigérants liquides	120-14800
Perfluorocarbures (PFC)		Réfrigérants, industrie électronique et industrie de l'aluminium	7400-12200
Hexafluorure de soufre (SF <sub>6</sub> )		Isolant isolé dans l'industrie électronique et l'industrie de magnésium	22.800

Les résultats montrent que c'est essentiellement le secteur de l'énergie qui est responsable à plus des deux-tiers des émissions (Tableau 06). Le potentiel du pays en hydrocarbures explique en grande partie cette situation. Le changement d'affectation des terres et la foresterie est le second secteur important du point de vue des émissions (12,44%), qui ne sont pas suffisamment atténuées par la séquestration qu'il assure. **L'agriculture** est le troisième secteur émetteur de gaz à effet de serre avec plus de **11,49%** du total. Le secteur des déchets intervient pour 4,59% et celui des procédés industriels pour 4,52%. Le gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) est le gaz le plus émis avec 72,40%, suivi du méthane (CH<sub>4</sub>) avec 18,31% et de l'oxyde nitreux (N<sub>2</sub>O) avec 9,29% (Djemouai, 2009).

Les émissions fugitives liées aux activités gazières et pétrolières sont loin d'être négligeables. Néanmoins, l'absence de coefficients d'émissions spécifiques à l'Algérie a fait que dans la majeure partie des calculs, ce sont les facteurs d'émissions par défaut, proposés par le manuel de référence de l'inventaire de GIEC qui ont été utilisés.

<b>Tableau 06 : Les émissions sectorielles de gaz à effet de serre en Algérie</b> (Djemouai, 2009).		
<b>Secteur</b>	<b>Mt Eq CO<sub>2</sub></b>	<b>Pourcentage (%)</b>
<b>Énergie</b>	70 165.71	66.92
<b>Sols/Forets</b>	13 039.56	12.44
<b>Agriculture</b>	12 038 34	<b>11.49</b>
<b>Déchets</b>	4815.11	4.59
<b>Procédés industriels</b>	4735.64	4.52
UNFCCC : United Nations Framework Conventions on Climate Change.		

Selon le CIAT (International Center for Tropical Agriculture), l'Afrique du Nord subira les impacts les plus négatifs liés au changement climatique, ainsi selon la même source 80 % des cultures montreront des pertes de productivités en 2050.

## **2. Le méthane et l'effet de serre**

L'importance d'un gaz pour son effet de serre dépend à la fois de son pouvoir radiatif (puissance radiative que le GES renvoie vers le sol) et de sa durée de vie dans l'atmosphère. Le pouvoir de réchauffement global (PRG) d'un gaz se définit comme le forçage radiatif cumulé sur une durée de 100 ans et s'exprime relativement au CO<sub>2</sub>. Le méthane est une cible particulièrement intéressante dans le cadre de la lutte contre l'effet de serre puisque son PRG est nettement supérieur (x 21-23) à celui du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et que sa durée de vie dans l'atmosphère est courte (12-20 ans). Ces deux derniers points signifient que le méthane est un gaz très réactif et qu'une réduction de ses émissions aura des répercussions positives rapides sur l'effet de serre (Solomon *et al.*, 2007). Malgré l'énorme potentiel de réchauffement du NO<sub>2</sub>, la quantité émise étant très faible par rapport au CO<sub>2</sub>, son impact n'a pas la même importance que celui du CH<sub>4</sub>. Le CH<sub>4</sub> n'agit pas seulement par absorption du rayonnement infra-rouge, il est aussi responsable de la formation photochimique d'autres gaz à effet de serre, comme l'O<sub>3</sub> troposphérique qui résulte de la dégradation du CH<sub>4</sub>.

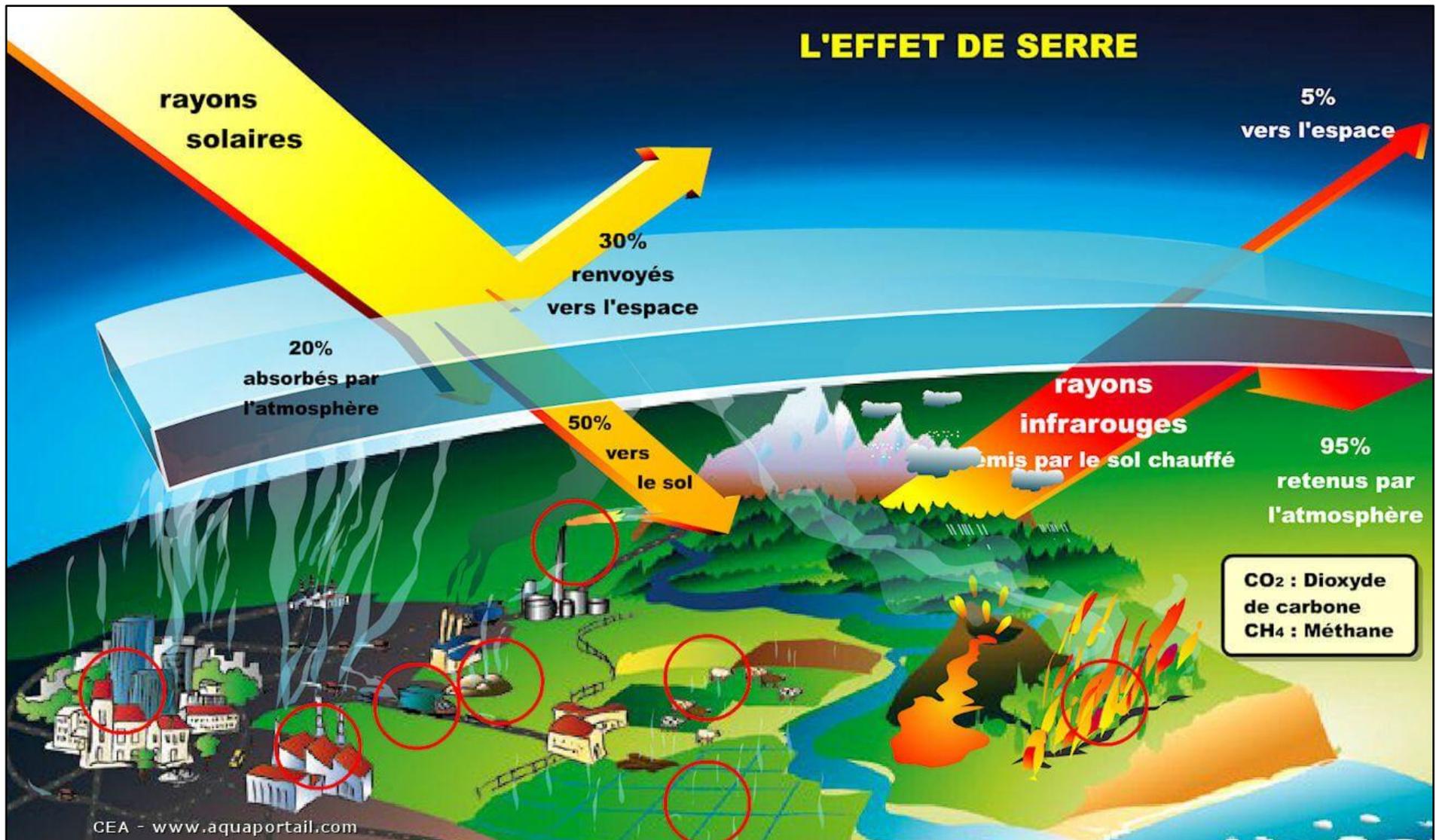


Figure 08 : Principe de l'effet de serre (www.aquaportail.com).

Une autre importance du CH<sub>4</sub> tient au fait que l'on pourrait stabiliser sa concentration dans l'atmosphère en réduisant les émissions anthropogéniques de 10% seulement, alors qu'il faudrait réduire de 60% les émissions de CO<sub>2</sub> pour un même résultat. En effet, les molécules de CH<sub>4</sub> persistent environ 12 ans dans l'atmosphère avant leur récupération dans les puits de carbone tels que les océans, le sol et les plantes. Alors que les molécules de CO<sub>2</sub> y séjournent 10 fois plus longtemps, c'est pourquoi une stratégie de réduction des émissions de CH<sub>4</sub> aurait un impact beaucoup plus immédiat sur l'effet de serre qu'une action sur le CO<sub>2</sub>, qui ne se ferait sentir qu'à bien plus long terme et impliquerait des efforts autrement plus importants (popova *et al.*, 2011).

### 3. Le méthane et les ruminants

La part relative de **l'agriculture** dans les **émissions de méthane** a eu tendance à augmenter au cours des dernières décennies, notamment parce que celle d'origine industrielle a diminué. L'élevage contribue directement et indirectement au changement climatique par les émissions de GES comme le dioxyde de carbone, le méthane et l'oxyde nitreux. Globalement, le secteur contribue à 18 % (7,1 milliards de tonnes d'équivalent CO<sub>2</sub>) des émissions de gaz à effet de serre au niveau mondial. Bien qu'il ne soit responsable que de neuf % des émissions de CO<sub>2</sub>, il génère 35 % des émissions anthropiques de méthane (CH<sub>4</sub>) ayant un PRG 23 fois plus que celui du CO<sub>2</sub> (Tubiello *et al.*, 2014).

La plus grande source d'émissions de GES agricoles est **le méthane** produit par la fermentation entérique en tant qu'un produit final d'une voie de dégradation anaérobie complexe de la biomasse végétale. Les émissions provenant de la fermentation entérique ont augmenté de 11%, passant de 1,858 Mt éq. CO<sub>2</sub> à 2,071 Mt éq. CO<sub>2</sub> entre 2001 et 2011. Les émissions agricoles mondiales devraient augmenter respectivement de 18% et 30% en 2030 et 2050 (Tubiello *et al.*, 2014).. La production de CH<sub>4</sub> par les ruminants varie en fonction de la zone géographique, de la qualité et de la composition du régime alimentaire et du niveau d'ingestion (Johnson and Ward, 1996).

Chez les ruminants, le méthane produit au cours des fermentations digestives est rejeté par éructation dans l'atmosphère. Les mesures de production de méthane digestif réalisées jusqu'à cette dernière décennie étaient motivées par l'importance des pertes énergétiques qu'elle représente pour les ruminants (6 à 9 % de l'énergie brute ingérée ; 10 à 15 % de l'énergie

métabolisable) et par les situations d'inconfort qu'elle entraîne chez l'homme. L'impact du méthane digestif sur l'effet de serre n'a été pris en considération qu'au cours des 30 dernières années, mais il est devenu aujourd'hui la préoccupation première des pouvoirs publics et des chercheurs dans la plupart des pays (Johnson and Johnson, 1995).

#### 4. La méthanogénèse ruminale et les microorganismes producteurs de méthane

Les conditions environnementales du tube digestif des ruminants sont particulièrement favorables aux *Archaea* méthanogènes, la méthanogénèse ruminale résulte, donc de l'activité exclusive de ces bactéries qui font partie du domaine des *Archaea* et du règne des *Euryarchaeota* (Woese *et al.*, 1990).

##### 4.1. Le groupe des *Archaea* méthanogènes

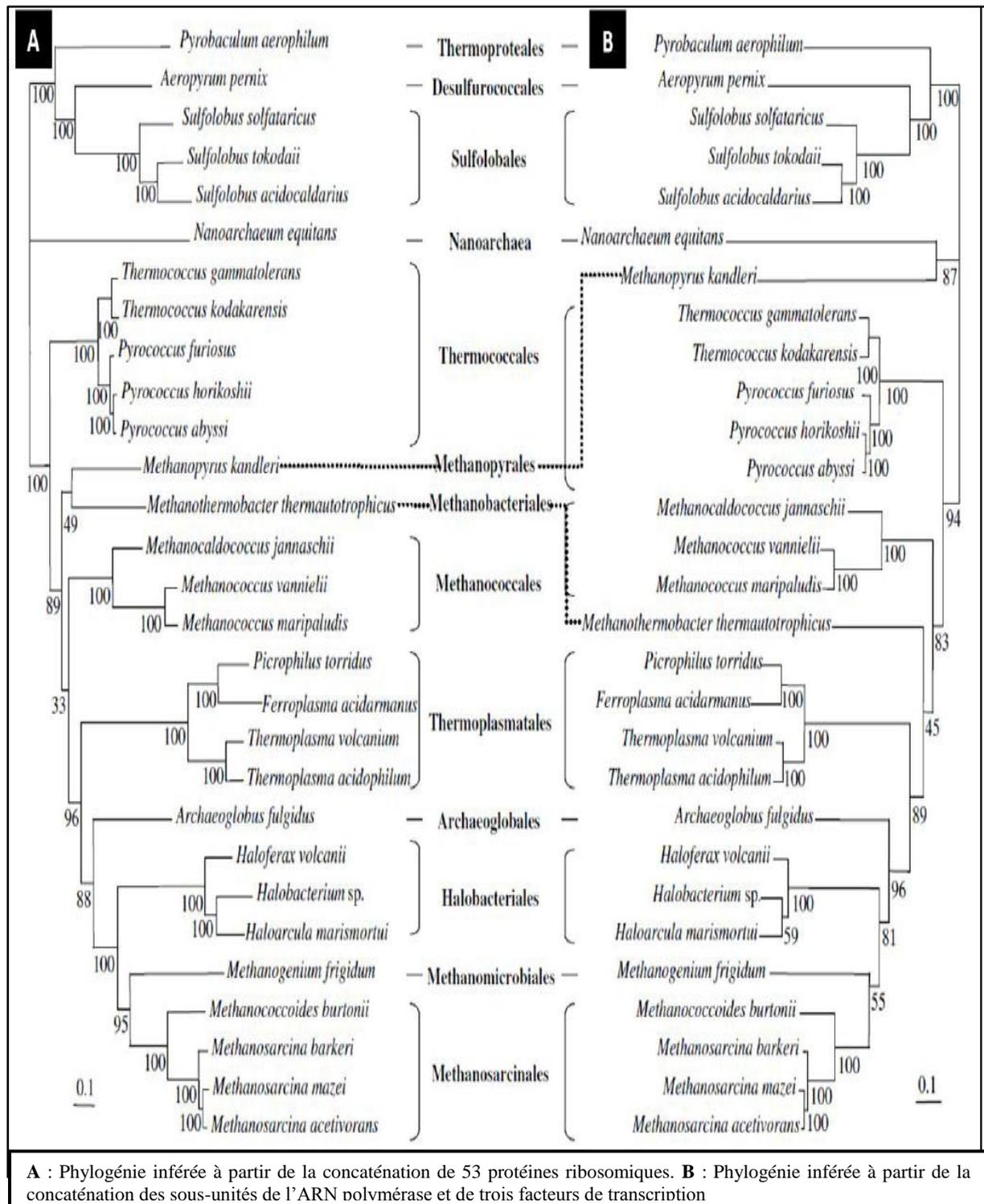
Les méthanogènes sont des micro-organismes qui produisent du CH<sub>4</sub> comme sous-produit métabolique de la vie en conditions anoxiques. Ils font tous partie du domaine des *Archaea*, phylum, *Euryarcheota* et sont organisés en 5 ordres: *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanopyrales* regroupant 10 familles et 31 genres (Garcia *et al.*, 2000) (Figure 09).

D'autres groupes phylogénétiques sont constamment découverts tels le RCC (Rumen Cluster C) et RC-I (Rice Cluster I) ; aucun représentant de ces deux groupes n'a encore été cultivé.

##### 4.2. Le métabolisme des *Archaea* méthanogènes

Les méthanogènes tirent l'énergie nécessaire à leur développement en produisant de CH<sub>4</sub> (Balch *et al.*, 1979; Thauer *et al.*, 2008). Les méthanogènes sont incapables d'utiliser la plus part des composés organiques, tels les hydrates de carbone et les acides gras à chaîne longue. Cette restriction impose une relation nutritionnelle étroite avec des microorganismes non-méthanogènes qui utilisent les composés organiques et dont les produits du métabolisme deviennent des substrats pour la méthanogénèse (Figure 10). Ainsi, en fonction du substrat préférentiel, les méthanogènes peuvent être divisés en trois grands groupes : **les hydrogénotrophes**, **les méthylophes** et **les acétotrophes** (Balch *et al.*, 1979; Garcia *et al.*, 2000).

**Les hydrogénotrophes** sont les plus fréquemment retrouvés, l'accepteur final d'électrons est le CO<sub>2</sub> et le donneur principal l'H<sub>2</sub>.

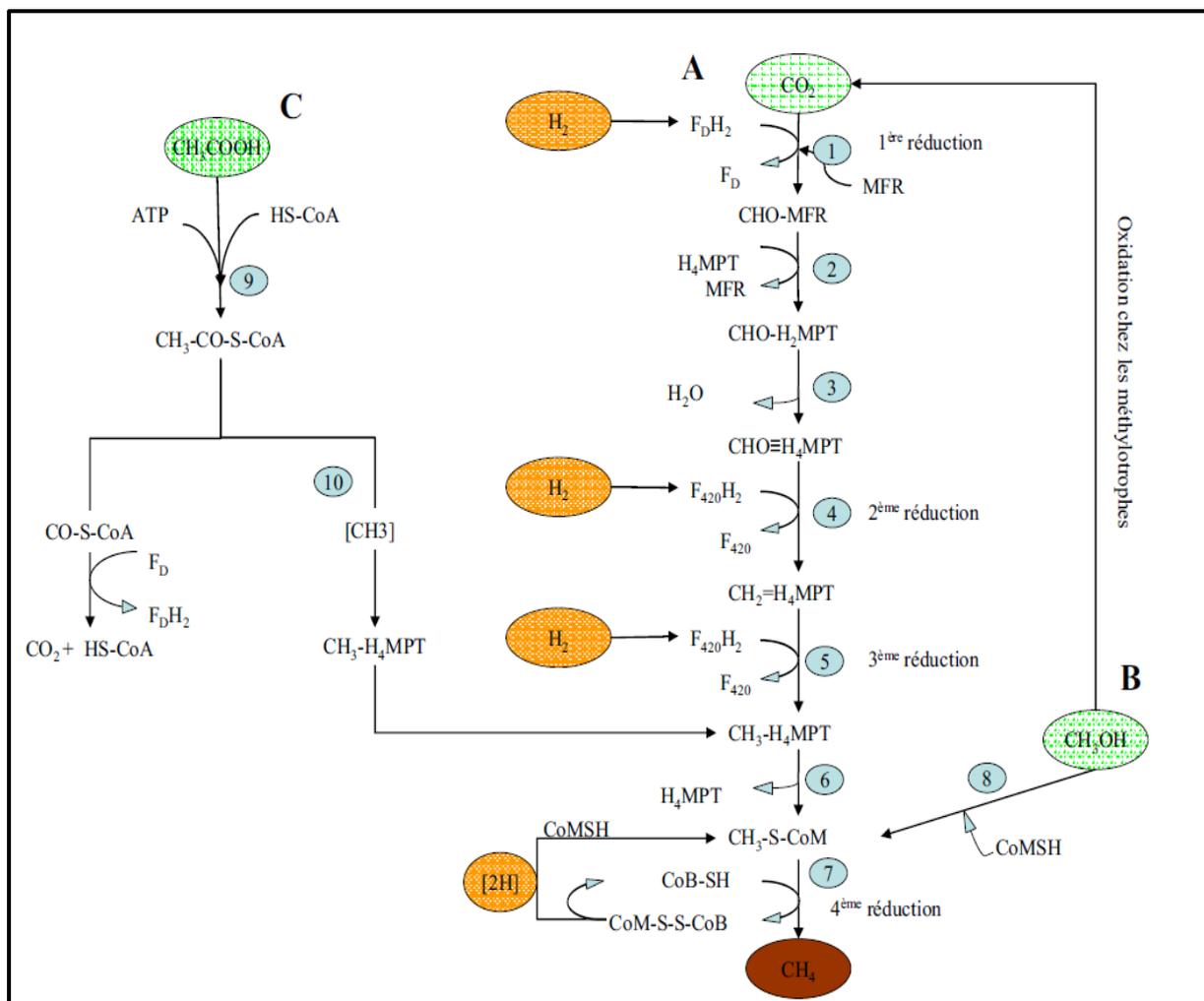


**Figure 09:** Phylogénie des *Archaea* (Gribaldo and Brochier-Armanet, 2006).

Parmi les hydrogénéotrophes, un grand nombre sont également capables d'utiliser le formate. Les *Archaea* méthanogènes **méthylotrophes**, utilisent des substrats contenant un groupement méthyle : méthanol, méthylamines (mono-, di-, tri- et tétra-méthylamines), méthylsulfides (méthanethiol, diméthylsulfide). Cependant, Les *Archaea* méthanogènes

**acétotrophes** appartenant exclusivement aux genres *Methanosarcina* et *Methanosaeta* utilisent l'acétate comme substrat en utilisant l'ATP, il est pris en charge par la coenzyme A (CoA-SH) (Popova *et al.*, 2011).

Les enzymes impliquées dans la méthanogénèse sont codées par des gènes pour certains, exclusivement présents chez les *Archaea* méthanogènes. Un gène particulier, le **mcrA**, a reçu beaucoup d'attention ces dernières années, étant identifié en tant que marqueur moléculaire de la communauté méthanogène au même niveau que le rrs.



**Figure 10:** Voies métaboliques de la méthanogénèse (Liu and Whitman, 2008)

### 4.3. Les *Archaea* méthanogène du rumen

Les *Archaea* méthanogènes du rumen complètent les fermentations des bactéries anaérobies en utilisant l'hydrogène produit lors de la fermentation des glucides pour synthétiser et produire du méthane (Wolin *et al.*, 1997). Elles sont des anaérobies strictes et

essentiellement des hydrogénotrophes, bien que certaines espèces peuvent occasionnellement utiliser le formate ou les méthylamines. Les *Archaea* méthanogènes constituent une petite partie de la biomasse microbienne du rumen, évaluée entre  $10^8$  et  $10^9$  *Archaea/g* de contenu ruminal par des méthodes culturales. Elle colonise le rumen très tôt après la naissance, bien avant que le jeune ruminant ne commence à se nourrir des végétaux (Reeve *et al.*, 1997).

Chez les ruminants, 2 phyla sont retrouvés dans le rumen avec majoritairement le phylum *Euryarchaeota* et rarement le phylum *Crenarchaeota* (Hook *et al.*, 2011). Les *Archaea* dans le rumen sont peu diversifiées, *Methanobrevibacter (Mbb.)* spp. est considérée comme la principale espèce de méthanogènes ruminiaux, que ce soit par des méthodes de culture (Stewart and Bryant, 1988), ou par des analyses génomiques. Ses principaux substrats sont le dihydrogène et le dioxyde de carbone mais le formate peut également être utilisé lorsqu'il est présent en grande concentration dans le rumen. *Mbb. Ruminantium* est la souche type et elle est caractérisée par une exigence en coenzyme M, spécifique aux méthanogènes (Stewart and Bryant, 1988), il joue un rôle de porteur de groupements méthyles. D'autres souches de *Methanobrevibacter* spp. sont présentes dans le rumen (*Mbb. smithii* et *Mbb. thaueri*) (Skillman *et al.*, 2006). Parmi les espèces méthanogènes, on note également la place importante de *Methanomicrobium mobile*, qui représente près de 54% des méthanogènes ruminiaux chez les ovins (Yanagita *et al.*, 2000).

Dans le rumen les *Archaea* méthanogènes occupent quatre différentes niches : libres dans le liquide ruminal, attachées aux particules alimentaires solides, attachées à l'épithélium ruminal ou en ecto- ou endo- symbiose avec les protozoaires (Janssen and Kirs, 2008). La quantification en qPCR ciblant le gène *mcrA* a montré que la population méthanogène attachée à l'épithélium ruminal était plus abondante que celle de la phase liquide ; les cellules attachées aux particules solides prenaient une place intermédiaire (Pei *et al.*, 2010).

Les *Archaea* méthanogènes ont été observées également sur la surface des protozoaires (Vogels *et al.*, 1980). Stumm *et al.* (1982) ont suggéré que pas moins de 20% des méthanogènes du rumen vivent en association avec les protozoaires.

De plus, Finlay *et al.* (1994) ont mis en évidence des *Archaea* en associations endosymbiotiques avec les protozoaires ciliés *Entodinium* spp. et *Dasytricha ruminantium* et ont estimé que les méthanogènes peuvent occuper jusqu'à 1% du volume cellulaire de ces

eucaryotes. Les *Archaea* méthanogènes associées aux protozoaires seraient responsables de 9 à 25% du CH<sub>4</sub> produit dans le rumen.

Les abondances des *Archaea* méthanogènes observées au niveau du rumen varient en fonction de la nature des rations, des protozoaires présents et aussi en fonction des amorces utilisées pour leurs identifications (Tymensen *et al.*, 2012).

## 5. Stratégies de réduction de la production de méthane entérique

Les émissions de gaz à effet de serre provenant de la production animale devraient augmenter dans les prochaines décennies en raison de l'accroissement démographique mondial et de l'évolution des régimes alimentaires à moins que des stratégies d'atténuation appropriées ne soient mises en œuvre. Bien que des mesures importantes aient récemment été prises, l'impact du secteur de l'élevage sur l'environnement, en particulier sur le changement climatique, n'est pas encore bien compris. En effet, les émissions provenant des systèmes d'élevage peuvent être considérablement réduites grâce à des technologies, des politiques et des mesures d'incitations adéquates pour leur mise en œuvre.

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

### 5.1. Situation actuelle et projection

Depuis une cinquantaine d'années, un grand nombre de pistes pour la réduction des émissions de CH<sub>4</sub> ont été proposées et étudiées par des nombreuses équipes, globalement, les actions concrètes de ces stratégies peuvent être séparées dans trois grands groupes selon s'ils s'agissent de la **composition de la ration**, **manipulation biotechnologique** directe du microbiote ruminal et les **additifs alimentaires** (Martin *et al.*, 2010). Ainsi, les stratégies de réduction se basant sur la ration s'articulent autour de (Tableau 07):

✚ **L'accroissement de la proportion de concentré dans la ration** entraîne une diminution de la production de CH<sub>4</sub>. Les aliments concentrés et les grains riches en amidon ont fait l'objet de plusieurs études. En général, elles ont conclu que, chez l'animal, l'ajout d'aliments concentrés riches en amidon favorise la production de propionate et réduit, par conséquent les quantités de méthane produit (Doreau *et al.*, 2011). A l'inverse, Il y a une relation

positive directe entre les émissions de méthane et une alimentation riche en fourrages qui favorisent la production d'acétate dans le rumen (Sauvant and Giger-Reverdin, 2007).

#### **Influence des quantités ingérées**

L'augmentation du niveau d'ingestion réduit le temps de séjour des aliments dans le rumen ainsi que la part de la digestion de la matière organique. Par conséquent, la quantité de méthane émise diminue d'environ 10% lorsque les quantités ingérées se doublent (Jouany, 1994). L'accélération du transit digestif dans le rumen avec les niveaux d'ingestion élevés, oriente les fermentations vers une plus grande production de propionate qui entre donc en compétition avec la méthanogénèse pour l'utilisation de l'hydrogène métabolique.

#### **L'enrichissement en lipides de la ration**

À la différence des régimes riches en amidon, la supplémentation de la ration avec des lipides a l'avantage d'augmenter sa valeur énergétique sans provoquer des baisses importantes du pH ruminal. Ils agissent en inhibant les protozoaires et en limitant la concentration de l'H<sub>2</sub>. La réduction des émissions de CH<sub>4</sub> avec des rations supplémentées en lipides (Beauchemin *et al* 2009, Martin *et al.*, 2010) s'expliquerait également par une baisse dans l'activité métabolique des méthanogènes, conséquence de la disponibilité limitée de l'H<sub>2</sub> (Doreau *et al.*, 2011). Les sources de gras sont diverses : huile de noix de coco, canola, soya, tournesol, lin et palme (et ses dérivés raffinés).

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

#### **La défaunation**

Elle consiste à éliminer les protozoaires du rumen car une partie des *Archaea* méthanogènes vit attachée à la surface extérieure des protozoaires ciliés du rumen. Cette symbiose participe au transfert de l'H<sub>2</sub> nécessaire à la réduction du CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> par les *Archaea* méthanogènes (Machmüller *et al.*, 2003a). Les *Archaea* méthanogènes associées aux protozoaires ciliés sont responsable de 9 à 37 % de la production de CH<sub>4</sub> dans le rumen (Machmüller *et al.*, 2003b). De ce fait, la défaunation permet de réduire la production de CH<sub>4</sub> sans effets remarquables sur la digestion ruminale.

**Tableau 07** : Strategies actuellement étudiées pour réduire les émissions du CH<sub>4</sub> par les ruminants, mécanismes et limites (Popova, 2012).

Stratégies	Mécanismes	Limites
<b>Composition de la ration</b> ✓ Augmenter le contenu en amidon ✓ Diminuer le contenu en parois cellulaires ✓ Réduire la taille des particules	➤ Diminution du temps de rétention ➤ Augmentation de la proportion molaire du propionate ➤ Diminution du pH ruminal ➤ Changement dans la composition de la biocénose ruminale	✗ Peut déplacer la méthanogénèse vers le reste du tube digestif (Caecum-colon) ✗ Risques d'acidose ruminale
<b>Lipides</b> ✓ Acides gras ✓ Huiles	➤ Inhibition directe des méthanogènes/protozoaires ➤ Augmentation de la proportion molaire du propionate ➤ Biohydrogénation	✗ Effet négatif sur l'ingestion, les performances animales ✗ Effets variables en fonction du régime et de l'espèce animale ✗ Besoin d'études à long-terme
✓ Défaunation ✓ Additifs chimiques ✓ Additifs organiques	➤ Diminution de la disponibilité du substrat hydrogène pour la méthanogénèse ➤ Effets directs sur les méthanogènes	✗ Possible adaptation de l'écosystème microbien ✗ Importance du régime alimentaire ✗ Difficulté en pratique à défauner et de maintenir les animaux à l'état défauné
✓ Vaccins contre les méthanogène	➤ Réponse immunitaire de l'animal hôte contre les méthanogènes.	Difficulté de définir les cibles du vaccin
✓ Monensine	➤ Inhibition des protozoaires et des bactéries à Gram positif ➤ Limitation de la disponibilité du substrat hydrogène pour la méthanogénèse	✗ Possible adaptation de l'écosystème microbien ✗ Efficacité variable en fonction du régime et de l'animal ✗ Utilisation interdite dans l'UE
<b>Substances végétales</b> ✓ Tanins condensés ✓ Saponines ✓ Huiles essentiels	➤ Activité antimicrobienne ➤ Diminution de la disponibilité du substrat hydrogène pour la méthanogénèse	✗ Dosage optimal encore à déterminer ✗ Pas assez d'études in vivo ✗ Pas assez d'études sur le long terme ✗ Effets sur la digestion peu étudiés
<b>Acides organiques</b> ✓ Malate ✓ Fumarate	➤ Puits à l'hydrogène ➤ Augmentation de la ration C <sub>2</sub> /C <sub>3</sub>	✗ Effets variables en fonction du régime ✗ Pas assez d'études in vivo ✗ Pas assez d'études sur le long terme ✗ Effets sur la digestion peu étudiés

### *Vaccination et anticorps*

La vaccination des animaux contre les *Archaea* méthanogènes permettrait de diminuer la production de CH<sub>4</sub> sans altérer la digestion, la performance animale ou la qualité des produits (Wright *et al.*, 2004). Il s'agit d'une stimulation du système immunitaire de l'animal afin de produire des anticorps antiméthanogéniques qui *via* la salive rejoindront le rumen où ils inhiberont les *Archaea*.

### *L'ajout de bactéries acétogènes*

Il stimule la voie d'acétogenèse réductrice à la condition stricte que les bactéries méthanogènes aient été préalablement inhibées par l'ajout de BES (l'acide 2-bromoethanesulfonique) ou de probiotique. La faible affinité des acétogènes pour l'hydrogène en comparaison de celle des méthanogènes d'une part, et leur caractère hétérotrophe qui les incite à utiliser d'autres sources de carbone que le CO<sub>2</sub> d'autre part, sont à l'origine de la faible contribution des acétogènes à la fixation de l'hydrogène ruminal (Popova *et al.*, 2011).

**Des additifs** ont été utilisés pour réduire la production de CH<sub>4</sub>, ils regroupent des additifs **chimiques ou naturels**

### *Les antibiotiques ionophores*

L'effet inhibiteur des antibiotiques (monensine, lasalocide, salinomycine, avoparcine) sur la méthanogénèse est traduit par une toxicité vis-à-vis des bactéries à Gram positif (Jouany, 1994). Ces derniers agissent comme échangeurs d'ions (sodium, potassium, calcium et H<sub>2</sub>) entre la bactérie et son milieu environnant. Les déséquilibres ioniques créés finissent par épuiser et tuer les bactéries. Leur emploi chez le ruminant entraîne à court terme une diminution de la production de CH<sub>4</sub> de 0 à 30% (Moran *et al.*, 2011). L'effet se maintient habituellement pendant plusieurs mois (Jouany and Lassalas, 1997).

### *Les acides organiques*

Les diacides organiques (aspartate, malate ou fumarate) sont des précurseurs potentiels de succinate et de propionate qui peuvent donc être utilisés pour diminuer la méthanogénèse lorsqu'ils sont ajoutés à la ration des ruminants. Ils orientent la fermentation ruminale vers la production de propionate qui résulte de leur conversion par les bactéries en succinate avec consommation du H<sub>2</sub> venant du formate ; le succinate est à son tour converti en propionate.

Les voies métaboliques alternatives de la méthanogénèse telles que la réduction des **nitrates et des sulfates** ont été employées pour réduire le CH<sub>4</sub> (Morgavi *et al.*, 2010). Brièvement, certaines bactéries spécifiques sont capables d'oxyder l' H<sub>2</sub> en utilisant des sulfates, des nitrates ou d'autres composés azotés ; le nombre de ces bactéries, normalement faible, augmente en présence de leur substrat de prédilection.

De nombreux **autres additifs chimiques** ont été testés comme par exemple les peptides riches en acides aminés soufrés (thiopeptine), les 9,10 anthraquinones, l'acide 2-bromoethanesulfonique (BES), les analogues halogénés du méthane (chloroforme, hydrate de chloral, bromochlorométhane, bromure de méthylène). Mais ces différents additifs sont peu prometteurs en termes d'utilisation sur le terrain pour le moment, car leur efficacité *in vivo* est mal connue, limitée et/ou transitoire et le risque de toxicité qu'ils présentent est potentiel ou prouvé.

Bien que les pistes évoquées ci-dessus pour réduire la production de CH<sub>4</sub> sont encourageantes à des degrés divers, et semblent provoquer une forte diminution de la production du CH<sub>4</sub>, leurs effets sont transitoires, et leurs applications sont souvent confrontées aux problèmes de cout et d'acceptabilité par le consommateur qui exigent, de plus en plus, des produits animaux non traités par des additifs chimiques. Pour cette raison, Il existe actuellement une voie prometteuse. Cette voie bénéficie d'une image plus naturelle, il s'agit des métabolites secondaires de plantes. Plus acceptables, ils ont certainement plus d'avenir dans les exploitations visant à réduire le CH<sub>4</sub> entérique.

### **5.2. Les métabolites secondaires de plantes / extraits de plantes**

De nombreux essais sont actuellement conduits dans le monde sur les plantes et/ ou leurs extraits riches en métabolites secondaires, utilisés comme moyen de manipuler la fonction digestive des ruminants. Certaines plantes ou extraits de plantes peuvent en effet modifier l'orientation des fermentations ruminales par leurs propriétés bactéricides et avoir des effets voisins de ceux obtenus avec les antibiotiques. Contrairement aux antibiotiques et aux additifs chimiques, ce type de produit bénéficie d'une bonne image en raison d'une origine naturelle. Le terme « extrait de plante », habituellement utilisé, bien que très vague, regroupe des mélanges de molécules obtenues grâce à différentes techniques d'extraction, à partir de végétaux ou parties de végétaux.

Les molécules actives de ces produits, potentiellement utilisables en alimentation des ruminants, sont issues du métabolisme dit secondaire des plantes car elles proviennent de voies différentes de celles essentielles à la vie, que sont la photosynthèse, la glycolyse ou encore la synthèse des acides aminés.

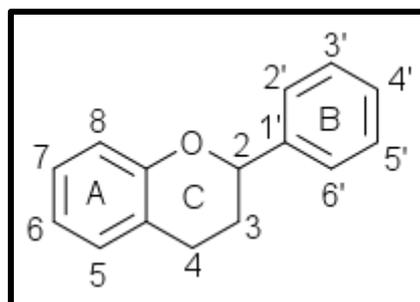
Chaque composé se caractérise par une propriété principale pouvant expliquer les différents effets sur le microbiote du rumen. Un grand nombre de molécules végétales étant soit de nature phénolique comme les flavonoïdes et les tannins, ou de nature terpénique comme les saponines, ont sollicité l'intérêt des chercheurs par leur capacité à inhiber la méthanogénèse, améliorer le métabolisme des protéines et la productivité animale. Dans cette thèse seront passés en revue les effets de quelques composés phénoliques (**flavonoïdes et tanins condensés**) et terpéniques (**saponines**) sur les fermentations et la méthanogénèse ruminale, ainsi que sur le microbiote du rumen (*Archaea* méthanogènes et protozoaires).

### 5.2.1. Les flavonoïdes

#### Chimie des flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Edenharder et Grünhage, 2003).

Ils sont trouvés dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes. Ils ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane (Macheix *et al.*, 2005) (Figures 11). Leur variation structurelle émane, en partie, du degré et le mode d'hydroxylation, méthylation, prénylation ou glycosylation.



**Figure 11:** Squelette de base des flavonoïdes

Ces divers composés se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycoside. En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : flavonoles, flavones, flavanones, isoflavanes, Chalcones, isoflavones et aurones (Havsteen, 2002 ; Edenharder and Grünhage, 2003) (Figure 12). Ils sont trouvés en abondance dans les familles suivantes : Polygonacées, Apiacées, Rutacées, **Astéracées** et Légumineuses.

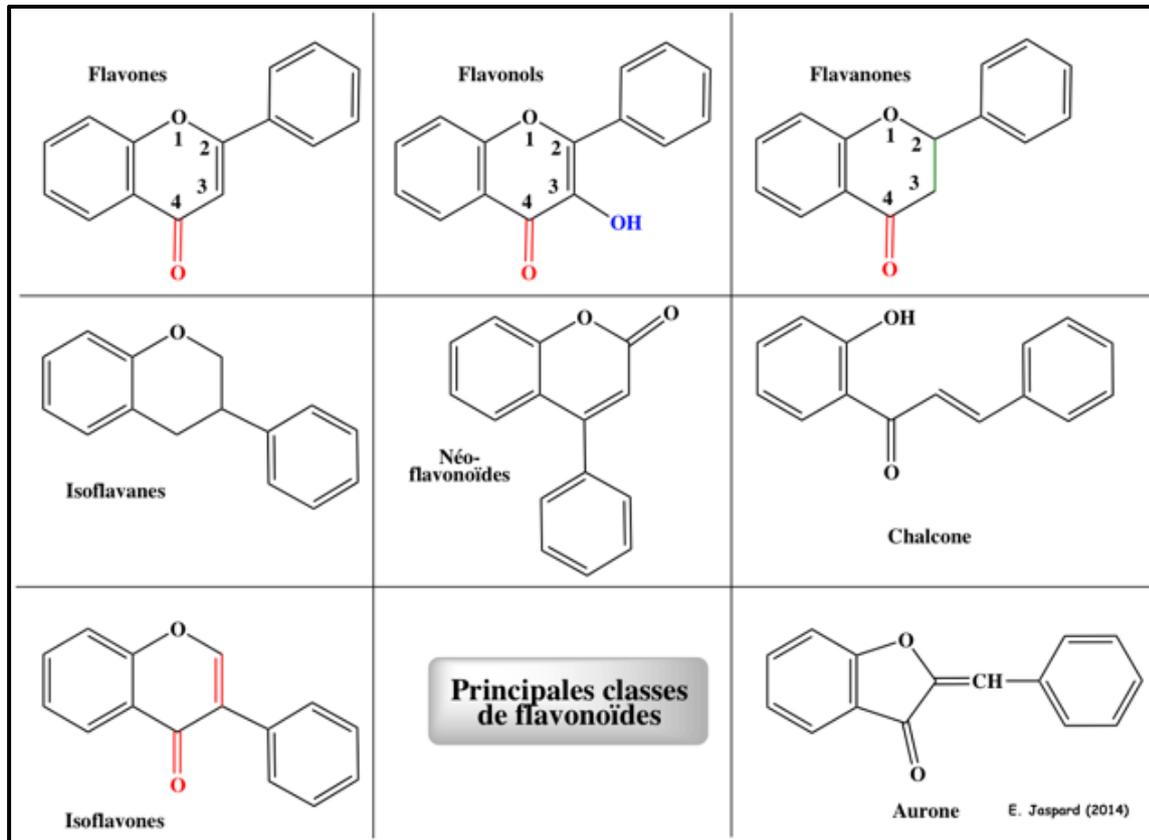


Figure 12 : Principales classes des flavonoïdes

#### ✚ Effets des flavonoïdes sur la méthanogénèse, les paramètres fermentaires et le microbiote du rumen

L'activité antimicrobienne de ces métabolites secondaires a été testée sur le microbiote ruminal et la totalité des études suggère un effet limité sur la fermentation dans le rumen, quelques travaux, cependant rapportent des effets bénéfiques sur la fermentation ruminale (Cushnie and Lamb, 2011).

L'effet des flavonoïdes sur la méthanogénèse est très limité. À titre d'exemple, Broudiscou *et al.* (2000) ont étudié l'effet de 13 extraits de plantes, sélectionnés pour leur contenu élevé en flavonoïdes, sur la fermentation ruminale et la méthanogénèse en cultures continues. Les extraits de *Lavandula officinalis* et de *Solidago virga-aurea* stimulent la fermentation, alors

que les extraits d'*Equisetum arvense* et de *Salvia officinalis* diminuent la méthanogénèse. Dans une autre expérience, Broudiscou and Lassalas (2000) ont étudié l'effet des extraits de *L. officinalis* et *E. arvense* et de l'isoquercitrine sur la fermentation ruminale en culture batch. L'addition d'un flavonol isolé à partir de *L. pedunculatus* à une culture pure de deux souches d'*Archaea* méthanogènes du rumen, en l'occurrence *Methanobrevibacter ruminantium* DSM 1093 et YLM-1 avec une concentration de 0.25 mg/l a inhibé 28% de la croissance de la première souche mesurée à travers la production du méthane, cependant, la deuxième souche n'a pas été négativement affectée par la même dose (Tavendale *et al.*, 2005).

Il semble que les flavonoïdes ont un effet direct sur les méthanogènes, en contrepartie, leur effet sur les protozoaires est mal connu. Par conséquent, il semble que certaines plantes contenant des flavonoïdes peuvent diminuer la production de méthane et simultanément, stimuler le métabolisme microbien (Broudiscou *et al.*, 2000, 2002). Quelques travaux sur l'effet des plantes/extraits riche en flavonoïdes sont exposés dans le tableau 08.

### 5.2.2. Les tanins

#### Chimie des tanins

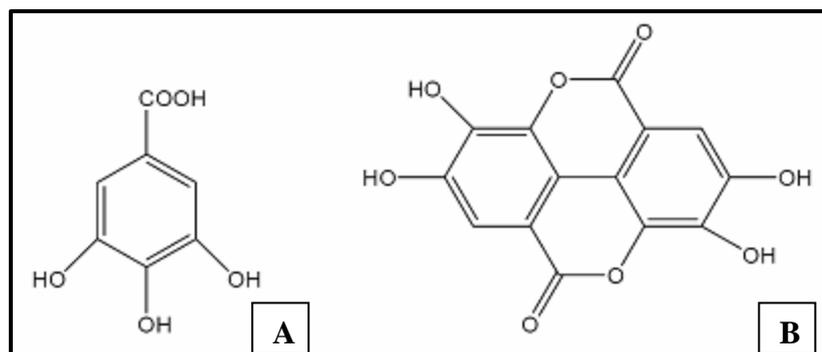
Les tanins sont définis comme des substances phénoliques hydrosolubles de masse moléculaire allant jusqu'à 20 000 Da (Hagerman, 2002). Leur structure chimique comprend au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupements phénoliques (Figure 13). Selon leur structure, ils sont généralement classés en deux groupes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Athanasidou *et al.*, 2001; Hassanpour *et al.*, 2011).

Ils ont la propriété de former des complexes réversibles ou irréversibles avec les protéines (principalement), les polysaccharides (cellulose, hémicellulose et pectine), les acides nucléiques, les stéroïdes et les alcaloïdes à cause de leur nombre important des groupes hydroxyles (ChaichiSemsari *et al.*, 2011).

**Les tanins condensés (TC)** sont des polymères de haut poids moléculaire, ce sont des oligomères (2-10 monomères) ou des polymères (>10 monomères) de flavonoïdes (flavan-3-ols), reliés majoritairement par des liaisons de type Carbone-Carbone insensibles à la dégradation enzymatique en anaérobie (Waghorn, 2008). C'est le nombre de monomères qui déterminent principalement le degré de polymérisation du tannin. La distribution des

monomères qui composent les TC est variable selon les espèces et les genres (Bayourthe et Lekhal, 2014).

**Les tanins hydrolysables (TH)** sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol (Cowan, 1999). Ils sont en général présents en plus faible concentration que les TC dans les plantes. Ils sont notamment hydrolysés dans le tractus digestif des ruminants et leurs produits de dégradation peuvent être absorbés.



**Figure 13** : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)

#### **✚ Effets des tanins condensés sur la méthanogénèse, les paramètres fermentaires et le microbiote du rumen**

En fait, les tanins étaient considérés communément et sans distinction comme des facteurs antinutritionnels ayant un impact négatif sur la santé animale.

Désormais, il a été montré qu'un apport faible à modéré (3-6% MS) produit des effets positifs, alors que leur ingestion massive aboutit à des effets néfastes sur les paramètres zootechniques, la physiologie digestive et la santé des animaux.

Les tannins exercent des actions antimicrobiennes dans le rumen, y compris sur les protozoaires, les bactéries et les champignons cellulolytiques (Patra and Saxena, 2009a), conduisant à des effets adverses sur la fermentation ruminale et sur les produits finaux de la dégradation, notamment l'ammoniac et les AGV (Grainger *et al.*, 2009; Bodas *et al.*, 2012). Les effets sur les concentrations d'ammoniac dans le rumen sont probablement liés à une réduction du nombre de protozoaires, qui jouent un rôle important dans la dégradation des protéines alimentaires du rumen (Jouany, 1994).

Tableau 08 : Effet des plantes/extraits riches en flavonoïdes sur la méthanogénèse et la fermentation ruminale (Patra and Saxena, 2010).

Plant materials	Test system (duration)	Dosage	Substrate/feed	Methane inhibition <sup>a</sup>	Methane inhibition <sup>b</sup>	Comments	References
<i>Azadirachta indica</i> seeds extracts (ethanol and methanol)	HGT (24 h)	Methanol and ethanol extracts of 0.5 ml/30 ml (0.2 g substrate)	Wheat straw: concentrate (1:1)	33.3 and 23.4%	29.4% and 19%	TVFA and digestibility unaffected, A/P and protozoal numbers decreased	Patra et al. (2006a)
<i>Carduus pycnocephalus</i> leaves	HGT (24 h)	1.25–3.75 g/l or 132–395 g/kg substrate	Hay: concentrate (32:68)	–	9.1–21.5%	Protozoal numbers unaffected	Goel et al. (2008a)
<i>C. pycnocephalus</i> leaves	HGT	1.25–3.75 g/l or 132–395 g/kg substrate	Hay	–	9.9–19.9%	Protozoal numbers decreased (4.4–23.8%)	Goel et al. (2008a)
<i>C. pycnocephalus</i> leaves extract (water and methanol (50 and 95%))	HGT (24 h)	0.5–1.1 g/l or 53–111 g/kg substrate	Hay or hay: concentrate (32:68)	3.4–7.8%	3.88–8.29%	Protozoal numbers unaffected	Goel et al. (2008a)
<i>C. pycnocephalus</i> leaves	Serum bottle (24 h)	1 g/l or 100 g/kg substrate	Luceme: grass hay: barley grain (50:40:10)	8.7%	9.86%	No effect on digestibility and rumen fermentation	Bodas et al. (2008)
<i>C. pycnocephalus</i> leaves extract (saponins 34.3%)	HGT (24 h)	0.14 g/l or 14.7 g/kg substrate	Hay: concentrate (1:1)	0.89%	1.33%	TVFA and A/P unaffected, methanogen numbers unaffected	Goel et al. (2008b)
<i>Equisetum arvense</i> plant extract (water extract); contains isoquercitrin	Dual outflow fermenter (7 days)	0.42 g/l or 13.9 g/kg substrate	Orchard grass hay: barley (50:50)	14.2%	–	No effect on rumen fermentation and protozoal numbers	Broudiscou et al. (2000)
<i>Frangula alnus</i> bark (alder buckthorn)	Serum bottle (24 h)	0.5–1.85 g/l or 48–178 g/kg substrate	Luceme: grass hay: barley (50:20:30)	31.6–55.8%	33.1–61.5%	Digestibility, TVFA and A/P decreased; no effect on these parameters at 5–10% of substrate	García-Gonzalez et al. (2008b)
<i>F. alnus</i> bark	Serum bottle (24 h)	1.4 g/l or 156 g/kg substrate	Luceme: grass hay: barley (50:20:30)	45.5%	42.5%	Digestibility, TVFA and A/P decreased	García-Gonzalez et al. (2008a)
<i>Hypericum perforatum</i> flower (Hypericin and hyperforin 0.08 and 20–40 g/kg DM, respectively)	Rusitec (10 days)	0.04 g/l or 2.85 g/kg substrate	Forage: concentrate (1:1)	–2.68% (no effect)	–2.10%	Digestibility, TVFA, A/P and protozoal numbers unaffected	Soliva et al. (2008)
<i>Populus tremula</i> leaves	Serum bottle (24 h)	1 g/l or 100 g/kg substrate	Luceme: grass hay: barley grain (50:40:10)	8.5%	10.2%	No effect on digestibility and rumen fermentation	Bodas et al. (2008)
<i>Prunus avium</i> leaves	Serum bottle (24 h)	1 g/l or 100 g/kg substrate	Luceme: grass hay: barley grain (50:40:10)	4.7%	7.21%	No effect on digestibility and TVFA; A/P increased	Bodas et al. (2008)
<i>Quercus robur</i> leaves	Serum bottle (24 h)	1 g/l or 100 g/kg substrate	Luceme: grass hay: barley grain (50:40:10)	9.4%	9.74%	No effect on digestibility and TVFA; A/P increased	Bodas et al. (2008)
<i>Rheum nobile</i> leaves	Serum bottle (24 h)	1 g/l or 100 g/kg substrate	Luceme: grass hay: barley grain (50:40:10)	14%	16.6%	Digestibility and TVFA increased; A/P decreased	Bodas et al. (2008)
<i>Rheum officinalis</i> root (rhubarb)	Serum bottle (24 h)	0.5–1.85 g/l or 4.8–178 g/kg substrate	Luceme: grass hay: barley (50:20:30)	33.5–71.6%	36.9–75.8%	Digestibility, TVFA and A/P decreased; no effect on these parameters at 5–10% of substrate	García-Gonzalez et al. (2008b)
<i>R. officinalis</i> root	Serum bottle (24 h)	1.4 g/l or 156 g/kg substrate	Luceme: grass hay: barley (50:20:30)	75.0%	74.3%	Digestibility, TVFA and A/P decreased	García-Gonzalez et al. (2008a)
<i>Salix caprea</i> leaves	Serum bottle (24 h)	1 g/l or 100 g/kg substrate	Luceme: grass hay: barley grain (50:40:10)	4.8%	5.89%	No effect on digestibility, TVFA and A/P	Bodas et al. (2008)
<i>Salvia officinalis</i> leave extract (water extract); contains luteolin	Dual outflow fermenter (7 days)	0.42 g/l or 13.9 g/kg substrate	Orchard grass hay: barley (50:50)	8.2%	–	No effect on rumen fermentation and protozoal numbers	Broudiscou et al. (2000)

L'activité antiméthanogénique des tannins extraits de différentes plantes a été largement démontrée dans des études *in vitro* et *in vivo* (Hess *et al.*, 2006; Goel and Makkar, 2012). Néanmoins, cet effet dépend de la dose, du type et de la source des tannins ainsi que du type de régimes alimentaires ingéré (Patra and Saxena, 2010; Pellikaan *et al.*, 2011). À titre d'exemple, les extraits de Quebracho (avec des doses de 5 et 25% des substrats) ont diminué linéairement de 13 et 54% respectivement la production de méthane (Bhatta *et al.*, 2009). Cependant, quelques études ont montré que de faibles doses de tannins n'ont aucun effet sur la diminution de la production de méthane (Śliwiński *et al.*, 2002). Ainsi, une diminution significative de la méthanogénèse peut ne pas être associée à une réduction significative de la digestibilité et de la concentration en acides gras volatiles (Carulla *et al.*, 2005; Hariadi and Santoso, 2010). L'activité anti-méthanogène des tannins peut s'expliquer par un effet direct sur l'activité des *Archaea* méthanogènes probablement due aux tannins-protéines/enzymes microbiens, et/ou à un effet indirect en diminuant la digestion des parois végétales. Les tannins peuvent également affecter indirectement les *Archaea* méthanogènes associées aux protozoaires, en inhibant ces derniers (Tavendale *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2011). Quelques travaux sur l'effet des plantes/extraits riche en tanins condensés sont exposés dans le tableau 09.

Les microorganismes du rumen peuvent développer des mécanismes d'adaptation leur permettant de devenir résistants aux effets néfastes des tannins par : la désintoxication des tannins, la synthèse de polymères complexant les tannins ou la formation de glycocalyx extracellulaire (Smith *et al.*, 2005; Patra and Saxena, 2010).

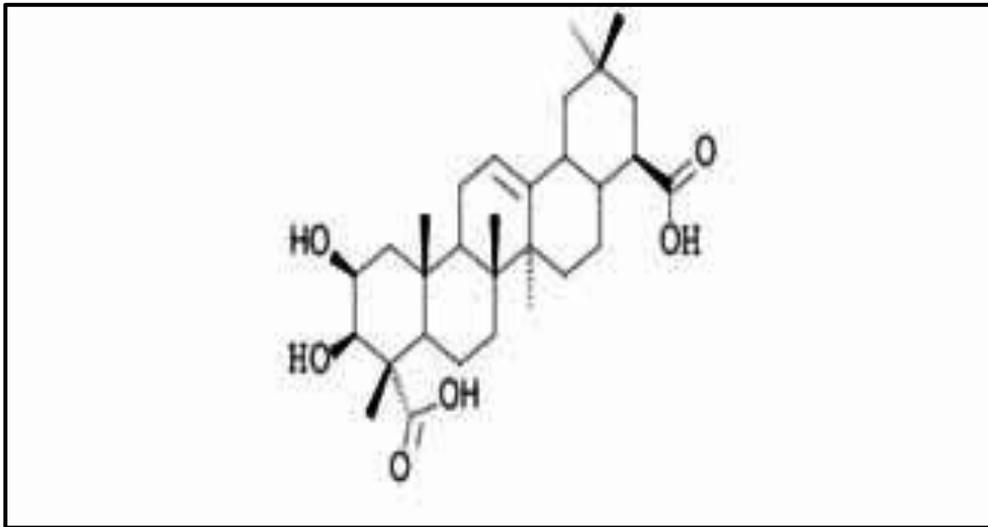
### **5.2.3. Les saponines**

#### **Chimie des saponines**

Les saponines ou saponosides sont composées d'une ou plusieurs chaînes hydrophiles (glycone) et d'un noyau lipophile (aglycone ou sapogénine). La nature des sections osidiques retrouvées à l'intérieur des saponines est très variée mais elles sont habituellement constituées de D-glucose, D-galactose, L-rhamnose, D-xylose, D-fucose et acide D-glucuronique (Figure 14). Leur masse moléculaire est comprise entre 600 à 2000 Daltons. Elles sont des tensio-actifs naturels à activité membranolytique vis-à-vis des eucaryotes (Bruneton, 1995).

Elles peuvent être classées en deux groupes en se basant sur la nature de leur squelette aglycone. Le premier groupe est constitué par des saponines stéroïdiennes, qui se rencontrent presque exclusivement dans les monocotylédones angiospermes. Le deuxième groupe, le plus

commun, est représenté par les saponines triterpénoïdes, elles sont rencontrées chez les dicotylédones angiospermes (Sparg *et al.*, 2004).



**Figure 14 :** Structure chimique d'une saponine triterpénoïdes (l'acide médicagénique).

**✚ Effets des saponines sur la méthanogénèse, les paramètres fermentaires et le microbiote du rumen**

L'inclusion de saponines dans le régime alimentaire des ruminants affecte généralement tous les aspects de la fermentation dans le rumen. Elles sont souvent associées à une baisse du niveau d'ingestion (Wu *et al.*, 1994; Lovett *et al.*, 2006), certaines études ont rapporté l'absence d'effets indésirables sur l'ingestion en présence de saponines (Singer *et al.*, 2008; Mao *et al.*, 2010). La production d'AGV est également influencée par l'addition de saponines, entre un effet positif, négatif ou absent, les résultats sont très divergents.

Tableau 09 : Effet des plantes/extraits riches en tanins condensés sur la méthanogénèse et la fermentation ruminale (Patra and Saxena, 2010).

Tannins	Test system (duration)	Dosage	Substrate/feed	Methane inhibition <sup>a</sup>	Methane inhibition <sup>b</sup>	Comments	References
<i>Acacia angustissima</i>	Rusitec (10 days)	20% of substrate	Brachiaria grass	12.3%	25.7% <sup>a</sup>	Digestibility unaffected	Zelege et al. (2006)
<i>Acacia mangium</i> (5.4% tannins)	HGT (24 h)	20% of substrate	Elephant grass	28.9%	12.6%	Digestibility, TVFA and protozoal numbers unaffected	Hariadi and Santoso (2010)
<i>Acacia meamsii</i> extract (CT 72.5%)	Sheep (21 days)	41 g/kg diets	Ryegrass, ryegrass: lucerne (1:1)	9.9%	7.0%	Digestibility, TVFA and total protozoal numbers unaffected, A/P decreased	Canulla et al. (2005)
<i>A. meamsii</i> tannins	Cattle (14 days)	8.6 and 14.6 g/kg of DM intake	Grazing ryegrass pasture with 4.5 kg grain	117.1 and 30%	13.9 and 22.4% <sup>c</sup>	Digestibility decreased	Grainger et al. (2009)
<i>A. meamsii</i> tannins	Cattle (35 days)	8.6 and 14.6 g/kg of DM intake	Grazing ryegrass pasture with 4.5 kg grain	11.5 and 28%	8.1 and 20.2% <sup>c</sup>	Digestibility decreased	Grainger et al. (2009)
<i>Baphytum petersianum</i> (4.3% tannins)	HGT (24 h)	20% of substrate	Elephant grass	25%	17.0%	Digestibility, TVFA and protozoal numbers unaffected	Hariadi and Santoso (2010)
<i>Castanea sativa</i> wood extract (Prodex <sup>®</sup> ; contains HT 20%)	Rusitec (10 days)	0.5 and 2.5 g/kg DM of effective tannins	Grass silage and hay: barley (77:23)	No effect (2.6–13.3%)	3.87 and 16.1%	Digestibility, TVFA, A/P, protozoal (20.9% at high concentration) and total bacterial numbers unaffected	Sliwinski et al. (2002a)
<i>C. sativa</i> wood extract (Prodex <sup>®</sup> ; contains HT 20%)	Sheep (21 days)	5 and 10.1 g/kg DM equivalent to 1 and 2 g/kg pure tannins	Hay: barley-based concentrate (1:1)	Increased by 21.5 (high concentration) to 32.6% (low concentration)	-17.9 and -21.7%	Digestibility, TVFA, A/P unaffected, protozoal numbers unaffected	Sliwinski et al. (2002b)
Chestnut tannins (Total tannins 51%)	HGT (24 h)	1, 2.5, 5 and 10%	Soybean	-5.1, 15.4, 25.6 and 33.3%	-5.0, 6.7, 9.5 and 12.8%	-	Roth et al. (2002)
<i>Emblica officinalis</i> seed pulp extracts (ethanol and methanol)	HGT (24 h)	Methanol and ethanol extracts of 0.5 ml/30 ml (0.2 g substrate)	Wheat straw: concentrate (1:1)	20 and 27.7%	14 and 22.2%	TVFA, A/P and digestibility unaffected, A/P, protozoal numbers decreased with ethanol extracts	Patra et al. (2006a)
<i>Hedysarum coronarium</i> forage	Dairy cows (12 days)	<i>H. coronarium</i> as sole feed	Ryegrass pasture	2.35%	20.7% <sup>d</sup>	-	Woodward et al. (2002)
<i>Jatropha curcas</i> (4.1% tannins)	HGT (24 h)	20% of substrate	Elephant grass	22.4%	14.8%	Digestibility, TVFA and protozoal numbers unaffected	Hariadi and Santoso (2010)
<i>L. cuneata</i> forage (14% CT)	Goats (36 days)	<i>L. cuneata</i> as sole feed	Compared with <i>L. cuneata</i> + polyethylene glycol	51.4%	43.1%	Digestibility and protozoal numbers decreased, TVFA and A/P unaffected	Animut et al. (2008b)
<i>Lespedeza cuneata</i> (contains 17.7% CT)	Goats (4 months)	Experimental group grazed on <i>L. cuneata</i> pasture	Control group grazed on crabgrass/tall fescue	30.2%	50.2%	TVFA and A/P unaffected	Puchala et al. (2005)
<i>Lespedeza striata</i> forage	Goats (21 days)	<i>Lespedeza</i> : sorghum-sudan grass (1:2, 2:1 and 3:0)	Compared with sorghum-sudan grass as control	32.9, 47.3 and 58.4%	29, 38.7 and 74.5%	Digestibility and protozoal numbers decreased, TVFA and A/P unaffected	Animut et al. (2008a)
<i>L. striata</i> forage (15.1%)	Goats (36 days)	<i>L. striata</i> as sole feed	Compared with <i>L. striata</i> + polyethylene glycol	49.5%	33.3%	Digestibility and protozoal numbers decreased, TVFA and A/P unaffected	Animut et al. (2008b)
<i>Lotus corniculatus</i> (CT-9.9%)	Glass bottle (12 h)	<i>L. corniculatus</i> forage	Compared with <i>Medicago sativa</i>	29.7%	16.2%	TVFA unaffected, A/P increased	Tavendale et al. (2005)
<i>Lotus pedunculatus</i> forage	Sheep (7 days)	<i>L. corniculatus</i> as sole feed	Ryegrass pasture	No effect	28.9% <sup>d</sup>	-	Woodward et al. (2001)
<i>L. pedunculatus</i> forage	Sheep (7 days)	<i>L. corniculatus</i> as sole feed	Lucern pasture	No effect	23.7% <sup>d</sup>	-	Woodward et al. (2001)
<i>L. corniculatus</i> silage	Dairy cows (12 days)	<i>L. corniculatus</i> as sole feed	Ryegrass silage	No effect (8.57%)	23.4% <sup>d</sup>	-	Woodward et al. (2001)
Mimosa tannins (Total tannins 38.6%)	HGT (24 h)	1, 2.5, 5 and 10%	Soybean	-7.7, 12.8, 20.5 and 30.8%	-1.67, 5.59, 6.15 and 8.38%	-	Roth et al. (2002)
Mimosa tannins (7.78% HT and 1.50% CT)	HGT (24 h)	5, 10, 15, 20 and 25% of substrates	Timothy hay: concentrate (65:35)	10.9–40.6%	9.9–37.0%	Digestibility, TVFA and A/P decreased at highest concentration; methanogen numbers unaffected; protozoal numbers decreased	Bhatta et al. (2009)
<i>Persea americana</i> (2.4% tannins)	HGT (24 h)	20% of substrate	Elephant grass	11.8%	-2.94%	Digestibility, TVFA and protozoal numbers unaffected	Hariadi and Santoso (2010)
<i>Phaleria papuana</i> (3.1% tannins)	HGT (24 h)	20% of substrate	Elephant grass	14.5%	6.1%	Digestibility, TVFA and protozoal numbers unaffected	Hariadi and Santoso (2010)

Certains auteurs ont rapporté une baisse de CH<sub>4</sub> sans aucune influence sur les AGV (Hess *et al.*, 2003; Patra *et al.*, 2006 ; Guo *et al.*, 2008). Pen *et al.* (2007) ont noté une diminution des AGV accompagnée d'une baisse quantitative de la production de CH<sub>4</sub> (- 11,7%). Cependant, Lila *et al.* (2003) ont rapporté une augmentation de la concentration des AGV avec l'addition de saponines. La plupart de ces études ont également montré une augmentation de la proportion de propionate, aboutissant à la diminution du ratio acétate/propionate (Lila *et al.*, 2003; Patra *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2008; Holtshausen *et al.*, 2009). Les saponines peuvent également diminuer la dégradation des protéines dans le rumen favorisant ainsi la synthèse de protéines microbiennes, ce qui limite la quantité de l'H<sub>2</sub> disponible pour la méthanogénèse. En général, l'effet des saponines sur la digestibilité est dose-dépendant. Ainsi, la réduction de la production de CH<sub>4</sub> est associée à celle de la digestibilité lorsque les saponines sont incorporées à des doses élevées (Hu *et al.*, 2005, Holtshausen *et al.*, 2009).

L'effet réducteur des saponines sur la production du CH<sub>4</sub> peut s'expliquer via la diminution de l'activité des gènes responsables de la méthanogénèse, sans aucun impact sur la population d'*Archaea* méthanogènes, même si les doses sont élevées (Guo *et al.*, 2008 ; Bodas *et al.*, 2012). D'autre part, les saponines peuvent indirectement affecter la méthanogénèse via l'inhibition des protozoaires (défaunation). Leur capacité à se complexer aux stérols est à l'origine de la lyse des membranes cellulaires des protozoaires (Hostettmann et Marston, 1995). Un effet promoteur sur les bactéries fibrolytiques a été, ainsi soulevé dans la littérature, cette effet serait la conséquence d'une stimulation de l'absorption des nutriments par les bactéries et/ou du pouvoir défaunant des saponines (Wina *et al.*, 2006 ; Zhou *et al.*, 2011) en raison de leur interaction avec les stérols présents dans la paroi des protozoaires ciliés (Patra and Saxena, 2009b). Toutefois, l'effet promoteur des saponines sur la communauté de bactéries fibrolytiques n'est pas une règle générale.

Quelques travaux sur l'effet des plantes/extraits riche en saponines sont exposés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Effet des plantes/extraits riches en saponines sur la méthanogénèse et la fermentation ruminale (Patra and Saxena, 2010)

Saponins	Test system (duration)	Dosage	Substrate/feed	Methane inhibition <sup>a</sup>	Methane inhibition <sup>b</sup>	Comments	References
<i>Acacia concinna</i> pod extracts (ethanol and methanol)	HGT (24 h)	Ethanol and methanol extracts of 0.5 ml/30 ml (0.2 g substrate)	Wheat straw: concentrate (1:1)	4.4 and 19.1%	3.8 and 18.6%	TVFA and digestibility unaffected, A/P and protozoal numbers decreased	Patra et al. (2006a)
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> fruits (saponins, 19 g/kg)	Rusitec (10 days)	2.84 g/l or 200 g/kg diet	Meadow grass: <i>Arachis pintoi</i> hay; barley straw (56:22:11)	Increased by 14%	Increased by 2.8% (no effect)	Digestibility and TVFA unaffected; protozoal numbers increased (54%)	Hess et al. (2003a)
<i>Knautia arvensis</i> leaves extract (saponins 82.4%)	HGT (24 h)	0.10 and 0.19 g/l or 10.2 and 20.4 g/kg substrate	Hay: concentrate (1:1)	5.50 and 6.43%	5.8 and 7.1%	TVFA and A/P unaffected, methanogen numbers unaffected	Goel et al. (2008b)
Lucerne saponins (27.8% saponins)	Sheep (14 days)	0.2–0.8 g/kg BW <sup>0.75</sup> or 1–4% of diet	Grass hay	No effect	No effect	Digestibility decreased at 2 and 4% concentrations; TVFA and A/P unaffected; Protozoal numbers decreased	Klita et al. (1996)
<i>Pithecellobium saman</i> fruits (saponins, 17 g/kg)	Rusitec (10 days)	2.84 g/l or 200 g/kg diet	Meadow grass: <i>Arachis pintoi</i> hay; barley straw (56:22:11)	Increased by 7% (no effect)	Increased by 4.2% (no effect)	Digestibility and TVFA unaffected; protozoal numbers increased (54%)	Hess et al. (2003a)
<i>Quillaja saponaria</i> extract (Mitsuba Trading, Japan; 5–7% saponins)	Continuous culture fermentation vessels (24 h)	2.30–6.91 g/l of medium or 92.0–276.4 g/kg of diet	Oat hay: concentrate (1:1)	No effect	–	TVFA and A/P unaffected, protozoal numbers decreased (34.4–41.3%)	Pen et al. (2006)
<i>Q. saponaria</i> extract (Mitsuba Trading, Japan; 5–7% saponins)	Continuous culture fermentation vessels (24 h)	2.30 and 4.6 g/l g/kg of diet or 92.0–184.0 g/kg of diet	Oat hay: concentrate (1:1)	No effect	–	TVFA and A/P unaffected, protozoal numbers decreased	Pen et al. (2008)
<i>Q. saponaria</i> extract (Mitsuba Trading, Japan; 5–7% saponins)	Sheep (18 days)	13.5 g/kg of diet or 16.1 g/day	Ryegrass hay:concentrate (3:2)	16.9% (no effect)	21.7%	TVFA decreased, Digestibility, A/P and protozoal numbers unaffected (6.3%)	Pen et al. (2007)
<i>Q. saponaria</i> plant (3% saponins)	Serum bottle (24 h)	0.38 g/l or 15 g/kg substrate	Barley silage: concentrate (51:49)	5.9%	4.43%	Digestibility and TVFA unaffected; A/P decreased	Holtshausen et al. (2009)
<i>Q. saponaria</i> plant (3% saponins)	Serum bottle (24 h)	0.75 g/l or 30 g/kg substrate	Barley silage: concentrate (51:49)	11.4%	0%	Digestibility decreased; TVFA unaffected; A/P decreased	Holtshausen et al. (2009)
<i>Q. saponaria</i> plant (3% saponins)	Serum bottle (24 h)	1.13 g/l or 45 g/kg substrate	Barley silage: concentrate (51:49)	12.2%	–5.33%	Digestibility decreased; TVFA unaffected; A/P decreased	Holtshausen et al. (2009)
<i>Q. saponaria</i> plant (3% saponins)	Cattle (28 days)	10 g/kg of DM	Barley silage: concentrate (51:49)	No effect	7%	Digestibility, TVFA, A/P and protozoal numbers unaffected	Holtshausen et al. (2009)
<i>Sapindus mukorossi</i> extracts (water, methanol and ethanol)	HGT (24 h)	16.7 ml/l or 0.50 ml extracts with 0.2 g substrates	Wheat flour: wheat straw (4:1)	96% (ethanol), 20% (water) and 22.7% (methanol)	–	Digestibility, A/P and protozoal numbers (70–90%) decreased, TVFA unaffected	Agarwal et al. (2006)
<i>Sapindus saponaria</i> fruits (saponins, 120 g/kg)	Rusitec (10 days)	1.42 g/l or 100 g/kg diet	Meadow grass: <i>Arachis pintoi</i> hay; barley straw (56:22:11)	20%	14.9%	Digestibility and TVFA unaffected; protozoal numbers decreased (54%)	Hess et al. (2003a)
<i>S. saponaria</i> fruits	Sheep (21 days)	5 g/kg BW <sup>0.75</sup>	Forage: concentrate (49.2–56:21)	6.5%	7.8%	Digestibility, A/P and protozoal counts decreased; TVFA and methanogens numbers increased	Hess et al. (2004)
<i>S. saponaria</i> fruits (crude saponins, 120 g/kg)	Rusitec (10 days)	1.2 g/l or 80 g/kg diet	Brachiaria grass (66–100%)	11%	14.5%	Digestibility decreased; TVFA unaffected; A/P decreased	Hess et al. (2003b)
<i>S. saponaria</i> extract (7% saponins as hederagenin equivalent)	HGT (24 h)	0.25, 0.5, 1, 2, 4 g/l	Elephant grass: wheat bran (7:3)	–	–	Methanogen numbers decreased at 4 g/l, TVFA increased at 2 and 4 g/l, A/P ratio decreased at 1, 2, 4 g/l, digestibility and protozoa decreased with increasing dose	Wina et al. (2005)
Saponins (DK international, USA)	Sheep (15 days)	170 mg/day or 0.13 g/kg diet	Mixed hay:concentrate (3:1)	15.5%	13.7%	Digestibility unaffected, A/P decreased, TVFA increased	Wang et al. (2009)

Deuxième partie

**Matériel et Méthodes**

## **1. Matériel végétale**

### **1.1. Enquête et collecte des échantillons**

Une étude préliminaire est effectuée en collaboration avec l'association environnementale « EL MABDOUA » à Ibn Ziad, Constantine, afin de dresser un inventaire préliminaire à propos de différentes espèces de la famille des *Asteraceae* présentes dans la région. Les données rassemblées avec ceux déjà répertoriés au niveau de l'association ont permis de distinguer 38 espèces réparties sur un plateau d'environ 10 Km<sup>2</sup>. Suite aux investigations réalisées auprès des éleveurs de la même région sur les espèces fourragères majoritairement broutées par les ruminants, une étude bibliographique a été menée afin de déterminer les espèces fourragères n'ayant pas fait l'objet des études antérieures vis-à-vis leur utilisation en tant que des fourrages de base et/ou des suppléments alimentaires dans l'alimentation des ruminants. À l'issue de toutes ces investigations, nous sommes arrivés à sélectionner sept espèces fourragères appartenant à la famille des *Asteraceae* dont un descriptif botanique de quatre entre elles est consigné dans le tableau 11. Les trois autres plantes ont été décrites soigneusement dans la partie bibliographique.

Les parties aériennes des sept espèces sélectionnées (Figure 15) ont été collectées aux alentours de la Daïra d'Ibn Ziad, localisée au nord-est de Constantine (36°22'45" latitude, 6°28'19" longitude) pendant la période de floraison. La collecte a été faite à travers cinq sorties sur terrain au cours d'une période s'étendant de Juillet 2011 à Avril 2012. Un climat tempéré chaud classé comme *Csa* selon la classification de Köppen-Geiger règne sur cette région. Pour chaque espèce, plusieurs spécimens de différentes locations ont été récoltés afin d'avoir un échantillon représentatif de la biomasse végétale totale. Chaque plante fut identifiée sur la base de son étude botanique en collaboration avec le botanicien, en l'occurrence, Mr Ali BOUTAMENA directeur de l'association environnementale « EL-MABDOUA » à Ibn Ziad, Constantine.

### **1.2. Préparation des échantillons**

Les espèces ainsi collectées sont triées manuellement afin d'éliminer toutes sortes de contaminants (épiphytes, larves, sol...), puis lavées à l'eau distillée et séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant 5 jours. Elles sont par la suite broyées dans un broyeur de laboratoire (BRABENDER Wiley mill, BRABENDER OHG Duisburg, Germany), calibrés à travers un tamis de 1mm et conservés à température ambiante dans des jarres clos jusqu'à leur utilisation. Notre étude est menée comparativement à un aliment de référence (standard)

composé d'une mixture de fourrage et de concentré, ils s'agissent du foin de luzerne, foin de ray-grass et du maïs (50-2-3, %). Il est choisi comme un aliment de référence afin de préserver l'écosystème microbien du rumen du fait qu'il est distribué aux animaux donneurs avant l'abatage.

## **2. Screening et analyses phytochimiques des plantes collectées**

L'analyse phytochimique (quantitative et qualitative) des composés secondaires est généralement influencée par la méthode d'extraction choisie. D'autres facteurs, comme le type de solvant, le rapport quantité de matière au volume du solvant et le temps requis jouent également un rôle important dans ladite analyse. Des fois, des étapes supplémentaires de purification doivent être entreprises en vue d'éliminer les composés intrus tels que les cires, les graisses et les chlorophylles.

Le criblage phytochimique des sept plantes est réalisé qualitativement et quantitativement par CLHP et spectrophotométrie UV-visible, respectivement. La première technique nous a permis d'estimer d'une manière générale l'abondance ou la richesse des extraits bruts en composés phénoliques (sans utilisation des références) basée sur le dénombrement des composants présentés sous forme de pics dans les chromatogrammes. L'analyse phytochimique quantitative par spectrophotométrie UV-visible nous a permis, cependant, de quantifier les teneurs des extraits en composés phénoliques totaux (PT) par colorimétrie en suivant la méthode de Folin-Ciocalteu. Les trois premières plantes ayant présenté un contenu élevé en composés phénoliques dans le criblage qualitatif et quantitatif ont fait l'objet, par la suite, d'une analyse phytochimique quantitative détaillée afin de déterminer leurs contenus en flavonoïdes, en tanins condensés et en saponines.

Bien que notre étude soit focalisée sur la famille des composés phénoliques, particulièrement les flavonoïdes et les tanins condensés, nous avons quantifié également un représentant de la classe des composés terpéniques, à savoir les saponines. Cela afin d'élargir le champ d'interprétation des résultats du fait que l'effet de tels substances bioactifs sur le fermenteur « rumen » et ses acteurs est approuvé à travers des dizaines d'études d'un côté, et de savoir l'aspect savonneux des plantes étudiées en raison de la quasi-absence des données bibliographiques sur le contenu de ces plantes en composés terpéniques, d'autre côté.

**Tableau 11 :** Caractéristiques botaniques et phénotypiques des plantes fourragères collectées de la région d'Ibn-Ziad

Nom latin	Nom commun	Nom vernaculaire	Description botanique
<i>Taraxacum officinales</i> L.	Pissenlit, Dent-de-lion, Florion d'or	Marrara, Khoss berri, Darssat l'aajouz.	<p><b>Description phénotypique et habitat :</b> C'est est une plante vivace haute de 10 à 30 cm, à racine charnue, sans tige, extrêmement fréquente dans les prairies et les pâturages. Le pissenlit se trouve natif ou subspontané dans toutes les régions tempérées du globe. Ses feuilles glabres, en rosette touffue, se divisent habituellement en lobes aigus dirigés vers le bas à segments triangulaires lancéolés. Ses capitules de fleurs jaune d'or, ligulées, rayonnent, solitaires, au sommet de tiges creuses et glabres. Ses fruits à aigrettes s'envolent au moindre vent. Il contient dans toutes ses parties un latex blanc.</p> <p><b>Principaux constituants :</b> Le pissenlit doit son amertume à des lactones sesquiterpéniques, dont le germacranolide. Elle renferme également des alcools triterpéniques et des stérols, phytostérol. Les feuilles sont riches en flavonoïdes, en provitamine A et en vitamine C, en sels minéraux en particulier du calcium et en protéines complètes.</p>
<i>Senecio Jacobaea</i> L.	Séneçon jacobée	Sharounat y'aakoub, Zahrat Cheikh Yaakoubia.	<p><b>Description phénotypique et habitat :</b> C'est une plante vivace glabre ou pubescente de 30 à 80cm, avec des feuilles glabres à contour oblong profondément pennatifidées, divisées en segments presque égaux, oblongs-obovales ou crénelés. Les fleurs jaunes, capitules de 6 à 10 mm de hauteur, en corymbe au sommet des tiges fleuries. Calicule à bractées courtes et peu nombreuses ; bractées de l'involucre tachées de brun au sommet. Les fruits sont des akènes pubescents.</p> <p><b>Principaux constituants :</b> Il renferme des tanins ainsi que des alcaloïdes pyrrolizidiniques, dont la sénéciphylline et la sénécionine, du mucilage, de la résine et des sels minéraux.</p>
<i>Chichorium Intybus</i> L.	Chicorée sauvage, Cheveux de paysan	El-hindebaa Alberia.	<p><b>Description phénotypique et habitat :</b> C'est une plante herbacée, annuelle, bisannuelle ou vivace atteignant jusqu'à 1 mètre de hauteur. La tige longue et frêle porte de maigres rameaux rigides formant avec la tige un angle obtus. Elle est originaire d'Europe, d'Asie et d'Afrique du Nord. La plante laisse s'écouler à la coupure un latex blanc très amer. Ses feuilles en rosette, d'aspect semblable à celles du pissenlit, sont profondément divisées en lobes écartés ou renversés. Elle s'illumine à la fin de l'été d'élégants capitules composés de fleurs en languette, d'un tendre bleu pâle.</p> <p><b>Principaux constituants :</b> La racine est très riche en inuline. Les feuilles renferment en quantité vitamines (provitamine A, vit B et C) et sels minéraux, ainsi que des protéines complètes. L'amertume de la plante est due à des lactones sesquiterpéniques.</p>
<i>Anacyclus clavatus</i> (Desf.) Pers.	Anacycle en massue, Réliana, Bchibchou	Kraa Al-jaja, Kouhwana.	<p><b>Description phénotypique et habitat :</b> C'est une plante annuelle de 20 à 40cm à feuilles alternes embrassantes, profondément divisées. La tige portant le capitule s'épaissit en dessous de celui-ci. L'involucre est formé de bractées inégales, se recouvrant en partie, ne portant pas d'appendice terminal. avec des tiges dressées, ramifiées et plus ou moins laineuses. Les feuilles sont allongées et pennées à segments linéaires très étroit. Il est originaire de Tout le littoral méditerranéen et l'Afrique septentrionale.</p> <p><b>Principaux constituants :</b> Il renferme des triterpènes, des stéroïdes, des coumarines, des lignanes, des polyacétylènes (alkamides) et des flavonoïdes.</p>

**Source** - Le Centre de recherche de Bourgogne-Franche-Comté, unité de malherbologie et agronomie ([www.dijon.inra.fr](http://www.dijon.inra.fr)) ;  
- Guide illustré de la flore Algérienne ([www.wilaya-alger.dz](http://www.wilaya-alger.dz)).



*Centaurea Pulata L.*



*Chamaemelum nobile L.*



*Anacyclus clavatus (Desf.) Pers.*



*Chrysanthemum segetum L.*



*Chichorium Intybus L.*



*Senecio Jacobaea L.*



*Taraxacum officinales L.*

Figure 15 : Photos des plantes collectées du champ d'Ibn Ziad.

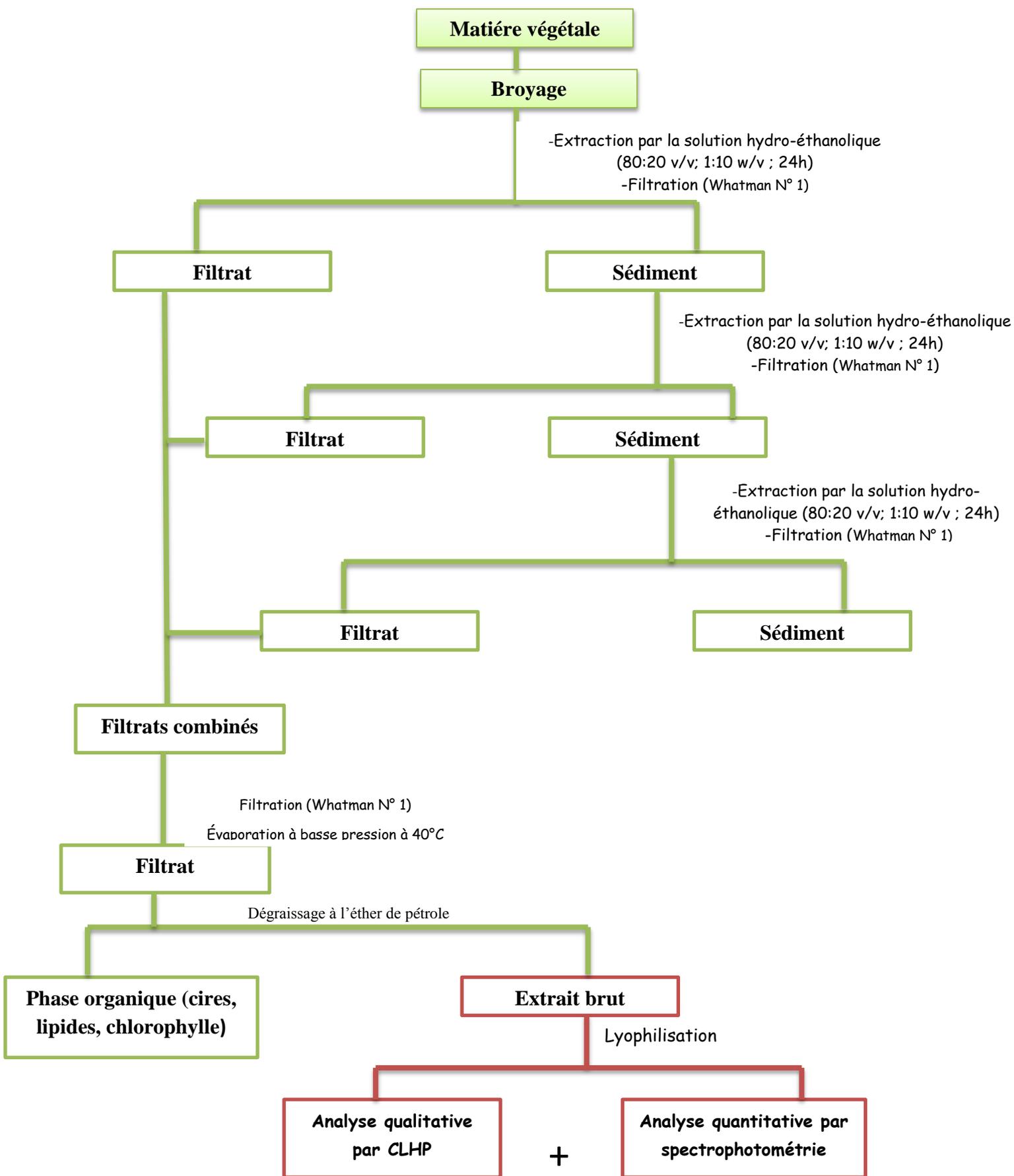
### 2.1. Préparation des extraits bruts par extraction solide-liquide (ESL)

Dans notre étude, l'objectif de l'extraction est de libérer les composés phénoliques présents dans les structures vacuolaires par rupture du tissu végétale et par diffusion. L'extraction solide-liquide est la technique la plus communément utilisée pour l'extraction des composés phénoliques à partir des plantes naturelles, essentiellement à cause de sa facilité, efficacité et sa large gamme d'application. En fait, le choix de la technique d'extraction utilisée dans notre étude (macération) est basé sur des travaux antérieurs dans notre laboratoire, à travers lesquels deux techniques ont été testées, la technique d'extraction avec la macération (Romani *et al.*, 2006) et la technique d'extraction avec la sonication (Falleh *et al.*, 2012) afin de déterminer la méthode la plus efficace pour extraire le maximum de composés phénoliques à partir de différents substrats étudiés. L'efficacité des techniques testées est estimée moyennant la détermination du rendement d'extraction définit comme étant le pourcentage % de l'extrait obtenu par rapport à la quantité initiale de la plante (Falleh *et al.*, 2008).

$$R (\%) = \frac{\text{La quantité de l'extrait brut lyophilisé (g)} \times 100}{\text{La quantité initiale de la poudre végétale (g)}}$$

L'extrait brut préparé à partir de chaque plante en utilisant la technique de **macération** est obtenus en couvrant une quantité bien définit de la poudre végétale sèche et broyée avec une solution hydro-éthanolique (80:20 v/v; 1:10 p/v) pendant 72h avec renouvellement du solvant chaque 24 heures. Les extraits sont ensuite combinés et filtrés sur papier filtre Whatman N° 1. Après concentration sous pression réduite à 40°C via un évaporateur rotatif (Rotavapor R.215.BUCHI, Switzerland), le filtrat ainsi obtenu est dégraissé par l'éther de pétrole, filtré puis lyophilisé (Alpha 1-4 LD plus, BIOBLOCK SCIENTIFIC, France) (Figure 16).

L'extraction assistée des composés phénoliques par **sonication** (ultrason) est réalisée, cependant, en dissolvant une quantité de la poudre végétale dans une solution aqueuse d'éthanol (80 : 20 v/v ; 1 : 10 p/p). La solution ainsi obtenu est introduite dans un ultrason d'une fréquence de 40KHz (Vibra cell <sup>TM</sup> BIOBLOCK SCIENTIFIC, Ilkirch. France) à 40°C pendant 40mn, l'extrait éthanolique est par la suite filtré sur papier Whatman N° 1. L'opération est répétée trois fois, et les filtrats ainsi obtenus sont combinés, puis lyophilisé.



**Figure 16 :** Protocole de screening phytochimique des plantes collectées.

## **2.2. Analyse qualitative par CLHP**

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est une méthode de séparation des constituants d'un mélange liquide basée sur les différences d'interactions entre les molécules à séparer et les phases mobile et stationnaire. Préalablement, les solutés sont mis en solution dans la **phase mobile** (solvant). Après son injection, ce mélange passe sous haute pression à travers une colonne (tube en acier inoxydable) qui renferme la phase **stationnaire**. Celle-ci est constituée de microparticules de silice, elle est très sensible aux impuretés, il est donc essentiel de purifier et de filtrer l'échantillon avant son injection. Dans notre étude, Une CLHP analytique de type THERMO SCIENTIFIQUE est utilisée, elle est constituée des éléments suivants : une pompe Prostar 1100, une colonne Hypersil ODS C18 (4.6mm × 250mm, phase inversée) de porosité 5µm, un détecteur à barrettes diodes (DAD, 1100), un système d'injection automatique model 1100 et un détecteur spectrophotométrique UV2000 fonctionnant à une longueur d'onde de 254nm.

La phase mobile est constituée par un mélange de solvants (gradient d'éluion) : Acétonitrile – Eau (ultrapure). L'échantillon est dissout dans le méthanol puis filtré à travers un filtre millipore 0.22 µm. La séparation a été faite à température ambiante sous un débit constant de 1ml/min avec un gradient de solvant programmé selon le tableau 12. Le volume d'injection est de 20 µl (Proestos *et al.*, 2006).

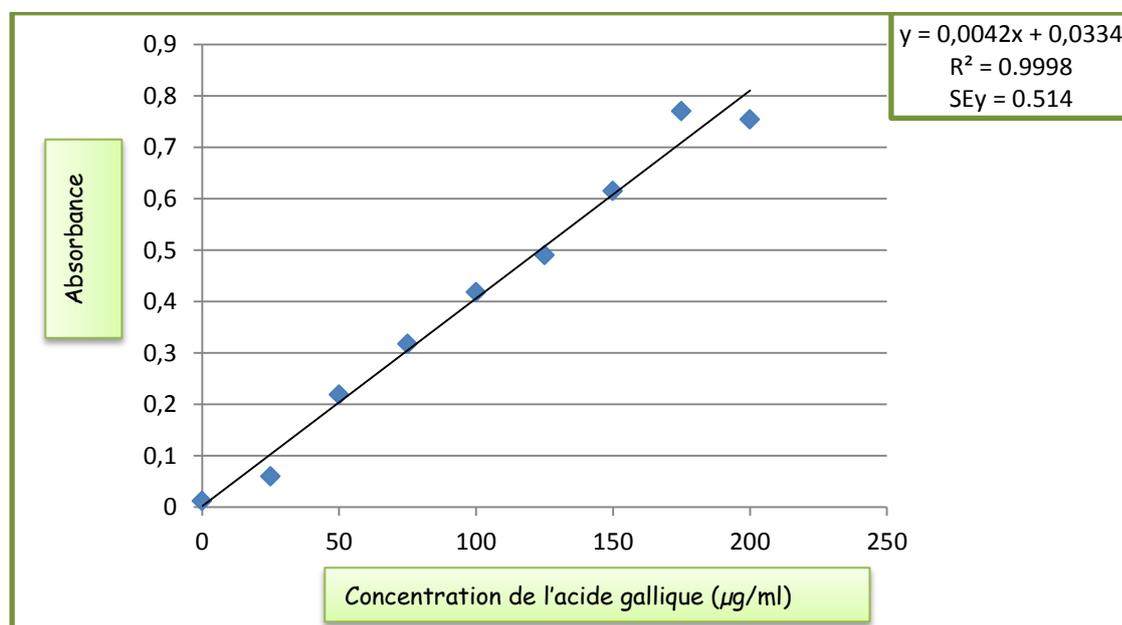
<b>Tableau 12</b> : Programme (temps, débit et gradient de solvants) de l'CLHP pour l'analyse qualitative des extraits.			
<b>T (min)</b>	<b>Acétonitrile (%)</b>	<b>Eau</b>	<b>Débit</b>
<b>0</b>	75	25	1ml/min
<b>10</b>	95	5	1ml/min
<b>45</b>	100	0	1ml/min
<b>65</b>	100	0	1ml/min

### 2.3. Analyse quantitative par spectrophotométrie UV-visible

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une structure chimique donnée en solution, sa concentration est considérée grande plus son absorbance dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer- Lambert est ainsi élevée. Tous les dosages sont réalisés en triplet.

#### ✓ Détermination de la teneur en polyphénols totaux (PT)

La teneur des extraits des plantes en phénols totaux est déterminée par la méthode de Singleton *et al.* (1990) en utilisant le réactif de Folin–Ciocalteu (FC): 125 µl de chaque extrait sont mélangés avec 125 µl du réactif FC et 500 µl de l'eau distillée. Après 3 min, 1.25 ml de la solution Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 2 % (m/v) sont ajoutées. Le mélange est par la suite agité et incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 90min, l'absorbance est mesurée par la suite à 760 nm par un spectrophotomètre UV-visible (Cary UV 60, AGILENT, Malaysia). La teneur en phénols totaux est exprimée en se référant à la courbe d'étalonnage établie à différentes concentrations de l'acide gallique (Figure 17).



**Figure 17:** Courbe étalon des phénols totaux (PT)

### **3. Analyse comparée de la composition chimique et phytochimique des trois plantes fourragères et de l'aliment de référence**

#### **3.1. Analyse fourragère**

La détermination du taux de la matière sèche (DM, method ID 934.01), de la matière minérale (method ID 942.05), de la matière azotée totale (N, method ID 954.01) et de la matière grasse (EE; method ID 920.39) ont été effectuée selon les normes décrites par l'AOAC (1990). Les dosages ont été faits en triplet, et les résultats sont rapportés par g /kg de matière sèche (MS).

##### **3.1.1. Détermination de la teneur en matière sèche**

Le taux de la matière sèche (MS) est déterminé par dessiccation d'environ 2 g de chaque échantillon dans une étuve préchauffée à 103°C pendant 12-24h jusqu'à poids constant. La différence de poids avant et après séchage correspond au taux d'humidité et le poids du résidu obtenu représente donc la teneur en matière sèche.

L'expression des résultats est faite comme suit :

$$\% \text{ MS} = \frac{P_2 - T_c}{P_1 - T_c} \times 100$$

Où :  $P_1$  : représente le poids du creuset avant séchage (tare + quantité de l'échantillon frais) (g) ;

$P_2$  : représente le poids du creuset après dessiccation (tare + résidus) (g) ;

$T_c$  : représente le poids du creuset vide (tare) (g).

Le taux d'humidité est calculé à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ d'humidité} = 100 - \% \text{ MS}$$

##### **3.1.2. Détermination de la teneur en matière organique et minérale**

Le taux de la matière minérale (MM) est obtenu après incinération de chaque échantillon préalablement séché dans un four à moufle à 550°C. La perte du poids durant le processus de calcination représente le contenu en matière organique (MO) et le poids du résidu obtenu après 8h d'incinération représente le taux en cendres.

$$\% \text{ MM} = \frac{P_3 - Tc}{P_2 - Tc} \times 100$$

**Où : P3 :** représente le poids du creuset après incinération (tare + cendres) (g) ;

**P2 :** représente le poids du creuset après dessiccation (tare + résidus) (g) ;

**Tc :** représente le poids du creuset vide (g).

La teneur en matière organique représente le complément à 100 des cendres :

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

### **3.1.3. Détermination de la teneur en matières azotées totales (MAT)**

Les matières azotées totales ou les protéines brutes (PB) incluent les protéines vraies et l'azote non protéique (ANP). L'ANP est formée d'ammoniac, de nitrates, d'acides aminés, d'urée et de peptides. L'azote total (N) contenu dans les fourrages est dosé par la méthode de Kjeldahl comportant trois étapes : la minéralisation, la distillation et la titration.

➤ **La minéralisation** : Dans un batch de minéralisation (Kjeldtec 2400 Foss), l'azote (N) organique contenu dans 1g de l'échantillon sec est d'abord transformé en azote minérale (sulfate d'ammonium) par l'acide sulfurique concentré (30ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) en présence de 0.2 mg d'un catalyseur (5.6 g de K<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> couplé avec 0.7g de CuSO<sub>4</sub>). L'opération s'est faite à 400°C pendant 1h.

➤ **La distillation** : L'addition d'une base forte (100 ml de NaOH 40%) permet de libérer l'ammoniac, qui est par la suite entraîné par condensation de la vapeur d'eau et repris dans 25ml d'une solution d'acide borique (4%) contenant quelques gouttes d'un indicateur coloré (rouge de méthyle et bleu de méthylène).

➤ **La titration** : Elle est effectuée sur le distillat par le biais d'une solution de titrage (HCl, 0.1N) jusqu'au virage de la couleur du vieux rose au gris. La teneur en azote est obtenue par l'équation suivante :

$$N = \frac{\text{Vol (Hcl) (ml)} \times 14.007 \times Nr}{\text{Prise d'essai} \times \text{MS} (\%)}$$

**Où : Nr :** La normalité de l'acide utilisé pour la titration (dans notre cas, 0.1).

La teneur en matières azotées totales (MAT) est obtenue en multipliant la teneur en azote (N) par 6,25.

### **3.1.4. Détermination de la teneur en matières grasses (MG)**

Les lipides ou l'extrait étheré (EE) sont composés de toutes les substances solubles dans l'éther. Quoiqu'ils contiennent surtout des lipides, ils peuvent aussi inclure d'autres substances solubles dans l'éther, telles que des cires et des vitamines liposolubles. Ils sont extraits en continu et à froid dans un appareil de Soxhlet. Environ 2 g de l'échantillon sont pesés dans des creusets en cellulose, à leurs tours, déposés dans des béchers en aluminium remplis en 60 ml d'un mélange de l'éther (éther diéthylique et éther de pétrole, 50 :50, v/v). En fait, le procédé s'est effectué en 3 phases : phase d'ébullition, de rinçage et d'évaporation. Après le dépôt des béchers en aluminium dans l'appareil, le mélange éther est alors porté à ébullition (90°C pendant 6h) jusqu'à obtention d'un maximum d'éther dans l'extracteur. Une fois l'éther est éliminé, les béchers sont séchés à l'étuve à 103°C pendant 3h.

L'expression des résultats se fait comme suit

$$\% \text{ EE} = \frac{(\text{PE-PV})}{\text{Prise d'essai} \times \text{MS} (\%)} \times 100$$

**Où : PE :** poids du bécher avec l'extrait étheré ;

**PV :** poids du bécher vide.

### **3.1.5. Détermination des composés de la paroi végétale**

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

#### ➤ **Estimation de la fraction NDF (Neutral Detergent Fibre)**

La fraction NDF correspond à la teneur en parois totales des fourrages (cellulose, hémicelluloses et lignine) et des cendres. Cette méthode au détergent neutre repose sur la solubilisation à pH neutre des protéines par le lauryl-sulfate de sodium et des substances pectiques par l'EDTA.

Dans des creusets en verre frités sont introduits 0.7 g de substrat préalablement séché. Ils sont placés dans l'appareil Fibertec (Ankom<sup>200</sup> Technology, Fairport, New York, USA) et remplis de 100 ml de la solution NDS (annexe 01). La digestion de l'amidon éventuellement contenu dans les échantillons s'est faite par l'utilisation d'une  $\alpha$ -amylase thermostable (0.8ml). L'appareil est vidangé de la solution NDS après une phase d'ébullition pendant 1h. Les creusets sont par la suite rincés trois fois à l'eau distillée chauffée à 80°C environ 10 min, déshydraté par 10-15ml d'acétone et séchés dans une étuve préchauffée à 103°C jusqu'à poids constant. Afin d'exclure le taux des cendres de la fraction NDF, les creusets ainsi obtenus sont portés à l'incinération dans un four à moufle à 550°C pendant 8h.

L'expression des résultats se fait comme suit :

$$\% \text{ NDF} = \frac{(\text{PS-PV}) - (\text{PC-PV})}{\text{Prise d'essai} \times \text{MS} (\%)} \times 100$$

**Où : PS :** poids du creuset après séchage

**PV :** poids du creuset vide

**PC :** Poids du creuset après incinération

➤ **Estimation de la fraction ADF (Acid Detergent Fibre)**

La fraction ADF correspond à la teneur des fourrages en cellulose et en lignine. La solution ADS (annexe 01) à base de bromure de céthyléthylammonium (CTAB) et d'acide sulfurique (1N) permet d'hydrolyser à chaud les constituants cytoplasmiques, les hémicelluloses et les protéines. Cette fraction est reliée à la digestibilité des fourrages, et elle est le facteur majeur des calculs du contenu énergétique des aliments.

Elle s'est réalisée et calculée de la même manière que la fraction NDF en remplaçant la solution NDS par la solution ADS, ainsi l'ajout de l' $\alpha$ -amylase est exclue. Les mêmes creusets en verre frités sont utilisés et remplis de 100 ml de la solution ADS. Ensuite, ils sont portés à ébullition pendant 1 heure. L'appareil est alors vidangé ; et les creusets sont rincés 03 fois avec de l'eau distillée chaude, lavés à l'acétone, séchés (103° C jusqu'à poids constant) et enfin incinérés (550°C pendant 8h).

➤ **Estimation de la fraction ADL (Acid Detergent Lignin)**

Cette fraction, caractéristique à la lignine brute, s'est déterminée via un traitement à l'acide sulfurique concentré. Les creusets récupérés, après l'analyse des ADF, sont traités à froid par l'acide sulfurique concentré à 72 % pendant trois heures. Ils sont par la suite rincés trois fois à l'eau distillée bouillante pendant 10 min, lavés à l'acétone et portés au séchage (103°C jusqu'à poids constant) et à l'incinération (550°C pendant 8h). Le calcul du taux en lignine s'est fait de la même manière que les deux fractions précédentes.

Les teneurs en hémicelluloses et en cellulose sont calculées respectivement par les différences (NDF – ADF) et (ADF – ADL).

➤ **Estimation des NFC (Non Fibre Carbohydrates)**

Les carbohydrates non fibreux représentent les glucides alimentaires hautement digestibles qui ne sont pas inclus dans la fraction NDF, y compris l'amidon, la pectine et les sucres. Ils sont le plus rapidement digestibles dans le rumen. Le contenu NFC est prédit à partir de l'équation de Mertens (1997) :

$$\text{NFC} = 100 - (\text{PB \%} - \text{MG\%} - \text{NDF \%} - \text{MM \%})$$

**3.2. Estimation de la valeur alimentaire relative (RFV)**

La RFV est un indice utilisé pour évaluer les aliments destinés aux ruminants. Il est basé sur le calcul de la matière sèche digestible (DMD) et la matière sèche consommée (DMC). La digestibilité et la consommation sont estimées à partir des analyses de l'ADF et de l'NDF, respectivement. Elle n'a pas d'indice et est utilisée seulement pour comparer la qualité de différents fourrages. Elle est calculée comme suit (Sheaffer *et al.*, 1995) :

$$\text{RFV} = \frac{\text{DMD} \times \text{DMC}}{1.29}$$

Où : **DMD** = 88.9 – (0.779 x ADF %);

**DMC** = 120/ NDF%.

### **3.2. Analyse phytochimique par colorimétrie**

#### **3.2.1. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux (FT)**

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par la méthode colorimétrique d'aluminium nitrate décrite par Turkoglu *et al.* (2007). Une quantité de 250 µl de l'extrait est mélangée avec : 2.5 ml de l'éthanol (96%), 0.1ml de l'acétate potassium 1M (CH<sub>3</sub>COOK) et 0.1ml d'aluminium nitrate (Al (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 9H<sub>2</sub>O). Après l'incubation pendant 40 min à température ambiante, l'absorbance de la solution est mesurée à 415 nm via un spectrophotomètre UV-visible (Cary UV 60, AGILENT, Malaysia). La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en se référant à la courbe d'étalonnage établie à différentes concentrations de la quercétine (Figure 18).

#### **3.2.2. Détermination de la teneur en tanins condensés (TC)**

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode de la vanilline en milieu acide décrite par Heimler *et al.* (2006). 5 ml du réactif de vanilline déjà préparé en mélangeant à volume égal 2.5 ml de la solution méthanolique de l' HCl à 8 % (v/v) avec 2.5 ml de la solution méthanolique de vanilline à 4% (m/v) sont ajoutés à 1 ml de l'extrait. Le mélange est par la suite agité vigoureusement et maintenu dans un bain marie à 30 °C pendant 20 mn. L'absorbance est mesurée à 500 nm par un spectrophotomètre UV-visible (Cary UV 60, AGILENT, Malaysia). La teneur en tanins condensés est exprimée en se référant à la courbe d'étalonnage établie à différentes concentrations de la catéchine (Figure 19).

#### **3.2.3. Détermination de la teneur en saponines totaux (ST)**

La teneur en saponines dans les extraits des plantes testées est déterminée selon la méthode décrite par Hiai *et al.* (1976). 50 µl de chaque extrait est mélangé avec la vanilline à 8% (m/v) et l'acide sulfurique à 72% (v/v). La mixture est incubée à 60°C pendant 10 min, et refroidit par la suite dans un bain d'eau glacée pendant 15 min, l'absorbance est lue à 544 nm par un spectrophotomètre UV-visible (Cary UV 60, AGILENT, Malaysia). La teneur en saponines est exprimée en se référant à la courbe d'étalonnage établie à différentes concentrations de la Quilaja (Figure 20).

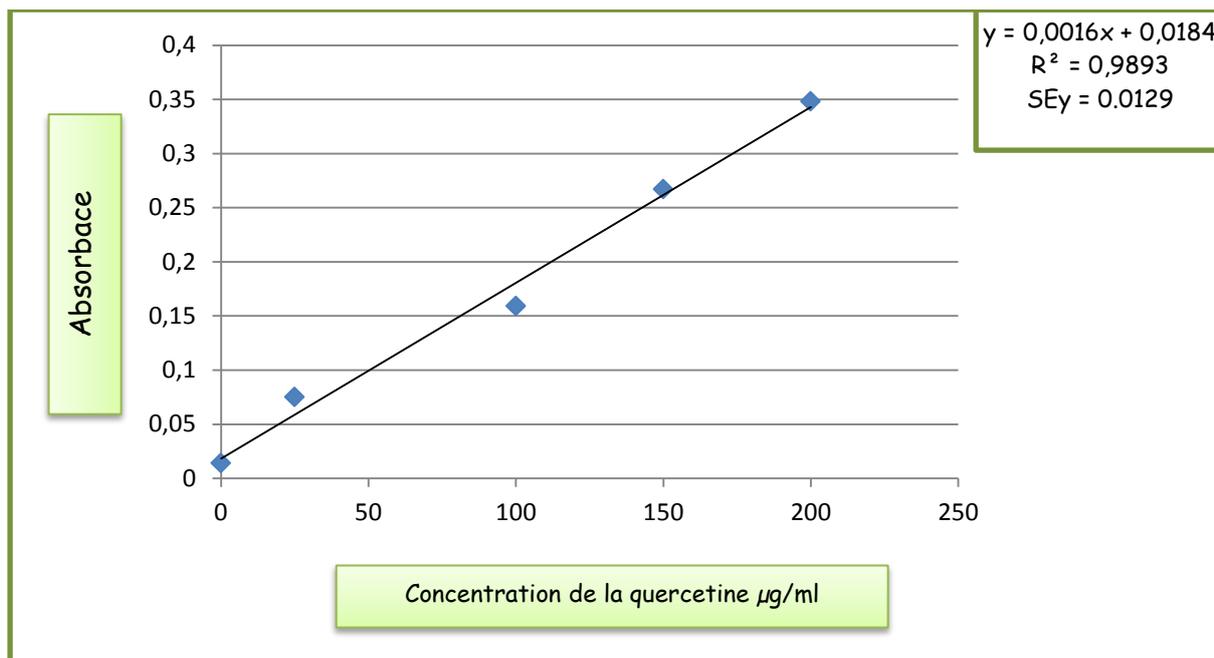


Figure 18: Courbe étalon des flavonoïdes totaux (FT)

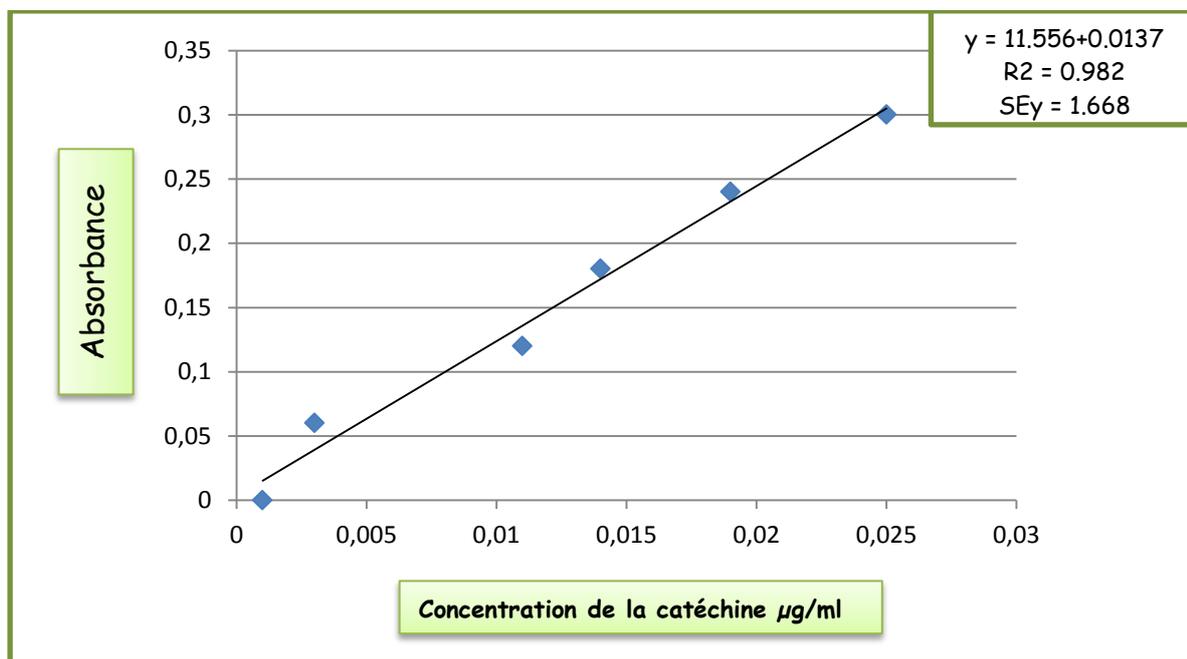


Figure 19: Courbe étalon des tanins condensés

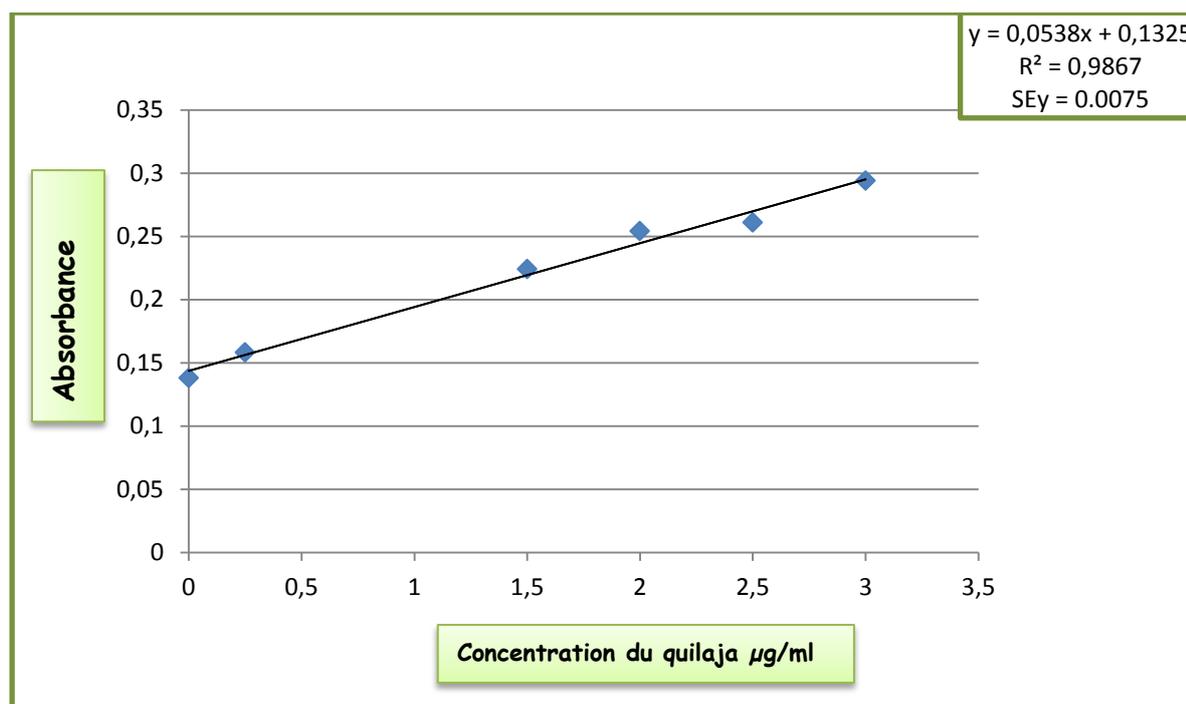


Figure 20: Courbe étalon des saponines totaux (ST)

#### 4. Étude de la Fermentescibilité *in vitro* des substrats par le microbiote ruminal

##### 4.1. Technique de production de gaz *in vitro*

Les gaz générés dans les essais de production de gaz *in vitro* sont le résultat de la fermentation des glucides en acides gras volatils et en biomasse microbienne. Le CH<sub>4</sub> et le CO<sub>2</sub> sont les gaz fermentaires essentiels résultant de la fermentation microbienne (production directe), en plus des gaz libérés à partir du système tampon (production indirecte). À l'origine, les techniques de production des gaz fermentaires ont débuté en 1943 par **Quin** ayant développé la technique de mesure du gaz par manométrie. En **1979**, **Menke et al** ont développé un système (essai de Hohenheim) dont les fermentations ont lieu dans des seringues en verre (100 ml de capacité) où le gaz produit pousse le piston à l'extérieur et le volume de gaz produit est enregistré manuellement. Une nouvelle technique a été mise en place consistant en l'utilisation d'un capteur de pression pour mesurer le gaz cumulé dans l'espace vide des systèmes batch (flacons en verre de 125 ml), l'enregistrement de la pression est effectué soit manuellement, comme décrit par **Theodoreau et al. (1994)**, soit automatiquement par **Pell et Schofield (1995)** décrivant pour la première fois l'utilisation des sondes de pression automatisées pour mesurer le gaz produit dans les flacons en verre.

#### 4.2. Description du système fermentaire de Theodourou

Dans notre étude, la fermentation est réalisée dans des flacons en verre (batch) de 120 ml de capacité selon la technique de production du gaz *in vitro* (IVGPT) décrite par Theodureau *et al.*, 1994. Ce système permet l'accumulation des gaz fermentaires dans l'atmosphère intérieure du flacon dont la pression est mesurée en utilisant un transducteur de pression (Cole et Parmer Instrument Co, Illinois, USA) relié à une valve à trois sorties. Dans la première sortie, le transducteur est inséré ; dans la deuxième sorties, une seringue hypodermique ayant la fonction de connecter le batch au transducteur ; la troisième (sur le côté) est connectée à une seringue en plastique calibrée (Figure 21). La pression gazeuse de l'espace libre à l'intérieur du batch est mesurée en insérant l'aiguille de la seringue hypodermique à travers le bouchon de butyle. Quand la valve à trois sorties est en position verticale (la première et la deuxième sorties sont ouvertes, tandis que la troisième est fermée), l'unité d'affichage du transducteur affiche la valeur de la pression de gaz dans l'espace libre en p.s.i. (livre \ pouce carré). Sa position horizontale (les trois sorties sont ouvertes) permet, cependant, de retirer le gaz accumulé dans l'espace vide du batch en libérant le piston de la seringue graduée jusqu'à ce que la valeur affichée sur l'unité d'affichage soit zéro indiquant, par ainsi que la pression de gaz à l'intérieur du batch et ramenée à la pression ambiante (tout les gaz fermentaires accumulés dans l'espace libre du batch sont recueillis dans la seringue graduée).



**Figure 21:** Système de fermentation décrit par Theodureau *et al.*, 1994

Il est important que la température dans l'espace libre du batch demeure constante pendant la période de mesure. Après chaque intervalle du temps, le batch est agité et remis à nouveau dans l'incubateur jusqu'à la lecture suivante. Dans notre étude, seules les valeurs de la pression enregistrées par le transducteur sont retenues pour déduire le nombre du mol du gaz produit ( $n$ ) dans chaque batch de fermentation en appliquant la loi des gaz parfaits :

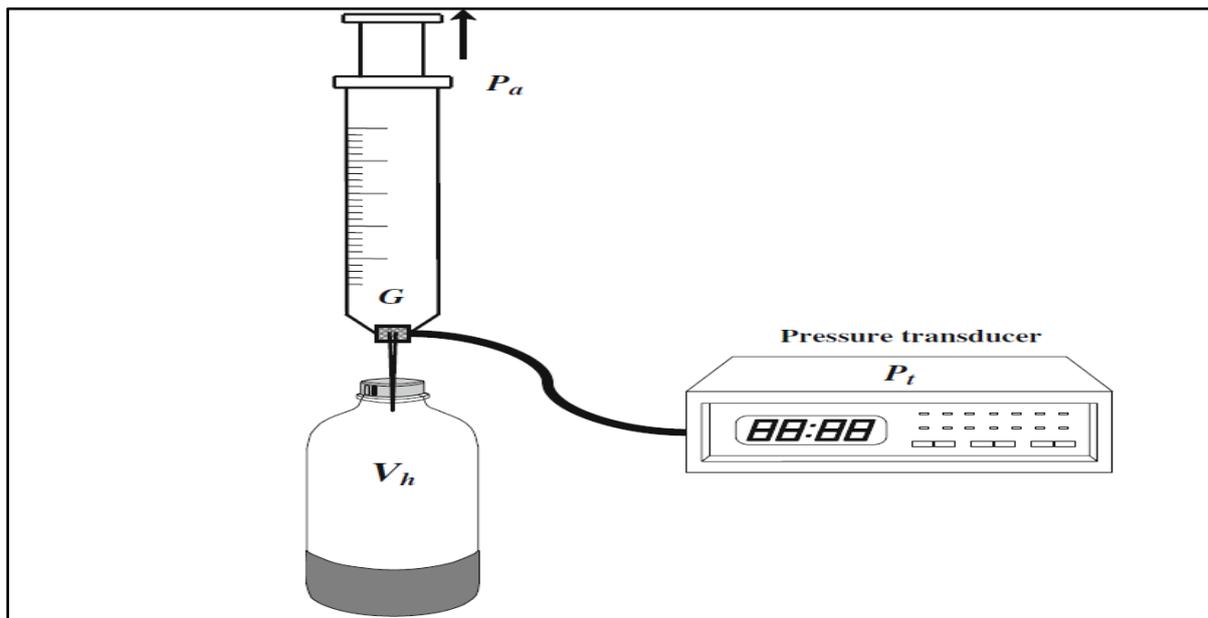
$$n = \frac{PV}{R\theta}$$

**P** : La pression enregistré par le transducteur ; **V** : Le volume mort du batch ; **R** : La constante des gaz ( $0.083 \text{ L. Atm. mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ) ;  **$\theta$**  : La température du batch ( $39 + 273\text{K}$ ).

Un volume du gaz produit en ml pourrait être déduit en utilisant la loi de Boyle stipulant que le volume (ml) et la pression (p.s.i) sont inversement proportionnels :

$$GP = \frac{V_h \times P_t}{P_a}$$

Ôu : **V<sub>h</sub>** (ml): le volume de l'espace libre du batch ; **P<sub>a</sub>** : la pression atmosphérique dans le laboratoire (p.s.i) ; **P<sub>t</sub>** : la pression de gaz affichée dans le transducteur (p.s.i) (figure 22).



**Figure 22** : Mesure de la production du gaz en utilisant la méthode de Theodourou *et al*, 1994.

#### **4.2.1. Préparation de l'inoculum**

Le liquide ruminal utilisé comme inoculum est prélevé immédiatement après l'abattage de trois vaches laitière (poids  $\approx$  680 kg) au niveau d'un abattoir spécialisé (abattoir agréé conformément à la législation d'UE, règlement N° 882/20). Les animaux à jeun depuis la nuit précédente suivent d'habitude un régime standard composé de 50% de foin de prairie et 50% d'une mixture de concentré commercialisée avec un accès libre à l'eau.

Le jus de rumen (phase solide plus phase liquide) est directement transféré au laboratoire des analyses alimentaires et de la nutrition animale (Napoli, Italie) dans des bouteilles Thermos préalablement chauffées à 39°C et saturées en CO<sub>2</sub>. Au laboratoire, le liquide ruminal des bovins est bien mélangé dans un Stomacher ® 400 pendant 1 min, puis filtré à travers quatre couches de mousseline chirurgicale stérile. Toutes les étapes sont réalisées sous un flux continu de CO<sub>2</sub> afin d'éviter toute sorte de contamination en O<sub>2</sub>.

#### **4.2.2. Préparation du milieu de culture**

Le milieu de culture ou autrement appelé « salive artificielle », en plus de son rôle en tant que tampon, elle approvisionne le microbiote ruminale en sels minéraux (macro et oligo-éléments) nécessaires à leur développement. Elle se compose d'un mélange de plusieurs solutions (Tableaux 13 et 14). Le mélange de couleur bleue est chauffé jusqu'à virage de la couleur vers le rose. Ensuite, la solution est barbotée avec un flux continu de CO<sub>2</sub>, ce qui entraîne la réduction de la salive artificielle indiquée par le virage de la couleur de l'indicateur du potentiel d'oxydoréduction (resazurine) du rose au blanc transparent.

À cette étape, un volume du liquide ruminal filtré est ajouté à deux volumes de salive artificielle (1 :2 ; v/v) selon la technique de Menke and Steingass (1988). Enfin, un barbotage en surface est maintenu pendant 10 min de manière à maintenir une atmosphère totalement anaérobie.

#### **4.2.3. Inoculation et incubation**

Approximativement 1g de chaque substrat : le standard, *C.pulata*, *C.segetum*, *C.nobile*, et les mixtures à base des extraits des mêmes plantes et du standard (2.5%, p/p) sont introduits dans chaque batch et mis à fermenter avec 30 ml de milieu de culture (10 ml de jus de rumen filtré plus 20 ml de salive artificielle). Les flacons sont ensuite fermés avec des bouchons de butyle, sertis avec une capsule en aluminium, secoués et placés dans une étuve à agitation rotatoire (STUART, S1500, UK) à 39°C. Pour chaque substrat, trois répétitions sont réalisées

Dans les mêmes conditions et afin de faire les corrections nécessaires, trois batch témoins sans substrat (jus de rumen plus salive artificielle) sont ainsi incubés.

**Tableau 13:** Préparation des solutions de la salive artificielle selon Menke and Steingass (1988)

Solution	Composition	quantité
Solution des éléments majeurs	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.7 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.2 g
	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0.6 g
	Eau distillée	1000 ml
Solution des éléments traces	CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O	13.2 g
	MnCl <sub>2</sub> ×4H <sub>2</sub> O	10.0 g
	CoCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	1 g
	FeCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	0.8 g
	Eau distillée	100 ml
Solution tampon	NaHCO <sub>3</sub>	35 g
	(NH <sub>4</sub> ) HCO <sub>3</sub>	4 g
	Eau distillée	1000 ml
Solution de Resazurine	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>4</sub>	100 mg
	Eau distillée	100 ml
Solution réductrice	Na <sub>2</sub> S×7H <sub>2</sub> O	285 mg
	NaOH (1N)	2 ml
	Eau distillée	47.5 ml

**Tableau 14 :** Composition de la salive artificielle selon Menke and Steingass (1988)

solutions	Pour 1 litre de la salive artificielle
Eau distillée	474.0 ml
1.Solution d'éléments traces	0.12 ml
Solution tampon	237.0 ml
Solution d'éléments majeurs	237.0 ml
Solution de Resazurine	1.22 ml
Solution réductrice	50 ml

### **4.3. Analyse quantitative de la production du méthane par CPG**

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation d'un mélange de molécules volatiles (analytes). Le mélange à analyser est transporté à travers une colonne renfermant une substance constituant la phase stationnaire. Le transport se fait à l'aide d'un gaz inerte (gaz vecteur) constituant la phase mobile. Les gaz sont séparés selon leur coefficient de partage (K) entre la phase mobile et la phase stationnaire.

Après 24h de fermentation, un échantillon représentatif du gaz total (1 ml) est prélevé en double à partir de l'espace vide du batch de fermentation à chaque intervalle de temps (3, 6, 9, 12 et 24h) via une microseringue étanche aux gaz (Hamilton, 5 ml) munie d'une vanne en supposant que l'échantillon pris a une composition égale à tout le gaz produit (Figure 23). Les échantillons de gaz sont analysés afin de déterminer leur concentration en méthane (CH<sub>4</sub>) en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (GC-17 A, SHIMADZU, Japan) équipé d'un détecteur de thermoconductivité (TCD) et d'un détecteur d'ionisation de flamme (FID) selon la technique de Van Nevel (1977).

La colonne est de type «capillaire» de 20 mètre de longueur et de 3 mm de diamètre intérieur (HaySepQ SUPELCO) remplie avec une phase stationnaire de type Porapak Q (80/100 mesh). Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 30 ml/min. La température du four de l'injecteur est de 50°C, celle du four de la colonne est de 210°C et celle du détecteur FID est de 190°C. La concentration de méthane est déterminée par utilisation d'une courbe étalon établi grâce à un gaz standard certifié (Air liquide, Italie). Le volume du dioxyde de carbone est calculé par soustraction du volume net de CH<sub>4</sub> enregistré par rapport au volume de gaz total produit.



**Figure 23** : Injection du volume de gaz dans la CPG via une microseringue étanche au gaz

#### 4.4. Stœchiométrie des fermentations

Les résultats obtenus à travers les différents essais de fermentation *in vitro* ont fait l'objet d'une étude comparative à des résultats obtenus à partir des équations théoriques dont la confection est basée sur les concentrations de trois principaux AGV (acide acétique, acide propionique et acide butyrique), ils s'agissent des résultats de la production du gaz total, du méthane et du gaz carbonique. À travers des analyses de régression linéaire, nous avons essayé d'estimer la quantité du gaz produit indirectement à partir du système tampons et prédire, en quelque sorte, la provenance du CO<sub>2</sub> qui, en associant avec de l'hydrogène produit le méthane. Autrement dit, le méthane produit après 24 h de fermentation est-il originaire d'un CO<sub>2</sub> fermentaire ou d'un CO<sub>2</sub> provenant du système tampon ?

Le gaz total estimé est calculé à partir de l'équation proposée par Getachew *et al.* (1998) :

$$\text{Gaz total estimé} = \text{CH}_4 \text{ estimé} + \text{CO}_2 \text{ estimé} + \text{CO}_2 \text{ indirect}$$

- ◆ CO<sub>2</sub> estimé = A/2 + P/4 + 1.5\* B;
- ◆ CH<sub>4</sub> estimé = [A+2\*B] - CO<sub>2</sub> estimé;
- ◆ CO<sub>2</sub> indirect: 1mmole CO<sub>2</sub> indirect = 0.87 mmoles AGV totaux.

Ôu : **A** : la production d'acétate (moles), **P** : la production de propionate (moles), **B** : la production de butyrate (moles)

D'autre part, vu l'importance de la concentration de l'hydrogène dans le processus de la méthanogénèse, le taux de récupération de l'hydrogène a été calculé à partir des concentrations des AGV comme déjà décrit par Demeyer (1991) :

$$\text{BH (\%)} = \frac{4M + 2P + 2B}{2A + P + 4B}$$

L'effet antiméthanoogène des substrats est déterminé selon les deux paramètres (R et R') décrits par Lopez *et al.* (2010) :

- ✓ **R** : L'effet antiméthanoogénique relatif à l'ajout de chaque substrat (Relative antimethanogenic effect) :

$$R = \mu \text{ test} / \mu \text{ control}$$

$\hat{\mu}$  :  $\mu$  test : La moyenne des concentrations du méthane enregistrées à partir du batch fermentaire incluant le substrat étudié

$\mu$  control : La moyenne des concentrations du méthane enregistrées à partir du batch fermentaire de control.

$R'$  : Le pourcentage de réduction/d'augmentation de la production du méthane relatif à l'ajout de chaque substrat (relative percentage of increase (positive) or decrease (negative) in methane production

$$R' = (\mu \text{ test} - \mu \text{ control}) / \mu \text{ control} * 100$$

## 5. Détermination des paramètres fermentaires

### 5.1. Mesure du pH

Après 24h de fermentation, le pH de chaque batch de fermentation est déterminé moyennant un pH mètre (HANNA instruments.Inc.woonsocket.RT.USA)

### 5.2. Dosage de l'azote ammoniacal (N-NH<sub>3</sub>)

L'azote ammoniacal (N-NH<sub>3</sub>) est déterminé en suivant la méthode décrite par Searle, 1984 basée sur la réaction de Berthelot, (1859). L'ion ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) se fixe sur une molécule de phénol en présence du chlore en milieu alcalin (pH < 10). La réaction est catalysée par le nitropussiate de sodium. Il se forme alors un complexe de type indophénol qui donne une coloration bleue. L'intensité de la coloration bleue reflète la concentration de l'azote ammoniacal mesurée par spectrophotométrie à 630 nm.

Les contenus des batch de fermentation sont acidifiés avec l'acide trichloracétique (10 :1 ; v/v) et la solution ainsi obtenue est conservée à -20°C. Avant analyse, les échantillons sont décongelés et centrifugés à 12000 rpm.

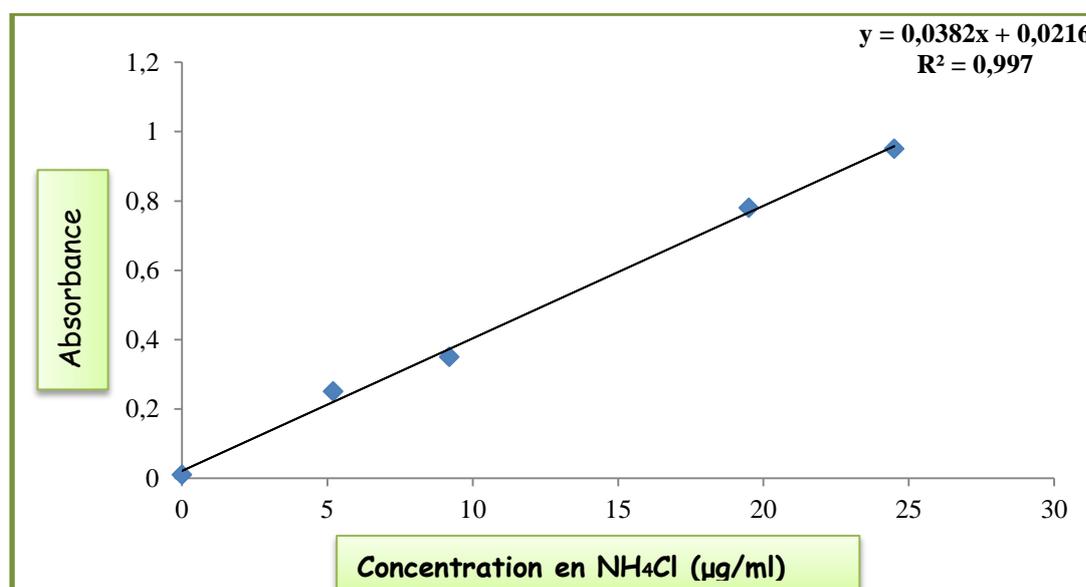
Cinq ml de la solution A (Tableau 15) sont mélangés avec 2 µl de l'échantillon déjà préparé. Après une bonne homogénéisation, 5 ml de la solution B sont ajoutés.

Ce mélange est maintenu dans un bain marie à 37°C pendant 30 min. Après refroidissement à température ambiante, la densité optique est mesurée à 630 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Helios Gamma, Thermoelectron Corporation).

Les résultats sont déduits à partir d'une courbe étalon standard et exprimés en équivalent de chlorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>Cl) (Figure 24).

**Tableau 15 :** Composition des solutions A et B pour le dosage de l'azote ammoniacal

<b>Solution A</b>	<b>Pour 500ml d'eau distillée</b>	
	Phénol	<b>5g</b>
	Nitroprosside de sodium	<b>25g</b>
<b>Solution B</b>	<b>Pour 500ml d'eau distillée</b>	
	Hydroxyde de sodium	<b>2.5g</b>
	Hypochlorite de sodium	<b>5ml</b>



**Figure 24:** Courbe étalon pour le dosage de l'azote ammoniacal.

### 5.3. Analyse qualitative et quantitative des acides gras volatils par CPG

La composition et les concentrations des acides gras volatiles présents dans les différents batch de fermentation sont déterminées par chromatographie en phase gazeuse de type gaz-liquide (GC Focus AI 3000, THERMO SCIENTIFIC, Waltham, MA, USA) munie d'un détecteur d'ionisation de flamme (FID).

Les solutés, détectés par ionisation de flamme, sortent par ordre croissant de leur poids moléculaire. Un intégrateur relié au détecteur du chromatographe calcule les surfaces des pics qui sont proportionnelles à la quantité des composés. Après 24h de fermentation, 5 ml du contenu de chaque batch fermentaire est centrifugés à 12000 g pendant 10 min à 4°C (Universal 32R centrifuge, HettichFurnTech Division DIY, Vlotho, Germany), le surnageant est ensuite acidifié avec une solution d'acide oxalique 0.06M dans des proportions 1 : 1 (v/v). Après homogénéisation, un volume de 0,50µl est injecté en tête de colonne et élué dans les conditions définies ci-dessous.

La colone est de type « capillaire » en silice de 30 m de longueur et 0.25 mm de diamètre intérieur remplie avec une phase stationnaire de type Supelco (15% SP-1220/1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> on 100/120 Chromosorb® W AW). Les températures du four de l'injecteur et du détecteur FID et de la colonne sont 175°C, 250°C et 240°C respectivement. Le débit du gaz vecteur (hélium) est fixé à 1.7ml/min. Un standard externe composé de 6 acides gras volatils (acide acétique, propionique, butyrique, isobutyrique, valérique et isovalérique) est utilisé pour la détermination de la concentration de chaque AGV dans les systèmes fermentaires en se référant à la surface des pics des chromatogrammes obtenus selon la formule suivante :

$$Ca = \frac{Sa}{Se \times Ka}$$

Ôù : **Ca** est la concentration du composé **a** dans l'échantillon, **Sa** est la surface du pic correspondant au composé **a**, **Se** est la surface du pic correspondant à l'étalon, et **ka** le facteur de réponse du composé **a**.

## 6. Mesure de la digestibilité des substrats

### 6.1. Mesure de la digestibilité apparente de la matière organique

Après fermentation, le contenu de chaque batch de fermentation est filtré à travers des creusets en verre frité (Schott Duran, Mainz, Germany, porosité # 2), préalablement tarés, par rinçage à l'eau distillée chaude. Les creusets contenant le résidu non dégradé sont placés pendant une nuit dans un four à 103°C, et ensuite pendant 8h dans un four à moufle à 550°C.

$$DAMO = \frac{(MOi - MOr) - MOb}{MOi} \times 100$$

Où : **MOi** : correspond à la matière organique introduite dans chaque batch (prise d'essai)

**MOr** : correspond à la matière organique résiduelle dans chaque batch de fermentation

**MOb** : représente la moyenne du résidu organique du blanc.

La digestibilité de la matière organique directement mesurée *in vitro* est comparée à la digestibilité de la matière organique estimée (**DAMOE**) à partir de la composition chimique des substrats selon la formule proposée par Chibani *et al.* (2010) :

$$\text{DAMOE (\%)} = - 0.90 \text{ ADF} + 1.177 \text{ MM} + 82.25$$

## 6.2. Estimation de l'énergie métabolisable (ME)

L'énergie métabolisable est calculée selon l'équation proposée par Menke and staingass (1988):

$$\text{EM (MJ/kg DM)} = 2,2 + 0,136 \text{ GP} + 0,057 \text{ CP}$$

Où : **GP** : Production de gaz après 24h de fermentation (ml) ;

**CP** : Protéines brutes.

## 7. Quantification de la population des méthanogènes et des protozoaires après fermentation *in vitro* par qPCR

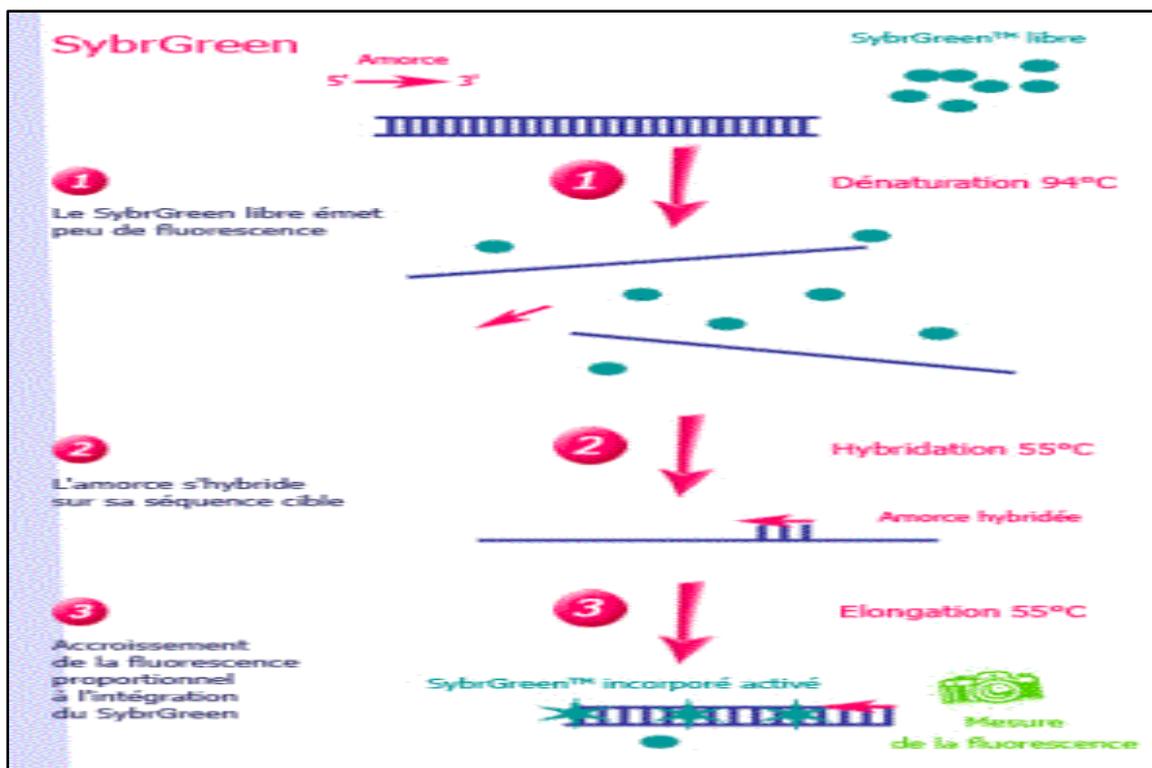
### 7.1. Principe

La technique de la PCR en temps réel présente le même principe que celui de la PCR conventionnelle à la différence que l'amplification est mesurée tout au long de la réaction. Elle repose sur la détection et la quantification d'un fluorochrome pendant l'amplification de la séquence cible. La fluorescence est donc proportionnelle à la quantité de produits d'amplification. En fait, Il existe deux systèmes de détection : détection par des agents intercalant et détection par des sondes.

Un agent intercalant est une molécule capable de s'insérer entre les bases appariées d'un acide nucléique. A l'image du bromure d'éthidium en PCR conventionnelle, l'intercalant le plus utilisé en PCR en temps réel est le **SYBR Green**. Son émission de fluorescence augmente lorsque qu'il est lié à l'ADN **double brin** (Figure 25). Une limitation de tel système est représentée par son mode de reconnaissance d'ADN non spécifique. En fait, chaque

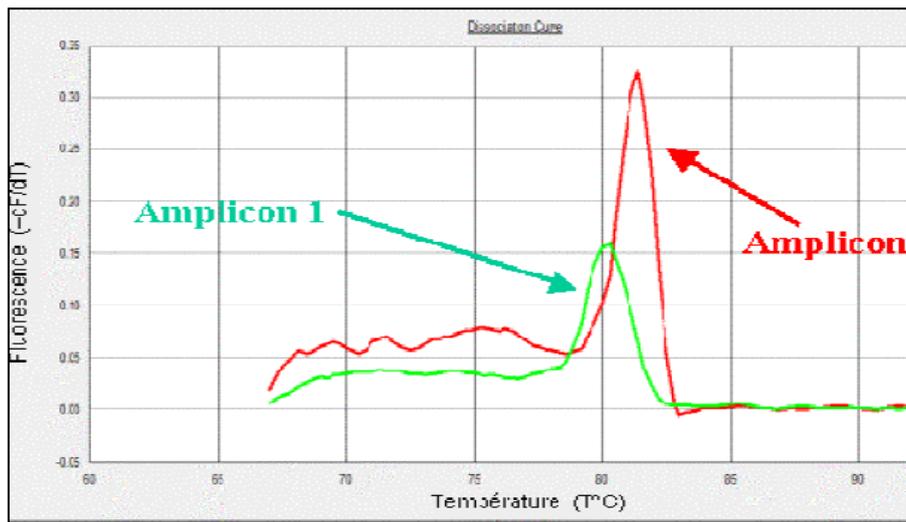
molécule d'ADN double brin présente dans la réaction est quantifiée, y compris donc les produits PCR non spécifiques et les dimères d'amorce. Afin de surmonter le problème et de soustraire l'élément de quantification dû aux ADN non spécifiques et aux dimères d'amorce sur certains dispositifs, il est indispensable d'effectuer une analyse de la **courbe de fusion** poste amplification.

La courbe de fusion est réalisée en soumettant les produits d'amplification à une température progressant par palier tout en mesurant l'intensité de fluorescence. Elle correspond, de ce fait, à la variation de la fluorescence en fonction de la température (figure 26). Chaque fragment amplifié est représenté par un pic correspondant à la température d'hybridation nommée ( $T_m$ ). Après l'étape finale de la PCR, les produits sont dissociés lentement et les données relatives à la fluorescence sont recueillies.



**Figure 25:** Système de détection de l'amplicon par le SYBR Green.

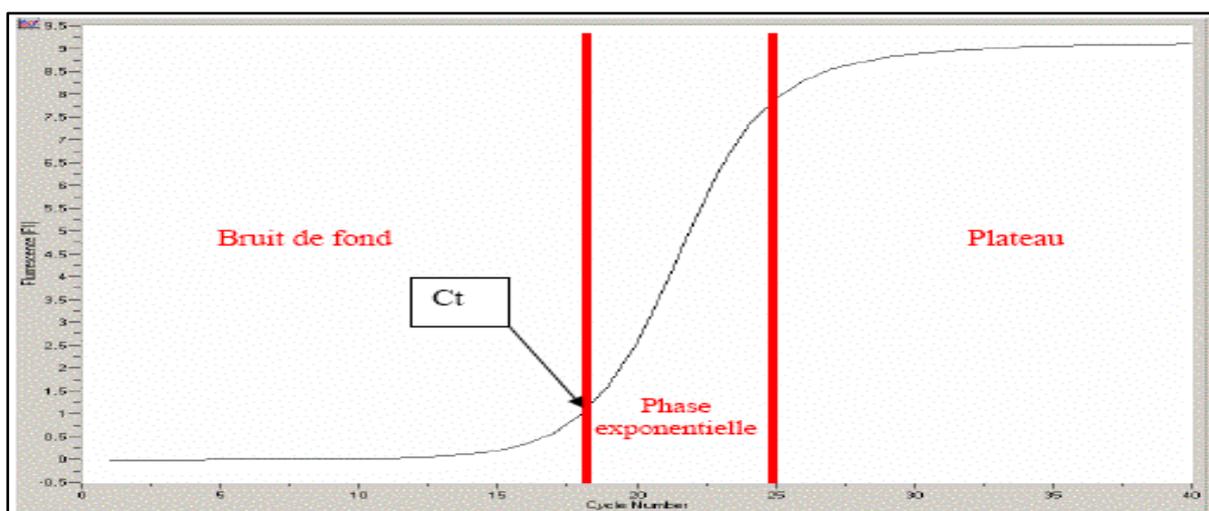
- 1) Durant l'étape de dénaturation, le SYBR Green libre émet peu de fluorescence ; 2) À la température d'appariement, les amorces s'hybrident sur la séquence cible ; 3) Lors de l'élongation, les molécules de SYBR Green se lient au nouveau double brin d'ADN ce qui produit une émission de fluorescence.



**Figure 26** : Illustration d'analyse de la courbe de fusion.

La détection basée sur des sondes s'appuie sur 4 technologies sondes : hydrolyse de sondes (**Taqman**), hybridation de 2 sondes avec émission de fluorescence par transfert d'énergie (**FRET** : fluorescence resonance energy transfer), balises moléculaires (Molecular Beacons) et amorces scorpion. Dans notre étude, seule la technologie de Syber-green est utilisée.

En suivant la fluorescence au cours du temps de la PCR en temps réel émise par le SYBR Green, on observe 3 phases : **i**) la phase de bruit de fond où la fluorescence proportionnelle au fragment amplifié est insuffisante ; **ii**) la phase exponentielle où le nombre d'amplicon double à chaque cycle ; **iii**) la phase de plateau où les différents composants de la PCR deviennent limitant (Figure 27).



**Figure 27** : Différentes étapes de l'augmentation de la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel.

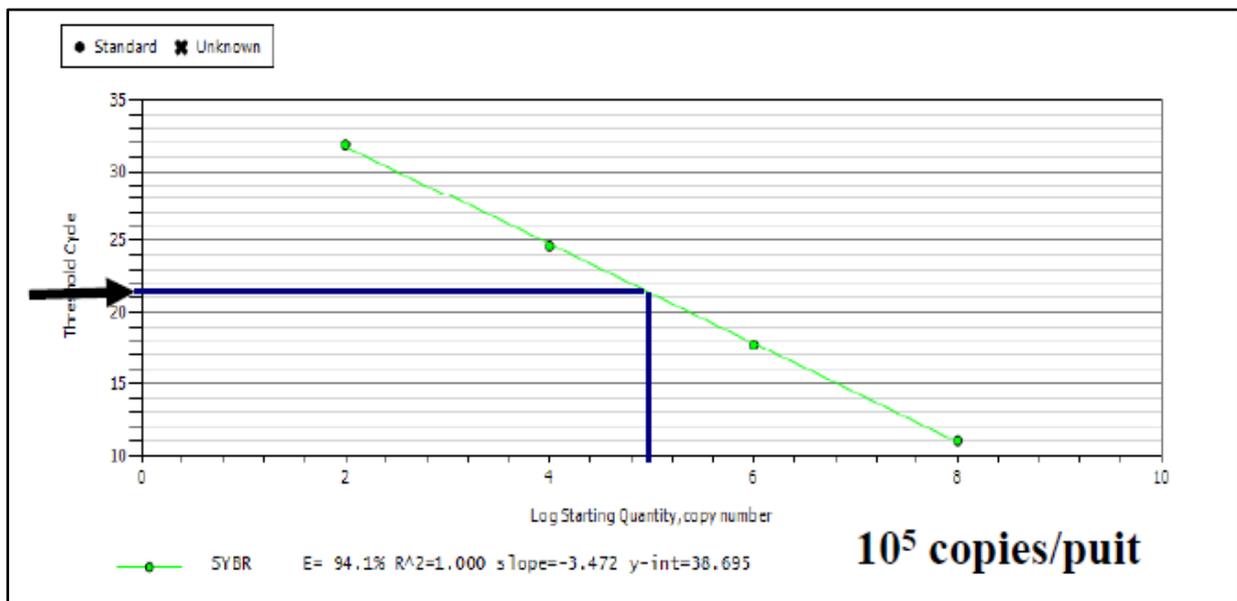
**Abscisse** : nombre de cycles (Ct) ; **ordonnée** : fluorescence mesurée en RLU (Unité relatives de lumière).

La valeur de cycle correspondant au signal seuil est appelée Ct (Cycle Threshold). Elle représente le cycle de PCR à partir duquel une augmentation notable de la fluorescence par rapport au bruit de fond est détectée. Le Ct est inversement proportionnel à la quantité d'ADN cible présente dans l'échantillon avant la PCR.

La valeur du Ct peut être traduite en un résultat quantitatif en la comparant avec les valeurs du Ct générées avec des courbes standards établis avec une quantité connue du gène cible (e. i : 300 000 copies) diluée en séries (1/10) . La droite d'étalonnage exprimant les variations du Ct en fonction de la quantité d'acide nucléique cible contenu dans chaque point de gamme est ensuite tracée (Figure 28). Il est alors possible d'en extrapoler le Ct obtenu et par conséquent d'en déduire la quantité d'acide nucléique cible exprimée en nombre de copies du gène/ml du contenu ruminal.

Au niveau expérimental, la quantité de produit formé dépend d'un facteur primordial qui est **l'efficacité d'amplification (E)** définie comme étant la proportion moyenne des molécules d'ADN cible se dupliquant à chaque cycle d'amplification, elle est calculée comme suit :

$$[10^{(-1/\text{pente})} - 1]$$



**Figure 28** : variation du Ct en fonction du log de nombre de copies d'un gène cible en séries de dilutions.

## **7.2. Protocol expérimental**

### **7.2.1. Extraction de l'ADN**

Afin d'exclure les contaminations croisées à cette étape, les ADN génomiques de deux communautés ont été extraits d'une manière isolée, pour cette raison, deux aliquotes de 1.5 ml du contenu de control et de chaque batch de fermentation après 24 h d'incubation sont prélevées séparément, elles sont par la suite centrifugées à 12000 g pendant 5 min, les culots ainsi obtenus sont immédiatement conservés dans la glace, puis transférés à -20°C.

En fait, l'extraction de l'ADN génomique a été réalisée à l'aide du kit Fast DNA SPIN kit for soil (MP BIOMEDICALS, Heidelberg, Germany) selon le protocole défini par le fabricant (Annexe 02). La spécificité de la méthode d'extraction qu'il met en œuvre repose sur une lyse mécanique des cellules microbiennes par agitation en présence de billes de verre et de tungstène.

La quantité (concentration en ng/ul) et la qualité de l'ADN extrait (rapports 260 nm/280 nm et 260 nm/230 nm) sont déterminées par spectrophotométrie en utilisant le Nanodrop (2000c, Thermo Scientific, German). La concentration de l'ADN extrait à partir de deux aliquotes est 400.9 ng/ul et 386 ng/ul, respectivement. La concentration de l'ADN ainsi obtenu est diluée 1 :10 avant son utilisation en tant que matrice en PCR à temps réel.

### **7.2.2. Choix des marqueurs moléculaire**

Dans toutes les analyses moléculaires et phylogénétiques, il faudra disposer d'un gène marqueur qui est présent dans tous les membres de la population à analyser et qui possède des régions conservées et variables. Pour les *Archaea*, l'identification est basée sur l'étude d'un gène marqueur fonctionnel spécifique qui code pour la méthyl-coenzyme M réductase (*mcrA*), une enzyme clé du processus catalysant la dernière étape (étape 7) de la méthanogénèse, (Figure 10).

L'enzyme *mcrA* semble être unique et présent chez tous les *Archaea* méthanogènes du rumen (Thauer, 1998) ce qui le fait un bon candidat comme marqueurs moléculaires pour des études en écologie microbienne. Pour les protozoaires, comme le cas des eucaryotes, l'ADNr 18S est choisi comme un bon marqueur moléculaire (Sylvester *et al.*, 2005; Skillman *et al.*, 2006) (Tableau 16). Les amorces ont été synthétisées par Eurofins Genomic (Ebersberg, Munich, Italie).

Dans notre étude, La pente et l'efficacité des amorces *mcrA* et rDNA 18s sont -3.43, 95.6% et -3.32, 100.5%, avec un  $R^2$  : 0.995 et 0.997, respectivement. L'efficacité de la qPCR avec les échantillons d'ADN a été confirmée similaire avec celle obtenue avec les courbes standards.

**Tableau 16:** Séquences nucléotidiques des amorces utilisées

<i>Les groupes microbiens</i>	<i>Séquences des amorces cibles</i>	<i>Références</i>
<i>Archaea méthanogènes</i>	<b>Forward</b> FGGSQR : (5'-TTCGGTGGATCDCARAGRGC-3') <b>Reverse</b> GFYGYDL: (5'-GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC-3')	Denman <i>et al.</i> , 2007
<b>Protozoaires totaux</b>	<b>Forward</b> P-SSU-316: (5'-GAGCTAATACATGCTAAGGC-3') <b>Reverse</b> P-SSU-539: (5'-CCCTCACTACAATCGAGATTTAAGG-3')	Skillman <i>et al.</i> , 2006

### 7.2.3. Condition qPCR

Dans notre étude, les qPCR ont été réalisées dans le but d'avoir une estimation quantitative des *Archaea* méthanogènes (gène *mcrA*) et des protozoaires (l'ADNr 18S) en utilisant une qPCR (7300 Real-Time PCR System, APPLIED BIOSYSTEMS) et le syber green master mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) dans des volumes réactionnels et des conditions PCR décrites dans les tableaux 17 et 18.

Un contrôle négatif (NTC) est également inclus dans chaque essai, ils contiennent tous les éléments du mélange réactionnel sans l'ADN matrice. L'acquisition et l'analyse des données de fluorescence ont été réalisées avec le logiciel SDS, version 1.4 (Applied Biosystem).

Les essais ont été réalisés en triplet et les résultats ont été exprimés comme étant la moyenne de 3 réplifications de copies *mcrA* ou ADNr 18S /ml du contenu ruminal.

**Tableau 17 :** Volumes des réactifs utilisés pour la réalisation de la qPCR

Composant	<i>Archaea méthanogènes</i>	<b>Protozoaires</b>
<b>Amorce F</b>	0.75ul (300 nM)	1 µl (400 nM)
<b>Amorce R</b>	0.75ul (300 nM)	1 µl (400 nM)
<b>L'ADN matrice</b>	2.5 ul	1.2 µl
<b>Syber Green Master Mix</b>	10 µl	15 µl
<b>Eau</b>	11ul	11.8
<b>Volume réactionnel total</b>	25µl	30 µl

**Tableau 18:** Paramètres des réactions de la qPCR

Étape	Archaea méthanogènes		Protozoaires	
	T°	Temps	T°	Temps
Dénaturation	50C°	2 min	50°C	2 min
	95 °C	2 min	95°C	8 min
Hybridation et élongation (40 cycles)			95°C	15 secs
	95C°	15 secs	55 °C	30 secs
	60°C	1 min	72 °C	30 secs
			72°C	5 min
Analyse de fusion	60-95°C	(0.5°C/30s)	60-95°C	(0.5°C/30s)

## 8. Analyse statistique

Une analyse de la variance à un seul facteur (ANOVA) est réalisée sur les données de la composition chimique et phytochimique, la production de gaz *in vitro*, la digestibilité, les paramètres fermentaires, et les quantifications microbiennes en utilisant le logiciel statistique SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), version 17.0.0.3, 2009, en prenant en compte l'espèce/l'extrait comme source de variation (effet fixe) et la source d'inoculum (effet aléatoire) comme facteur de blocage. Les erreurs standards de moyennes correspondent aux écarts types déduits de l'analyse de la variance. Le test de comparaison multiple de Tukey's est utilisé pour déterminer la moyenne qui diffère du reste du groupe. Elles sont considérées significativement différentes pour une valeur de probabilité ( $P < 0,05$ ). Des coefficients de corrélation linéaires de Pearson sont déterminés par paires entre les variables étudiées. L'effet corrélatif des saponines sur les différents paramètres fermentaires n'a pas été fait du fait que les concentrations de ces entités chimiques dans les plantes étudiées sont très faibles.

**Troisième partie**

**Résultats et discussion**

## **Chapitre I : Caractéristiques chimiques et phytochimiques des plantes appartenant à la famille des Asteraceae**

### **1. Screening des plantes sélectionnées**

#### **1.1. Rendement d'extraction**

Les meilleurs rendements d'extraction sont enregistrés par la macération, soit une moyenne de 14.6% versus 11.5% pour la sonication pour l'ensemble des substrats étudiés (Figure 29). En fait, il est difficile de comparer les rendements obtenus dans notre étude avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée, ainsi qu'à l'origine géographique des plantes.

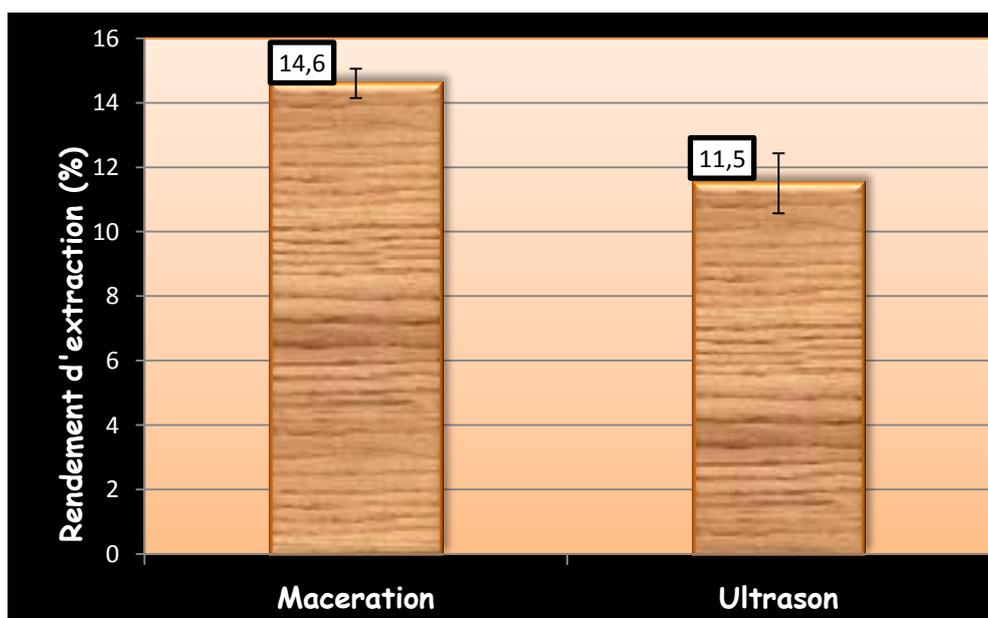
Le choix de la solution hydro-alcoolique pour l'extraction est basé sur le fait que la plupart des phénols simples présents dans les vacuoles peuvent aisément être extraites par des alcools comme le méthanol, l'éthanol et l'acétone. Cependant, quelques phénols extrêmement polaires peuvent ne pas être entièrement extraits par ces solvants purs, des mixtures d'alcool-eau sont recommandées (Mueller-Harvey, 2006). Selon Mohameddi and Atik (2011), l'addition de l'eau aux solvants organiques augmente la solubilité des composés phénoliques par modulation de la polarité du solvant organique. En addition, l'éthanol a été prouvée, à travers plusieurs études être la meilleure, en combinaison avec l'eau, pour l'extraction du maximum des composés phénoliques emprisonnés dans la matrice végétale (Mulinacci *et al.*, 2004 ; Catalinque *et al.*, 2010; Koffi *et al.*, 2010 ; Mahmoudi *et al.*, 2012 ; Bourgou *et al.*, 2016). Le pourcentage choisi (80 : 20) est également prouvé à travers plusieurs études être le meilleur pour donner des teneurs maximales en composés phénoliques (Kim *et al.*, 2007 ; Telli *et al.*, 2010).

#### **1.2. Analyse qualitative des extraits par CLHP**

Notre étude est focalisée sur la famille des composés phénoliques. Les extraits obtenus à partir des sept plantes ont été soumis à une analyse qualitative par CLHP en comparant leurs profils chromatographiques (annexe 03) entre eux pour sélectionner ceux les plus riches en composés phénoliques en basant sur le nombre de composants apparus dans les chromatogrammes sous forme de pics.

D'une façon générale, *C.segetum* présente le profil le plus concentré en composés phénoliques révélé par le nombre des pics le plus élevé, estimé à 39. Les profils obtenus pour les extraits de *S.jacobaea*, *C.intybus* et *A.clavatus* sont peu intenses comparativement aux

autres extraits, leurs nombres de composés (pics) sont 22. 22 et 20, respectivement. *C.nobile*, *C.pulata* et *T.officinales* présentent, quant à eux, des profils chromatographiques qualitativement similaires avec un nombre de composés (pics) intermédiaires, estimés à 31, 30 et 27, respectivement. Autrement dit, peu de molécules détectables en UV à 254 nm semblent être extraites à partir de ces plantes.



**Figure 29** : comparaison des rendements d'extraction obtenus à partir de la technique de macération et de la sonication.

Chaque chromatogramme est dominé par un/plusieurs pic(s) majoritaire(s) dont les temps de rétention diffèrent d'un profil à un autre. À titre d'exemple, le composant majoritaire apparu dans le profil chromatographique de *T. Officinale* avec un temps de rétention égale à 8.608 (pic n° 14) pourrait être correspondre, selon la bibliothèque interne, au trigalloyl-HHDP-glucose étant un tanin élagique. De plus, Le composant majoritaire présent dans l'extrait de la camomille noble avec un temps de rétention égale à 18.397 (pic n° 11) peut être correspondre, selon la même référence, à l'acide gallique. Il nous est toutefois impossible d'identifier tous les composants majoritaires présents dans nos extraits car leurs temps de rétention ne correspondent pas à ceux enregistrés dans notre bibliothèque.

Étant donné que le temps de rétention d'un composant dans un mélange de molécules dépend de la nature de la phase stationnaire, de la composition de la phase mobile, des conditions analytiques. Ainsi, la séparation des composés phénoliques par CLHP est conduite de différentes manières selon l'espèce étudiée, la méthode d'extraction, le type de colonne, le

solvant et le gradient d'élution, il est donc difficile d'identifier les composants de nos extraits en basant seulement sur la littérature et sans avoir recours à des méthodes de couplage, telles que la spectroscopie de masse (MS), les détecteurs à barrettes de diode (DAD), la résonance magnétique (RMN), etc.

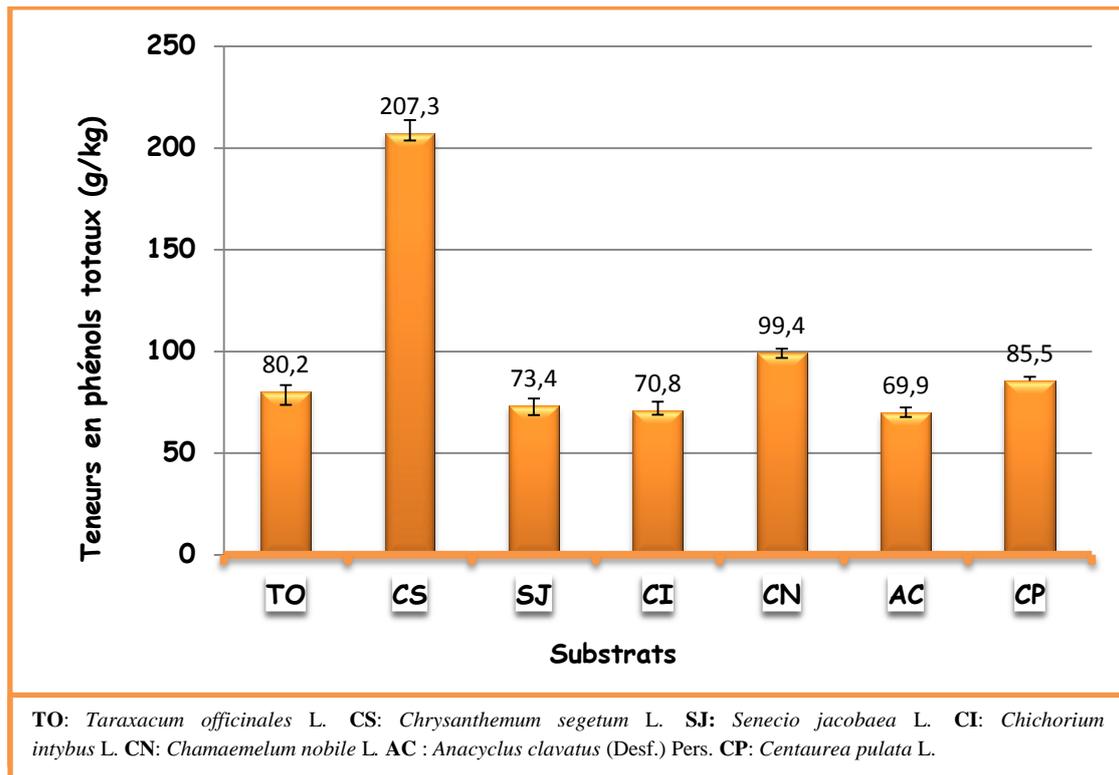
À cet effet, les composants identifiés à notre niveau (l'acide gallique et le tanin élagique) ne présentent pas les mêmes temps de rétention dans la littérature vue, comme déjà signalé, la dissemblance des conditions analytiques. À titre d'exemple, Kabran *et al.* (2014) et Talbi (2015) ont identifié l'acide gallique dans l'extrait de *Combretum paniculatum* et *Artemisia campestris* avec des temps de rétention largement inférieurs au notre, soit 3.1 et 3.54, respectivement. Similairement, un temps de rétention supérieur au nôtre, soit 27.9 est attribué au trigalloyl-HHDP-glucose selon Frakassetti *et al.* (2013). De plus, l'objectif de notre travail ne s'articule pas sur l'identification des composants de nos substrats, ou même de définir leur concentration dans le mélange mais plutôt, sélectionner ceux dont la richesse en composés phénoliques est maximum.

### **1.3. Analyse quantitative des extraits par spectrophotométrie (UV-visible)**

Les teneurs en composés phénoliques des extraits étudiés révèlent peu de variabilités entre les espèces. *C.segetum* renferme la concentration la plus élevée en phénols totaux (plus de 20% de la MS) (Figure 30), il manifeste nettement qu'elle est approximativement deux fois supérieure que celle de *C.nobile* (9.9,% MS), de *C.pulata* (8.5 % MS), de *T. Officinale* (8% MS) et de *S.jacobaea* (7.3% MS). Elle est toutefois, trois fois plus élevée que celle de *C.intybus* (7% MS) et d'*A.clavatus* (6.9% MS). Le classement décroissant des extraits sur la base de leurs contenus en composés phénoliques est identique à celui obtenu à travers leur analyse par CLHP, il est présenté comme suit :

***C.segetum* > *C.nobile* > *C.pulata* > *T. Officinale* > *S.jacobaea* > *C.intybus* > *A.clavatus***

Djermane *et al.* (2017) ont noté, en comparant deux plantes appartenant à la famille des *Asteraceae* en matière de leurs contenus en composés phénoliques, que *T. Officinale* renferme le taux le plus élevé en PT comparativement à l'*A.clavatus* en soulevant l'acétate d'éthyle comme le meilleur solvant d'extraction des polyphénols.



**Figure 30:** Comparaison du contenu en composés phénoliques (g/kg) des sept plantes sélectionnées.

Cependant, Milek and Ligath (2015) ont soulevé des concentrations assez faibles en composés phénoliques dans l'extrait hydro-méthanolique (70 %) d'une anacycle polonaise, soit, 4.1% (p : v). Heimler *et al.* (2009) ont noté une concentration en polyphénols estimée à 6% dans la chicorée rouge (*C.intybus*) présentée majoritairement par des flavonoïdes et des acides phénoliques comme l'acide hydroxycinnamique. Le même constat est soulevé par Carazzone *et al.* (2013) et Azzini *et al.* (2016).

De ce fait, à l'issu des résultats obtenus à travers les analyses qualitatives et quantitatives, nous sommes arrivés à sélectionner les trois premières plantes riches en composés phénoliques, en l'occurrence, *Chamaemelum nobile*, *Centaurea pullata* et *Chrysanthemum segetum* pour déterminer leurs compositions chimiques et phytochimiques détaillées, leurs profils fermentaires, leurs effets antiméthanogéniques et, enfin, leurs impacts sur la population des méthanogènes et des protozoaires dans le rumen.

## **2. Analyse chimique et phytochimique de trois plantes fourragères et de l'aliment de référence**

il est essentiel de noter, à priori, que seules les vertus médicinales de *Centaurea pullata* et *Chrysanthemum segetum* sont évoquées dans la littérature à travers le monde, aucun travail n'a été entrepris sur la valeur nutritive de ces deux plantes comme aliment/additif dans l'alimentation des ruminants. Ainsi les études sur leur fermentescibilité ruminale ainsi que de leurs extraits sont quasi-absentes. De ce fait, l'étude de leurs impacts sur le déroulement de la fermentation au niveau du rumen ainsi que leurs effets sur la méthanogénèse ruminale pourrait être d'un intérêt majeur. L'inexistence des travaux menés sur leurs compositions chimiques (cytoplasmiques et pariétales) nous a menée à se référer, pour des fins de comparaison, à des espèces de la même famille d'*Asteraceae* ou à des espèces appartenant à d'autres familles botaniques. *C.nobile*, à moindre échelle, a attiré l'attention des nutritionnistes et des animalistes en raison de ses fameuses propriétés antibactériennes, cicatrisantes, immunomodulatrices, anti-athérosclérotiques et antioxydantes reconnues depuis l'antiquité. Mais les études menées sur cette plante en matière de sa valeur nutritive et son effet, ainsi que son extrait, sur la fermentation et la méthanogénèse dans le rumen demeurent rares et peu nombreuses. D'une manière générale, la valeur alimentaire d'un fourrage quelconque est estimée à partir de son contenu en nutriments potentiellement digestibles (essentiellement l'azote et les minéraux) et sur la présence de composés antinutritionnels tel que la lignine, les tanins, les saponines...etc.

La composition chimique (composants cellulaires et pariétaux) et la valeur relative des plantes fourragères cibles (*Chamaemelum nobile*, *Chrysanthemum segetum* et *Centaurea pullata*) et de l'aliment de références sont illustrées dans le tableau 19.

### **2.1. Les constituants cytoplasmiques**

#### **2.1.1. Teneurs en matières sèches (MS)**

L'analyse du tableau 20 a révélé clairement une variabilité entre les espèces dans toutes les composantes mesurées ( $p < 0.001$ ). Tous les substrats étudiés renferment des taux en matière sèche (MS) supérieurs à 90%. Les valeurs les plus élevées sont notées chez les trois plantes fourragères, soient 93.9, 93.6 et 93.2 % MS pour *Chamaemelum nobile*, *Centaurea pullata* et *Chrysanthemum segetum*, respectivement. La zone géographique de provenance des

plantes étudiées caractérisée par un climat semi-aride à aride pendant la période estival, pourrait expliquer, en partie, ces taux faibles d'humidité.

La teneur plus élevée en eau relevée pour l'aliment de référence comparativement aux autres substrats (9,2 % MS) pourrait être dû, dans une certaine mesure, à sa formulation composée de 70% foin et de 30% concentré. Le mode et les conditions du stockage des composantes expliqueraient éventuellement le contenu hydrique total de l'aliment. Le taux de MS obtenus pour l'aliment de référence est comparable à ceux d'autres aliments ; foin de vesce avoine (Houmani *et al.*, 2000 ; Zitouni *et al.*, 2014, Chentli *et al.*, 2014), quelques espèces des graminées (Abdulrazak *et al.*, 1999 ; Arhab *et al.*, 2009 ; Bouallala *et al.*, 2013 ; Özelçam *et al.*, 2015 ) et de pailles des céréales (Triki *et al.*, 2010).

D'après Bernez *et al.* (2000), les proportions d'eau varient en fonction de l'organe de la plante (feuille, tige, fruit), de la saison, de la nature du sol et de la phase végétale. Au fur et à mesure que les structures de la cellule jeune se différencient (épaississement de la membrane, développement des organes), la teneur en eau s'abaisse. Il a été rapporté qu'un taux élevé d'humidité provoque une dilution de l'ensemble des nutriments (macro et micro) présents dans la matrice végétale, ce qui engendre éventuellement une faible valeur énergétique des fourrages. Une corrélation négative a été soulevée dans ce sens ( $r < -0,489$  ;  $p < 0.0001$ ) (Garcia-Herrera *et al.*, 2014). De même, Adinortey *et al.* (2012) rapporte que le taux d'humidité fournit une indication de la présence des vitamines hydrosolubles dans la matrice végétale. En plus, un taux faible en eau facilite la conservation et le stockage et augmente, par ainsi la stabilité microbiologique des aliments.

De ce qui précède, il manifeste que les trois plantes fourragères renferment une teneur intéressante en matière sèche, ce qui leur attribue une potentielle utilisation (source importante de MS) comme fourrage de base dans les régimes alimentaires du cheptel local.

### **2.1.2. Teneurs en matières minérales (MM)**

Les espèces étudiées ainsi que l'aliment de référence renferment des taux différents en cendres ( $p < 0.0001$ ). Ils sont d'une moyenne de 10.6% MS, variant de 6.9% MS pour l'aliment de référence et 13.9% MS pour *C.nobile*. Cette dernière se distingue par une forte teneur en minéraux comparativement aux autres espèces (10.8% et 11.5% MS pour *C.segetum* et *C.pulata*, respectivement).

Tableau 19 : Analyse chimique des plantes fouragères étudiées et de l'aliment de référence (g. kg <sup>-1</sup> MS).					
Constituants chimiques	L'aliment de référence	<i>Chamaemelum nobile</i>	<i>Chrysanthemum segetum</i>	<i>Centaurea pullata</i>	P
MS *	908.2 <sup>a</sup> ± 0.57	939.1 <sup>b</sup> ± 5.23	932.2 <sup>b</sup> ± 0.71	936.6 <sup>b</sup> ± 0.14	< 0.001
MO	846.95 <sup>c</sup> ± 0.35	799.70 <sup>a</sup> ± 1.41	823.80 <sup>b</sup> ± 1.83	821.0 <sup>b</sup> ± 1.41	< 0.0001
MM	60.9 <sup>a</sup> ± 0.28	139.4 <sup>c</sup> ± 3.82	108.4 <sup>b</sup> ± 2.55	115.6 <sup>b</sup> ± 1.56	< 0.0001
MAT	90.5 <sup>b</sup> ± 0.14	94.8 <sup>b</sup> ± 0.21	50.5 <sup>a</sup> ± 3.54	101.3 <sup>c</sup> ± 0.21	< 0.0001
MG	17.9 <sup>a</sup> ± 0.22	84.1 <sup>c</sup> ± 1.70	49.35 <sup>b</sup> ± 0.92	47.9 <sup>b</sup> ± 1.20	< 0.0001
NDF	426.3 <sup>c</sup> ± 0.71	399.05 <sup>b</sup> ± 5.59	470 <sup>d</sup> ± 5.09	234.45 <sup>a</sup> ± 0.07	< 0.0001
ADF	329.9 <sup>b</sup> ± 0.35	319.3 <sup>b</sup> ± 7.28	422.75 <sup>c</sup> ± 0.64	229.2 <sup>a</sup> ± 5.59	< 0.0001
ADL	61.6 <sup>c</sup> ± 0.21	80.05 <sup>d</sup> ± 1.20	49 <sup>b</sup> ± 2.69	36.7 <sup>a</sup> ± 2.69	< 0.0001
Cellulose (C)	267.4 <sup>c</sup> ± 0.71	239.2 <sup>b</sup> ± 6.08	373.75 <sup>d</sup> ± 2.05	192.45 <sup>a</sup> ± 2.90	< 0.0001
Hemicelluloses (HC)	97.5 <sup>c</sup> ± 0.49	79.8 <sup>c</sup> ± 12.87	47.25 <sup>b</sup> ± 5.73	5.3 <sup>a</sup> ± 5.66	< 0.001
NFC	404.4 <sup>c</sup> ± 0.57	282.6 <sup>a</sup> ± 3.68	321.75 <sup>b</sup> ± 10.25	500.9 <sup>d</sup> ± 0.07	< 0.0001
RFV	138.24 <sup>b</sup> ± 0.11	149.33 <sup>b</sup> ± 0.83	109.26 <sup>a</sup> ± 1.04	242.49 <sup>c</sup> ± 1.75	< 0.0001

MS : Matière sèche; MM: Matière minérale; MO: Matière organique; MAT: Matières azotées totales; MG: Matières grasses; NDF: Neutral detergent fiber, ADF: Acid detergent fiber ; ADL: Acid detergent lignin; NFC: Non fibrous carbohydrates: 100 – (% NDF + % CP + % EE + % Ash, NRC, 2001) ; RFV : Relative feed value : DMD x DMC/1.29, Dry Matter Digestion (DMD) = 88.9 – (0.779 x ADF %); Dry Matter Consumption (DMC) = 120/ NDF% (Sheaffer *et al.*, 1995). P: probabilité; S.E.M: Erreur standard des moyennes.

<sup>a,b,c,d</sup> moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes (p < 0.05).

MS\* : Calculer par rapport à 1Kg de la matière fraîche de chaque plante avant dessiccation.

En fait, des valeurs différentes des nôtres variant entre 6.4 et 1.6 % MS ont été rapportées par Guimarães *et al.* (2013) et Manca (2014), respectivement pour la camomille noble. Ces mêmes auteurs ont attribué la forte teneur en minéraux notée pour *C.nobile* à des éventuelles contaminations de la plante par le sol au moment de la récolte. Notamment, un sol sec et sablonneux riche en silice est le milieu approprié pour la croissance de cette espèce. Le contenu en cendres de *C.segetum* et *C.pulata* est inférieur à celui rapporté dans la littérature pour des légumineuses fourragères (28 - 46 g/kg MS) (Amarteifio and Moholo, 1998; Holse *et al.*, 2010; Ezeagu and Ibegbu, 2010), tandis qu'il est comparable à celui rapporté pour d'autres espèces fourragères de la même famille (*Artemisia herba-alba*, *Chicorium intybus*, *Senecio glaucus* et *Echinops giganteus*) (Abdou Bouba *et al.*, 2012 ; Al Amier *et al.*, 2015 ). Le stade végétative, les conditions pédoclimatiques et les conditions d'analyse au niveau de chaque laboratoire pourraient justifiés les écarts notés entre les résultats.

Le phosphore (K) et le sodium (Na) sont les minéraux prépondérants dans plusieurs espèces de la famille des *Asteraceae*, le calcium (Ca) et le magnésium (Mg) se trouvent en deuxième position (Escudero *et al.*, 2003 ; Jan *et al.*, 2011 ; Garcia-Herrera *et al.*, 2014 ).

Chehma (2005) et Chehma and Youcef (2009) ont souligné que la composition minérale d'un fourrage résulte de l'action combinée de plusieurs facteurs parmi lesquels, la fertilité, le pH du sol, la phase végétative, la saison et l'efficacité de la captation racinaire de chaque plante. Dans le même contexte, les variations en contenu minérale entre les espèces dépend primordialement de l'activité chlorophyllienne et métabolique de la plante (Dudouet, 1999). De ce fait, les espèces fourragères étudiées peuvent être considérées comme une source considérable d'éléments minéraux pour probablement combler les déficits en minéraux de certains régimes alimentaires locaux.

### 2.1.3. Teneurs en matières azotées totales (MAT)

Les teneurs en matières azotées totales varient de façon significative en fonction de l'espèce ( $p < 0,0001$ ). La teneur la plus importante est notée chez *C. pullata* (10.1 %MS), tandis que la plus faible est rencontrée chez *C.segetum* (5 % MS%). L'aliment de référence montre cependant, une teneur en MAT comparable à celle du *C.nobile* avec des taux respectifs de 9% et 9.4 % MS. Bien que les trois espèces aient été récoltées dans le même stade phénologique (floraison), cette variation peut être expliquée par le caractère génétique, morphologique, édaphique et la capacité photosynthétique propre à chaque espèce.

Les taux en MAT enregistrés dans notre étude sont inférieurs à ceux rapportés pour des espèces de la même famille, *Cichorium endivia* (14.11%MS), *Cichorium intybus* (14 % MS), *Glebionis coronaria* (11.33% MS), *Taraxacum officinalis* (22.2% MS), *Tussilago farfara* (24%), *Artemisia herba alba* (12.1%), *Cynara cardunculus* (21.6%) et *Launaea taraxacifolia* (26.67% MS) (Falkowski *et al.*, 1990 ; Tanji, 1993; Foti *et al.*, 1999 ; Jan *et al.*, 2011 ; Adinortey *et al.*, 2012 ; Faiku *et al.*, 2012 ; Boufennara *et al.*, 2013), et de ceux des feuilles de légumineuses; *Gliricidia sepium* (20% MS), *Leucaena leucocephala* (24% MS) et *Medicago sativa* (22 % MS) (Foroughbakhch *et al.* , 2012). Les écarts entre les résultats pourraient être dû à la capacité de ces derniers à fixer l'azote atmosphérique. Des espèces vivaces de la famille des *fabaceae*, *lamiaceae*, *Zygophyllaceae*, *Plumbaginaceae*, *Poaceae* et *Mimosaceae* présentent des teneurs en MAT inférieurs à 11 % MS, par exemple : *Acacia tortilis* (10.2 % MS), *Retama retam* (11%), *Pituranthos chloranthus* (5.5%), *Zygophyllum album* (10.0%), *Limoniastrum guyonianum* (9.5%), *Poa sinaica* (10.1 % MS) et *Tetrapleura tetraptera* (10.5% MS) , respectivement (Boubaker *et al.*, 2005 ; Chehma, 2010 ; Al masri, 2011 ; Abdou Bouba *et al.*, 2012 ; Al masri, 2013 ; Dambe *et al.*, 2015).

Il a été rapporté que le rapport tiges/feuilles influence la valeur azotée des plantes fourragères. En effet, la richesse de l'échantillon au moment de la récolte en feuilles au détriment des autres organes (tiges, fleurs...etc.) accentue le taux des protéines et des minéraux comparativement aux échantillons en contiennent moins (Andrieu and Weiss, 1981). Selon Jarrige *et al.* (1995) de très nombreuses protéines se trouvent au niveau des feuilles dont la plupart ayant des activités enzymatiques. Les chloroplastes à eux seuls contiennent plus de la moitié des protéines foliaires en plus des protéines membranaires. Cependant, ces teneurs diminuent avec la sénescence de la plante. La fertilisation azotée a été également rapportée comme un facteur déterminant des taux des matières azotées totales des fourrages.

Hariadi and Santoso (2010) stipulent que les fourrages dont les teneurs en MAT sont inférieurs au seuil de 70 g/kg de MS limite l'activité microbienne dans le rumen et nécessite, par ainsi une supplémentation azotée afin d'assurer un apport en azote satisfaisant pour le bon développement du microbiote ruminale. Dans le même sens, Quansah and Makkar (2012) rapportent que les ressources alimentaires ayant un taux de protéines brutes entre 8 et 16 % MS sont désignés comme des « bons » substrats (Good), ceux avec un taux supérieur à 16 % MS sont retenus comme des « très bon » substrats « very good », tandis que ceux ayant un

taux inférieur à 8% sont « pauvres ». D'autre côté, Un animal pesant approximativement 50 kg doit avoir un apport quotidien de 75 g de protéines, et pour un gain quotidien de 50, 100 et 150 g de poids vif, le même animal doit recevoir 89, 103 et 117 g de protéines, respectivement (NRC, 2001). Tenant compte de toutes ces spéculations, nous pouvons conclure que *C.nobile* et *C.pullata* présentent un bon apport protéique pour l'alimentation du bétail en faisant satisfaire le minima des besoins en azote pour la bonne performance et le bien-être de l'animal. En contrepartie, l'utilisation de *C.segetum* comme un fourrage de base requiert inévitablement une supplémentation azotée afin d'améliorer son ingestion par les ruminants et combler le déficit en azote qui en résulte.

#### **2.1.4. Teneurs en matières grasses (MG)**

Il manifeste du tableau 20 que les plantes étudiées renferment des teneurs distinctes en matière grasse ( $P < 0, 0001$ ). La fraction lipidique varie entre 1.7% MS chez l'aliment de référence et 8.4% MS pour *C.nobile*. *C.segetum* renferme un taux proche de celui du *C.pullata* (4.9 et 4.7% MS, respectivement). Ces deux mêmes espèces présentent des taux en MG similaires à ceux de *Sonchus oleraceus*, *Sonchus tenerrimus* (5 % et 4.2% MS, respectivement) de la famille des *Asteraceae*, tandis qu'ils sont inférieurs à celui noté pour *Artemisia herba alba* (9%) appartenant à la même famille (Houmani *et al.*, 2004).

Kulivand and Kafilzadeh (2015) rapportent un taux assez élevé comparativement au notre pour *C.nobile*, soit 2,7% MS. En contrepartie, des valeurs 6 fois moins sont enregistrées pour *Chondrilla juncea*, *Taraxacum obovatum* et *Achillea millefolium* de la même famille (1.5, 1.2, et 1,8 % MS, respectivement) (Guil-Guerrero and Torija-Isasa, 2016, Manca, 2014). Les mêmes auteurs stipulent que la famille des *Asteraceae* est la plus riche en matière grasse comparativement aux autres familles (*Malvaceae*, *Cruciferaea*, *Chenopoiaceae* et *Portulaceae*). En addition, les acides gras polyinsaturés prédominent les acides gras saturés et ceux monoinsaturés, l'acide  $\alpha$ -linoléique (18:3n-3) est de loin le plus représentatif (plus de 50%) de la fraction lipidique, suivie par l'acide linoléique (18:2n-6) et l'acide palmitique (16:0) (Escudero *et al.*, 2003 ; Guil-Guerrero and Torija-Isasa, 2016). Le taux en MG enregistré pour l'aliment de référence est similaire à ceux des arbustes méditerranéens pâturés par des chèvres sardes (Cabbidu *et al.*, 2000).

En fait, il a été rapporté par Dang Van *et al.* (2013) que la ration riche en matière grasse (> 5 %) peut aboutir à un effet d'inhibition de l'activité bactérienne dans le rumen. Cette

inhibition peut être l'effet soit d'enrobage des fibres limitant leur attaque par les bactéries, soit d'une toxicité spécifique sur certaines populations bactérienne. De ce fait, une teneur en MG de 3-3.5% MS dans la ration est optimale pour un bon développement du processus fermentaire au niveau du rumen. Donc, *C.pullata* et *C.segetum* ont des teneurs en MG inférieures au seuil de toxicité pour la flore bactérienne, à contrario, *C.nobile* devra être utilisée conjointement avec un tampon permettant de maintenir un environnement stable et adéquat au développement du microbiote ruminale.

### 2.1.5. Teneurs en hydrates de carbone non fibreux (NFC)

Dans cette étude, les teneurs en NFC calculées sont statistiquement différentes entre les substrats ( $P < 0, 0001$ ). Dans un ordre décroissant, *C.pullata* renferme le taux le plus élevé (50% MS) suivie par l'aliment de référence (40% MS) et *C.segetum* (32.1% MS). *C.nobile* vient en dernière position avec un taux de 28.2% MS. Le taux enregistré pour *C. nobile* est en accord avec les résultats de Manca (2014) pour la même espèce, soit 34.7 % MS. Cependant, il est relativement faible par rapport aux résultats de Guimarães *et al.* 2013 (63.83 % MS). Selon les mêmes auteurs, le fructose est le sucre prépondérant dans *C.nobile* suivi par le glucose et le sucrose. Le tréhalose, en contrepartie, ne se trouve qu'en trace.

Hormis *C.pullata*, il semble manifeste que les contenus en NFC des substrats étudiés ne dépassent pas la limite recommandée par l'NRC (2001) estimée entre 33 et 42%. Le régime alimentaire dont les teneurs en NFC sont supérieures à ce seuil critique tend à abaisser le pH du milieu en diminuant la motilité du rumen. Il est bien admis qu'un pH ruminal inférieur à 5 endommage les papilles ruminale et réduit, par conséquence, la surface absorbante des AGV.

Par ailleurs, la santé et le bien être de l'animal sont négativement affectés par les faibles teneurs en NDF et/ou les fortes teneurs en NFC. Les indicateurs qui répondent rapidement à ce scénario sont le pH ruminal, le pourcentage de la matière grasse du lait et l'activité de mastication. Dans leur étude, Andrade *et al.* (2012) rapportent que l'utilisation de fourrages avec des teneurs en NFC supérieures à 44% MS ou des teneurs en NDF inférieures à 30% MS dans l'alimentation des vaches allaitantes pourraient engendrer une diminution de la digestibilité et du taux butyrique (TB) du lait. De ce fait, l'utilisation de la centaurée comme fourrage de base dans l'alimentation des ruminants pourrait être l'origine de nombreux problèmes principalement l'acidose ruminale et la diminution du taux butyrique (TB) du lait,

en particulier chez les vaches laitières. Cependant, son inclusion dans les rations à base de fourrage comme une source d'énergie au lieu des concentrés est possible, le pourcentage d'incorporation devra être étudié et contrôlé. Par contre, il ressort que *C.nobile* et *C.segetum* peuvent être en général classés, en tant que source d'énergie intermédiaire comprise entre les concentrés et les fourrages.

## **2.2.Les constituants pariétaux**

Parmi les facteurs limitant de la digestion des aliments, il convient de souligner le rôle important de la teneur en parois végétales. Les constituants de ces parois sont peu (celluloses, hémicelluloses) ou pas (lignine, cutine) digestibles. En conséquence, les variations de teneurs en paroi végétale représentent la cause de variation la plus importante de la digestibilité et de la valeur énergétique des aliments du bétail. Notre étude montre que les teneurs en parois totales (NDF) varient de façon significative en fonction de l'espèce. ( $P < 0, 0001$ ). Elles sont de l'ordre de 23.4 à 47% MS. Une faible teneur est enregistrée chez *C.pullata* (23.4% MS), tandis que de fortes teneurs sont notées chez *C.nobile* (39.9% MS) et *C.segetum* (47 % MS). Ces derniers valeurs sont inférieurs à ceux rapportés par Fall *et al.*(1997) pour des espèces ligneuses collectées du Sahel (400 et 420 g /kg MS) ,des fourrages autochtones des zones arides égyptiennes (368-651 g/kg MS) (Sallam *et al.*, 2006), des espèces herbacées en Mexique (400-700g/kg MS) (Gutiérrez *et al.*, 2008), en Kenya (186-481g/kg MS) (Abdulrazak *et al.*, 2000) et des fourrages méditerranéennes (383-615 g/kg MS) (Ammar *et al.*,2005; Parlak *et al.*, 2011). En plus de l'effet de la région, l'effet de la saison a été également souligné (Martiniello *et al.*, 2007 ; Grdović *et al.*, 2013).

Dans le même contexte, Oktay and Temel (2015), à travers leur étude sur *Calligonum polygonoides* collectées en moi d'Avril et en mois de Novembre, ont conclu que plus la plante avance dans les différents stades de développement plus leur contenu en parois totales augmente et leur contenu protoplasmique (protéines brutes et sucres) s'abaisse. L'effet de l'altitude a été également évoqué (Temel and Tan, 2011). Les conditions environnementales (haute température et faible précipitation) tendent à augmenter la fraction pariétale et diminuer le contenu en sucres solubles (Pascual *et al.*, 2000 ; Ammar *et al.*, 2005 ; Abebe *et al.*, 2012). D'une manière générale, les contenus de la fraction insoluble (NDF) enregistrés dans notre étude demeurent moyennement pauvres comparativement à ceux des fourrages jugés de mauvaise qualité pouvant atteindre 75% MS. D'après la littérature, des faibles

pourcentages en NDF sont proscrits en alimentation animale, un intervalle de 25% à 30% est pratiquement recommandé, en dessous de ce seuil apparaît le phénomène de l'acidose (Jolly and Wallace, 2007). La présence des fibres donc stimule la rumination et permet de maintenir une fonction ruminale normale. Cependant une limite supérieure à 50% d'NDF mène à l'apparition d'un effet antagoniste des fibres sur l'ingestion et la digestion du régime alimentaire.

Le contenu en fibres acides constituant le complexe lignocellulosique (**ADF**) est généralement relié à la digestibilité et à la valeur énergétique des aliments. Van Soest (1994) note que la richesse en parois cellulaires, notamment en lignocellulose, a une influence négative sur la digestibilité. De même, selon Mc Donald *et al.* (1995), la fraction ADF est corrélée négativement à la digestibilité globale réduisant ainsi la quantité d'énergie potentiellement disponible pour l'animal. Dans notre étude, le contenu en ADF est statistiquement distinct entre les espèces ( $P < 0, 0001$ ). La teneur la plus élevée est enregistrée pour *C.segetum* (42.2% MS), alors que la plus faible est observée chez *C.pullata* (22.9% MS). *C.nobile* et l'aliment de référence présentent des taux intermédiaires, de l'ordre de 31.9 et 32.9% MS, respectivement.

Bien que le contenu en lignine (ADL) se diffère statistiquement entre les espèces ( $P < 0, 0001$ ), les teneurs demeurent très faibles, ils varient entre 3.6 et 8% MS. Comme attendu, *C.pullata* présente le taux le plus faible et *C.segetum* le plus élevé. Le calcul des fractions hémicellulosiques et cellulosiques montre des résultats statistiquement différents ( $P < 0, 0001$ ). Par rapport au contenu totale en fibres, *C.pullata* renferme le taux le plus élevé en cellulose (82% NDF) et le taux le plus faible en hémicellulose (2.2% NDF), *C.nobile*, à l'opposé, présente le taux le plus faible en cellulose (60% NDF) et le plus élevé en hémicellulose (20% NDF). *C.segetum* contient des taux intermédiaires (79.5 et 10% en cellulose et en hémicellulose, respectivement). Les résultats obtenus pour *C.segetum* sont quasi-identiques de ceux rapportés pour *Chrysanthemum coronarium* (Chang *et al.*, 1995). La prépondérance de la fraction cellulosique par rapport à celle de la lignine dans la fraction pariétale des trois espèces pourrait, par ailleurs, être associée à une haute digestibilité au niveau du rumen.

Les teneurs en fibres obtenus dans cette étude corroborent ceux des travaux de Arhab *et al.* (2009) ; Mebirouk *et al.* (2014) ; Kadi *et al.* (2016) pour des ressources fourragères locaux

poussant dans des conditions semblables, tandis qu'ils sont largement inférieurs aux mesures notées pour des herbes et des arbustes locaux des zones arides (Arhab *et al.*, 2009 ; Haddi *et al.*, 2009). Manca (2014) a rapporté des taux en constituants pariétaux quasi-identiques pour la camomille noble, soient : 36.9, 34.3 et 9.8 % MS pour NDF, ADF et ADL, respectivement, par contre, des teneurs inférieures aux nôtres ont été notées par Kulivand and Kavilzadeh (2015) pour la même espèce (325 et 251 g/kg MS pour NDF et ADF, respectivement). Les divergences enregistrées entre les résultats pourraient être attribuées aux différentes proportions du feuillage et des branches dans les échantillons, ainsi que le stade phénologique des plantes au moment de la récolte.

De la même famille, *Artemisia campestris*, *Artemisia herba alba* et *Helianthus annuus* présentent un contenu fibreux assez élevé (Moujahed *et al.*, 2013 ; Oliveras-Palma *et al.*, 2013). *C.pullata* se distingue des autres substrats par de faibles teneurs en fibres pariétales, en particulier la fraction ADL. Les faibles teneurs en NDF, ADF et ADL enregistrées pour *C.pullata* recourent ceux notés pour *Acacia tortilis*, *Atriplex halimus* *Albizia julibrissin*, *Calendula arvensis* des familles de *Fabaceae*, *Chenopodiaceae* et *Asteraceae*, respectivement (Tefera *et al.*, 2008 ; Bouaaza *et al.*, 2012 ; Moujahed *et al.*, 2013).

### 2.3. Les composés secondaires

Les teneurs en phénols totaux (PT), flavonoïdes totaux (FT), saponines totaux (ST) et tanins condensés (TC) sont exposés dans la figure 31. Il en ressort que la moitié de la fraction phénolique chez *C.nobile* est représentée par des flavonoïdes (46.4 %), cependant cette demi-fraction est subdivisée entre les flavonoïdes et les tanins condensés chez *C.segetum* avec des concentrations respectives de 28.4 et 22.9 %. Les flavonoïdes, néanmoins constituent 54% de la fraction phénolique de *C.pullata*. Hormis *C.segetum*, tous les substrats étudiés se manifestent pauvres en tanins condensés (TC) et en saponines totaux (ST). Leurs concentrations de ces derniers ne dépassent pas le 1.3 % MS.

Des résultats assez élevés ont été obtenus par Srivastava and Gupta (2009) pour le contenu phénolique (340g/kg MS) et flavonoïques (236 g/kg MS) de l'infusion des feuilles de la camomille noble dont les flavonoïdes correspondent majoritairement à l'apigénine et à ses dérivés. Les résultats des spectres de masse ont révélé que la majorité des composés phénoliques de *C.nobile* est représentée par des flavonoïdes (flavonols et flavones), des acides phénoliques et de ses dérivés (Guimarães *et al.*, 2013).

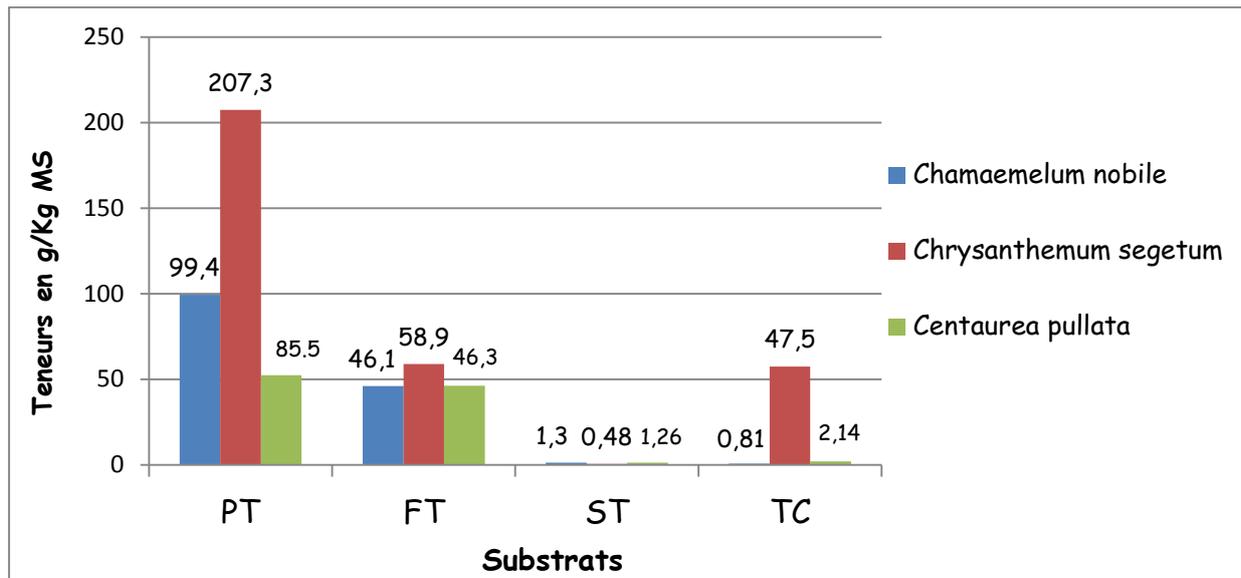


Figure 31 : Teneurs en facteurs antinutritionnels ( $\text{g.kg}^{-1}$  MS) des plantes étudiées.

Les résultats enregistrés dans nos travaux pour *C.segetum* et *C.pullata* relatifs aux PT et FT sont largement supérieurs aux valeurs enregistrés par Fraisse *et al.* (2011) pour 18 espèces de la famille des *Asteraceae* (25 à 80 et 1.62 à 23.44  $\text{g/kg}$  MS, respectivement.). Ces mêmes auteurs stipulent que la majorité de la fraction phénolique des espèces étudiées est représentée par des flavonoïdes, une forte corrélation a été relevée entre les deux fractions ( $r = 0.95$ ,  $p < 0.001$ ).

La même tendance est notée pour les résultats rapportés par Olennikov and Kashchenko (2014) pour le contenu flavonoïque de 9 variétés de *Calendula officinalis* (*Asteraceae*) estimé entre 6.11 et 15.74  $\text{mg/g}$  MS, ils suggèrent que la date de récolte au moment de la floraison (début ou fin) influence fortement le contenu flavonoïques des espèces végétales. Le cultivar a été rapporté, ainsi comme un indice majeur de variation. De même, Boufennara *et al.* (2012) ont conclu, d'après leur étude sur 9 espèces végétales appartiennent à quatre familles botaniques différentes, que la famille des *Asteraceae* représentée par le genre *Artemisa spp* est la plus riche en composés phénoliques comparativement aux autres familles. Les discordances entre les résultats obtenus et rapportés dans la littérature peuvent être dues, en partie aux différentes techniques de dosage utilisées, ainsi qu'aux procédés spécifiques d'extraction et à la diversité des standards utilisés. L'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide ferulique, l'acide rosmarinique, la myricétine et la rutine ont été rapportés comme des composants majeurs des espèces de la famille des *Asteraceae* (Sytar *et al.*, 2015). Le contenu

en TC enregistré chez *C.segetum* est comparable à celui des feuilles du palmier (49.1 g/kg DM) (Arhab *et al.*, 2009) et à ceux de *Persea americana* (46 g/kg DM) et *Hibiscus tiliaceus* (42 g/kg DM) appartenant à la famille des *Laureaceae* et *Malvaceae*, respectivement (Jayanegara *et al.*, 2011).

Öksüz and Wagner (1982) ont rapporté que les espèces du *Chrysanthemum* contiennent principalement des sesquiterpènes lactones, des flavonoïdes et des coumarins. La couleur jaune des pétales du *C.segetum* est imputable à la présence du flavonols “gossypetine” comme un composant majeur et primordial (Geissman and Steelink, 1957 ; Stick *et al.*, 1996). En plus de la gossypetine, la “luteolin 7-glucoside” a été également rapportée comme un composant principale des vacuoles de *C.segetum* (Williams *et al.*, 2001; Dogan *et al.*, 2012). Quand à *C.pullata*, les études phytochimiques rapportent un contenu phénolique composé majoritairement par des sesquiterpènes lactones et des flavonoïdes (Djeddi *et al.*, 2008 (a, b), Khammar and Djeddi, 2012). Deux flavones dérivés des apigénines ont été également identifiés chez *C. tougourensis* (Nacer *et al.*, 2012). L’effet inhibiteur de plusieurs espèces de la centaurée sur la protéine de NF-kB (nuclear factor-kappa B) a été attribué probablement à la présence des flavonoïdes (Karamenderes *et al.*, 2007). De même, 2 triterpènes et 5 flavonoïdes ont été isolés de *Centaurea pubescens* (Mouffok *et al.*, 2011).

Il est important de souligné que la biosynthèse et l’accumulation des métabolites secondaires dans les espèces végétales sont susceptibles d’être affectés par un certain nombre de facteurs biotiques et abiotiques. Ils sont liés soient à la plante elle-même (l’espèce végétale, la variété, la partie anatomique utilisée et le stade de maturité), aux facteurs environnementaux (la température, l’humidité, les rayonnements, l’altitude, le stress hydrique et la fertilité des sols), aux facteurs agronomiques (les conditions de culture, l’irrigation, la fertilisation et les méthodes et les conditions de récolte) et aux facteurs de transformation après la récolte (le stockage et la conservation). (Salem and Lopez, 2012 ; pavarini *et al.*, 2012). Particulièrement, Ganzera *et al.* (2008) et Albert *et al.* (2009) ont rapporté l’effet de l’altitude sur le contenu de *Arnica Montana* (*Asteraceae*) en flavonoïdes et en acides phénoliques en stipulant que les hautes altitudes favorisent leur biosynthèse et leur accumulation dans les feuilles. Une exposition continue aux radiations solaires ainsi qu’une atmosphère riche en CO<sub>2</sub> ont été rapportés pour stimuler le processus de biosynthèse des flavonoïdes et des tanins, respectivement (Jaakola *et al.*, 2004; Stiling and Cornelissen, 2007).

Il est bien établi que certains métabolites secondaires tels que les tanins condensés et les saponines, en certaines concentrations, affectent négativement la valeur nutritive des fourrages broutés par les ruminants (Hart *et al.*, 2008 ; Kamra *et al.*, 2012 ; Salem *et al.*, 2012). Ils pourraient avoir un effet limitant sur la disponibilité des nutriments pour le microbiote ruminale en raison des complexes qu'ils forment avec les macromolécules, en particulier les protéines et nombreux types de molécules tels que les glucides, les éléments minéraux, les enzymes et les polymères synthétiques diminuant, par ainsi la digestibilité des aliments dans le rumen. En contrepartie, Kumar et Vaithyanathan (1990) rapportent des effets bénéfiques des tanins condensés dans les aliments des ruminants (< 50 g/Kg MS) du fait qu'ils favorisent l'absorption des acides aminés dans l'intestin grêle en les protégeant des effets du suc gastrique. Zimmer and Cordesse (1996) rapportent également que cette même dose de tanins condensés améliore la dégradation quantitative des protéines chez les ovins. De ce fait, *C.segetum*, d'après son contenu modéré en tanins condensés, peut présenter un avantage nutritionnel pour l'animal. Cependant, d'autres chercheurs constatent que la teneur, la qualité et la quantité des composés secondaires ne déterminent pas toujours l'effet souhaité, mais d'autres facteurs comme la réactivité, la structure, le poids moléculaire et l'interaction des différents composés secondaires peuvent intervenir et influencer l'ingestion (Mc Neil *et al.*, 1984 ; Haslem, 1989).

#### **2.4. La valeur relative des substrats (RFV)**

La valeur relative d'un aliment (RFV) est une terminologie généralement utilisée pour déterminer la qualité fourragère d'un aliment destiné à l'alimentation du bétail. Son intérêt est de classer les aliments, en particulier les fourrages, en fonction de la digestibilité et de la consommation de leur matière sèche (DMD et DMC, respectivement). Ce classement est fait par rapport à la valeur nutritive typique du foin de luzerne en pleine de floraison estimée à 100. Il ressort du tableau 20 que les résultats de la valeur alimentaire (RFV) des substrats étudiés sont très disparates ( $P < 0,0001$ ). Tous les substrats étudiés présentent une valeur supérieure à celle du foin de luzerne. *C.pullata* se distingue par la valeur nutritive la plus élevée (242.5), contrairement à *C.segetum* caractérisé par la valeur nutritive la plus faible (109.26). Les feuilles du mûrier, des abricots et des pêches présentent des valeurs similaires à celle enregistrée pour la centaurée (224, 257, et 250, respectivement) (Temel and Pehlivan, 2015). *C.nobile* et *C.segetum* ont des valeurs intermédiaires entre les fourrages et les concentrés (Jeranyama, 2004). Les variations enregistrées entre les espèces sont imputables à

leurs contenus divergents en NDF et ADF. Temel and Pehlivan (2015) rapportent que RFV varie en fonction de l'espèce, du cultivar, des conditions environnementales et de la phase phénologique.

Finalement, des tentatives infructueuses ont été menées pour comparer la composition chimique globale des plantes étudiées à des aliments conventionnels "repères" décrit dans les tables de l'INRA, 2007 (Sauvant *et al.*, 2007), notamment aux fourrages verts et ceux présentés sous forme d'ensilage, vu leur contenu très élevé en eau (75-90% MS), aux foin en raison de leur contenu très élevé en NDF (55-67 % MS), aux pailles du fait de leur teneurs extrêmement élevé en fibres (NDF et ADF > 75% et 50% MS, respectivement). De même, nos substrats renferment des taux équivoques en nutriments comparativement à ceux rapportés pour les concentrés (graines de céréales, tourteaux...etc.) et coproduits. Du point de vue de la composition chimique globale, *C.segetum* et *C.nobile* sont préconisées comme des fourrages grossiers (fourrage de base) dont la teneur en parois totale est rapportée entre 35 et 70% MS avec une prédominance des fibres digestibles, des complémentations en matières azotées et en tampons sont indispensables. Quand à *C.pullata*, sa composition chimique lui confère une opportunité de l'utiliser précocement comme une source d'énergie dans les rations à base de fourrage.

## **Chapitre II : Fermentation *in vitro* des plantes riches en composés phénoliques et de leurs extraits**

### **1. Aspect nutritionnel**

#### **1.1 Fermentation *in vitro* des plantes fourragères et de l'aliment de référence par le microbiote ruminal**

##### **1.1.1. Production de gaz *in vitro***

La technique de production de gaz *in vitro* est une simulation de la dégradation des aliments par les microorganismes dans le rumen. En fait, la méthode de production de gaz utilisée dans notre étude (Theodorou *et al.*, 1994) est une technique fiable et largement utilisée pour la détermination de la valeur nutritive ainsi que les caractéristiques fermentaires des aliments destinés à l'alimentation des ruminants. Au bout de 24h d'incubation, la pression cumulative dans l'espace vide de chaque système batch (flacon en verre de 120 ml) est mesurée en utilisant un transducteur de pression. Les valeurs obtenus sont, par la suite, converties en (mmol) ou en (ml) de gaz dans les conditions standards de température et de pression.

Les résultats de la production de gaz *in vitro* des substrats étudiés ainsi que de l'aliment de référence sont consignés dans le tableau 20. A priori, il faut noter que les résultats obtenus à l'issue de la fermentation *in vitro* de l'extrait de *C.pulata* se sont avérés très peu satisfaisants. En effet, malgré un statut nutritionnel très intéressant de la plante d'origine, son extrait s'est avéré très mal fermenté par le microbiote ruminal pour des raisons qui restent inconnues.

Il en ressort que la production de gaz *in vitro* est statistiquement proche entre tous les substrats après 24h d'incubation ( $p > 0.05$ ). Il s'est avéré également que, au bout de 24h de fermentation, la centaurée est la plus fermentescible en produisant la plus grande quantité de gaz total (118.1 ml/g MO) comparativement au control (116 ml/g MO). Le chrysanthème est, à un certain degré, le moins fermenté par le microbiote ruminal (108.8/g MO). La camomille noble, quand à elle, présente un comportement intermédiaire en produisant 113.1 ml du gaz total par gramme de matière organique. Les résultats obtenus sont proches de ceux d'Arhab *et al.* (2009) ; Bouffenara *et al.* (2012) ; Medjekal *et al.* (2016) pour des espèces fourragères appartenant à la même famille (*Asteraceae*). L'analyse du même tableau révéla que les deux extraits produisent le gaz en quantités plus élevées que leurs plantes d'origines (116 et 113.8 ml/g MO pour *ECN* et *ECS*, respectivement).

La classification des substrats sur la base des résultats de la production de gaz après 24 h d'incubation est la suivante:

***C.pulata* > L'aliment de référence > ECN > ECS > C.nobile > C.segetum.**

En premier lieu, l'augmentation de la production du gaz chez *C.pulata* pourrait être dû à son contenu élevé en sucres fermentescible (NFC), l'effet corrélatif positif et significatif enregistré dans notre étude entre les deux paramètres ( $r = 0.763$ ,  $p < 0.05$ , tableau 21) pourrait justifier le résultat obtenu (Tableau 21). Ce dernier rejoint celui de Ben Salem *et al.* (2002) qui ont attribué les variations de production de gaz entre deux plantes fourragères (le *Cactus* et l'*Acacia*) à la différence entre leurs contenus en hydrates de carbones fermentescibles. De plus, La contribution de la fraction protéique à la production du gaz est relativement faible par rapport aux hydrates de carbone, la même tendance est rapportée pour le contenu lipidique à l'issu duquel la production du gaz est très négligeable, voire inexistante (Al-Soqeer, 2008). Ce rapport est confirmé dans notre étude à travers l'absence des effets corrélatifs significatifs des matières azotées totales et des matières grasses sur la production du gaz *in vitro* ( $p > 0.05$ ). des résultats similaires ont été signalés par de nombreux auteurs (Long *et al.*, 1999; Aregheore, 2000).

La présence des flavonoïdes dans la centaurée (> 50% de la fraction phénolique) peut probablement présenter un effet favorable, même si statistiquement non prouvé, sur la quantité du gaz produite au bout de 24h de fermentation. D'ailleurs, il a été rapporté que la présence de quelques métabolites secondaires dans les aliments broutés par les ruminants exerce un effet positif sur la production de gaz *in vitro* (McSweeney *et al.*, 2001 ; Smith *et al.*, 2005). Ces derniers auteurs ont signalé une dégradation microbienne des flavonoïdes au niveau du rumen par un clivage de leurs anneau C en libérant, par ainsi, des acides phénoliques simples (l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique et l'acide phénylacétique) et d'autres produits non aromatiques qui seront utilisés, par la suite, par le microbiote ruminal comme une source alternative de carbone. Broudiscou *et al.* (2000) ont également signalé que ces molécules améliorent la dégradation de la cellulose et la croissance de plusieurs souches de *Ruminococcus Albus*.

**Tableau 20:** Productions de gaz (mmol/g MO ; ml/g MO) à partir des substrats étudiés et de l'aliment de référence après 24h de fermentation *in vitro*.

Plantes entières	Gaz totale (mmol/g MO)	Gaz totale (ml/g MO)
Control	5.17 <sup>a</sup>	116 <sup>a</sup>
<i>C.pulata</i>	5.27 <sup>a</sup>	118.1 <sup>a</sup>
<i>C.nobile</i>	5.05 <sup>a</sup>	113.1 <sup>a</sup>
<i>C.segetum</i>	4.86 <sup>a</sup>	108.8 <sup>a</sup>
S.E.M	0.065	1.460
<i>P</i>	0.126	0.124
Extraits	Gaz totale (mmol/g MO)	Gaz totale (ml/g MO)
<i>ECN</i>	5.17 <sup>a</sup>	116 <sup>a</sup>
<i>ECS</i>	5.07 <sup>a</sup>	113.8 <sup>a</sup>
S.E.M	0.085	1.309
<i>P</i>	0.770	0.765

*ECN* : extrait de *C.nobile*, *ECS* : extrait de *C.segetum*. *P* : probabilité, S.E.M : Erreur standard des moyennes.

**Tableau 21:** Coefficient de Corrélations (r) entre les composants chimiques, phytochimiques et la production de gaz à partir des substrats étudiés après 24 h de fermentation *in vitro*.

	Gaz totale
<b>MAT</b>	0.002 <sup>ns</sup>
<b>MG</b>	-0.259 <sup>ns</sup>
<b>NDF</b>	-0.275 <sup>ns</sup>
<b>ADF</b>	-0.200 <sup>ns</sup>
<b>ADL</b>	-0.631 <sup>ns</sup>
<b>NFC</b>	<b>0.763<sup>*</sup></b>
<b>C</b>	-0.058 <sup>ns</sup>
<b>PT</b>	<b>-0.652<sup>**</sup></b>
<b>FT</b>	-0.303 <sup>ns</sup>
<b>TC</b>	-0.402 <sup>ns</sup>

**MAT:** Matières azotées totales, **MG :** Matières grasses, **NDF :** Neutral detergent fiber, **ADF :** Acid detergent fiber, **ADL :** Acid detergent lignin, **NFC:** Non fibrous carbohydrates, **C,** Cellulose, **PT :** Phénols totaux, **FT :** Flavonoïdes totaux, **TC :** Tanins condensés, \* : **P < 0,05**, \*\* : **P < 0,01**, ns : non significative (P > 0,05).

Un effet positif des flavonoïdes sur la production de gaz *in vitro* a été également soulevé par Ehssan *et al.* (2013), où la naringine, la rutine et la quercétine ayant augmenté significativement la quantité du gaz produite après 24h d'incubation ( $P < 0.05$ ).

En seconde lieu, la diminution de la production de gaz chez *C.nobile*, *C.segetum* et l'extrait de cette dernière (ECS) est probablement due, soit à son contenu fibreux élevé, soit à son contenu élevé en fraction phénolique et/ou l'interaction entre ces deux facteurs.

En fait, l'influence négative du contenu fibreux des aliments sur la production de gaz au niveau du rumen a été universellement évoquée à travers plusieurs études (Aposi *et al.*, 1998; Larbi *et al.*, 1998 ; Getachew *et al.*, 2000 ; Fructos *et al.*, 2004). Dans notre étude, aucun effet de la fraction fibreuse (NDF, ADF et ADL et la cellulose) n'a été soulevé vis-à-vis le processus de la production du gaz *in vitro*. En contrepartie, la fraction phénolique (PT) exerce un effet antagoniste hautement significatif sur ledit processus ( $r = -0.652$ ,  $p < 0.01$ , tableau 21). Étant donné que la majorité des travaux antérieurs ont décrit l'effet négatif des tanins condensés sur le processus de production de gaz via leur effet sur l'activité microbienne (Hervás *et al.*, 2003 ; Salem *et al.*, 2007 ; Getachew *et al.*, 2008 ) en formant des complexes avec les différentes molécules nutritives (fibres, minéraux et protéines), dans notre étude, les tanins condensés n'enregistrent aucun effet notable sur le processus discuté ( $p > 0.05$ ). Ceci pourrait s'expliquer soit par un effet non significatif de ces substances actives présentes en cette quantité ( $< 50$  g/Kg MS) et une adaptation consécutive du microbiote ruminal, (**aspect quantitatif**), soit par l'existence d'autres métabolites secondaires non rapportés dans notre étude (phénoliques ou non-phénoliques) ayant un effet antagoniste sur la fermentation ruminale (**aspect qualitatif**). La même tendance est notée pour les flavonoïdes. En fait, il a été rapporté par Rahman *et al.* (2013) que lorsque de faibles quantités de substances bioactifs sont consommées dans les aliments, la plupart de ces métabolites peuvent être détruits par les bactéries du rumen. Comme c'est déjà mentionné dans la section précédente, la qualité et la quantité des composés secondaires ne justifient pas, elles seuls les résultats obtenus. D'autres facteurs comme la réactivité, la structure, le poids moléculaire et l'interaction des différents composés secondaires peuvent intervenir et influencer les différents paramètres fermentaires.

En fait, différents modes d'actions des composés phénoliques sur l'écosystème ruminal sont rapportés dans la bibliographie, ils peuvent agir, soit sur les enzymes extracellulaires secrétées par les bactéries du rumen, soit sur la perméabilité membranaire de ces dernières

(Makkar, 2008). Ils ont également la capacité de se lier aux quelques ions (Calcium et soufre) indispensables pour la croissance bactérienne (Makkar, 2008 ; Rochfort *et al.*, 2008).

Malgré la richesse de *C.nobile* et *C.segetum* en fibres pariétaux, les quantités de gaz produites au bout de 24 h à l'issue de leur fermentation ainsi que leur extraits demeurent proches de celles notées pour de *C.pulata* et l'aliment de référence dont le contenu fibreux est assez faible, cela s'expliquait par le fait qu'elles renferment une fraction NDF hautement digestible et pauvre en lignine.

## **2. Étude du profil fermentaire**

### **2.1. Détermination du pH**

Le pH du milieu ruminal est considéré, parmi autres, comme un paramètre crucial pour le bon déroulement des processus fermentaires dans le rumen. Il est à la fois un résultat des fermentations et un facteur déterminant des réactions. Le maintien du pH du milieu dans une plage dite de « normalité » allant de 6 à 7 est fondamental pour la survie et la stabilité des populations microbiennes et pour le bon fonctionnement de leur système métabolique et enzymatique. Les valeurs de pH enregistrées dans les différents batch de fermentation sont représentées dans le tableau 22. Au terme de 24h d'incubation, les variations du pH entre les trois plantes fourragères sont significativement différentes ( $p < 0.05$ ). La fermentation en anaérobose de *C.pulata* induit une baisse du pH à 6.89 avec une différence de 0.2 comparativement au milieu fermentaire du standard (7.08). Cependant, les deux extraits tendent à maintenir le pH dans une mesure statistiquement similaire (7.08 et 7.07 pour l'*ECN* et l'*ECS*, respectivement) à celle enregistrée pour le control.

La chute de pH dans le cas de *C.pulata* peut être reliée à la production accrue d'acide gras volatils dans le milieu comme déjà indiquée par Sauvante *et al.* (2006) ayant rapportés que le pH et la concentration des AGVs sont significativement liés ( $\text{pH} = 6,96 - 0,007 [\text{AGV}]$  ( $n = 807$ ,  $R^2 = 0,28$ ). Malgré la richesse de cette dernière en hydrates de carbone hautement fermentescibles, le pH ruminal n'a pas été négativement affecté, cette situation inattendue peut être attribuée à la capacité tampon du système salivaire utilisé (Juul, 1981) et/ou au pouvoir tampon intrinsèque du substrat lui-même (Sauvante *et al.*, 2006). Dans le même contexte, Reverdin *et al.* (2002) ont rapporté l'effet favorable du contenu en MM et en MAT dans l'augmentation du pouvoir tampon des aliments, conduisant par ainsi à une amélioration de la salivation et par conséquence à une stabilité du pH ruminal.

Étant donné la pression de sélection exercée par le pH ruminal sur les populations microbiennes, toutes les valeurs enregistrées dans cette étude demeurent compatibles au développement de la majorité des communautés ruminales, à savoir : les bactéries fibrolitiques (pH  $\geq$  6) (Jouany, 1994) en favorisant leur attachement au constituants pariétaux, les *Archaea* méthanogènes (6 - 8) (Stewart and Bryant, 1988), les protozoaires (5.4 - 7.8) (Clarke, 1977 ; Dehority, 2005) ainsi que la population fongique (pH  $\geq$  5.5) (Grenet *et al.*, 1989). De même, l'intervalle obtenu dans notre étude est propice pour la production du gaz (6.6 - 7.6) et du méthane (7- 7.2) (Russel and Wallace, 1998 ; Kumar *et al.*, 2009 ).

**Tableau 22:** Mesure du pH, concentrations en azote ammoniacal, estimation de la biomasse microbienne et de l'ATP des substrats étudiés après 24h d'incubation *in vitro*.

Plantes entières	pH	NH3-N (mg/100ml)	PF (mg/ml)	BM (mg)	ATP
Control	7.08 <sup>b</sup>	14.6 <sup>c</sup>	4.89 <sup>c</sup>	244.5 <sup>a</sup>	12.70 <sup>a</sup>
<i>C. pulata</i>	6.98 <sup>a</sup>	14.8 <sup>b</sup>	4.42 <sup>b</sup>	257 <sup>c</sup>	13.55 <sup>a</sup>
<i>C. nobile</i>	7.07 <sup>b</sup>	13 <sup>a</sup>	4.07 <sup>a</sup>	206.5 <sup>a</sup>	12.28 <sup>a</sup>
<i>C. segetum</i>	7.06 <sup>ab</sup>	12.9 <sup>a</sup>	4.48 <sup>b</sup>	226 <sup>ab</sup>	12.27 <sup>a</sup>
S.E.M	0.025	0.232	0.076	5.662	0.201
<i>P</i>	0.013	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.062
Extraits	pH	NH3-N (mg/100ml)	PF (Mg/ml)	BM mg	ATP
ECN	7.08 <sup>a</sup>	12.88 <sup>b</sup>	5.48 <sup>b</sup>	271.64 <sup>b</sup>	12.10 <sup>a</sup>
ECS	7.07 <sup>a</sup>	10.59 <sup>a</sup>	4.93 <sup>a</sup>	251.87 <sup>ab</sup>	12.35 <sup>a</sup>
S.E.M	0.007	0.427	0.101	4.670	0.164
<i>P</i>	0.795	< 0.0001	0.002	0.015	0.348
<p><b>NH3-N</b> : azote ammoniacal, <b>PF</b> (Facteur de partition)= quantité du substrat dégradé (mg) /volume du gaz produit(ml, 24h) (Blümmel <i>et al.</i>, 1997); <b>BM (Biomasse microbienne)</b>= Quantité du substrat dégradé – (volume du gaz produit * 2.25) (Blümmel <i>et al.</i>, 1997); <b>ATP</b> = A*2 + P*3 + B*3 + 1*CH<sub>4</sub> ; <b>A</b> : production d'acétate , <b>P</b> : production de propionate , <b>B</b> : production de butyrate (Getachew <i>et al.</i>,1998)</p> <p><b>S.E.M</b> : Erreur standard des moyennes. <b>P</b> : Probabilité.</p> <p><sup>a,b,c</sup> : Moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes (P &lt; 0,05).</p>					

## 2.2. Production d'azote ammoniacal (N-NH<sub>3</sub>)

L'ammoniac (NH<sub>3</sub>) est un élément précurseur essentiel pour la croissance de la plupart des espèces bactériennes du rumen qui le prélèvent et l'utilisent pour la synthèse de leurs propres acides aminés constitutifs (la protéosynthèse microbienne), en particulier les bactéries cellulolytiques et amylolytiques. De ce fait, sa concentration dans le suc digestif est un facteur limitant de la croissance de tels microorganismes. Une déficience en telle concentration engendre une réduction dans la biomasse microbienne et par ainsi une réduction de la digestibilité de l'aliment. La concentration de l'azote ammoniacal (N-NH<sub>3</sub>) mesurée après 24h de fermentation (Tableau 22) est statistiquement distincte entre les substrats testés (P <0,0001). Une légère augmentation dans la production de l'azote ammoniacal est notée dans le cas de l'incubation de *C.pulata* (14.48 mg/100 ml) comparativement au standard (14.46 mg/ 100ml), néanmoins, la dégradation, que ce soit de *C.segetum* ou de *C.nobile* induit une diminution de telles concentrations après 24 h (11.6 et 10.9%, respectivement) comparativement à celle notée pour l'aliment de référence.

Étant donné que la protéosynthèse microbienne est positivement liée, d'un côté, aux apports en protéines dégradables dans la ration et, d'autre coté, à la quantité d'énergie (sous forme d'APT) produite par la fermentation des glucides (Wallace and Cotta 1988 ; Soliva *et al.*, 2008), notre résultat est tout à fait logique et prévisible du fait que *C.pulata* présente des teneurs plus élevées en matière azotée totale (MAT) et en carbohydrates hautement fermentescibles (NFC) comparativement aux autres substrats. Ceci favorise la protéolyse ruminale et la libération de l'azote ammoniacal dans le rumen et par conséquent, augmenter l'efficacité de la protéosynthèse microbienne. Cette situation est traduite, dans notre cas, par l'augmentation du taux de la biomasse microbienne (BM), tout en admettant que le rapport P/E (Protéines/Énergie) est équilibré et synchronisé.

La réduction de la production de l'azote ammoniacal issue de l'incubation de *C.segetum* et *C.nobile* (10.9 et 11.6 %, respectivement) accompagnée par la diminution du taux de la biomasse microbienne (BM) pourrait probablement être attribué soit à l'aspect quantitatif et qualitatif (solubilité et structure) de la source protéique dans les deux plantes (Jouany *et al.*, 1995), soit à l'effet inhibiteur sélectif des métabolites secondaires contenu dans les deux substrats vis-à-vis quelques microorganismes protéolytiques et désaminatrice du rumen (Min *et al.*, 2003 ; Hutton *et al.*, 2012), particulièrement, les bactéries dites hyper-ammonia productrices, telles que : *Clostridium sticklandii*, *Peptostreptococcus anaerobius* et les

champignons anaérobies (McIntosh *et al.*, 2003). Un déséquilibre dans la faune ruminale (protozoaires) pourrait ainsi justifier la diminution du taux de l' $\text{N-NH}_3$  produit au fait que leur activité désaminatrice est trois fois supérieure à celle des bactéries (Jouany *et al.*, 1995 ; Eugène, 2004).

En contraste, la diminution plus prononcée de la production de l' $\text{N-NH}_3$  dans le cas de la fermentation des extraits de *C.nobile* (ECN) et de *C.segetum* (ECS) (16.4% et 27.5% pour ECN et ECS, respectivement) est accompagnée d'une augmentation, bien qu'elle ne soit significative, du taux de la biomasse microbienne (11 % et 3%, respectivement) comparativement au standard. En fait, l'augmentation du taux de la biomasse microbienne au moment où l' $\text{N-NH}_3$  se diminue pourrait être attribué à l'inhibition de la population des protozoaires induisant, consécutivement la prolifération intense des bactéries Gram-négative productrices du propionate, telles que *Selenomonas ruminantium*. De plus, tel déséquilibre dans la faune ruminale diminue le processus de la lyse bactérienne ce qui engendre une augmentation de la biomasse microbienne totale (Williams and Coleman, 1991). L'éventuel effet de la faune ruminale (protozoaires) sur la production de l' $\text{N-NH}_3$  est discuté dans les sections suivantes.

Afin de mieux cibler la cause la plus persuasive parmi toutes ces spéculations, les paramètres relatifs à la production de l' $\text{N-NH}_3$  au niveau du rumen (MAT, NFC, ATP, BM et PF) ont été définis. Dans le même sens, un test de corrélation a été établi (tableau 24). Il ressort clairement que le taux de la matière azotée totale (MAT), de l'ATP et celui des sucres hautement fermentescibles (NFC) agissent positivement et significativement sur la production de l' $\text{N-NH}_3$  après 24h d'incubation ( $r = 0.612$ ,  $p < 0.05$ ;  $r = 0.606$ ,  $p < 0.01$ ;  $r = 0.773$ ,  $p < 0.05$ , respectivement) suivis par l'influence négative des phénols totaux ( $r = -0.567$ ,  $p < 0.05$ ). Le taux de la biomasse microbienne (BM) a été également influencé positivement et significativement par le taux de l' $\text{N-NH}_3$  produit au bout de 24h ( $r = 0.741$ ,  $p < 0.01$ ), ce résultat confirme celui rapporté par Blümmel *et al.* (1997) et Nagadi *et al.* (2000) stipulant que la dégradation de la masse protéique alimentaire conduit essentiellement à la production d'ammoniac et de la biomasse bactérienne. En contrepartie, le facteur de partition (PF) reflétant l'efficacité de la biosynthèse des protéines microbiennes par les microorganismes à partir du substrat ingéré, ne présente aucune influence significative sur la production d'ammoniac après 24h d'incubation ( $p > 0.05$ ).

De ce qui précède, on pourrait donc émettre l'hypothèse que la réduction de la production de l'azote ammoniacal dans le cas de l'incubation de *C.segetum*, *C.nobile* et leurs extraits respectifs pourrait être justifiée, soit par leur taux limitant en MAT et en NFC et par conséquent en ATP, soit par l'effet inhibiteur des phénols totaux qui s'y trouvent sur l'une des communautés microbiennes responsables, de loin ou de prêt, de la production de l'ammoniac dans le rumen. L'interaction entre ces deux facteurs est ainsi probable. Dans ce contexte, Bergen, 1977 a décrit l'effet de quelques acides phénoliques sur les enzymes protéolytiques (protéase et uréase) responsables de la production d'ammoniac dans le rumen.

En fait, l'effet négatif de quelques métabolites secondaires, en particulier les tanins, sur la protéolyse ruminale, a été largement évoqué dans la littérature *in vitro* (Min *et al.*, 2002 ; Mueller-Harvey, 2006; Durmic *et al.*, 2010 ; Goel and Makkar , 2012 ; Soltan *et al.*, 2012) et *in vivo* (Puchala *et al.*, 2005, Beauchemin *et al.*, 2007, Animut *et al.*, 2008) via leur capacité à se lier avec les protéines ruminales (enzymes, protéines microbiennes...etc.) en provoquant, par ainsi leur inactivation. Cependant, dans notre étude, les tanins n'enregistrent aucun effet prononcé sur la production d'ammoniac, la même tendance est enregistrée pour les flavonoïdes, ce qui pourrait s'expliquer comme déjà mentionné, par l'aspect quantitatif et/ ou qualitatif des substances bioactives présent dans la matrice végétale des plantes étudiées et l'adaptation du microbiote ruminale vis-à-vis ces conditions. En fait, il a été rapporté par Makkar (2009) que l'une des mécanismes adaptatifs des ruminants à l'encontre de la présence des tanins hydrolysables dans la ration est leur possession des protéines salivaires riches en proline. Ces protéines, appelées également mucines, constituent la première ligne de défense contre les tanins diététiques. Elles ont une très grande affinité pour les tanins auxquels elles se combinent pour prévenir la précipitation des protéines alimentaires. Le même auteur rapporte que certains microorganismes du rumen développent un mécanisme adaptatif par la protection de leur protéine membranaire par une stratégie de déploiement des lipides ou par la sécrétion d'exopolysaccharides. Ces molécules ont une grande affinité d'association avec les tanins et, par conséquent, inactivent leur effet inhibiteur sur la microflore ruminale.

D'une manière générale, il faut noter que les concentrations en N-NH<sub>3</sub> enregistrées dans cette étude demeurent supérieures à la valeur préconisée par Boniface *et al.* (1986) pour assurer une activité métabolique optimum du microbiote ruminal, estimée à 5 mg/100ml. Les valeurs du PF enregistrées dans cette étude sont relativement en accord avec l'intervalle établi par Blümmel *et al.* (1997) qui s'étend entre 2,75 et 4,41 mg/ml.

### 2.3. Production des acides gras volatiles (AGV)

La dégradation microbienne (hydrolyse et fermentation) des carbohydrates alimentaires (fibreux et non fibreux) en anaérobiose aboutit à la formation des acides gras volatiles (AGV), des gaz (CO<sub>2</sub> et CH<sub>4</sub>), de la chaleur et de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (APT) utilisé par les micro-organismes pour répondre à leurs propres besoins (Cuvelier *et al.*, 2005 ; Carjot, 2013). Les AGV sont en partie absorbés par l'épithélium ruminal en fournissant plus de 70% de l'approvisionnement énergétique pour l'animal (Rahman *et al.*, 2013). Dans cette étude, les concentrations des AGV totaux (mmol/g MO) et des AGV individuels sont présentés dans le tableau 23. Il est à noter que la fermentation *in vitro* des différents substrats conduit également à la formation d'acides isobutyrique, isovalérique, valérique et caproïque mais en concentrations négligeables.

**Tableau 23:** Concentrations des acides gras volatils totaux (mmoles/g MO), proportions molaires des AGV individuels et ratio molaire des substrats étudiés après 24h d'incubation *in vitro*.

Plantes entières	AGV†	Acétate (C2)	Propionate (C3)	Butyrate (C4)	C2 :C3
Control	5.04 <sup>ab</sup>	3.09 <sup>b</sup>	1.01 <sup>a</sup>	0.53 <sup>ab</sup>	3.05 <sup>b</sup>
<i>C. pulata</i>	5.15 <sup>b</sup>	3.34 <sup>c</sup>	1.04 <sup>a</sup>	0.61 <sup>a</sup>	3.20 <sup>b</sup>
<i>C. nobile</i>	4.85 <sup>ab</sup>	2.51 <sup>a</sup>	1.33 <sup>b</sup>	0.61 <sup>a</sup>	2.04 <sup>a</sup>
<i>C. segetum</i>	4.76 <sup>a</sup>	2.59 <sup>a</sup>	1.27 <sup>b</sup>	0.64 <sup>a</sup>	1.91 <sup>a</sup>
S.E.M	0.051	0.105	0.037	0.016	0.139
P	0.019	0.005	< 0.0001	0.141	< 0.0001
Extraits	AGV†	Acétate (C2)	Propionate (C3)	Butyrate (C4)	C2 :C3
ECN	4.91 <sup>a</sup>	2.68 <sup>a</sup>	1.27 <sup>b</sup>	0.68 <sup>a</sup>	2.10 <sup>a</sup>
ECS	4.85 <sup>a</sup>	2.62 <sup>a</sup>	1.32 <sup>b</sup>	0.65 <sup>a</sup>	2.06 <sup>a</sup>
S.E.M	0.048	0.072	0.048	0.026	0.136
P	0.284	0.006	0.012	0.050	< 0.0001

AGV† : Acides gras volatiles totaux ; S.E.M : Erreur standard des moyennes. P : Probabilité.  
<sup>a,b,c</sup> : Moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes (P < 0,05).

Il en ressort qu'au bout de 24h d'incubation, la production des AGVt à partir des plantes fourragères est significativement différente de celle enregistrée pour l'aliment de référence ( $p < 0.05$ ). La production la plus élevée est observée chez la centaurée (5.15 mmoles/g MO) et la plus basse est notée chez le chrysanthème (4.76 mmoles/g). L'inclusion des deux extraits aux batch de fermentation du standard (2.5% MS) n'a aucun effet tangible sur la production des AGV comparativement au control (4.85 et 4.91 mmoles g/MS pour ECS et ECN, respectivement).

La légère augmentation de la production des AGVt chez *C.pulata* (2.2%) comparativement à celle notée pour le standard suggère une intensification de l'activité fermentaire de la plante par le microbiote ruminal probablement en raison de sa richesse en sucres énergétiques et en protéines (Getachew *et al.*, 2000). Cette suggestion est confirmée à travers les fortes corrélations (tableau 24) observées entre les AGVt et le taux des sucres fermentescibles (NFC) d'un côté, et entre les AGVt et le taux de la matière azotée totale d'autre coté, soient  $r = 0.856$  ;  $p < 0.01$  ;  $r = 0.648$  ;  $p < 0.05$ , respectivement.

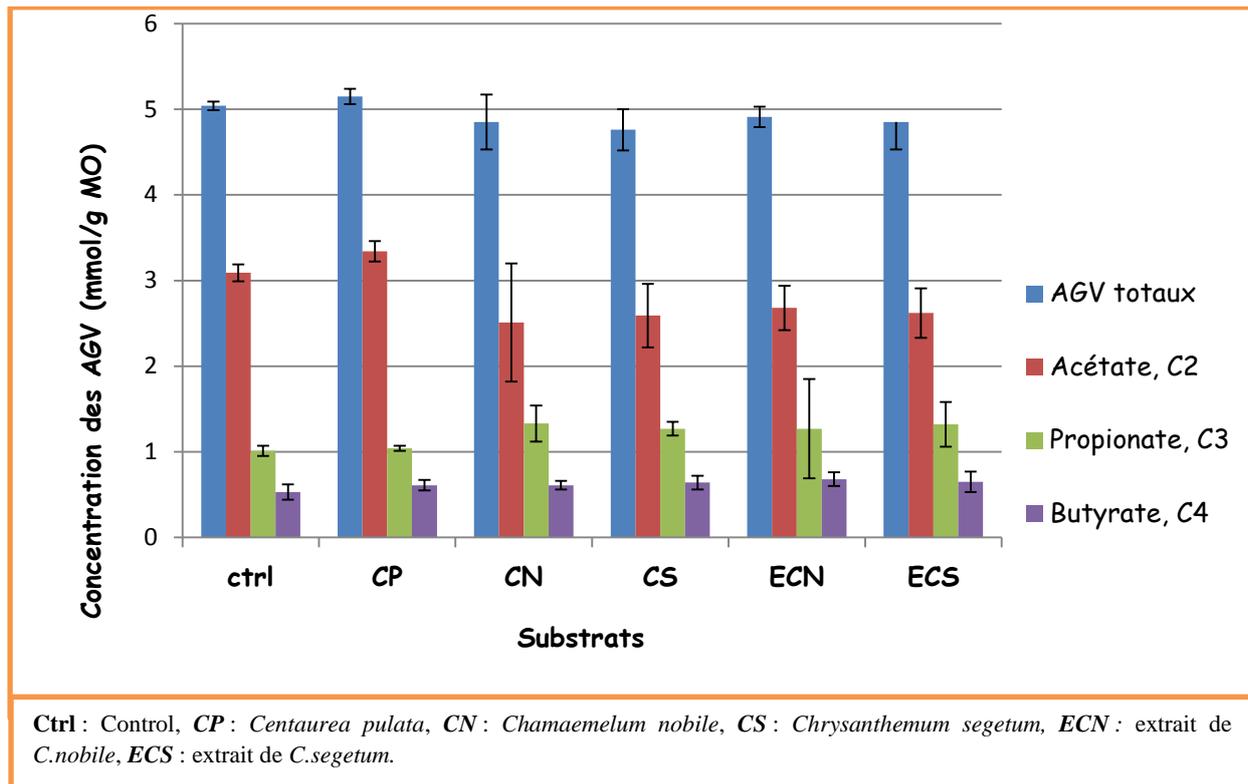
La contribution de la matière azotée totale à la production des acides gras volatils a constaté une vague controverses dans la littérature. Néanmoins, Wattiaux and Armentano (2011) ont notifié que la fermentation de certains acides aminés produit des acides appelés "**iso-acides**" ou "**acides gras branchés**" étant utilisés, parallèlement avec l'ATP, par les bactéries au profil de leur croissance et prolifération. L'intensification de l'activité fermentaire du microbiote ruminal a été également justifiée, dans ce cas-là, par l'augmentation significative du taux de la biomasse microbienne (BM) et l'effet corrélatif fortement significatif entre ce dernier et les AGVt ( $r = 0.801$  ;  $p < 0.01$ ). La corrélation insignifiante entre les AGV et le pH peut être attribuée à l'absence du processus d'ingestion et de mastication dans les systèmes *in vitro*.

La diminution de la production des AGVt dans le cas de la fermentation de *C.nobile et de C.segetum* pourrait être due à leur composition chimique, notamment leur contenu relativement faible en énergie et en sucres digestibles, ainsi qu'à la présence des substances antinutritionnels et/ou leur éventuelle interaction. La même tendance est enregistrée pour les deux extraits. De ce fait, des corrélations négatives et significatives entre la production des AGV et le contenu en fibres pariétaux sont enregistrées, soient  $r = -0.715$ ,  $p < 0.05$  ;  $r = -0.875$ ,  $p < 0.01$  ;  $r = -0.864$ ,  $p < 0.01$ , pour l'NDF, ADF et cellulose, respectivement).

**Tableau 24** : Coefficients de Corrélations entre les composants chimiques, phytochimiques et les paramètres fermentaires des substrats étudiés.

	N-NH3	AGVt	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	Ap	BM	ATP	PH	PF	MAT	NDF	ADF	ADL	NFC	Cellu	PT	FT	TC	
<b>N-NH3</b>	<b>1</b>																			
<b>AGVt</b>	<b>0.476*</b>	<b>1</b>																		
<b>C2</b>	<b>0.717**</b>	0.230 <sup>ns</sup>	<b>1</b>																	
<b>C3</b>	<b>-0.513*</b>	-0.223 <sup>ns</sup>	<b>-0,506*</b>	<b>1</b>																
<b>C4</b>	-0.371 <sup>ns</sup>	-0.115 <sup>ns</sup>	-0,369 <sup>ns</sup>	0,177 <sup>ns</sup>	<b>1</b>															
<b>AP</b>	<b>0.701**</b>	0.338 <sup>ns</sup>	<b>0,883**</b>	<b>-0,874**</b>	-0,194 <sup>ns</sup>	<b>1</b>														
<b>BM</b>	<b>0.741**</b>	<b>0.801**</b>	<b>0.555*</b>	<b>-0.538*</b>	0.027 <sup>ns</sup>	<b>0,676**</b>	<b>1</b>													
<b>ATP</b>	<b>0.606**</b>	0.309 <sup>ns</sup>	<b>0.870**</b>	-0,104 <sup>ns</sup>	-0,138 <sup>ns</sup>	<b>0,660**</b>	<b>-0.544*</b>	<b>1</b>												
<b>PH</b>	0.251 <sup>ns</sup>	0.145 <sup>ns</sup>	<b>-0.413*</b>	<b>0,444*</b>	0.088 <sup>ns</sup>	<b>-0.460*</b>	-0,245 <sup>ns</sup>	-0,218 <sup>ns</sup>	<b>1</b>											
<b>PF</b>	0.461 <sup>ns</sup>	<b>0.559*</b>	0.255 <sup>ns</sup>	-0,410 <sup>ns</sup>	-0,139 <sup>ns</sup>	0.329 <sup>ns</sup>	<b>0.573*</b>	0.231 <sup>ns</sup>	0.112 <sup>ns</sup>	<b>1</b>										
<b>MAT</b>	<b>0.612*</b>	<b>0.648*</b>	0.118 <sup>ns</sup>	-0,194 <sup>ns</sup>	-0,011 <sup>ns</sup>	0,270 <sup>ns</sup>	<b>0,728*</b>	0,191 <sup>ns</sup>	0,086 <sup>ns</sup>	0,570 <sup>ns</sup>	<b>1</b>									
<b>NDF</b>	-0,648 <sup>ns</sup>	<b>-0,715*</b>	-0,203 <sup>ns</sup>	0,219 <sup>ns</sup>	0,278 <sup>ns</sup>	-0,396 <sup>ns</sup>	-0,662 <sup>ns</sup>	-0,187 <sup>ns</sup>	0,437 <sup>ns</sup>	-0,083 <sup>ns</sup>	-0,706 <sup>ns</sup>	<b>1</b>								
<b>ADF</b>	-0,677 <sup>ns</sup>	<b>-0,875**</b>	-0,159 <sup>ns</sup>	0,280 <sup>ns</sup>	0,138 <sup>ns</sup>	-0,365 <sup>ns</sup>	<b>-0,760*</b>	-0,180 <sup>ns</sup>	0,325 <sup>ns</sup>	-0,356 <sup>ns</sup>	<b>-0,908**</b>	<b>0,934**</b>	<b>1</b>							
<b>ADL</b>	-0,426 <sup>ns</sup>	-0,161 <sup>ns</sup>	-0,366 <sup>ns</sup>	0,395 <sup>ns</sup>	0,230 <sup>ns</sup>	-0,533 <sup>ns</sup>	-0,258 <sup>ns</sup>	-0,220 <sup>ns</sup>	0,478 <sup>ns</sup>	0,185 <sup>ns</sup>	0,150 <sup>ns</sup>	0,501 <sup>ns</sup>	0,241 <sup>ns</sup>	<b>1</b>						
<b>NFC</b>	<b>0,773*</b>	<b>0,856**</b>	0,319 <sup>ns</sup>	-0,660 <sup>ns</sup>	-0,098 <sup>ns</sup>	0,677 <sup>ns</sup>	<b>0,715*</b>	0,214 <sup>ns</sup>	-0,340 <sup>ns</sup>	0,329 <sup>ns</sup>	0,468 <sup>ns</sup>	<b>-0,789*</b>	<b>-0,720*</b>	<b>-0,761*</b>	<b>1</b>					
<b>C</b>	-0,596 <sup>ns</sup>	<b>-0,864**</b>	-0,077 <sup>ns</sup>	0,198 <sup>ns</sup>	0,079 <sup>ns</sup>	-0,272 <sup>ns</sup>	<b>-0,722*</b>	-0,134 <sup>ns</sup>	0,215 <sup>ns</sup>	-0,415 <sup>ns</sup>	<b>-0,973**</b>	<b>0,839**</b>	<b>0,972**</b>	0,006 <sup>ns</sup>	-0,560 <sup>ns</sup>	<b>1</b>				
<b>PT</b>	<b>-0,567*</b>	<b>-0,864**</b>	<b>-0,438*</b>	-0,413 <sup>ns</sup>	0,139 <sup>ns</sup>	<b>-0,565*</b>	<b>-0,518*</b>	-0,408 <sup>ns</sup>	0,366 <sup>ns</sup>	0,144 <sup>ns</sup>	0,109 <sup>ns</sup>	0,500 <sup>ns</sup>	0,256 <sup>ns</sup>	<b>0,994**</b>	<b>-0,836*</b>	0,026 <sup>ns</sup>	<b>1</b>			
<b>FT</b>	-0,353 <sup>ns</sup>	-0,302 <sup>ns</sup>	-0,350 <sup>ns</sup>	0,107 <sup>ns</sup>	0,099 <sup>ns</sup>	-0,338 <sup>ns</sup>	-0,218 <sup>ns</sup>	-0,404 <sup>ns</sup>	0,070 <sup>ns</sup>	0,323 <sup>ns</sup>	0,358 <sup>ns</sup>	0,170 <sup>ns</sup>	-0,072 <sup>ns</sup>	<b>0,848*</b>	-0,537 <sup>ns</sup>	-0,276 <sup>ns</sup>	<b>0,869**</b>	<b>1</b>		
<b>TC</b>	-0,370 <sup>ns</sup>	-0,399 <sup>ns</sup>	-0,268 <sup>ns</sup>	0,213 <sup>ns</sup>	0,169 <sup>ns</sup>	-0,342 <sup>ns</sup>	-0,244 <sup>ns</sup>	-0,268 <sup>ns</sup>	0,194 <sup>ns</sup>	0,386 <sup>ns</sup>	0,417 <sup>ns</sup>	0,200 <sup>ns</sup>	-0,062 <sup>ns</sup>	<b>0,951**</b>	-0,619 <sup>ns</sup>	-0,290 <sup>ns</sup>	<b>0,946**</b>	<b>0,918**</b>	<b>1</b>	

AGVt : Acides gras volatils totaux, C<sub>2</sub> : Acétate, C<sub>3</sub> : Propionate, C<sub>4</sub> : Butyrate. MAT: Matières azotées totales, PF : Facteur de partition, NDF : Neutral detergent fiber, ADF : Acid detergent fiber, ADL : Acid detergent lignin, NFC: Non fibrous carbohydrates, C, Cellulose, BM : Biomasse Microbienne, PT : Phénols totaux, FT : Flavonoïdes totaux, TC : Tanins condensés, \* : P < 0,05, \*\* : P < 0,01, ns : non significative (P > 0,05).



**Figure 32** : Production des AGV totaux et individuels à partir des substrats étudiés après 24 h de fermentation *in vitro*.

L'effet négatif des constituants des parois végétales sur le profil fermentaire en acides gras volatiles est tout à fait prévisible et corrobore avec les travaux de Bannink *et al.* (2006).

Similairement aux travaux de Jayanegara *et al.* (2011), les phénols totaux possèdent des effets corrélatifs négatifs et fortement significatifs sur la production d'AGV totaux ( $r = -0,864$ ,  $p < 0.01$ ). Contrairement aux travaux de Garcia-Gonzalez *et al.* (2008) et Santoso *et al.* (2013), dans notre étude, les tanins condensés ne jouent aucun effet corrélatif significatif sur le processus de production des AGVt, la même tendance est enregistrée pour les flavonoïdes. Ceci peut être attribué une autre fois, à l'aspect qualitatif et quantitatif de substances antinutritionnel présentes dans la matrice végétale des plantes étudiées.

En matière de l'aspect qualitatif, il ressort du tableau 23 que les proportions d'acétate produites à partir des différents substrats sont significativement différentes de celle du standard ( $p < 0.05$ ). Elles sont comprises entre 2.51 et 3.34 mmol/g MO, la concentration la plus élevée est enregistrée pour le *C.pulata*, tandis que la plus faible est notée pour *C.nobile*.

La tendance inverse est constatée pour les concentrations de propionate, elles sont plus élevées chez *C.nobile* (1.33 mmoles/g MO) et plus faible chez *C.pulata* (1.04 mmoles/g MO). *C.segetum* et le control le produisent en concentrations intermediares (1.01 et 1.27 mmol/MO, respectivement). Les mixtures des extraits avec l'aliment de référence, quant à eux, se comportent de la même façon que leurs plantes d'origines en provoquant une augmentation significative du propionate (25 et 30% pour *ECN* et *ECS*, respectivement) et une diminution significative des proportions molaires de l'acétate (13.3 et 15.2% pour *ECN* et *ECS*, respectivement) comparativement au standard.

Bien qu'il y ait une légère augmentation du taux de butyrate issus de la fermentation des différents substrats comparativement au contrôle, les proportions molaires enregistrées demeurent proches et comparables ( $p > 0.05$ ). Les ratios acétate/propionate varient entre 1.91 et 3.20. La forte concentration de l'acétate produite chez *C.pulata* mène consécutivement à un rapport  $C_2/C_3$  significativement plus élevé comparativement au standard ( $p < 0.0001$ ). La même tendance est enregistrée pour les deux extraits dont le ratio est statistiquement différent de celui de l'aliment de référence (2.10 et 2.06 pour *ECN* et *ECS*, respectivement). Dans le même contexte, Sauvant *et al.* (2011) stipulent qu'un ratio  $C_2/C_3$  égal ou supérieur à 2.5 reflète une activité fermentaire optimale au niveau du rumen.

Il est généralement admis que le type d'hydrates de carbone dans la ration influence la quantité des différents AGV produits dans le rumen. Alors que les hydrates de carbone fibreux favorisent la production de  $C_2$ , les hydrates de carbone facilement fermentescibles tel que l'amidon favorisent la production de  $C_3$  et de  $C_4$  (Jaroslav and Dvořák, 2009), ce qui est en contradiction avec les résultats obtenus dans cet essai. En fait, l'absence des effets corrélatifs significatifs entre la production des AGV majeurs et les différents composants chimiques (tableau 24) pourrait justifier, en partie l'absence de l'effet de la composition chimique sur la production d'acétate, de propionate et de butyrate en supposant, par ailleurs, l'existence d'autres facteurs influençant les orientations fermentaires observées.

Il ressort du tableau 24 que la fraction phénolique exerce une influence significative négative sur la production d'acétate et par conséquent sur le rapport A/P ( $r = -0.438$ ,  $p < 0.05$ ;  $r = -0.565$ ,  $p < 0.05$ , respectivement). Cette évidence suggère que le détournement des voies de fermentations peut être attribuée à la présence de telles substances antinutritionnelles.

comme déjà indiqué en ci-dessus. Cette tendance a été déjà signalée par Jayanegara *et al.* (2011) où la fraction phénolique est rapportée négativement et significativement effective sur le processus de production d'acétate et de propionate ( $r = -0.50, p < 0.001$  ;  $r = -0.39, p < 0.05$ , respectivement).

L'analyse du tableau 23 révèle également que la légère augmentation de la concentration des AGV totaux observée chez *C.pulata* est concomitante avec une augmentation de la proportion d'acétate (8.1%) et de propionate (3.0%) et des proportions de butyrate (15%). Étant donné que la formation d'acétate et de butyrate s'accompagne d'une libération d'hydrogène, la production de méthane suivie par la production du propionate sont reconnues parmi les voies les plus promotrices pour la consommation d'hydrogène dans le rumen (Janssen, 2010). Bien que le propionate et le méthane rivalisent pour l'hydrogène dans le rumen, et l'augmentation des concentrations de méthane est souvent associée à une diminution du taux de propionate (Moss *et al.*, 2000; Patra *et al.*, 2006) et vice versa, leur augmentation concomitante au bout de 24h dans le cas de la fermentation *in vitro* de *C.pulata* en présence d'un microbiote ruminal mixte suggère qu'il y avait une saturation apparente de la méthanogénèse suite à l'accumulation de l' $H_2$  dans le milieu, ce qui mène à l'utilisation de l' $H_2$  épargné pour produire plus de propionate (tableau 25). Un tel plafonnement de la production de  $CH_4$  a été montré *in vitro* par Navarro-Villa *et al.* (2011) et *in vivo* par Sauvart *et al.* (2011). L'effet fortement corrélatif entre la production du méthane et celle d'acétate d'un côté, et entre le méthane et celle de propionate d'autre côté ( $r = 0.575, p < 0.01$  ;  $r = -0.601, p < 0.01$ , respectivement) (tableau 26) pourrait, à un certain degré, renforcer cette suggestion. L'acétogénèse réductrice est une autre voie consommatrice d'hydrogène, elle est engendrée par le développement des bactéries acétogènes au détriment des méthanogènes pour réduire le  $CO_2$  en formant de l'acétate, mais cette théorie n'a pas été encore prouvée au niveau du rumen, mais plutôt au niveau du gros intestin des ruminants (Morgavi *et al.*, 2010).

La fermentation de *C.nobile*, *C.segetum* a induit une diminution des proportions d'acétate ( $p < 0.05$ ) et une augmentation des concentrations de propionate ( $p < 0.05$ ) et de butyrate ( $p > 0.5$ ) comparativement au control. Le même constat est soulevé pour les deux extraits. En fait, la baisse de la production de l'acétate diminuait la libération de l'hydrogène dans le système de fermentation, en contrepartie, la production plus élevée de propionate, en tant que puits de l' $H_2$ , diminue la disponibilité de l'hydrogène pour la production de  $CH_4$  (Janssen, 2010).

Cette situation est confirmée par la baisse des taux du méthane à l'issue de la fermentation *in vitro* de *C.nobile*, *C.segetum* ainsi que leurs extraits respectifs. De plus, la fermentation de différents substrats (plantes et extraits) induit une diminution significative du ratio A/P ( $p < 0,05$ ) comparativement à l'aliment de référence, Sauvant *et al.* (2011) estiment que les rations ayant un rapport A/P élevée sont les plus méthanogènes.

### **3. Aspect environnemental**

#### **3.1. Effet antiméthanogénique des substrats étudiés**

La fermentation des hydrates de carbone produit, parmi autres, de l'hydrogène notamment par la glycolyse (Glucose  $\rightarrow$  2 pyruvate + **4H**) et ainsi par la formation d'acétate (Pyruvate +  $H_2O \rightarrow$  acetate (C2) +  $CO_2$  + **2H**) (Janssen, 2010). Une augmentation de la pression partielle de l' $H_2$  par l'accumulation du  $NADH_2$  en raison d'une réduction de l'activité de la NADH déshydrogénase, peut potentiellement inhiber le fonctionnement normal du rumen (Wolin *et al.*, 1997).

Le méthane est l'un des plus grands puits d'élimination de l' $H_2$  ( $CO_2$  + **8H<sub>2</sub>**  $\rightarrow$  methane ( $CH_4$ ) +  $2H_2O$ ). La formation de propionate (Pyruvate + **4H<sub>2</sub>**  $\rightarrow$  propionate +  $H_2O$ ) permet aussi d'éliminer de l'hydrogène libre du contenu ruminal, mais de façon moins efficace que celle de la méthanogénèse (utilisation de 4 molécules d'hydrogène par molécule de propionate versus 8 molécules d'hydrogène utilisées par molécule de méthane). L'hydrogène étant un substrat limitant dans la voie métabolique de la méthanogénèse, deux modes d'action majeurs ont été discutés dans la littérature pour réduire son concentration : soit **réduire sa production nette** ou la **réorienter** vers d'autres **voies métaboliques** potentiellement bénéfiques pour l'animal.

La production d'hydrogène peut être réduite suite à une suppression partielle ou totale de la population de protozoaires (défaunation) dans le rumen du fait que les protozoaires sont de forts producteurs d'hydrogène. En ce qui concerne le deuxième aspect, l'augmentation de la part du propionate dans le profil des AGV est d'une grande importance, du fait que la production du propionate limite la disponibilité de l'hydrogène pour la production du méthane. De plus, le propionate est considéré comme le précurseur majeur pour la glycogénèse animale (Leng *et al.*, 1967). L'utilisation de l'hydrogène dans d'autres voies biochimique comme l'acétogénèse, les voies réductrices des sulfates et des nitrates, la synthèse microbienne (10%), la biohydrogénation des acides gras (1-2%) ont été décrit dans

la littérature comme d'autres puits potentiels de l'H<sub>2</sub> moléculaire (Morgavi *et al.*, 2010). Dans notre étude, les volumes de méthanes produits au bout de 24h de fermentation, le bilan de récupération de l'hydrogène, l'effet antiméthanogéniques (R) et le pourcentage d'augmentation ou de diminution de la méthanogénèse (R') des substrats étudiés sont illustrés dans le tableau 25.

**Tableau 25:** Production de méthane et estimation de l'effet antiméthanogène des substrats étudiés après 24h d'incubation *in vitro*.

Plantes entières	CH <sub>4</sub> (mmol/g MO)	GT mesuré (mmol/g MO)	CH <sub>4</sub> /GT	CH <sub>4</sub> /AGVt	BH (%)	R	R'
Control	1.85 <sup>c</sup>	5.17 <sup>a</sup>	0.358 <sup>b</sup>	0.365 <sup>b</sup>	112.3 <sup>a</sup>	-	-
<i>C. pulata</i>	1.87 <sup>bc</sup>	5.27 <sup>a</sup>	0.355 <sup>b</sup>	0.365 <sup>b</sup>	106.2 <sup>a</sup>	1.01	1.74
<i>C. nobile</i>	1.38 <sup>a</sup>	5.05 <sup>a</sup>	0.276 <sup>a</sup>	0.285 <sup>a</sup>	108.7 <sup>a</sup>	0.75	-24.3
<i>C. segetum</i>	1.34 <sup>a</sup>	4.86 <sup>a</sup>	0.276 <sup>a</sup>	0.282 <sup>a</sup>	102.5 <sup>a</sup>	0.73	-27.1
S.E.M	0.0565	0.0651	0.0988	0.0093	2.099	-	-
P	<0,0001	0.126	<0,0001	<0,0001	0.438	-	-
Extraits	CH <sub>4</sub> (mmol/g MO)	GT mesuré (mmol/g MO)	CH <sub>4</sub> /GT	CH <sub>4</sub> /AGVt	BH (%)	R	R'
<i>ECN</i>	1.12 <sup>ab</sup>	5.17 <sup>a</sup>	0.218 <sup>b</sup>	0.230 <sup>b</sup>	89.98 <sup>b</sup>	0.61	-39.10
<i>ECS</i>	0.92 <sup>a</sup>	5.07 <sup>a</sup>	0.180 <sup>a</sup>	0.190 <sup>a</sup>	83.18 <sup>c</sup>	0.48	-50.20
S.E.M	0.099	0.085	0.019	0.018	3.370	-	-
P	<0,0001	0.770	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-	-

GT : Gaz total (mmol/g MO), R : L'effet antiméthanogénique relatif à l'ajout de chaque substrat (Relative antimethanogenic effect) :

$$R = \mu \text{ test} / \mu \text{ control (Lopez et al., 2010)}$$

R' : Le pourcentage de réduction/d'augmentation de la production du méthane relatif à l'ajout de chaque substrat (relative percentage of increase (positive) or decrease (negative) in methane production) :

$$R' = (\mu \text{ test} - \mu \text{ control}) / \mu \text{ control (Lopez et al., 2010)}$$

$$\text{Bilan d'Hydrogène (BH, \%)} = \frac{4M+2P+2B}{2A+P+4B}$$

M : production de méthane (mmoles), P : production de propionate (mmoles), B : production de butyrate (mmoles), A : production d'acétate (mmoles).

P : probabilité, S.E.M : L'erreur standard des moyennes.

<sup>a,b,c</sup> : Moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes (P < 0,05).

Il en ressort que les volumes de méthane produits au bout de 24h de fermentation sont significativement différents entre les substrats étudiés ( $<0,0001$ ). Les plus faibles productions de  $\text{CH}_4$  sont enregistrées dans les batch fermentaires supplémentés par des extraits de *C.nobile* (1.12 mmol/MO) et *C.segetum* (0.92 mmol/MO) comparativement au control (1.85mmol/MO). Les batch de fermentations contenant leur plante d'origine ont induit, cependant, des productions plus importantes (1.38 et 1.34 mmol/MO, respectivement). *C.pulata*, quant à elle, a provoqué une légère augmentation ( $p > 0.05$ ) de la production du méthane (1.87mmol/MO) comparativement au control. La divergence observée entre les substrats étudiés pourrait être associée soit à leur composition chimique, soit à leurs composition phytochimique, ou à l'interaction entre eux.

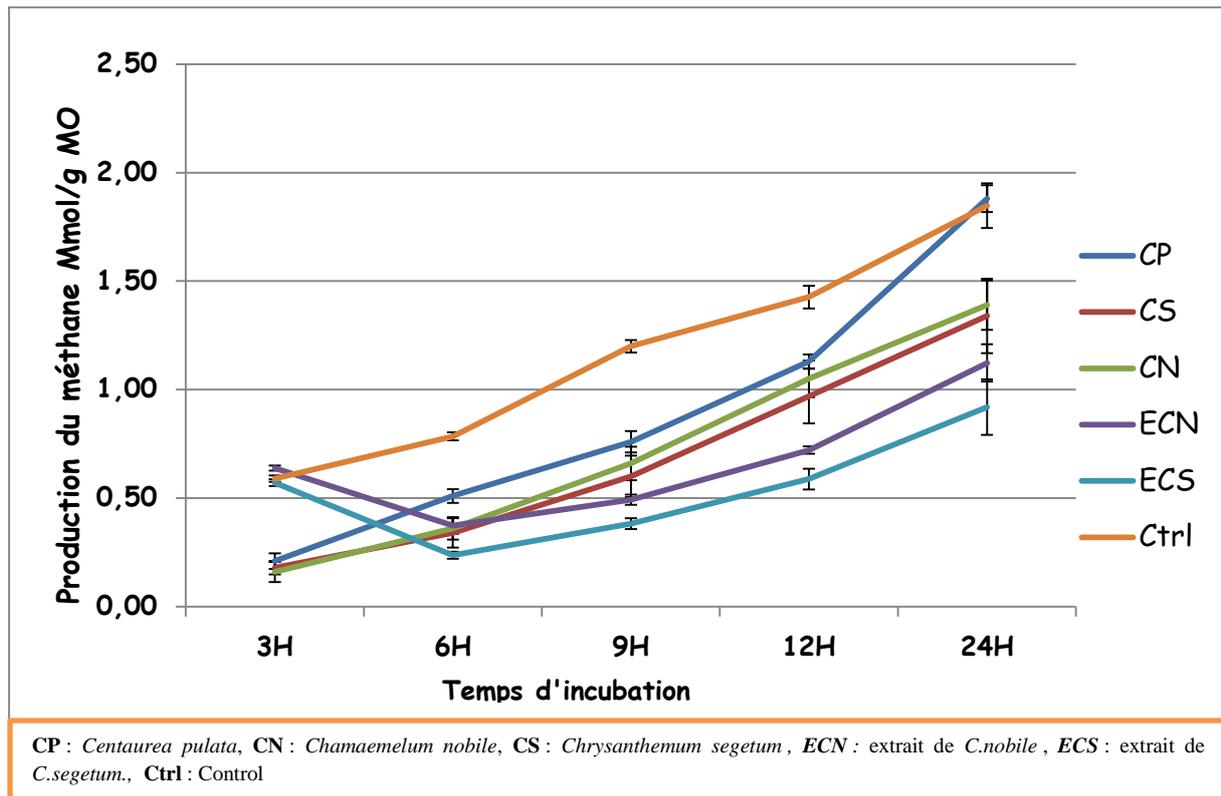
Le suivie de la production du méthane après 3, 6, 9, 12 et 24h (figure 33) révèle que, hormis les deux extraits, tous les substrats présentent une allure ascendante en produisant des quantités accrues en  $\text{CH}_4$  à chaque temps d'incubation. L'incubation de l'extrait du chrysanthème et de la camomille noble notent, cependant, une chute drastique dans la production du méthane après 3h de fermentation pour qu'elle reprend, par la suite sa tendance progressif. Ce déclin est surprenant est pourrait être justifié seulement par les effets probables de la composition chimique et phytochimiques des substrats. En fait, par référence aux valeurs de coefficient de Pearson démontrées dans le tableau 26, il semble clairement l'effet associatif de la fraction pariétale et la fraction phénolique sur la production du méthane durant les trois premières heures de fermentation ( $r = -0.794$ ,  $p < 0.01$  ;  $r = -0.764$ ,  $p < 0.01$  ;  $r = -0.498$ ,  $p < 0.01$  pour ADF, ADL et PT, respectivement). Il en manifeste également que l'effet de la fraction phénolique reste significatif jusqu'à 24h de fermentation, ce qui suggère que les PT ont un impact négatif plus prononcé dans le temps sur la production de méthane que la fraction fibreuse.

Plusieurs rapports bibliographiques faisant état de l'effet de la composition chimique sur la méthanogénèse ruminale ont stipulé que les substrats riches en amidon et en sucres fermentescibles conduisent, en se basant sur l'équation stœchiométrique de Wolin, à une fermentation propionique et butyrique consommatrice d'hydrogène et donc limitante de la production du  $\text{CH}_4$ . Par ailleurs, la fermentation ruminale en anaérobiose des substrats riches en fibres conduit à une production accrue d'acide acétique génératrice d'hydrogène dont l'élimination engendre une production accrue de  $\text{CH}_4$  (Ørskov and Ryle, 1990 ; Mc Allister *et al.*, 1996).

**Tableau 26:** Coefficient de Corrélations (r) entre la production du méthane à différents temps d'incubation, le profil des acides gras volatils, quelques paramètres fermentaires et la composition chimique et phytochimique des substrats examinés.

	CH <sub>4</sub> (3h)	CH <sub>4</sub> (6h)	CH <sub>4</sub> (9h)	CH <sub>4</sub> (12h)	CH <sub>4</sub> (24h)	CO <sub>2</sub>	BH
AGVt	0.256 <sup>ns</sup>	<b>0.465<sup>*</sup></b>	<b>0.495<sup>*</sup></b>	0.380 <sup>ns</sup>	<b>0.613<sup>**</sup></b>	<b>0.736<sup>**</sup></b>	<b>0.543<sup>**</sup></b>
C2	<b>0.563<sup>**</sup></b>	<b>0.484<sup>*</sup></b>	<b>0.630<sup>**</sup></b>	0.366 <sup>ns</sup>	<b>0.575<sup>**</sup></b>	<b>0.579<sup>**</sup></b>	<b>-0.473<sup>*</sup></b>
C3	<b>-0.691<sup>**</sup></b>	<b>-0.590<sup>**</sup></b>	-0.379 <sup>ns</sup>	-0.284 <sup>ns</sup>	<b>-0.601<sup>**</sup></b>	<b>-0.602<sup>**</sup></b>	0.091 <sup>ns</sup>
C4	<b>-0.332<sup>ns</sup></b>	-0.050 <sup>ns</sup>	<b>-0.512<sup>*</sup></b>	-0.175 <sup>ns</sup>	-0.286 <sup>ns</sup>	-0.273 <sup>ns</sup>	-0.070 <sup>ns</sup>
N-NH <sub>3</sub>	0.566 <sup>**</sup>	0.540 <sup>**</sup>	0.569 <sup>**</sup>	0.387 <sup>ns</sup>	-0.453 <sup>ns</sup>	<b>0.734<sup>**</sup></b>	0.418 <sup>ns</sup>
MAT	+0.614 <sup>ns</sup>	0.459 <sup>ns</sup>	0.076 <sup>ns</sup>	0.689 <sup>ns</sup>	0.651 <sup>ns</sup>	<b>0.889<sup>**</sup></b>	0.510 <sup>ns</sup>
NDF	0.432 <sup>ns</sup>	-0.846 <sup>**</sup>	-0.313 <sup>ns</sup>	<b>-0.825<sup>*</sup></b>	-0.513 <sup>ns</sup>	0.653 <sup>ns</sup>	-0.307 <sup>ns</sup>
ADF	<b>-0.749<sup>**</sup></b>	-0.583 <sup>ns</sup>	-0.239 <sup>ns</sup>	<b>-0.820<sup>*</sup></b>	-0.658 <sup>ns</sup>	-0.512 <sup>ns</sup>	-0.478 <sup>ns</sup>
ADL	<b>-0.764<sup>**</sup></b>	-0.213 <sup>ns</sup>	-0.618 <sup>ns</sup>	-0.362 <sup>ns</sup>	-0.322 <sup>ns</sup>	-0.659 <sup>ns</sup>	0.029 <sup>ns</sup>
NFC	<b>0.935<sup>**</sup></b>	0.654 <sup>ns</sup>	0.584 <sup>ns</sup>	0.648 <sup>ns</sup>	<b>0.769<sup>*</sup></b>	-0.318 <sup>ns</sup>	0.436 <sup>ns</sup>
C	-0.551 <sup>ns</sup>	-0.588 <sup>ns</sup>	-0.097 <sup>ns</sup>	<b>-0.756<sup>*</sup></b>	0.605 <sup>ns</sup>	<b>0.794<sup>*</sup></b>	-0.502 <sup>ns</sup>
PT	<b>-0.498<sup>*</sup></b>	<b>-0.605<sup>**</sup></b>	<b>-0.635<sup>**</sup></b>	<b>-0.624<sup>**</sup></b>	<b>-0.714<sup>**</sup></b>	-0.606 <sup>ns</sup>	-0.186 <sup>ns</sup>
FT	-0.193 <sup>ns</sup>	-0.408 <sup>ns</sup>	<b>-0.540<sup>*</sup></b>	<b>-0.560<sup>*</sup></b>	-0.427 <sup>ns</sup>	<b>-0.712<sup>**</sup></b>	-0.065 <sup>ns</sup>
TC	-0.129 <sup>ns</sup>	-0.421 <sup>ns</sup>	<b>-0.539<sup>*</sup></b>	<b>-0.576<sup>*</sup></b>	-0.036 <sup>ns</sup>	-0.425 <sup>ns</sup>	-0.218 <sup>ns</sup>

AGVt : Acides gras volatils totaux, C2 : Acétate, C3 : Propionate, C4 : Butyrate, MAT: Matières azotées totales, BH : Bilan d'hydrogène, NDF : Neutral detergent fiber, ADF : Acid detergent fiber, ADL : Acid detergent lignin, NFC: Non fibrous carbohydrates, C, Cellulose, PT : Phénols totaux, FT : Flavonoïdes totaux, TC : Tanins condensés, \* : P < 0,05, \*\* : P < 0,01, ns : non significative (P > 0,05).



**Figure 33** : Suivie de la production de méthane des substrats étudiés à différents temps d'incubation.

Pour cette raison, la diminution du taux de production de méthane chez *C.nobile* et *C.segetum* ( $R^2 = -24.3$  et  $-27.1\%$ , respectivement) au bout de 24h de fermentation est surprenante vue leurs contenus fibreux (40 et 47% MS, respectivement) assez élevés comparativement aux autres substrats.

De même, l'augmentation de la quantité du  $CH_4$  produite à l'issue de la fermentation de *C.pulata* après 24h de fermentation ( $R^2 = 1.74\%$ ) traduit par l'effet antiméthanogéniques (R) supérieur à 1 (tableau 25) est ainsi inattendue vue sa richesse en sucres fermentescibles (51% MS) et son contenu fibreux faible comparativement aux autres substrats. Dans le même contexte, aucun effet du contenu en azote n'est soulevé sur la méthanogénèse ruminale ( $r = 0.651$ ,  $p < 0.05$ ). Ce facteur n'est pas réputée être un facteur de variation important de la production de  $CH_4$  ruminale. Cependant, lorsque 59 expériences portant sur l'influence du taux de MAT sont sélectionnées dans la base «Rumener», il apparaît une influence négative significative du taux de MAT sur la production de  $CH_4$  :  $CH_4$  (g/kg MOD) =  $40,1 - 0,32$  MAT%MS (Sauvant *et al.*, 2011).

De plus, bien que la fraction phénolique totale ait exercé un effet négatif et significatif sur la méthanogénèse ruminale, les flavonoïdes et les tanins condensés, faisant partie de cette fraction, ne présentent aucun effet significatif vis-à-vis ce processus ( $r = -0.427$ ,  $p > 0.05$  ;  $r = -0.036$ ,  $p > 0.05$ , respectivement), cela pourrait avoir deux aspects différents : soit un **aspect qualitatif**, soit un **aspect quantitatif** comme déjà mentionné dans les sections précédentes. Similairement à nos résultats, Jayanegara *et al.* (2011), à travers leur étude sur l'effet de 17 plantes sur la méthanogénèse ruminale, ont signalé une forte corrélation entre les PT et la production du méthane ( $r = -0.59$ ,  $p > 0.05$ ), cependant aucun effet des tanins condensés n'est enregistré sur ledit processus ( $r = -0.07$ ,  $p > 0.05$ ). Les mêmes auteurs ont attribué cet effet antiméthanogénique à l'action antagoniste des phénols non tanniques contenant dans la matrice végétale des plantes étudiées. Il est largement évoqué, à travers des dizaines d'études antérieures, que la production de CH<sub>4</sub> ruminale diminue lors de l'utilisation de régimes alimentaires contenant des phénols (Puchala *et al.*, 2005; Patra *et al.*, 2006 ; Animut *et al.*, 2008). Mais c'était pas toujours le cas (Beauchemin *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2007). En fait, telles divergences entre les travaux peuvent être liées à la diversité des structures phénoliques, de leur dosage, de leur activité individuelles et/ou de leur l'interaction avec d'autres composés (Makkar, 2003, Oskoueian *et al.*, 2013). À cet effet, Jayanegara *et al.* (2011) ont stipulé que le nombre et la position des groupes hydroxyle et/ou la présence de groupes aliphatiques et glycosyliques dans la structure de ces entités chimiques est proportionnel à leur effet antiméthanogénique. L'effet de ces métabolites secondaires sur le processus de la méthanogénèse est encore mal connu. Ils agissent, soit **directement** sur les archaebactéries méthanogènes et/ou les protozoaires associés par l'inhibition de la fonction de leur membrane cytoplasmique, l'inhibition de la synthèse de leur parois cellulaire ou l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, soit **indirectement** en limitant l'accessibilité des microorganismes aux substrats. D'autres études rapportent que les phénols simples tels que les acides p-coumarique et cinnamique diminuent fortement la production de méthane (Patra *et al.*, 2006).

En admettant que l'inhibition de la production de CH<sub>4</sub> est la résultante d'une modification dans le profil des AGV (Ungerfeld *et al.*, 2003; Cieslak *et al.*, 2012), et que la formation d'acétate s'accompagne d'une production d'hydrogène et donc de méthane alors que celle du propionate est consommatrice d'hydrogène, l'inhibition de la production du CH<sub>4</sub> dans le cas de *C.segetum* et *C.nobile* et de leurs extraits avec une diminution significative de

la production de l'acétate et une augmentation ainsi significative ( $p < 0.05$ ) de la production du propionate est tout à fait logique et prévisible (tableau 23 et 25).

Cieslak *et al.* (2012) ayant rapporté que la production de  $C_3$  et la méthanogénèse sont compétitifs pour l'utilisation de l'hydrogène dans le rumen. La corrélation négative enregistrée dans notre étude entre la production du  $CH_4$  après 24h de fermentation et le propionate ( $r = -0.601$  ;  $p < 0.01$  ; tableau 26) pourrait également appuyer ce constat. En fait, la baisse de la production de l'acétate diminuait la libération de l'hydrogène dans le système de fermentation, en contrepartie, la production plus élevée de propionate, en tant que puits de l' $H_2$ , diminue la disponibilité de l'hydrogène pour la méthanogénèse (Janssen, 2010). Dans le cas des deux extraits, la réduction de production du méthane entérique est concomitante ainsi avec une augmentation de la biomasse microbienne (BM), ce qui suggère l'utilisation de l'hydrogène par cette dernière en tant qu'un autre **puits d' $H_2$**  pour réduire la méthanogénèse ruminale, ce constat pourrait être justifié par le taux de réduction du  $CH_4$  plus élevé chez les deux extraits (0.61 et 0.48 pour *ECN* et *ECS*, respectivement) que chez leurs plantes d'origines (0.75 et 0.73, respectivement). Nos résultats sont cohérents avec les travaux de Wang *et al.* (2012). En fait, l'effet plus notable des extraits de plantes sur la méthanogénèse ruminale comparativement aux plantes entières dans le même intervalle de temps (24h de fermentation) pourrait être justifié par une libération des substances bioactives emprisonnées dans la matrice végétale après l'extraction et par ainsi, un effet direct sur l'un / les acteurs impliqués directement ou indirectement sur le processus discuté. La chute de la production du méthane après les trois premières heures d'incubation dans le cas de l'incubation des extraits pourrait confirmer notre suggestion.

Contrairement à *C.nobile* et *C.segetum* ainsi que leurs extraits, l'augmentation de la production du  $CH_4$  au bout de 24h de fermentation de *C.pulata* est concomitante d'un côté, avec une production accrue du gaz totale, et d'autre côté, avec une production élevée des AGVt ce qui reflète une intensification du taux de la fermentation dans les systèmes batch concernés comme déjà signalée par Blümmel and Becker (1997). L'effet significatif du taux en NFC sur la méthanogénèse ruminale ( $r = 0.769$ ,  $p < 0.05$ ), et l'effet du même paramètre sur la production totale du gaz et des AGVt (décrit dans la section précédente) pourrait justifier l'augmentation simultanée de leur concentration.

Dans notre étude, la relation fortement corrélative entre le CH<sub>4</sub> et les AGVt produits après 24h de fermentation ( $r = 0.613$  ;  $p < 0.01$  ; tableau 26) concorde avec celle établie par Kamalak *et al.* (2002). De plus, l'augmentation proportionnelle de la production de méthane avec la production d'acétate est probablement due à une amélioration de la dégradabilité des fibres (Groot *et al.*, 1998). La droite de régression (figure 34) illustrant la relation positive entre le CH<sub>4</sub> et l'acétate concorde parfaitement avec celle obtenue par Rahman *et al.* (2013) ( $y = 0,0846 x$ ,  $R^2 = 0,58$ ). Il est admis qu'une réduction de 25% du méthane digestif ne perturbe pas les fonctions digestives ou fermentaires essentielles du rumen. Au-delà, une réduction de la méthanogénèse ne peut être envisagée que si l'hydrogène est incluse dans d'autres voies métaboliques telles que la synthèse de propionate ou de butyrate.

L'expression de la production du méthane par unité du gaz totale ou/de AGVt produits peut donner une indication plus spécifique de l'effet d'un tel substrat sur la production de méthane. Dans notre étude, les rapports de CH<sub>4</sub>/AGVt des substrats étudiés sont significativement différents ( $p < 0.0001$ ). Selon Medjakal *et al.* (2016), Dans un ensemble d'échantillons, les plantes ayant le rapport le plus réduit sont celles considérées les plus antiméthanogéniques. De ce fait, dans notre étude, les deux extraits suivis par leurs plantes d'origine sont les substrats ayant le potentiel le plus effectif dans la réduction des émissions atmosphérique du méthane à effet de serre. Néanmoins, les valeurs enregistrées pour *C.pulata* et l'aliment de référence les classifient, selon les mêmes auteurs, parmi les substrats ayant aucun effet antiméthanogénique.

Pour des raisons de comparaison, Kulivand and Kafilzadeh (2015) ont étudié huit graminées provenant de Kermanshah (Iran) en terme de leur composition chimique, leur paramètre cinétiques et leur effet antiméthanogène, *Chamaemelum nobile* a été désigné comme le meilleur candidat sur la base de sa valeur nutritive et de son effet antiméthanogénique (plus de 20%). Nos résultats sont, par ailleurs, incompatibles avec ceux obtenus par Garcia-Gonzalez *et al.* (2008) n'ayant observé aucun effet notable des fleurs de *Chamaemelum nobile* sur la production de méthane *in vitro* et sur d'autres paramètres de fermentation. De même, Patra *et al.* (2009a) ont testé l'effet de l'huile de la camomille comme un additif alimentaire (5% de MO) sur la production du méthane *in vivo*, les auteurs ont enregistré une réduction dans la production quotidienne de méthane par 22% comparativement au control.

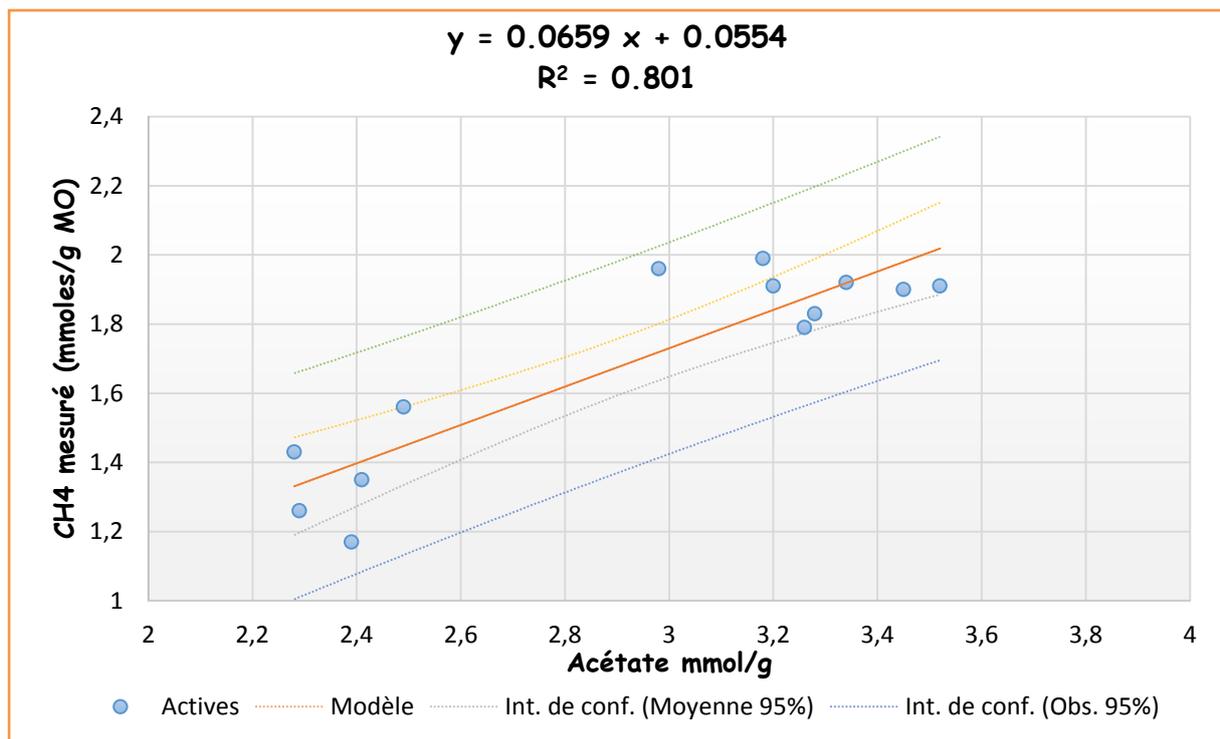


Figure 34 : Relation entre la proportion molaire de l'acétate et la production du méthane.

L'effet antiméthanogénique de cette huile a été attribué, par les mêmes auteurs, à son effet négatif sur la digestibilité des fibres, probablement dû au processus de biohydrogénation des acides gras insaturés dans le rumen. En addition, Après l'accomplissement du projet européen "Rumen Up" du FC Framework 5, plusieurs tests de screening ont été effectués, où un grand nombre d'espèces végétales (plus de 500 espèces) ont été examinés afin de déterminer leur effet sur la fermentescibilité et la méthanogénèse ruminales afin d'envisager leur éventuelle utilisation en tant qu'additifs alimentaires dans la nutrition des ruminants. À titre d'exemple, le bulbe de l'ail (*Allium sativum*) a été identifié par Staerfl *et al.* (2010) comme l'un des parties des légumes les plus efficaces pour réduire plus de 50% de production du CH<sub>4</sub> entérique.

Dans le même contexte, après 24 h de fermentation, Bodas *et al.* (2008), en testant 450 espèces végétales *in vitro*, ont noté plus de 15% de réduction de CH<sub>4</sub> avec : *Carduus pycnocephalus*, *Populus tremula* (*Salicaceae*), *Prunus avium* (*Rosaceae*), *Quercus Robur* (*Fagaceae*), *Rheum nobile* (*Polygonaceae*) et *Salix caprea* (*Salicaceae*) sans aucun effets négatifs sur l'ensemble des paramètres de fermentation (digestibilité, gaz total et AGV). De même, Durmic *et al.* (2010) ont évalué 128 plantes pérennes ligneuses australiennes, *Cullen australasicum*, *Enchy-laena tomentosa*, *Eremophila longifolia*, *Maireana astrotricha* et

*Templetonia retusa* ont été sélectionnées comme les espèces les plus réductrices de la production du méthane *in vitro*. Cet effet favorable a été attribué probablement, par les mêmes auteurs, à la présence de métabolites secondaires.

Le taux de récupération de l'hydrogène ou « **bilan d'hydrogène** » « **BH** » calculé à partir des quantités d'AGV et de méthane produites *in vitro* varie entre 83.18 et 112.3 %. Nos résultats suggèrent que malgré il y avait une diminution dans la production du méthane dans le cas de *C.nobile* et *C.segetum* et leurs extraits respectifs, le H<sub>2</sub> n'a pas été accumulé, affirmant, une autre fois, son utilisation par d'autres voies métaboliques. Nos résultats sont supérieurs aux fourchettes établies par Demeyer and Fievez (2000) et Ungerfeld (2015) estimées entre 78 et 96%, 80 et 100%, respectivement avec une moyenne de récupération de 90%. Ils indiquent des fermentations normales sans accumulation de produits fermentaires inconnus d'où il est possible de conclure que l'hydrogène produit lors de la dégradation de différents substrats est probablement récupéré soit pour la production du propionate, soit pour la production de la biomasse microbienne.

### 3.2. Stœchiométrie des fermentations

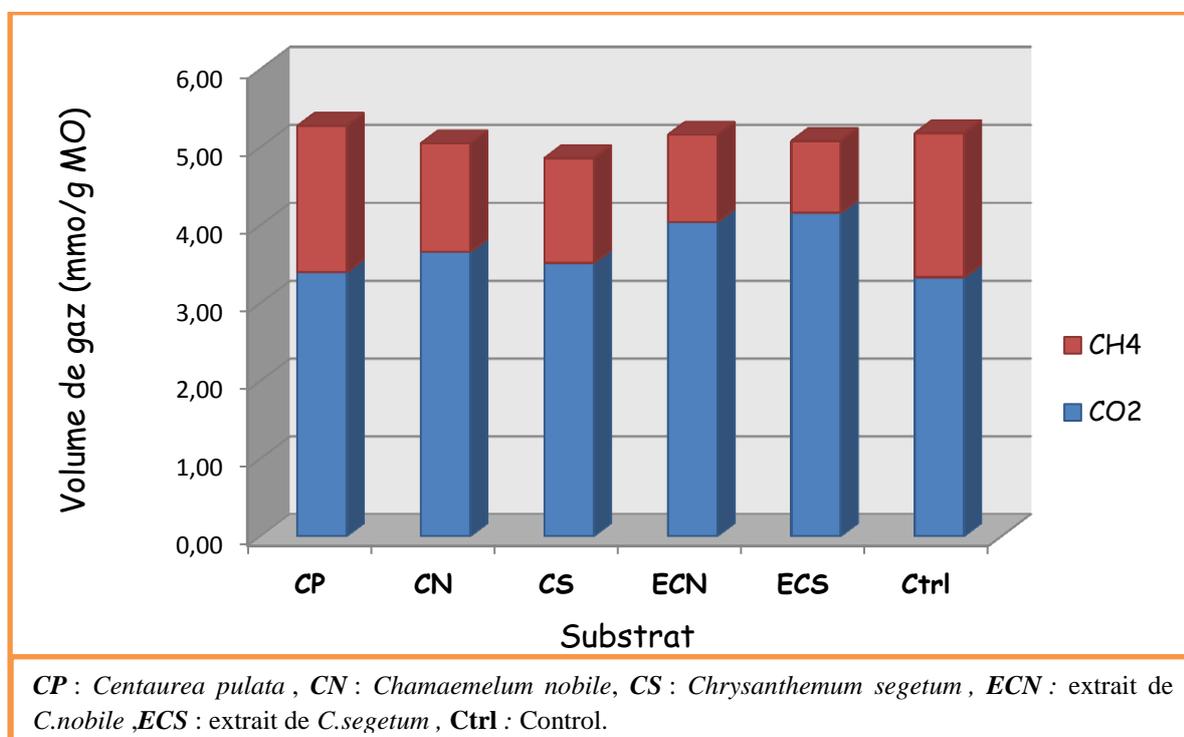
L'étude de la stœchiométrie des fermentations ruminales est fondamentale, elle permet de comprendre la partition des produits issus de la dégradation et de la fermentation des constituants de la ration, entre des produits « **utiles** » (AGV et biomasse microbienne) et des produits **inutilisables**, voire polluants pour l'environnement (CH<sub>4</sub> et CO<sub>2</sub>). Les gaz produits à l'issue des fermentations ruminales sont constitués de CO<sub>2</sub> (65 %), de CH<sub>4</sub> (entre 25 et 30 %), d'azote (2 %) et d'hydrogène (< 1 %). Des traces d'oxygène ont également été détectées (Vermorel, 1995). Ces proportions varient en fonction de la nature et du niveau d'apports des aliments. Les résultats de la production des gaz fermentaires (CO<sub>2</sub> et CH<sub>4</sub>) produits à partir des différents substrats ainsi que du contrôle sont exposés dans le tableau 27. Il en ressort que la fermentation pendant 24h de nos substrats (plantes et extraits) a engendré un profil fermentaire orienté principalement vers une production accrue de CO<sub>2</sub> au détriment de la production de CH<sub>4</sub>, le CO<sub>2</sub> représente entre 64 à 75% du pool gazeux pour les plantes entières versus 78 à 82% pour les deux extraits) (figure 35).

En fait, les concentrations de CO<sub>2</sub> produit à l'issue de la fermentation de l'ensemble des plantes fourragères après 24h de fermentation varient entre 3.30 et 3.65 mmol/ g MO), la

valeur la plus élevée est enregistrée chez *C.nobile* et la plus faible est notée chez l'aliment de référence. Bien qu'ils aient des augmentations légères dans son production, ces augmentations demeurent statistiquement similaire comparativement au standard ( $p > 0.05$ ). En contrepartie, l'incorporation des deux extraits à l'aliment de référence (2.5%) a induit une augmentation significative de la production du  $\text{CO}_2$  comparativement au control mis à fermenter seul ( $p > 0.0001$ ). L'extrait de *C.segetum* a engendré une augmentation de 24% de la production du  $\text{CO}_2$  comparativement au standard, tandis que celui de la camomille l'a haussée de 21%. Étant donné que la production du  $\text{CO}_2$  et du  $\text{CH}_4$  est antagoniste, nous considérons que les substrats ayant la production la plus élevée en  $\text{CO}_2$  notent la plus faible production de  $\text{CH}_4$ , de ce fait, les deux extraits semblent être les meilleurs candidats vis-à-vis leurs effets réducteurs de la production du méthane.

En fait, le  $\text{CO}_2$  produit dans les systèmes fermentaires *in vitro* en terme de 24 h d'incubation est un mélange du gaz direct issu de la dégradation des constituants de la ration par le microbiote ruminal et du gaz indirect issu des bicarbonates du système tampon lors de la dissociation des acides organiques en base selon l'équation suivante :

$\text{HCO}_3^- + \text{H}_3\text{O}^+ \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$  (processus de neutralisation de l'acidité engendrée par la production accrue des AGV) (Serment, 2012).



**Figure 35 :** Répartition quantitative *in vitro* du gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ) et du méthane ( $\text{CH}_4$ ) à l'issu de la fermentation des substrats étudiés.

Tableau 27 : Stœchiométrie de la production de gaz *in vitro* (mmol/ g MO) des substrats étudiés après 24 h de fermentation *in vitro*.

Plantes entières	CH <sub>4</sub> mesuré (mmol/g MO)	CH <sub>4</sub> estimé (mmol/g MO)	CO <sub>2</sub> mesuré (mmol/g MO)	CO <sub>2</sub> estimé (mmol/g MO)	GT mesuré (mmol/g MO)	GT estimé (mmol/g MO)
Control	1.85 <sup>b</sup>	1.56 <sup>bc</sup>	3.33 <sup>a</sup>	2.60 <sup>ab</sup>	5.17 <sup>a</sup>	8.56 <sup>bc</sup>
<i>C.pulata</i>	1.87 <sup>b</sup>	1.71 <sup>c</sup>	3.39 <sup>a</sup>	2.85 <sup>b</sup>	5.27 <sup>a</sup>	9.06 <sup>c</sup>
<i>C.nobile</i>	1.38 <sup>a</sup>	1.23 <sup>a</sup>	3.65 <sup>a</sup>	2.51 <sup>a</sup>	5.05 <sup>a</sup>	7.97 <sup>a</sup>
<i>C.segetum</i>	1.34 <sup>a</sup>	1.29 <sup>ab</sup>	3.51 <sup>a</sup>	2.57 <sup>ab</sup>	4.86 <sup>a</sup>	8.02 <sup>ab</sup>
S.E.M	0.0565	0.0554	0.0655	0.0458	0.0651	0.115
<i>P</i>	<0,0001	0.001	0.323	0.030	0.126	<0,0001
Extraits	CH <sub>4</sub> mesuré (mmol/g MO)	CH <sub>4</sub> estimé (mmol/g MO)	CO <sub>2</sub> mesuré (mmol/g MO)	CO <sub>2</sub> estimé (mmol/g MO)	GT mesuré (mmol/g MO)	GT estimé (mmol/g MO)
<i>ECN</i>	1.12 <sup>b</sup>	1.36 <sup>ab</sup>	4.04 <sup>b</sup>	2.63 <sup>a</sup>	5.17 <sup>a</sup>	8.33 <sup>a</sup>
<i>ECS</i>	0.92 <sup>a</sup>	1.31 <sup>a</sup>	4.16 <sup>b</sup>	2.68 <sup>a</sup>	5.07 <sup>a</sup>	8.16 <sup>a</sup>
S.E.M	0.099	0.432	0.1089	0.0462	0.085	0.091
<i>P</i>	<0,0001	0.035	<0,0001	0.814	0.770	0.210

CO<sub>2</sub> estimé :  $A/2+P/4+1.5*B$ , **A** : production d'acétate (moles), **P** : production de propionate (moles), **B** : production de butyrate (moles) (Getachew *et al.*,1998),

CH<sub>4</sub> estimé :  $[A+2*B]-CO_2$  estimé ; **A** : production d'acétate (moles), **B** : production de butyrate (moles) (Getachew *et al.*,1998).

Gas total estimé : CO<sub>2</sub> estimé + CH<sub>4</sub> estimé+ CO<sub>2</sub> indirect (1mmole CO<sub>2</sub> indirect = 0.87 mmoles AGVt) (Getachew *et al.*,1998).

*P* : probabilité, S.E.M : L'erreur standard des moyennes.

<sup>a,b,c</sup> : Moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes (P<0,05).

En admettant que 1 mmol des AGV produits à partir du système fermentaire génère 0.8 - 1.0 mmol du CO<sub>2</sub> à partir du système tampon à base de bicarbonate (Beuvink and Spoelstra, 1992; Blümmel and Ørskov, 1993). Dans notre étude, en se basant sur les données prédites, nous constatons que le gaz indirect (CO<sub>2</sub>) produit dans les systèmes batch après 24h d'incubation représente entre 44.6 et 56.4% de la production totale du gaz estimé.

Les résultats obtenus recourent ceux de Blümmel and Ørskov (1993) rapportant un pourcentage de gaz indirect 53.6% du gaz total à l'issue de la fermentation de la paille pendant 24h. Ainsi, Blümmel *et al.* (1999) ayant observé des proportions de gaz indirect entre 49 et 56 % lors de la fermentation *in vitro* de 55 substrats. Dans le même contexte, Getachew *et al.* (1998) stipule qu' à partir d'une ration à base de fourrage, le gaz indirect produit à partir du bicarbonate du tampon représente 50% du gaz total, néanmoins, cette production s'élève à 60% dans le cas des rations à base de concentré.

En contrepartie, les données réelles calculées à partir de nos essais révèlent une surestimation de la quantité du gaz indirect (CO<sub>2</sub>) produite à partir du système tampon utilisé. Etant donné que le système tampon utilisé dans notre étude contient des bicarbonates ainsi que des phosphates, et que la réaction des AGV avec les phosphates, contrairement à celle des bicarbonates, ne produit pas de gaz, nous supposons qu'une partie considérable des AGV produits à partir de la fermentation de nos substrats à réagit plutôt avec le phosphate qu'avec le bicarbonate. Similaire à nos résultats, Beuvink and Spoelstra (1992) ont estimé que 13% des AGV produits ont été réagi avec les phosphates du système tampon. De ce fait, nous suggérons que la plus grande partie du méthane produit dans nos essais est à l'origine d'un CO<sub>2</sub> provenant de la fermentation des constituants des substrats testés et non plus du système tampon.

Ces résultats sont confirmés, dans notre étude, par l'absence d'un effet corrélatif entre la production du gaz et la production des AGV (tableau 26), et ils sont incohérents avec ceux de Blümmel and Ørskov (1993) ayant rapporté l'association étroite entre la production du gaz et la production des AGV *in vitro*. Autrement dit, la prédiction des quantités des gaz produites au terme des fermentations à partir des concentrations définies des AGV majeurs pourrait être, selon les données de notre étude, infiables et incompatibles. Cela pourrait être dû aux conditions différentes des essais et les différentes techniques de mesure de gaz utilisées dans chaque essai.

## 4. Étude de la digestibilité des substrats

### 4.1. Digestibilité apparente de la matière organique

Daccord (2005) considère la détermination de la digestibilité de la matière organique des fourrages comme une base essentielle pour estimer leur valeur nutritive, elle exprime, selon Selmi *et al.* (2013), la proportion d'un constituant chimique disparue entre sa consommation et son excrétion dans les fèces. Elle dépend, selon Jarrige *et al.* (1995) de l'accessibilité des polymères du fourrage à la colonisation et par ainsi la dégradation par les microorganismes du rumen. Elle peut être déterminée par plusieurs méthodes au niveau du laboratoire (*in vitro*) en incubant l'échantillon à tester en présence du jus de rumen, ou en utilisant des solutions enzymatiques, comme elle peut être estimée à partir de la composition chimique de l'aliment.

Les résultats de la digestibilité apparente de la matière organique (mesurée et estimée) ainsi que l'estimation de la l'énergie métabolisable après 24h d'incubation des substrats étudiées sont exposés dans le tableau 28.

La digestibilité apparente mesurée *in vitro* des plantes entières oscille entre 41,7 et 48,1%. *C.pulata*, comme attendu, se distingue par le coefficient de digestibilité le plus élevée comparativement aux autres substrats. Néanmoins, *C.segetum* note la valeur la plus faible. Il ressort également du tableau 28 que le batch fermentaire contenant l'extrait de *C.nobile* à 2.5% MS est mieux dégradé (45.15%) que celui contenant *C.segetum* (43.8%). La classification décroissante des substrats sur la base de la digestibilité apparente *in vitro* de la matière organique est alors la suivante:

***C.pulata* > l'aliment de référence > ECN > ECS > *C.nobile* > *C.segetum***

La différence notée entre les substrats étudiés pourrait être due à leurs compositions chimiques différentes, en particulier leurs contenus en fibres pariétaux, en sucres fermentescibles et la présence plus ou moins des composés antinutritionnels. Van Soest *et al.* (1967) note que la richesse en parois cellulaire a une influence négative sur la digestibilité, en particulier la lignine, représentant une barrière physique limitant l'accès des enzymes microbiennes à la paroi cellulaire.

De même, Al Masri (2013) montre qu'un accroissement des constituants pariétaux impliquerait une perte de 2 à 3 points de la DAMO. De plus, Demarquilly et Andrieu (1992) confirme que la digestibilité d'une plante donnée est positivement liée à sa teneur en matières azotées et négativement corrélée à sa teneur en cellulose brut. Nos résultats, en absence de travaux comparatifs, sont inférieurs à ceux de Bouaaza *et al.* (2014) et Boufennara *et al.*(2013) pour des espèces de la famille des *Asteraceae*. De ce fait, *C.pulata* avec la teneur la

plus faible en lignine (3.6% MS) s'est montré la plus digestible, Néanmoins, *C.nobile* avec une teneur en lignine de (8% MS) est mieux dégradée que *C.segetum* dont la teneur en lignine est inférieure (5 % MS). Cette situation peut être expliquée, probablement par le fait que la lignine de la camomille est peu polymérisée et/ ou l'existence de substances antinutritionnels dans le chrysanthème limitant par ainsi l'accessibilité aux nutriments digestibles par le microbiote du rumen.

**Tableau 28** : Détermination de la digestibilité apparente de la matière organique (mesurée et estimée) et prédiction de l'énergie métabolisable des substrats étudiés après 24 h de fermentation *in vitro*.

Plantes entières	DAMO (%)	DAMOE (%)	EM (MJ/Kg MO)
Control	44.3 <sup>ab</sup>	59.06 <sup>b</sup>	3.44 <sup>b</sup>
<i>C.pulata</i>	48.1 <sup>c</sup>	75.2 <sup>d</sup>	3.45 <sup>b</sup>
<i>C.nobile</i>	42.8 <sup>ab</sup>	70.2 <sup>c</sup>	3.43 <sup>b</sup>
<i>C.segetum</i>	41.7 <sup>a</sup>	57.0 <sup>a</sup>	3.17 <sup>a</sup>
<i>S.E.M</i>	0.833	2.781	0.02
<i>P</i>	0.023	<0.0001	<0.0001
Extraits	DAMO (%)	DAMOE (%)	EM (MJ/Kg OM)
<i>ECN</i>	45.15 <sup>b</sup>	/	3.48 <sup>b</sup>
<i>ECS</i>	43.86 <sup>a</sup>	/	3.43 <sup>b</sup>
<i>S.E.M</i>	0,014	/	0.009
<i>P</i>	0.194	/	0.066

**DAMO**: Digestibilité apparente de la matière organique *in vitro*, **EM**: Énergie métabolisable.

**EM (MJ/Kg MS)** = 2,2 + 0,136 PG + 0,057 PB, (Menke and Steingass 1988);

**PB**: Protéines brutes (%); **PG**: Production de gaz après 24h de fermentation.

**DAMOE(%)** : Digestibilité de la matière organique estimée à partir de la composition chimique.

**DAMOE (%)** = - 0.90 ADF + 1.177 MM+ 82.25 (Chibani *et al.*, 2010).

*P*: probabilité, *S.E.M* : Erreur standard des moyennes.

*a, b, c, d* : Moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes (P<0,05).

Dans notre étude, aucune corrélation significative n'est enregistrée entre la digestibilité de la matière organique et les constituants chimiques (NDF, ADF, ADL, MAT, cellulose), cependant un effet négatif significatif des phénols totaux a été soulevé vis-à-vis la DMO (r = - 0.502, p < 0.05) (Tableau 29).

Les phénols totaux contenus dans la matrice végétale des plantes étudiées, en particulier dans *C.segetum*, pourraient avoir un effet antagoniste sur la disponibilité de leurs nutriments pour le microbiote ruminale en raison des complexes qu'ils forment avec les macromolécules, en particulier les protéines et nombreux types de molécules tels que les glucides, les éléments minéraux, les enzymes et les polymères synthétiques qui en diminuent la dégradabilité. Les flavonoïdes et les tanins condensés n'exercent, en contrepartie, aucun effet significatif sur la digestibilité de nos substrats ( $p > 0.05$ ).

Nos résultats sont contradictoires avec ceux de Barman and Rai (2008) ayant rapporté une corrélation significative et négative entre les tannins des fourrages et la DAMO. De même, Ben Salem *et al.* (2005) font également état d'une corrélation négative entre les composés secondaires, la production de gaz *in vitro* et la digestibilité de la MS en utilisant un inoculum d'ovins. Ces résultats nous laissent supposer, comme déjà discuté dans les sections antérieures, que soit la fraction phénolique renferme d'autres composants, hormis les deux fractions discutées en ci-dessus, ayant un effet négatif sur la digestibilité, soit l'effet recherché exige leurs présences en quantités plus élevées dans la matrice végétale.

Les taux de la digestibilité apparente de la matière organique enregistrés dans notre étude ont permis de classer les substrats dans le même ordre en matière des quantités de gaz produites dans le même intervalle de temps, cela est clairement traduit par l'effet corrélatif positif et significatif entre les deux paramètres ( $r = 0.409$ ,  $p < 0.05$ ), la détermination de la digestibilité des substrats est donc un bon marqueur qui peut être utilisé dans l'évaluation du potentiel nutritif des aliments destinés à l'alimentation animal.

D'après Pitt *et al.* (1996), la quantité de gaz libérée lorsque les aliments sont incubés *in vitro* en présence d'une flore ruminale mixte est étroitement liée à la digestibilité et à la valeur énergétique des aliments broutés par les ruminants. En contrepartie, aucun effet corrélatif n'est enregistré entre la DAMO et la concentration des AGVt, d'un part, et entre la DAMO et la production du méthane *in vitro* d'autre part. Nos résultats sont corroborés avec ceux de Carulla *et al.* (2005), Hariadi and Santoso, (2010) ayant stipulé qu'une diminution significative de la méthanogénèse peut ne pas être associée à une réduction significative de la digestibilité et de la concentration en acides gras volatiles. Néanmoins, Durmic *et al.* (2010), Jayanegara *et al.* (2011) ont conclu, à travers leurs études, que la digestibilité *in vitro* présente un effet corrélatif positif et significatif avec la production du méthane/g MS incubée.

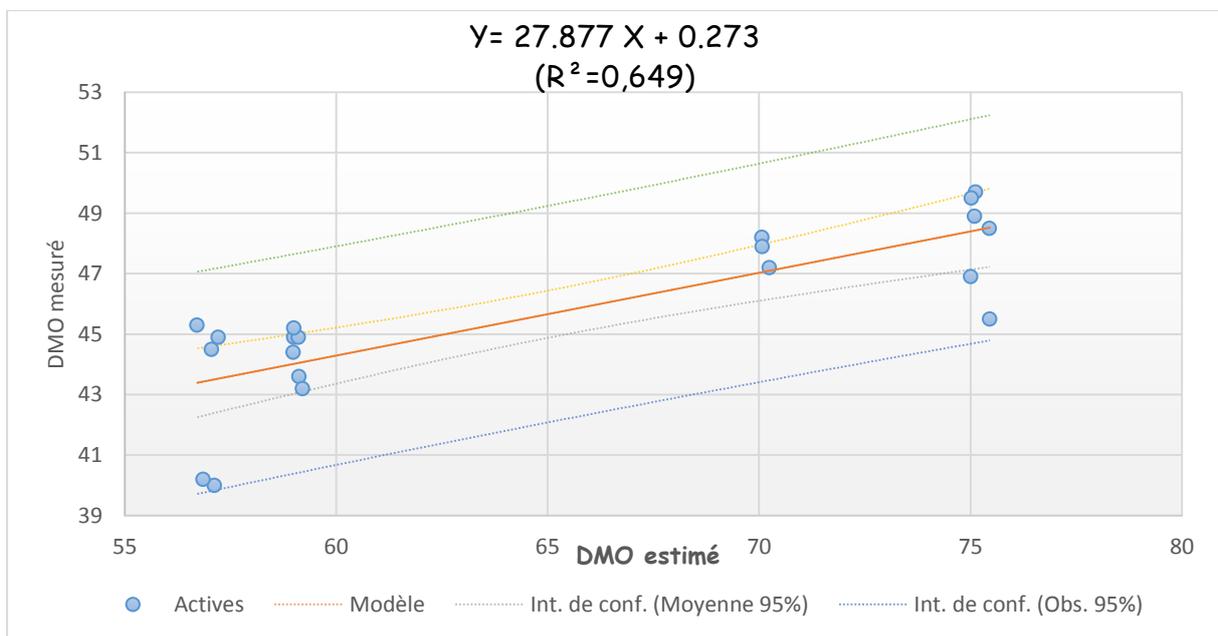
**Tableau 29:** Coefficient de Corrélations (r) entre la digestibilité de la matière organique (DAMO), l'énergie métabolisable estimée, la production du gaz, la méthanogénèse et la composition chimique et phytochimique des substrats examinés.

	DAMO	EM
AGVt	0.045 <sup>ns</sup>	0.151 <sup>ns</sup>
C2	<b>0.557<sup>**</sup></b>	<b>0.411<sup>*</sup></b>
C3	<b>-0.486<sup>*</sup></b>	<b>-0.536<sup>**</sup></b>
C4	-0.214 <sup>ns</sup>	-0.080 <sup>ns</sup>
AP	<b>0.578<sup>**</sup></b>	<b>0.524<sup>**</sup></b>
GT 24h	<b>0.409<sup>*</sup></b>	0.359 <sup>ns</sup>
CH <sub>4</sub>	0.369 <sup>ns</sup>	<b>-0.495<sup>*</sup></b>
MAT	0.657 <sup>ns</sup>	<b>0.959<sup>**</sup></b>
NDF	0.058 <sup>ns</sup>	-0.582 <sup>ns</sup>
ADF	0.383 <sup>ns</sup>	<b>-0.821<sup>*</sup></b>
ADL	-0.508 <sup>ns</sup>	0.219 <sup>ns</sup>
NFC	0.075 <sup>ns</sup>	0.456 <sup>ns</sup>
C	0.522 <sup>ns</sup>	<b>-0.902<sup>**</sup></b>
PT	<b>-0.502<sup>*</sup></b>	0.146 <sup>ns</sup>
FT	-0.456 <sup>ns</sup>	0.425 <sup>ns</sup>
TC	-0.376 <sup>ns</sup>	0.448 <sup>ns</sup>

**GT :** Gas total (mmol/g MO) ; **AGVt :** Acides gras volatils totaux, **C2 :** Acétate, **C3 :** Propionate, **C4 :** Butyrate. **MAT:** Matières azotées totales, **NDF :** Neutral detergent fiber, **ADF :** Acid detergent fiber, **ADL :** Acid detergent lignin, **NFC:** Non fibrous carbohydrates, **C,** Cellulose, **PT :** Phénols totaux, **FT :** Flavonoïdes totaux, **TC :** Tanins condensés, \* : P < 0,05, \*\* : P < 0,01, ns : non significative (P > 0,05).

Étant donné qu'il existe une corrélation positive entre la production totale de gaz et la dégradabilité des aliments, une production de gaz total plus élevée représente dans une certaine mesure, une meilleure digestibilité des aliments (Cone *et al.*, 1996; Blümmel *et al.*, 1997). Ainsi, l'addition des extraits de *C.nobile* et *C.segetum* pourrait ne pas nuire à la digestibilité des régimes alimentaires. Cependant, Patra *et al.* (2006) a mis en garde que la digestibilités de la matière organique des aliments est diminuée de manière significative avec l'addition de plusieurs extraits de plantes, tels que les extraits de gousses de *Acacia concinna* (Shikakai), la pulpe de *Terminalia Chebula* (harad), *Terminalia Belerica* (Bahera), *Emblica officinalis* (amla) et noyau de semence d'*Azadirachta indica* (semence de neem). Cette incohérence pourrait être attribuée à différentes espèces végétales, à la quantité d'extraits ajoutées et aux animaux donneurs.

Les valeurs de la digestibilité apparente prédites à partir de la composition chimique sont significativement distinctes entre les substrats ( $p < 0.0001$ ). Elle a engendré des valeurs largement supérieures tout en maintenant le même classement des substrats que celui enregistré *in vitro*. La relation entre la digestibilité de la matière organique estimée à partir de la composition chimique (y) et celle mesurée *in vitro* (x) illustrée dans la figure 36 révèle que les deux variables sont fortement corrélées ( $y = 27.877x + 0.273$ ,  $R^2 = 0.649$ ) ce qui suggère que la prédiction de la digestibilité de la matière organique à partir des données de la composition chimique est adéquate en absence des études *in vitro* pour l'évaluation des aliments destinés à l'alimentation des ruminants.



**Figure 36 :** Relation entre la DAMO estimée à partir de la composition chimique et la DMO mesurée *in vitro*.

D'une manière générale, la digestibilité des 3 espèces ainsi que leurs extraits respectifs est comparable à celle du substrat de référence. Ce résultat suggère que leur contenu fibreux est digestible par le microbiote ruminal. L'effet corrélative positif et fortement significatif entre la DAMO et la production d'acétate ( $r = 0.557$ ,  $p < 0.01$ ) (tableau 29) pourrait confirmer notre suggestion du fait que la production d'acétate est directement reliée à la dégradation des fibres pariétaux (Groot *et al.*, 1998). La digestibilité de la MO d'un aliment de bonne valeur nutritionnelle doit être, selon Maia *et al.* (2012) égale ou supérieure à 50% après 24h d'incubation *in vitro*, ainsi, les taux de la digestibilité apparente enregistrés dans notre étude n'apparaissent pas être un facteur limitant pour leur utilisation dans la formulation des régimes alimentaires au profit des ruminants.

#### **4.2. Estimation de l'énergie métabolisable**

L'énergie métabolisable est obtenue en retranchant de l'énergie brute les quantités d'énergie correspondant respectivement aux excréments solides, liquides et gazeux émises en 24 heures. Autrement dit, elle correspond à la portion de l'énergie de l'aliment qui peut être réellement utilisée et profitée par l'animal (entretien, production...etc.). Les énergies métabolisables dégagées par les différents substrats sont présentées dans le tableau 28. *C.pulata* est l'espèce qui enregistre la valeur en énergie métabolisable la plus élevée (3.45 MJ/Kg OM), cependant, *C.segetum* note, comme le cas de la digestibilité, la valeur la plus faible (3.17 MJ/Kg OM). Les résultats obtenus sont comparables au niveau énergétique des concentrés (Van Soest, 1994).

L'incubation de l'extrait de la camomille et du chrysanthème pendant 24h a augmenté le taux de la digestibilité et de l'énergie métabolisable comparativement aux résultats obtenus lors de l'incubation des espèces entières, cela pourrait être justifié par une disponibilité plus accrue de l'énergie et des macro/micronutriments, en particulier les protéines, emprisonnés dans la matrice végétale après l'extraction. Il a été rapporté que les fourrages caractérisés par une digestibilité et une quantité en énergie métabolisable faible ont une fraction pariétale épaisse et lignifiée et un contenu faible en protéines et en minéraux (Papachristou *et al.*, 2005 ; Parlak *et al.*, 2011). Les effets corrélatifs obtenus confirment ces spéculations, d'un part, l'effet antagoniste de la fraction ADF, en particulier la cellulose, vis-à-vis les quantités de l'énergie métabolisable dégagées de chaque substrat ( $r = -0.821$  ;  $p < 0.05$  ;  $r = -0.902$  ;  $p < 0.01$ , respectivement) et d'autre part, l'effet fortement positif des protéines sur ledit paramètre ( $r = 0.959$ ,  $p < 0.01$ , tableau 29).

En admettant que la production du méthane digestif représente des pertes énergétiques estimées de 6 à 9% de l'énergie brut ingérée et de 10 à 15% de l'énergie métabolisable (Jouany, 2008), nous supposant que les aliments jugés avoir un aspect antiméthanogéniques ont tendance à améliorer la quantité d'énergie profitable par l'animal, cette suggestion est affirmée par le coefficient de corrélation négatif et significatif enregistré dans notre étude entre la production du méthane et la digestibilité *in vitro* ( $r = -0.495$ ,  $p < 0.05$ ).

### **Chapitre III : Analyse des variations microbiologiques de la flore et de la faune productrices de méthane par PCR en temps réel**

Le rumen abrite une communauté complexe de microorganismes, dont les bactéries, les protozoaires, les champignons et les *Archaea* méthanogènes, responsables en consortium de la dégradation enzymatique des aliments pour fournir de l'énergie et des nutriments pour le ruminant hôte. Les méthodes d'énumération classiques du microbiote ruminal ont été rapidement remplacées par des techniques moléculaires qui peuvent être utilisés pour caractériser les communautés microbiennes complexes sans culture (Higuera, 2013). Plusieurs techniques moléculaires à l'instar de l'hybridation d'ADN, la PCR en temps réel, l'électrophorèse en gel à gradient de dénaturation (DGGE) et d'autres techniques ont été utilisées pour élucider les changements quantitatifs et phylogénétiques des groupes microbiens dans le rumen (Tajima *et al.*, 2001, Denman *et al.*, 2006). Dans notre étude, La PCR en temps réel (qPCR) a été utilisée pour détecter les éventuelles variations de la communauté des *Archaea* méthanogènes et des protozoaires en réponse aux substrats analysés. La quantification exprimée en nombre de copies des gènes ciblant les deux populations microbiennes /ml du milieu de fermentation après 24h d'incubation est résumée dans le tableau 30, les figures 37et 38.

Dans notre étude, il nous a été permis, en utilisant la qPCR, de calculer à partir des courbes étalons le nombre de copies des gènes cibles après 24h de fermentation en système batch. Elle consiste à déduire le nombre de copies du gène en comparant les valeurs (Ct) calculés à partir de l'échantillon analysé avec ceux la courbe d'étalonnage déjà établie à partir des concentrations du gène cible bien identifiées. Il est à souligner que nos résultats reposent sur l'hypothèse que l'efficacité d'amplification (E) de nos échantillons et celle de la courbe standard sont similaires.

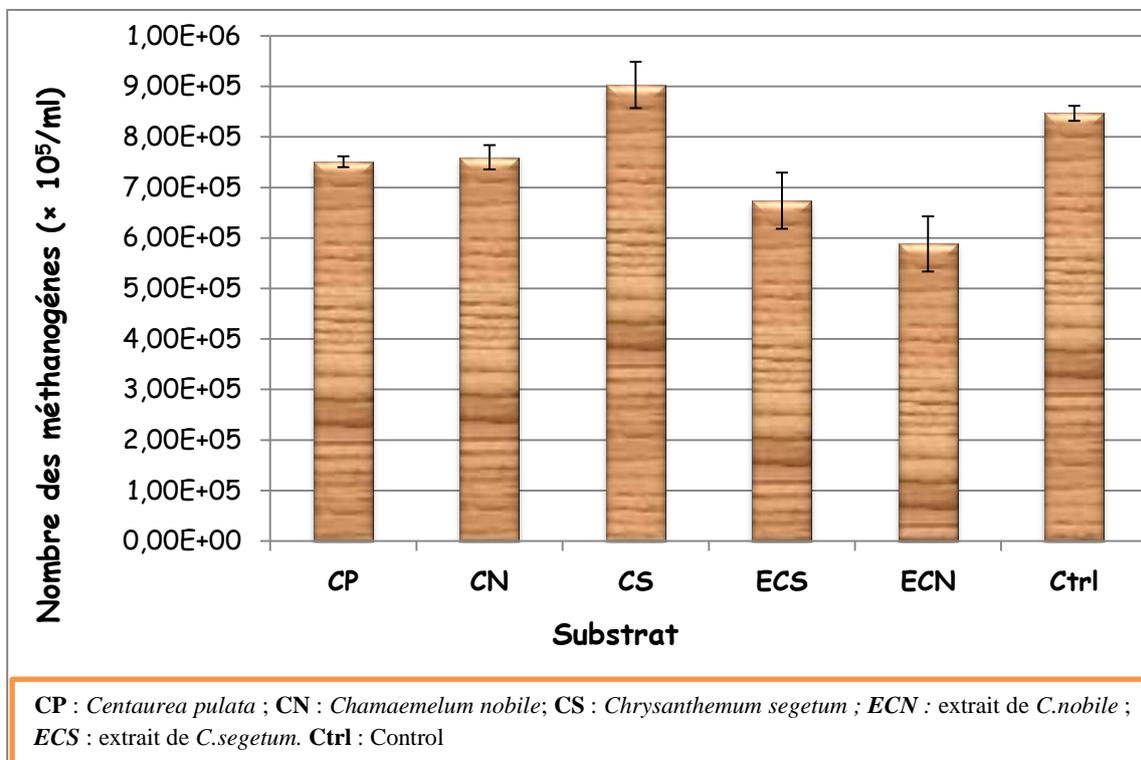
#### **1.1. Impact des substrats étudiés sur la population des *Archaea* méthanogènes**

Les *Archaea* méthanogènes utilisent l'hydrogène produit par les microorganismes fermentaires pour réduire le CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub>, de ce fait, l'énergie nécessaire à leur croissance est obtenue principalement via la production du méthane. Malgré le rôle crucial qu'elles jouent dans l'écosystème microbien, elles ne constituent qu'une petite partie de la biomasse microbienne (Yanagita *et al.*, 2000).

**Tableau 30 :** Effets des substrats étudiés sur la quantité (nombre de copies / ml) des *Archaea* méthanogènes et des protozoaires déterminés par la qPCR après 24 h d'incubation *in vitro*.

Plantes entières	<i>Archaea</i> méthanogènes	Protozoaires
	( $\times 10^5$ copies/ml)	( $\times 10^3$ copies/ml)
Control	8.47 <sup>a</sup>	3.85 <sup>c</sup>
<i>C. pulata</i>	7.51 <sup>a</sup>	4.10 <sup>c</sup>
<i>C. nobile</i>	7.59 <sup>a</sup>	3.11 <sup>c</sup>
<i>C. segetum</i>	9.03 <sup>a</sup>	3.32 <sup>c</sup>
P	0.247	0.054
Extraits	<i>Archaea</i> méthanogènes	Protozoaires
	( $\times 10^5$ copies/ml)	( $\times 10^3$ copies/ml)
ECN	6.74 <sup>a</sup>	2.98 <sup>b</sup>
ECS	5.88 <sup>a</sup>	2.09 <sup>a</sup>
P	0.615	< 0.0001

<sup>a, b, c</sup> : Moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes (P<0,05).



**Figure 37 :** Quantité (nombre de copies/ml) des *Archaea* méthanogènes évaluée par la qPCR en fonction des substrats incubés après 24 h d'incubation *in vitro*.

Dans notre étude, l'augmentation des copies du gène *mcrA* dans le cas de la fermentation du chrysanthème et leur diminution avec les deux autres espèces fourragères comparativement au control demeurent, statistiquement parlant, non significative ( $p > 0.05$ ). La même tendance est enregistrée avec les deux extraits (tableau 31). Il est admis que la production du méthane pourrait être affectée, parmi autres, par une toxicité vis-à-vis la communauté des *Archaea* méthanogènes responsables, en premier lieu de la production du méthane entérique dans le rumen. La composition de la ration et la nature de l'aliment ingéré par l'animal influencent également l'abondance de ladite communauté (Popova *et al.*, 2011). Ces mêmes auteures ont stipulé que la communauté des méthanogènes dans le rumen de bovins était plus riche chez des animaux recevant un aliment fibreux, comparés à des animaux recevant une ration riche en amidon et en sucres solubles.

En fait, selon les résultats présentés dans le tableau 31 révélant l'absence des relations significatives entre le nombre de copies du gène *mcrA* et la composante chimique et phytochimique des substrats étudiés, d'un part, et l'absence du même effet entre la population des *Archaea* et le processus de la méthanogénèse, nous émettons l'hypothèse que la réduction de la production du méthane enregistrée avec *C.nobile* et *C.segetum* et leurs extraits respectifs pourraient être expliquée soit par une baisse dans l'activité métabolique des *Archaea* méthanogènes, soit par un changement dans leur diversité. Kamra *et al.*(2006) rapportent une inhibition totale de la méthanogénèse en présence de 5 mM d'acide bromoéthanesulfonique (BES) sans un effet sur la population des *Archaea* méthanogènes estimée par la qPCR.

De même, Zhou *et al.* (2011) ont conclu que la réduction dans le nombre des *Archaea* méthanogènes ne nécessite pas une réduction significative dans la production du méthane et vice versa, les mêmes auteurs ont stipulé, en appuyant sur les résultats de la PCR-DGGE, que l'activité individuelle de quelques espèces méthanogènes est plus effective sur la production du méthane que l'activité exercée par la totalité de la communauté.

L'augmentation du nombre des copies du gène *mcrA*, même si non significative, accompagnée par une réduction de la production du méthane dans le cas de la fermentation de *C.segetum* est inattendue du fait que cette espèce renferme le taux le plus élevé en fibres pariétaux, de même en phénols totaux, en particulier les tanins condensés réputés, à travers des centaines d'études, avoir un effet antagoniste vis-à-vis la population des *Archaea* méthanogènes dans le rumen.

**Tableau 31:** Coefficients de Corrélation (r) entre la quantité des *Archaea* méthanogènes et des protozoaires et la production des AGV, la production du gaz, du méthane, de l'ammoniac, la digestibilité de la matière organique (DAMO) et la composition chimique et phytochimique des substrats examinés.

	<i>Archaea</i> méthanogènes	Protozoaires
<b>AGVt</b>	-0.048 <sup>ns</sup>	<b>0.451</b> *
<b>C2</b>	-0.008 <sup>ns</sup>	0.189 <sup>ns</sup>
<b>C3</b>	-0.094 <sup>ns</sup>	<b>-0.482</b> *
<b>C4</b>	-0.296 <sup>ns</sup>	-0.007 <sup>ns</sup>
<b>AP</b>	-0.121 <sup>ns</sup>	0.388 <sup>ns</sup>
<b>GT (24h)</b>	<b>-0.418</b> *	0.157 <sup>ns</sup>
<b>CH<sub>4</sub></b>	-0.245 <sup>ns</sup>	<b>0.521</b> *
<b>N-NH<sub>3</sub></b>	0.038 <sup>ns</sup>	<b>0.471</b> *
<b>DMOIV</b>	-0.245 <sup>ns</sup>	0.172 <sup>ns</sup>
<b>MAT</b>	-0.220 <sup>ns</sup>	0.531 <sup>ns</sup>
<b>NDF</b>	-0.109 <sup>ns</sup>	-0.225 <sup>ns</sup>
<b>ADF</b>	0.084 <sup>ns</sup>	-0.426 <sup>ns</sup>
<b>ADL</b>	-0.019 <sup>ns</sup>	0.233 <sup>ns</sup>
<b>NFC</b>	-0.365 <sup>ns</sup>	0.268 <sup>ns</sup>
<b>C</b>	0.090 <sup>ns</sup>	-0.498 <sup>ns</sup>
<b>PT</b>	0.444 <sup>ns</sup>	-0.335 <sup>ns</sup>
<b>FT</b>	0.448 <sup>ns</sup>	0.095 <sup>ns</sup>
<b>TC</b>	-0.441 <sup>ns</sup>	0.178 <sup>ns</sup>

**AGVt** : Acides gras volatils totaux, **C2** : Acétate, **C3** : Propionate, **C4** : Butyrate. **GT** : Gas total (mmol/g MO) ; **DMOIV** : Digestibilité de la matière organique *in vitro* ; **MAT**: Matières azotées totales ; **NDF** : Neutral detergent fiber, **ADF** : Acid detergent fiber, **ADL** : Acid detergent lignin, **NFC**: Non fibrous carbohydrates, **C**, Cellulose, **PT** : Phénols totaux, **FT** : Flavonoïdes totaux, **TC** : Tanins condensés, \* : **P < 0,05**, ns : non significative (**P > 0,05**).

Ce résultat a été déjà rapporté par Min *et al* (2003) ayant observé un effet positif des TCs d'écorce de pin sur certaines populations d'*Archaea* comme *Akkermansia* et *Methanosphaera* et ce quelle que soit la dose (0,17, 1,6 et 3,3% de la MS de la ration) utilisée.

Machmüller *et al.* (2003b) ont conclu que malgré le nombre total des *Archaea* méthanogènes n'a pas été significativement affecté, leur diversité est augmentée, notamment les deux clusters: *Methanosphaera stadtmanae* et *Methanobrevibacter smithii*, cela pourrait être du, selon les mêmes auteurs, à la capacité de ces microorganismes à s'adapter aux

composés aromatiques. Dans le même contexte, Mosoni *et al.*(2011) ont signalé que bien que la défaunation réduisait l'émission de CH<sub>4</sub>, la densité des méthanogènes augmentait 10 fois.

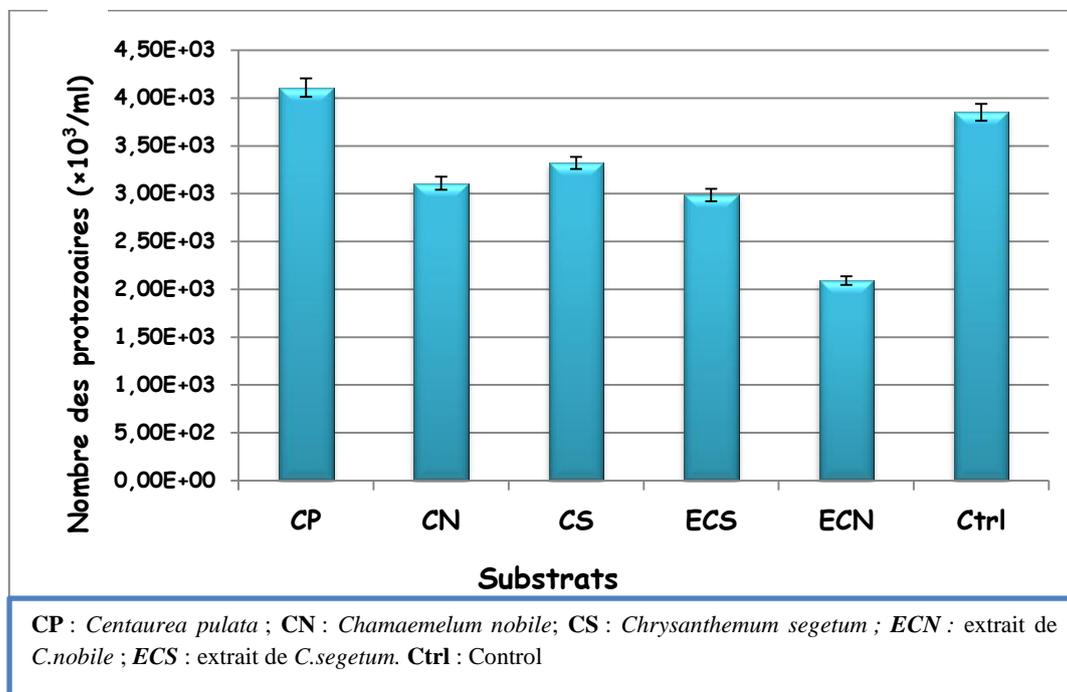
Finalement, il est intéressant de signaler que l'interprétation des résultats obtenus en présence des plantes et/ou des extraits végétaux contenant des molécules bioactives, est difficile en raison de la complexité des structures, ainsi que la possibilité d'interactions entre les différents composants bioactifs et des composants alimentaires. Soltan *et al.* (2012) ont également suggéré que les propriétés antiméthanogéniques potentielles des aliments contenant des métabolites secondaires peuvent être liées non seulement à la teneur en différents composants bioactifs mais aussi à d'autres facteurs.

### **1.2. Impact des substrats étudiés sur la population des protozoaires**

La variation quantitative de la faune ruminale (protozoaires) totale entre les différents substrats est mentionnée dans le tableau 30 et la figure 38. Le nombre des protozoaires totaux est significativement différent entre les deux extraits ( $p < 0,0001$ ) comparativement au control, en contrepartie, aucune différence significative n'est enregistrée entre les espèces fourragères ( $p > 0.05$ ) en se référant, toujours au control. L'incorporation de l'extrait de *C.segetum* se distingue par la diminution la plus importante comparativement à l'extrait de *C.nobile* (23% et 45%, respectivement). Récemment, Boussaâda *et al.* (2018) ont également signalé une diminution dans le nombre de protozoaires totaux par des extraits de feuilles d'*Eucalyptus globulus*.

La diminution du nombre des protozoaires dans les mêmes batch est proportionnelle avec la diminution de la production du méthane, induisant par ainsi une inhibition de la méthanogénèse ruminale. En fait, les protozoaires sont parmi les microorganismes producteurs de l'H<sub>2</sub>, ils occupent une place prépondérante les rendant une cible concrète pour réduire ces émissions de gaz à effet de serre. Cette position est renforcée par leur association physique étroite avec les méthanogènes. Certains de ces derniers peuvent être associés d'une manière intracellulaire (endosymbiose) ou extracellulaire (ectosymbiose) à des protozoaires ciliés. Cette relation symbiotique engendre 40% de la méthanogénèse dans le liquide du rumen (Tokura *et al.*, 1999a). Quand les *Archaea* méthanogènes perdent leur partenaire symbiotique, cette situation entraîne une réduction de leur activité biologique (Kamra *et al.*, 2006). De ce fait, nous supposons que l'inactivation des protozoaires pourrait être

responsable, en partie, de la réduction de la production du méthane dans les systèmes batch supplémenté des deux extraits, du fait que les protozoaires sont des forts producteurs de l'hydrogène, leur relation symbiotique avec les *Archaea* (Transfer interespecies d'hydrogène) diminue l'approvisionnement de ces dernier en H<sub>2</sub> ce qui réduit la production de CH<sub>4</sub> à partir d'une seule molécules de CO<sub>2</sub> et quatre molécule de l'H<sub>2</sub>. L'effet corrélatif positif et significatif entre le nombre des protozoaires et la production du méthane ( $r = 0.521$  ;  $p < 0.05$ , tableau 31) pourrait appuyer ce constat. En fait, il est généralement admis que la perturbation dans la relation symbiotique entre les protozoaires et les *Archaea* méthanogènes dans le rumen provoque une réduction de la production du méthane entérique approximativement de 37% (Finlay *et al.*, 1994).



**Figure 38** : Quantité (nombre de copies/ml) des protozoaires évaluée par la qPCR en fonction des substrats incubés après 24 h d'incubation *in vitro*.

La réduction du nombre des protozoaires dans les batch de fermentation supplémentés des deux extraits après 24h de fermentation est associée proportionnellement à la diminution du taux de l'ammoniac (N-NH<sub>3</sub>). Cette situation est prouvée par l'effet corrélatif significatif entre les deux paramètres ( $r = 0.471$  ;  $p < 0.05$ ), elle pourrait être due à une réduction de l'activité protéolytique des protozoaires comme déjà mentionné plus haut. Soares *et al.* (2008) ont également fait état d'une corrélation positive entre le nombre de protozoaires total et la production d'N-NH<sub>3</sub> dans le rumen de bovins. Le tableau 31 révèle également que la

concentration des protozoaires présente un effet positif sur la production des AGVt ( $r = 0.451$  ;  $p < 0.05$ , tableau 31) ce qui concorde avec la bibliographie, où il est rapporté que l'addition des protozoaires à un rumen défauné a fréquemment un effet positif sur la production d'AGV. La composition molaire est modifiée dans le sens d'une production accrue d'acétate et du butyrate au détriment du propionate (Jouany *et al.*, 1988).

En fait, l'effet corrélatif notable des composé phénoliques sur le processus de la méthanogénèse ruminal et l'absence du même effet, par ailleurs, sur la population des protozoaires et des *Archaea* méthanogènes ( $p > 0.05$ , tableau 31) peut être expliquée par l'effet probable de telles entité chimiques sur d'autres acteurs impliqués indirectement sur le processus de la méthanogénèse ruminale, du fait que la digestion ruminale des fourrages et le processus de la méthanogénèse sont réalisés en grande partie par une symbiose et interactivité entre une population mixte de bactéries, protozoaires et champignons. Un déséquilibre dans la structure et/ou l'activité de l'un des acteurs de cet écosystème pourrait avoir un effet sur l'ensemble des processus ruminiaux.

## Quatrième partie

# Conclusions générales et perspectives

Cette étude, conduite en collaboration entre le centre de recherche en biotechnologie (CRBt) et le département de la médecine vétérinaire et la production animale (DMVPA), université de Federico II, Napoli, Italie, est menée pour évaluer le **potentiel nutritif** et **environnemental** de trois plantes appartenant à la famille des *Asteraceae* collectées de la région de Ibn Ziad, Constantine. Leurs extraits respectifs riches en substances bioactives ont été également étudiés. L'objectif principal assigné à ce travail de recherche est la formulation de régimes alimentaires à base de plantes et/ou de leurs extraits pour, *in fine*, améliorer la qualité et la productivité du cheptel local. La valorisation des ressources fourragères locales comme des alternatives alimentaires est réalisée à travers le contrôle de leur fermentescibilité et leur impact sur l'activité de l'écosystème ruminal *in vitro*. Dans un premier volet et après une phase de screening de sept plantes astéracéennes, trois plantes sont retenues pour l'étude de leur composition chimique, phytochimique et biologique (fermentescibilité *in vitro*,) à savoir : *Chamaemelum nobile*, *Centaurea pullata* et *Chrysanthemum segetum*. Dans un second volet, nous avons effectué des investigations sur l'influence de quelques métabolites secondaires présents dans ces mêmes trois plantes (phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés) sur les différents paramètres fermentaires (production du gaz, production des AGV et protéolyse ruminale) et particulièrement sur le processus de la méthanogénèse ruminale afin de minimiser les effets néfastes des émanations de méthane sur l'environnement. L'effet de ces entités chimiques sur le changement potentiel du profil microbien de rumen a été également investigué. La quantification des *Archaea* méthanogènes et des protozoaires impliqués directement dans le processus de la méthanogénèse ruminale en utilisant la qPCR était d'une grande importance.

Dans une étude préliminaire, deux techniques d'extraction sont testées afin de mettre en évidence leur efficacité sur la quantité des substances bioactives emprisonnées dans la matrice végétale, la macération semble être la plus performante avec un rendement d'extraction proche du 15% versus 11% pour la sonication. *A priori*, les sept plantes récoltées de la région de Ibn Ziad sont investiguées en matière de leurs contenus en composés phénoliques à travers des analyses phytochimiques qualitatives (CLHP) et quantitatives (spectrophotométrie). L'analyse qualitative (analyse des pics) révèle que le chrysanthème présente le profil le plus concentré en composés phénoliques. Ce résultat est confirmé par l'analyse quantitative par spectrophotométrie UV-visible indiquant que cette espèce présente le taux le plus élevé en phénols totaux (plus de 20% de la MS). De ce fait, le classement décroissant des extraits des

plantes sur la base de leurs contenus en composés phénoliques en se basant sur l'analyse qualitative et quantitative est présenté comme suit : *C.segetum* > *C.nobile* > *C.pulata* > *T. Officinale* > *S.jacobaea* > *C.intybus* > *A.clavatus*. Sur la base de ces résultats, les trois premières plantes ont été retenues pour déterminer leurs compositions chimiques et phytochimiques détaillées, leurs profils fermentaires, leurs effets antiméthanogéniques et, enfin, leurs impacts sur la population des méthanogènes et des protozoaires dans le rumen.

Sur la base de leur composition chimique, les plantes prospectées sont une source importante de matière sèche et d'énergie, de niveau intermédiaire entre les concentrés et les fourrages, ce qui indique un potentiel d'utilisation comme fourrage dans les rations du cheptel local. *C.nobile* se caractérisent par un contenu élevé en composés pariétaux particulièrement la cellulose, ce qui nous permet de les catégoriser parmi les aliments grossiers. Elle détient, également une teneur en protéines brutes supérieure du niveau minimum de 7-8% MS requis pour le fonctionnement optimal du rumen (Van Soest, 1994). De ce fait, elle pourrait donc être envisagée comme palliatif au déficit fourrager en période de disette. Elle pourrait être, ainsi incorporée en proportion convenable, en tant que supplément protéique, dans les rations de mauvaise qualité (à faible teneur en N). Comme elle pourrait être utilisée pour combler les déficits en besoins minéraux dans certaines conditions physiologiques.

*C.segetum* ne doit pas être considéré comme une culture fourragère équilibrée car bien qu'il représente une source non négligeable en NFC (source importante d'énergie pour les ruminants) et en fibres pariétales, son teneur en protéines brutes (5% MS) reste insuffisante pour des performances adéquates de production animale. D'où la nécessité de les combiner à une autre source de protéines. La présence conséquente d'une teneur élevée en composés phénoliques peut entraver leur utilisation en tant que fourrage de base. Certains composés phénoliques sont des facteurs antinutritionnels, susceptibles d'avoir d'éventuels effets néfastes sur la fermentation microbienne des aliments dans le rumen.

*C.pulata*, quant à elle, peut être classée parmi les fourrages riches en énergie, ce qui permet également de promouvoir cette espèce comme supplément pouvant améliorer les rations de base comme les pailles ou les foin généralement distribuées aux ruminants par les éleveurs locaux, surtout pendant les périodes de sécheresse.

Il est peut être difficile de suggérer l'utilisation de ces plantes fourragères comme constituant optimal des rations alimentaires uniquement sur la base de leur composition chimique. Leur caractéristiques nutritionnelles ont été également évaluées à travers leur fermentation *in vitro* comparativement à un aliment de référence composé d'une mixture de

fouillage et de concentré (70-30 %). En fait, l'évaluation de la fermentescibilité *in vitro* de nos substrats (parties aériennes et extraits) par le microbiote ruminal nous a permis dans un premier temps d'éliminer les résultats obtenus à l'issue de la fermentation *in vitro* de l'extrait de *C.pulata* qui s'est avéré très peu satisfaisants. En effet, malgré un statut nutritionnel très intéressant de la plante d'orig

ine, il s'est avéré très mal fermentée par le microbiote ruminal pour des causes qui restent inconnues.

Les résultats de la production du gaz *in vitro* montrent que tous les substrats sont dégradés par le microbiote ruminal. Globalement, il s'est avéré que *C. pullata* est la plus fermentescible comparativement au substrat de référence et autres substrats. Ce qui peut s'expliquer par une fraction pariétale hautement digestible, particulièrement leur contenu élevé en sucres fermentescibles (NFC). *C.segetum* s'est avéré, cependant, le moins fermenté par le microbiote ruminal, cela peut être attribué à leur contenu fibreux élevé et /ou à la présence d'une teneur importante en composés phénoliques (20% MS) connus par leurs actions antagonistes vis-à-vis les molécules nutritives et des enzymes microbiens (Edwards *et al.*, 2012). La classification des plantes sur la base des résultats de la production de gaz est la suivante : *C.pulata* > *L'aliment de référence* > *ECN* > *ECS* > *C.nobile* > *C.segetum*. En fait, par référence aux valeurs des coefficients de Pearson obtenues dans cette étude, la fraction phénolique est négativement corrélée à la production de gaz total ( $P < 0,05$ ) après 24 h de fermentation. Les tanins condensés ne présentent, néanmoins, aucun effet notable sur ledit processus. Ceci pourrait s'expliquer soit par un effet non significatif de ces substances actives présentes en faibles quantités ( $< 50$  g/kg MS) et une adaptation consécutive du microbiote ruminal à cette situation (**aspect quantitatif**), soit par l'existence d'autres métabolites secondaires non rapportés dans notre étude (phénoliques ou non-phénoliques) ayant un effet antagoniste sur la fermentation ruminale (**aspect qualitatif**). La même tendance est enregistrée pour les flavonoides.

Les essais de digestibilité *in vitro* de la MO concordent avec les résultats de la production de gaz *in vitro* ( $r= 0,409$  ;  $P < 0,05$ ). *C.pulata* s'est avérée la plus digestible, *C.nobile* et *C.segetum* ainsi que leurs extraits ne présentent aucun effet négatif sur la digestibilité apparente de la matière organique après 24h de fermentation *in vitro*. Malgré ils présentent des valeurs de digestibilités inférieures à celles du témoin, elles restent dans l'intervalle des valeurs observées avec d'autres cultures fourragères conventionnelles (Batista *et al.*, 2003). D'une manière générale, les taux de la digestibilité apparente enregistrés dans notre

étude n'apparaissent pas être un facteur limitant pour leur utilisation dans la formulation des régimes alimentaires au profit des ruminants.

L'étude du profil fermentaire a démontré que les trois plantes fourragères, le standard et les deux extraits enregistrent des concentrations en azote ammoniacal supérieures à la concentration rapportée par Boniface *et al.* (1986). *C. pullata* se caractérise également par la production la plus élevée de l' $\text{N-NH}_3$ , ce qui mène consécutivement à une augmentation de la protéolyse ruminale et augmentation de la charge microbienne (BM). La forte corrélation enregistrée entre les matières azotées totales et l'azote ammoniacal ( $r = 0.612$ ,  $p < 0.05$ ) appuie l'hypothèse d'une bonne dégradabilité des matières azotées totales des substrats étudiés. La production des AGV totaux est significativement différente entre les trois plantes fourragères. Similairement aux résultats de la production du gaz et de l' $\text{N-NH}_3$ , *C. pulata* se différencie aussi par une production accrue en AGV avec une prédominance de l'acide acétique. Les ratios acétate/propionate (1.91 et 3.70) sont du même ordre que les ratios rapportés dans la littérature considérés comme appréciables pour une bonne activité fermentaire (Sauvant *et al.*, 2011). Ce qui indique notamment une proportion élevée en NDF digestible dans les aliments et un effet positif sur le métabolisme énergétique global.

L'aspect environnemental de notre recherche est investigué à travers le suivie de la production du méthane *in vitro*. Il est essentiellement renforcé par l'utilisation de l'outil de la biologie moléculaire en étudiant deux acteurs microbiens impliqués directement dans le processus de la méthanogénèse ruminale à savoir : les protozoaires et les *Archaea* méthanogènes. Les résultats obtenus ont révélé que, hormis *C. pulata*, *C. nobile* et *C. segetum* ainsi que leurs extraits respectifs ont induit une baisse de la production de  $\text{CH}_4$  *in vitro*. L'action inhibitrice des extraits ECN et ECS (-39.10 et -50.20%, respectivement) sur le  $\text{CH}_4$  est plus prononcée que celle de leurs plantes d'origine ( $R' = -24.3$  et  $-27.1\%$ , respectivement). L'absence d'effet toxique des substrats étudiés sur la population des méthanogènes simultanément à une diminution de la production de  $\text{CH}_4$  pourrait être due à un effet sur la diversité de cette population et/ou de son activité (Tavendale *et al.*, 2005 ; Popova *et al.*, 2011). Nos travaux montrent donc qu'il n'existe pas de lien étroit entre la quantité de  $\text{CH}_4$  produit et le nombre des *Archaea* méthanogènes dans le rumen. Ces résultats suggèrent également que les méthanogènes s'adaptent aux différentes conditions ruminales qui leur sont proposées, particulièrement la présence des substances antinutritionnels. Ils seraient capables de se maintenir dans un état de latence.

La diminution du nombre de copie du gène ADNr 18S dans les batch de fermentation des deux extraits est proportionnelle à la production du méthane *in vitro* ( $r= 0.521$ ,  $p < 0.05$ ). La diminution de leur nombre affecte leur relation symbiotique avec les *Archaea* méthanogènes. Étant donné que les protozoaires sont des forts producteurs de l'hydrogène, leur relation symbiotique avec les *Archaea* (Transfer interespecies d'hydrogène) diminue l'approvisionnement de ces dernier en H<sub>2</sub> ce qui réduit la production de CH<sub>4</sub>.

Il est admis qu'une réduction de 25% du méthane digestif ne perturbe pas les fonctions digestives ou fermentaires essentielles du rumen. Au-delà, une réduction de la méthanogénèse ne peut être envisagée que si l'hydrogène est incluse dans d'autres voies métaboliques. Dans notre étude, l'augmentation de la propionogénèse au détriment de et la méthanogénèse ainsi que l'augmentation de la biomasse microbienne (BM) confirme la bonne voie d'utilisation de de l'H<sub>2</sub> ruminal, et par conséquent, un écosystème microbien équilibré et synchronisé. Le bilan d'hydrogène calculé à partir des quantités des AGV et du méthane produites *in vitro* confirme cette hypothèse. En fait, l'effet corrélatif notable des composé phénoliques sur le processus de la méthanogénèse ruminal et l'absence du même effet, par ailleurs, sur la population des protozoaires et des *Archaea* méthanogènes peut être expliqué par l'effet probable de telles entité chimiques sur d'autres acteurs impliqués indirectement sur le processus de la méthanogénèse ruminale, du fait que la digestion ruminale des fourrages est réalisée en grande partie par une symbiose entre une population mixte de bactéries, protozoaires et champignons.

De ce qui précédé, en combinant les deux approches (nutritionnelle et environnementale), nous pouvons conclure le suivant :

- *Centaure pulata* présente une qualité nutritionnelle très appréciable, cependant son effet sur la réduction des émissions atmosphérique est quasi absent, ainsi son utilisation en tant que fourrage de base pourrait être l'origine de nombreux problèmes principalement l'acidose, ce qui la fait un complément énergétique au fourrage de base de mauvaise qualité. Son incorporation devrait être faite, cependant avec précaution et en proportion bien définit.
- *Chamaemelum nobile* détient une bonne qualité nutritionnelle, son efficacité dans l'inhibition de la production de CH<sub>4</sub> *in vitro* sans effets indésirables sur les paramètres fermentaires et la digestibilité est démontrée à travers les différents essais *in vitro*. L'utilisation de son extraits présente, cependant une clé de contrôle **plus avantageuse**

et **prometteuse** que la plante d'origine, en vue de leur efficacité pour atténuer la production de CH<sub>4</sub> et de réguler le fonctionnement du rumen. De ce fait, leur usage dans l'alimentation animale pourrait être envisagé comme supplément dans certains blocs nutritionnels. La même tendance est notée pour l'extrait de *C. segetum*.

- ***Chrysanthemum segetum*** est d'une qualité nutritionnelle pauvre, le taux élevé en substance bioactives et la faible teneur en protéines suggère sa valorisation comme source naturelle de substances bioactives mais faiblement recommandée comme aliment pour bétail.

L'utilisation des extraits de la camomille noble et du chrysanthème en tant que des additifs alimentaire pour lutter contre le dilème de l'effet de serre est fortement recommandée du fait que le développement du marché des extraits de plantes dans le secteur de l'alimentation animale est en forte progression dans le monde. Ce développement s'explique d'une part, parce qu'ils constituent une alternative naturelle aux antibiotiques facteurs de croissance interdits dans l'UE depuis 2006 et, d'autre part, en raison de leurs effets sur les performances de production, la qualité des produits, la santé et le bien-être des animaux et du consommateur.

Enfin, il semble très important de conduire un complément d'études *in vivo* du fait qu'il est difficile d'extrapoler les résultats prometteurs de l'inhibition de la méthanogénèse *in vitro* aux conditions *in vivo*. Le screening d'une vaste gamme de plantes fourragères disponibles en Algérie serait beaucoup plus efficace si leurs fractions phénoliques et terpéniques seraient dosées et identifiées en basant sur des techniques avancées de la chimie analytique comme la RMN, l'CLHP-MS/MS...Etc. Bien que la majorité des études dans le monde aient démontré l'effet des saponines, des flavonoïdes et des tanins sur la méthanogénèse ruminale, nous proposons dans des études supplémentaires d'investiguer l'effet probable de certains sesquiterpènes lactones et des coumarines sur ledit processus, du fait que les plantes étudiées dans notre thèse sont riches d'un part, et la quasi-absence des études révélant leur activité sur les processus fermentaires dans le rumen d'autre part.

D'un point de vue méthodologique, l'approche de biologie moléculaire nous a permis d'avoir un regard global et rapide sur les deux communautés microbiennes impliquées dans le processus de la méthanogénèse. Toutefois, une étude plus approfondie des fonctions du microbiote ruminal par des technologies récentes (-omiques-) seraient intéressantes pour élargir notre compréhension des mécanismes impliqués dans la production du méthane entérique ainsi que les autres processus fermentaires apparentés.

# Références bibliographiques

**A**

- **Abdelguerfi**, A., Laouar, M. et M'hammedi-Bouzina, M., 2008. Les productions fourragères et pastorales en Algérie: Situation et possibilités d'amélioration. *Revue Agriculture et développement*, 6, pp. 14-25.
- **Abdou Bouba**, A., Njintang Yanou, N., Foyet, H., Scher, J., Montet, D. and Mbofung, C.M., 2012. Proximate composition, mineral and vitamin content of some wild plants used as spices in Cameroon. *Food and Nutrition Sciences*, 3(4), pp.423-432.
- **Abdulrazak**, S.A., Fujihara, T., Ondiek, J.K. and Ørskov, E.R., 2000. Nutritive evaluation of some *Acacia* tree leaves from Kenya. *Animal Feed Science and Technology*, 85(1-2), pp.89-98.
- **Abebe**, A., Tolera, A., Holand, Ø., Ådnøy, T. and Eik, L.O., 2012. Seasonal variations in nutritive value of some browse and grass species in Borana rangeland, Southern Ethiopia. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(2).p.261-271.
- **Adinortey**, M.B., Sarfo, J.K., Ouayson, E.T., Weremfo, A., Adinortey, C.A., Ekloh, W. and Ocran, J., 2012. Phytochemical Screening, Proximate and Mineral Composition of *Launaea taraxacifolia* Leaves. *Research Journal of medicinal Plants*, 6(2).pp.171-179.
- **Akin**, D.E. and Benner, R., 1988. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(5), pp.1117-1125.
- **Albert**, A., Sareedenchai, V., Heller, W., Seidlitz, H.K. and Zidorn, C., 2009. Temperature is the key to altitudinal variation of phenolics in *Arnica montana* L. *Oecologia*, 160(1), pp.1-8.
- **Al-Masri**, M.R., 2011. Evaluation of some drought-tolerant native range plants in terms of their nutritive components and *in vitro* digestible organic matter and metabolizable energy. *Tropical Agriculture (Trinidad)*, 88, pp.61-68.
- **Al-Masri**, M.R., 2013. Nutritive evaluation of some native range plants and their nutritional and anti-nutritional components. *Journal of applied animal research*, 41(4), pp.427-431.
- **Al-Soqeer**, A.A., 2008. Nutritive value assessment of *Acacia* species using their chemical analyses and *in vitro* gas production technique. *Research Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4, pp.688-694.
- **Amarteifio**, J.O. and Moholo, D., 1998. The chemical composition of four legumes consumed in Botswana. *Journal of Food Composition and Analysis*, 11(4), pp.329-332.

- **Ammar**, H., Lopez, S. and González, J.S., 2005. Assessment of the digestibility of some Mediterranean shrubs by in vitro techniques. *Animal feed science and technology*, 119(3-4), pp.323-331.
- **Andrade-Montemayor**, H.M., Cordova-Torres, A.V., García-Gasca, T. and Kawas, J.R., 2011. Alternative foods for small ruminants in semiarid zones, the case of Mesquite (*Prosopis laevigata* spp.) and Nopal (*Opuntia* spp.). *Small Ruminant Research*, 98(1), pp.83-92.
- **Andrieu**, J., et Weiss Ph., 1981. Prévion de la digestibilité et de la valeur énergétique des fourrages verts de graminées et de légumineuses. In : Andrieu J., Demarquilly C. and Wegat-Litre, E (eds.). Prévion de la valeur nutritive des aliments des ruminants, pp.61-79. INRA Edition. Paris, France. *Animal Feed Science and Technologie*. 106, pp.3–19.
- **Animut**, G., Puchala, R., Goetsch, A.L., Patra, A.K., Sahl, T., Varel, V.H. and Wells, J., 2008. Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. *Animal Feed Science and Technology*, 144(3-4), pp.212-227.
- **AOAC**, 1990. Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, Ed, William. Horwitz. Washington, USA.
- **Apori**, S.O., Castro, F.B., Shand, W.J. and Ørskov, E.R., 1998. Chemical composition, in sacco degradation and in vitro gas production of some Ghanaian browse plants. *Animal Feed Science and Technology*, 76(1-2), pp.129-137.
- **Aregheore**, E.M., 2000. Chemical composition and nutritive value of some tropical by-product feedstuffs for small ruminants *in vivo* and *in vitro* digestibility. *Animal Feed Science and Technology*, 85(1-2), pp.99-109.
- **Arhab**, R., 2006. Étude de la fermentescibilité *in vitro* et de la digestibilité *in vivo* de végétaux des zones arides et de sous-produits de l'agronomie saharienne par l'estimation de l'activité métabolique du microbiote ruminale d'ovins. Thèse de doctorat, option : Biochimie appliquée. Université des frères Mentouri 1, Constantine, Algerie. p.124.
- **Arhab**, R., Macheboeuf, D., Aggoun, M., Bousseboua, H., Viala, D. and Besle, J.M., 2009. Effect of polyethylene glycol on in vitro gas production and digestibility of tannin containing feedstuffs from North African arid zone. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(3).pp.475-486.
- **Athanasiadou**, S., Kyriazakis, I., Jackson, F. and Coop, R.L., 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology*, 99(3), pp.205-219.

- **Avula**, B., Wang, Y.H., Wang, M., Avonto, C., Zhao, J., Smillie, T.J., Rua, D. and Khan, I.A., 2014. Quantitative determination of phenolic compound by UHPLC-UV-MS and use of partial least-square discriminant analysis to differentiate chemo-types of *Chamomile/Chrysanthemum* flower heads. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 88, pp.278-288.
- **Azzini**, E., Maiani, G., Garaguso, I., Polito, A., Foddai, M.S., Venneria, E., Durazzo, A., Intorre, F., Palomba, L., Rauseo, M.L. and Lombardi-Boccia, G., 2016. The potential health benefits of polyphenol-rich extracts from *Cichorium intybus* L. studied on Caco-2 cells model. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 25, pp.1-9.

## **B**

- **Bach**, A., Calsamiglia, S. and Stern, M.D., 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of dairy science*, 88, pp.E9-E21.
- **Balch**, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R., & Wolfe, R. S., 1979. Methanogens : reevaluation of a unique biological group. *Microbiological reviews*, 43, pp.260-296.
- **Bannink**, A., Kogut, J., Dijkstra, J., France, J., Kebreab, E., Van Vuuren, A.M. and Tamminga, S., 2006. Estimation of the stoichiometry of volatile fatty acid production in the rumen of lactating cows. *Journal of Theoretical Biology*, 238(1), pp.36-51.
- **Barkely**, T.M., Brouillet, L. and Strother, J.L., 2006. Flora of North America(*Asteraceae*). Ed, Flora of North America Éditorial Committee. Oxford and New York: Oxford University Press. pp. 3-69.
- **Barman**, K. and Rai, S.N., 2008. *In vitro* nutrient digestibility, gas production and tannin metabolites of *Acacia nilotica* pods in goats. *Asian australasien journal of animal sciences*, 21(1), pp.59-65.
- **Batista**, A. M. V., Mustafa, A. F., Santos, G. R. A., De Carvalho, F. F. R., B. Dubeux Jr, J. C., Lira, M. A. and Barbosa, S. B. P., 2003. Chemical composition and ruminal dry matter and crude protein degradability of spineless cactus. *Journal of Agronomy and crop Science*, 189(2), pp.123-126.
- **Bauchop**, T., 1981. The anaerobic fungi in rumen fibre digestion. *Agriculture and Environment*, 6(2-3), pp.339-348.

- **Bayourthe**, C. and Ali-Haimoud-Lekhal, D., 2014. Les extraits de plantes chez le ruminant: effets sur les fermentations dans le rumen et la qualité lipidique des produits animaux. *INRA Production. Animale*, 27(4), pp.317-328.
- **Beauchemin**, K.A., McGinn, S.M., Martinez, T.F. and McAllister, T.A., 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 85(8), pp.1990-1996.
- **Beauchemin**, K. A., Kreuzer, M., O'mara, F., & McAllister, T. A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Animal Production Science*, 48, pp. 21-27.
- **Beever**, D.E. 1993. Rumen fonction. In : Forbs, J.M and France, J.France. (eds.).Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism, pp. 256-261.Wallingford.UK.
- **Beniston**, N.T. and Beniston, W.S., 1984. Flore d'Algérie. Ed, entreprise Nationale du livre. Algerie, p.99
- **Bernalier**, A., Fonty, G. and Gouet, P., 1991. Cellulose degradation by two rumen anaerobic fungi in monoculture or in coculture with rumen bacteria. *Animal Feed Science and Technology*, 32(1-3), pp.131-136.
- **bernez**, i., Daniel, h. and Haury, j., 2001. Étude des variations des communautés végétales aquatiques sous l'effet de perturbations anthropiques en rivière régulée. *bulletin francais de la pêche et de la pisciculture*, (357-360), pp.169-189.
- **Beuvink**, J.M.W. and Spoelstra, S.F., 1992. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(4), pp.505-509.
- **Bhatta**, R., Uyeno, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Yabumoto, Y., Nonaka, I., Enishi, O. and Kurihara, M., 2009. Difference in the nature of tannins on *in vitro* ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic *Archaea* and protozoal populations. *Journal of Dairy Science*, 92(11), pp.5512-5522.
- **Blain**, J.C., 2002. Introduction à la nutrition des animaux domestiques. Technique et Documentation. pp.425.
- **Blümmel**, M. and Ørskov, E.R., 1993. Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 40(2-3), pp.109-119.

- **Blümmel**, M. and Becker, K., 1997. The degradability characteristics of fifty-four roughages and roughage neutral-detergent fibres as described by *in vitro* gas production and their relationship to voluntary feed intake. *British Journal of Nutrition*, 77(5), pp.757-768.
- **Blümmel**, M., Makkar, H.P.S. and Becker, K., 1997. *In vitro* gas production: a technique revisited. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 77(1-5), pp.24-34.
- **Blümmel**, M., Aiple, K.P., Steingäß, H. and 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. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 81(3), pp.157-167.
  
- **Bobe**, G., Young, J.W. and Beitz, D.C., 2004. Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *Journal of dairy science*, 87(10), pp.3105-3124.
- **Bodas**, R., López, S., Fernandez, M., García-González, R., Rodríguez, A.B., Wallace, R.J. and González, J.S., 2008. *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), pp.245-258.
- **Bodas**, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F.J. and López, S., 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1-4), pp.78-93.
- **Boniface**, A.N., Murray, R.M. and Hogan, J.P., 1986. Optimum level of ammonia in the rumen liquor of cattle fed tropical pasture hay. In *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*, 16, p. 151-154.
- **Bouallala**, M., Chehma, A., and Hamel, F., 2013. Evaluation de la valeur nutritive de quelques plantes herbacées broutées par le dromadaire dans le sahara nord-occidental algérien. *Lebanese Science Journal*. 14 (1): pp.33-39.
  
- **Boussaâda**, A., Arhab, R., Calabrò, S., Grazioli, R., Ferrara, M., Musco, N., Thlidjane, M. and Cutrignelli, M. I., 2018. Effect of *Eucalyptus globulus* leaves extracts on *in vitro* rumen fermentation, methanogenesis, degradability and protozoa population. *Annales of animal sciences*. 6 : pp. 1-29.
- **Bouazza**, L., Bodas, R., Boufennara, S., Bousseboua, H. and Lopez, S., 2012. Nutritive evaluation of foliage from fodder trees and shrubs characteristic of Algerian arid and semi-arid areas. *Journal of animal and feed sciences*, 21(3).pp.521-536.

- **Bouazza, L.**, 2014. Étude de la valeur nutritive de légumineuses arbustives du genre *Acacia*. : Effets spécifiques de leurs hautes teneurs en tannins condensés sur la méthanogénèse ruminale d'ovins. Thèse de doctorat, option : Biotechnologies végétales. Université des frères Mentouri1, Constantine, Algérie. p.125.
- 
- **Boubaker, A.**, Buldgen, A. and Kayouli, C., 2005. Composition chimique et teneur en composés phénoliques des espèces arbustives du Nord-Ouest de la Tunisie. *Ferchichi A.(comp.), Ferchichi A.(collab.)*. Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens. *Options Méditerranéennes*, 62, pp.315-317.
- **Boufennara, S.**, Lopez, S., Bousseboua, H., Bodas, R. and Bouazza, L., 2012. Chemical composition and digestibility of some browse plant species collected from Algerian arid rangelands. *Spanish journal of agricultural Research*, 10(1), pp.88-98.
- **Boufennara, S.**, Bouazza, L., Lopez, S., Bousseboua, H. and Bodas, R., 2013. Effect of polyethylene glycol addition on methane production from some Algerian browse plant species in an *in vitro* gas system. *Options Méditerranéennes*, 107, pp.283-287.
- **BOURGOU, S.**, Beji, R. S., Medini, F. and Ksouri, R., 2016. Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of New Sciences*, 28 (12).pp.1-7.
- **Boutaghane, N.**, 2013. Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales Algériennes *Genista ulicina* Spach (*Fabaceae*) et *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (*Asteraceae*).Thèse de doctorat, option : chimie pharmaceutique. Université des frères Mentouri 1, Constantine, Algérie. p.31.
- **Broudiscou, L.P.** and Lassalas, B., 2000. Effects of *Lavandula officinalis* and *Equisetum arvense* dry extracts and isoquercitrin on the fermentation of diets varying in forage contents by rumen microorganisms in batch culture. *Reproduction Nutrition Development*, 40(5), pp.431-440.
- **Broudiscou, L.P.**, Papon, Y. and Broudiscou, A.F., 2000. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology*, 87(3-4), pp.263-277.
- **Broudiscou, L.P.**, Papon, Y. and Broudiscou, A.F., 2002. Effects of dry plant extracts on feed degradation and the production of rumen microbial biomass in a dual outflow fermenter. *Animal Feed Science and Technology*, 101(1-4), pp.183-189.

- **Bruneton, J.**, & Pharmacognosy, P. (1995). Medicinal Plants. Ed, Intercept, Andover, UK, pp. 691-693.

## C

- **Cabiddu, A.**, Decandia, M., Sitzia, M. and Molle, G., 2000. A note on the chemical composition and tannin content of some Mediterranean shrubs browsed by Sarda goats. *Options méditerranéennes*, 52, pp.175-178.
- **Carazzone, C.**, Mascherpa, D., Gazzani, G. and Papetti, A., 2013. Identification of phenolic constituents in red chicory salads (*Cichorium intybus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 138(2-3), pp.1062-1071.
- **Carjot, A.N.**, 2013. Étude de la corrélation entre l'efficacité alimentaire et l'analyse des résidus de bouses chez les vaches laitières nourries avec une ration totale mélangée. Thèse de doctorat en médecine vétérinaire. Université de Claude Bernard, Lyon. France. p. 37.
- **Carnat, A.**, Carnat, A. P., Fraisse, D., Ricoux, L., & Lamaison, J. L., 2004. The aromatic and polyphenolic composition of Roman camomile tea. *Fitoterapia*, 75(1), pp.32-38.
- **Carulla, J.E.**, Kreuzer, M., Machmüller, A. and Hess, H.D., 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian journal of agricultural research*, 56(9), pp.961-970.
- **Case, R.J.**, Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W.F. and Kjelleberg, S., 2007. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and environmental microbiology*, 73(1), pp.278-288.
- **ChaichiSemsari, M.**, MaheriSis, N., Sadaghian, M., Eshratkhah, B. and Hassanpour, S., 2011. Effects of administration of industrial tannins on nutrient excretion parameters during naturally acquired mixed nematode infections in Moghani sheep. *Journal of American Science*, 7(6), pp.245-248.
- **Chang, S.C.**, Lee, M.S., Li, C.H. and Chen, M.L., 1995. Dietary fibre content and composition of vegetables in Taiwan area. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 4, pp.204-210.
- **Chehma, A.**, 2005- Étude floristique et nutritive des parcours camelins du Sahara septentrional algérien. Cas de la région d'Ouargla et Ghardaïa. Thèse doctorat, option : Biologie appliquée. Annaba. Algérie. p.178.

- **Chehema**, A. and Youcef, F., 2009. Variations saisonnières des caractéristiques floristiques et de la composition chimique des parcours sahariens du Sud-Est algérien. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 20(4), pp.373-381.
- **Chehema**, A., Faye, B. and Bastianelli, D., 2010. Valeurs nutritionnelles de plantes vivaces des parcours sahariens algériens pour dromadaires. *Fourrages*. 204, pp.263-268
- **Chentli**, A., Gillmann, L., Bouazza, L., Medjkal, S., Limami, A. M., Le Paven, M.C.M., and Bousseboua, H. 2014. Effects of secondary compounds from cactus and acacias trees on rumen microbial profile changes performed by Real-Time PCR. *International Journal of Advanced Research*, 2, pp.660-671.
- **Chevalier**, A., 1997. Notes Historiques sur l'origine du Chrysanthème d'automne. *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale*, 17(195), pp.804-813.
- **Chevalier**, F.H. 2001. La digestion ruminale des amidons : cinétique et application. Thèse de doctorat en médecine vétérinaire, Toulouse, France. pp. 65-82.
- **Chibani** C, Chabaca R et Boulberhane D 2010 Fourrages algériens. 1. Composition chimique et modèles de prédiction de la valeur énergétique et azotée. *Livestock Research for Rural Development*, 28 (8). <http://www.lrrd.org/lrrd22/8/chab22153.htm>
- **Cieslak**, A., Zmora, P., Pers-Kamczyc, E. and Szumacher-Strabel, M., 2012. Effects of tannins source (*Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation *in vivo*. *Animal feed science and technology*, 176(1-4), pp.102-106.
- **Clarke**, R. T. J., 1977. The gut and its micro-organisms. In: Clarke, R. T. J., Bauchop, T. (eds.). *Microbial ecology of the gut*, pp. 36-71. Academy Press, New York, USA.
- **Clémont**, D, 2014. La digestion ruminale : mise en place d'un modèle d'étude *in vitro* à long terme en culture batch. Thèse de doctorat en médecine vétérinaire, Toulouse, France. pp.50-58.
- **Cone**, J.W., van Gelder, A.H., Visscher, G.J. and Oudshoorn, L., 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Animal Feed Science and Technology*, 61(1), pp.113-128.
- **Cowan**, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), pp.564-582.
- **Cushnie**, T.T. and Lamb, A.J., 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 38(2), pp.99-107.

- **Cuvelier**, C., Cabaraux, J.F., Dufrasne, I., Istasse, L. and Hornick, J.L., 2005. Production, digestion et absorption des acides gras chez le ruminant. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 149 (1), pp. 49-59.

## D

- **Daccord**, R., 2005. Digestion chez les ruminants et digestibilité des fourrages. *Tagungsbericht*, 13, pp.98-110.
- **Dambe**, L.M., Mogotsi, K., Odubeng, M. and Kgosikoma, O.E., 2015. Nutritive value of some important indigenous livestock browse species in semi-arid mixed Mopane bushveld, Botswana. *Livestock Research for Rural Development*, 27(10). <http://www.lrrd.org/lrrd27/10/mogo27209.htm>
- **Dang Vana**, Q.C., M. Focanta, M., Froidmontb, E. and Larondellea, Y.2013. Influence de la structure de la ration et de la supplémentation lipidique sur la qualité nutritionnelle de la matière grasse du lait. *Carrefour Productions animales*, 29, pp.98-104.
- **Davis**, P.H., Mill, R.R., Tan, K., 1988. *Centaurea* L. In: Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K. (Eds). *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*, 10, pp.489-501. Edinburgh University Press, Edinburgh, Ecosse, UK.
- **de Oliveira**, S.G., Berchielli, T.T., dos Santos Pedreira, M., Primavesi, O., Frighetto, R. and Lima, M.A., 2007. Effect of tannin levels in sorghum silage and concentrate supplementation on apparent digestibility and methane emission in beef cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 135(3-4), pp.236-248.
- **Dehority**, B. A., 2003. *Rumen microbiology*. Ed, Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- **Delteil**, L., 2012. *Nutrition et alimentation des animaux d'élevage* (3<sup>ème</sup> édition). Ed, Educargi, Dijon, France. p.286.
- **Demarquilly**, C. and Andrieu, J., 1992. Composition chimique, digestibilité et ingestibilité des fourrages européens exploités en vert. *INRA Productions animales*, 5(3), pp.213-221.
- **Demeyer**, D.I., 1991. "Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut". In: Jouany, J.P. (Eds). *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*, pp.217-237. INRA Edition, Paris, France.
- **Demeyer**, D. and Fievez, V., 2000, March. Ruminants et environnement: la méthanogenèse. , *Annales de zootechnie*, 49 (2), pp. 95-112.

- **Denman**, S.E. and McSweeney, C.S., 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS microbiology ecology*, 58(3), pp.572-582.
- **Denman**, S.E., Tomkins, N.W. and McSweeney, C.S., 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS microbiology ecology*, 62(3), pp.313-322.
- **Djeddi**, S., Chatter, R., Karioti, A., Argyropoulou, C., Kharrat, R. and Skaltsa, H., 2008(a). Analgesic activity of secondary metabolites from two *Centaurea* species. *Planta Medica*, 74(09), pp.2876-2880.
- **Djeddi**, S., Karioti, A., Sokovic, M., Koukoulitsa, C. and Skaltsa, H., 2008 (b). A novel sesquiterpene lactone from *Centaurea pullata*: Structure elucidation, antimicrobial activity, and prediction of pharmacokinetic properties. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(7), pp.3725-3731.
- **Djemouai**, K.2009. L'Algerie et le processus des changements climatiques. Rapport interministériel sur les changements climatiques, convention cadre des nations unies sur les changements climatiques (UNFCCC). Plan d'action de Bali (1/CP.13).
- **Djermane**, N., Arhab, R., Khellaf, R.,and Djellid, Y.2017. Influence of the Flavonoic Contents of Taraxacum officinale and Anacyclus clavatus on Ruminant Methane Production in Batch System. *Open Veterinaria*. 8 (4): pp.305-314
- **Dogan**, Y., 2012. Traditionally used wild edible greens in the Aegean Region of Turkey. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 81(4), pp.329.
- **Doreau**, M., Martin, C., Eugène, M., Popova, M., & Morgavi, D. P., 2011. Leviers d'action pour réduire la production de méthane entérique par les ruminants. *Productions Animales*, 24, pp.461-474.
- **Dostál**, J., 1973. Preliminary notes on the subtribe *Centaureinae*. *Acta botanica Academiae Scientiarum Hungaricae* 19: pp. 73–79.
- **Dudouet**, C., 1999. La production des bovins allaitant. Ed, France Agricole. p.395.
- **Dupont**, F. and Guignard, J.L., 2012. Botanique: Les familles des plantes. Ed, Elsevier Health Sciences. Paris. p.254.
- **Durmic**, Z., Hutton, P., Revell, D.K., Emms, J., Hughes, S. and Vercoe, P.E., 2010. *In vitro* fermentative traits of Australian woody perennial plant species that may be considered as potential sources of feed for grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 160(3-4), pp.98-109.

## E

- **Edenharder**, R. and Grünhage, D., 2003. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 540(1), pp.1-18.
- **Edwards**, J.E., Huws, S.A., Kim, E.J. and Kingston-Smith, A.H., 2007. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(3), pp.323-335.
- **El Mokni**, R. and El Aouni, M.H., 2011. Découverte de la grande camomille, *Tanacetum parthenium* (Asteraceae) pour la flore de Tunisie: Une adventice naturalisé. *Flora Mediteranea*, 21, pp.299-303.
- **El-Amier**, Y.A. and Abdullah, T.J., 2015. Evaluation of nutritional value for four kinds of wild plants in Northern sector of Nile Delta, Egypt. *Open Journal of Applied Sciences*, 5(07), pp.393-402.
- **Escudero**, N.L., De Arellano, M.L., Fernández, S., Albarracín, G. and Mucciarelli, S., 2003. Taraxacum officinale as a food source. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58(3), pp.1-10.
- **Eugène**, M., Archimede, H. and Sauvant, D., 2004. Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. *Livestock Science*, 85(1), pp.81-97.
- **Ezeagu**, I.E. and Ibegbu, M.D., 2010. Biochemical composition and nutritional potential of ukpa: a variety of tropical lima beans (*Phaseolus lunatus*) from Nigeria-a short report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 60(3).pp.231-235.

## F

- **Faichney**, G.J., 1995. Transit des digesta dans le tube digestif des ruminants. In : Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farc,e M.H., Journet, M. (eds.). Nutrition des ruminants domestiques. Ingestion et digestion, pp. 431-464 .INRA Edition, Paris, France.
- **Faiku**, F., Haziri, A., Domezeti, B. and Mehmeti, A., 2012. Total lipids, proteins, minerals and essential oils of Tussilago farfara (l.) from south part of Kosova. *European Journal of Experimental Biology*, 2(4), pp.1273-1277.
- **Falkowski**, M., Kukula, I., Kozlowski, S., Gaborcik, N., Krajcovic, V. and Zimkova, M (1990). Biological properties and fodder value of dandelion. Soilgrass land animal

relationships. Proceedings of 13th General Meeting of the European Grassland Federation. Banska Bystrica, Czechoslovakia, (2), pp.208-211.

- **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M. and Abdelly, C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), pp.372-379.
- **Falleh, H., Ksouri, R., Lucchessi, M.E., Abdelly, C. and Magné, C., 2012.** Ultrasound-assisted extraction: Effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae shoots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(2), pp.243-249.
- **Fall-Touré, S., Traoré, E., N'Diaye, K., N'diaye, N.S. and Sèye, B.M., 1997.** Utilisation des fruits de *Faidherbia albida* pour l'alimentation des bovins d'embouche paysanne dans le bassin arachidier au Sénégal. *Livestock Research for Rural Development*, 9(5), pp.19.
- **Farah Abdelhafid, K.2014.** Changement climatique ou variabilité climatique dans l'Est algérien. Mémoire de magistère, option : Pathologie des écosystèmes forestiers. Université des frères Mentourie 1, Constantine. Algerie. pp.22-25.
- **Finlay, B. J., Esteban, G., Clarke, K. J., Williams, A. G., Embley, T. M., & Hirt, R. P. 1994.** Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters*, 117, pp.157-161.
- **Fonty, G., Grenet, E., Fevre, M., Breton, A. and Gouet, P., 1988.** Écologie et fonctions des champignons anaérobies du rumen. *Reproduction Nutrition Développement*, 28(1), pp.1-18.
- **Fonty G., and Forano E., 1999.** Ecologie de la dégradation et de la fermentation des polysides constitutifs des parois végétales dans le rumen. *Cahier Agriculture*, 8 (1), pp.21-35.
- **Fonty, G., and Chaucheyras-Durand, F., 2007.** Les écosystèmes digestifs. Ed, Technique & Documentation, Paris. pp. 79-256.
- **Forano, E., Broussolle, V. and Duraud, D. 1996.** Degradation of plant cell wall polysaccharides by rumen bacteria and fungi. *Annales de Zootechnie*, 45 : pp.55-66.
- **Ford, C.W., Elliott, R. and Maynard, P.J., 1987.** The effect of chlorite delignification on digestibility of some grass forages and on intake and rumen microbial activity in sheep fed barley straw. *The Journal of Agricultural Science*, 108(1), pp.129-136.

- **Foroughbakhch**, P.R., Parra, A.C., Estrada, A.R., Vazquez, M.A.A. and Avila, M.L.C., 2012. Nutrient content and in vitro dry matter digestibility of *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp. and *Leucaena leucocephala* (Lam. De Wit.). *Journal of Animal and Veterinary Advances*.11 (10).pp.1708-1712.
- **Foti**, S., Mauromicale, G., Raccuia, S.A., Fallico, B., Fanella, F. and Maccarone, E., 1999. Possible alternative utilization of *Cynara* spp.: I. Biomass, grain yield and chemical composition of grain. *Industrial Crops and Products*, 10(3), pp.219-228.
- **Fracassetti**, D., Costa, C., Moulay, L. and Tomás-Barberán, F.A., 2013. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry*, 139(1-4), pp.578-588.
- **Fraisse**, D. ; Felgines, C., Texier, O. and Lamaison, J.L.(2011). Caffeoyl Derivatives: Major Antioxidant Compounds of Some Wild Herbs of the *Asteraceae* Family. *Food and Nutrition Sciences*, 2, pp.181-192.
- **Frutos**, P., Hervás, G., Giráldez, F.J. and Mantecón, A.R., 2004. An in vitro study on the ability of polyethylene glycol to inhibit the effect of quebracho tannins and tannic acid on rumen fermentation in sheep, goats, cows, and deer. *Australian Journal of Agricultural Research*, 55(11), pp.1125-1132.

## G

- **Ganzer**, M., Egger, C., Zidorn, C. and Stuppner, H., 2008. Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in *Arnica montana* L. by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Analytica chimica acta*, 614(2), pp.196-200.
- **Garcia**, J. L., Patel, B. K., & Ollivier, B., 2000. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe*, 6, pp.205-226.
- **Garcia-Gonzalez**, R., López, S., Fernandez, M., Bodas, R., González, J.S., 2008. Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*. 147, pp.36–52.
- **García-Herrera**, P., Sánchez-Mata, M.C., Cámara, M., Fernández-Ruiz, V., Díez-Marqués, C., Molina, M. and Tardío, J., 2014. Nutrient composition of six wild edible Mediterranean *Asteraceae* plants of dietary interest. *Journal of Food Composition and Analysis*, 34(2), pp.163-170.
- **Gausson**, H. and Leroy, H.F., 1982. Précis de botanique, végétaux supérieurs (2<sup>ème</sup> édition), Ed, Elsevier-Masson. Paris. pp.424-426.

- **Geissman**, T.A. and Steelink, C., 1957. Flavonoid Petal Constituents of *Chrysanthemum segetum* L. *The Journal of Organic Chemistry*, 22(8), p.946-948.
- **Getachew**, G., Blümmel, M., Makkar, H.P.S. and Becker, K., 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 72(3-4), pp.261-281.
- **Getachew**, G., Makkar, H.P.S. and Becker, K., 2000. Tannins in tropical browses: effects on *in vitro* microbial fermentation and microbial protein synthesis in media containing different amounts of nitrogen. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), pp.3581-3588.
- **Getachew**, G., Pittroff, W., Putnam, D.H., Dandekar, A., Goyal, S. and DePeters, E.J., 2008. The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on *in vitro* rumen fermentation and microbial protein synthesis. *Animal Feed Science and Technology*, 140(3-4), pp.444-461.
- **Giger-Reverdin**, S., Abijaoudé, J. A., Prado, I. N., Tessier, J., Morand-Fehr, P., 1997. Effect of diet composition on the kinetics of osmotic pressure in the rumen of dairy goats. *Options Méditerranéennes*, 34, pp.143-147.
- **Giger-Reverdin**, S., Duvaux- Ponter., Sauvant, D., Martin, O., Nunes, I. and Muller, R., 2002. Intrinsic buffering capacity of feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, 96, pp. 83-102.
- **Gihad**, E.A., El Gallad, T.T., Sooud, A.E., Abou El –Nasr, H.M., Farid, M.F.A. (1989). Feed and water intake, digestibility and nitrogen utilisation by camels compared to sheep and goat fed low protein desert by-products. *Options méditerranéennes*, 2, pp.75-80.
- **Goel**, G. and Makkar, H.P., 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical animal health and production*, 44(4), pp.729-739.
- **Grainger**, C., Clarke, T., Auldist, M.J., Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Waghorn, G.C. and Eckard, R.J., 2009. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*, 89(2), pp.241-251.
- **Grdović**, S., Petrujkić, B., Šefer, D., Mirilović, M., Dimitrijević, V. and Stanimirović, Z., 2013. The nutritive value of Valjevac grassland-Zasavica reservation. *Acta veterinaria*, 63(5-6), pp.699-706.

- **Grenet, E., Breton, A., Barry, P. and Fonty, G., 1989.** Rumen anaerobic fungi and plant substrate colonization as affected by diet composition. *Animal Feed Science and Technology*, 26(1-2), pp.55-70.
- **Gribaldo, S. and Brochier-Armanet, C., 2006.** The origin and evolution of *Archaea*: a state of the art. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1470), pp.1007-1022.
- **Groot, J.C., Williams, B.A., Oostdam, A.J., Boer, H. and Tamminga, S., 1998.** The use of cumulative gas and volatile fatty acid production to predict *in vitro* fermentation kinetics of Italian ryegrass leaf cell walls and contents at various time intervals. *British Journal of Nutrition*, 79(6), pp.519-525.
- **Guignard, J.L., 1994.** Abrégé botanique, les familles de plantes (9 ème Edition). Ed, Elsevier-Masson. Paris. p.204.
- **Guil-Guerrero, J.L. and Torija-Isasa, M.E. , 2016.** Fatty acid profiles of méditerranéen edibles plants. In : Sanchez Mata, M.C. and Tardia, J. (eds.). *Mediterranean Wild Edible Plants*, pp. 173-270. Springer, New York, NY.
- **Guillaume, H.B., 2007.** Flore du Rumen : Origine, Composition, Evolution, Conséquence Physiopathologiques. Thèse de doctorat en médecine vétérinaire, Alfort, France. pp. 21-47
- **Guilloteau, P., le huerou-luron, I., malbert, C.H., toullec, R. 1995.** Les sécrétions digestives et leur régulation. In : Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M-H., Journet, M. (eds.). *Nutrition des ruminants domestiques. Ingestion et digestion*, pp. 499-526. INRA Edition, Paris, France.
- **Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Calhella, R.C., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Queiroz, M.J.R. and Ferreira, I.C., 2013.** Nutrients, phytochemicals and bioactivity of wild Roman chamomile: a comparison between the herb and its preparations. *Food Chemistry*, 136(2), pp.718-725.
- **Guo, Y.Q., Liu, J.X., Lu, Y., Zhu, W.Y., Denman, S.E. and McSweeney, C.S., 2008.** Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*, 47(5), pp.421-426.
- **Gutierrez, D., Mendoza, S., Serrano, V., Bah, M., Pelz, R., Balderas, P. and LeON, F., 2008.** Proximate composition, mineral content, and antioxidant properties of 14 Mexican weeds used as fodder. *Weed biology and management*, 8(4), pp.291-296.

- **Guyader, J.**, Eugène, M., Noziere, P., Morgavi, D.P., Doreau, M. and Martin, C., 2014. Influence of rumen protozoa on methane emission in ruminants: a meta-analysis. *Animal*, 8(11), pp.1816-1825.

## H

- **Haddi, M.L.**, Arab, H., Yacoub, F., Hornick, J.L., Rollin, F. and Mehennaoui, S., 2009. Seasonal changes in chemical composition and *in vitro* gas production of six plants from Eastern Algerian arid regions. *Livestock research for rural development*, 21(4), pp.1-16.
- **Hagerman, A.E.**, 2002. The Tannin Handbook. Department of Chemistry and Biochemistry, Miami University, Oxford, OH. <http://www.users.miamioh.edu/hagermae/>
- **Harborne, J.B.**, Heywood, V.H. and Saleh, N.A.M., 1970. Chemosystematics of the compositae: Flavonoid patterns in the *Chrysanthemum* complex of the tribe Anthemideae. *Phytochemistry*, 9(9), pp.2011-2017.
- **Harborne, J.B.** and Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), pp.481-504.
- **Hariadi, B.T.** and Santoso, B., 2010. Evaluation of tropical plants containing tannin on *in vitro* methanogenesis and fermentation parameters using rumen fluid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(3), pp.456-461.
- **Hart, K.J.**, Yanez-Ruiz, D.R., Duval, S.M., McEwan, N.R. and Newbold, C.J., 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 147(1-3), pp.8-35.
- **Haslam, E.**, 1989. Plant polyphenols. In: Haslam, E. (eds.). Vegetable tannins, pp.15-89. Cambridge University press. UK.
- **Hassanpour, S.**, Sadaghian, M., MaheriSis, N., Eshratkhah, B. and ChaichiSemsari, M., 2011. Effect of condensed tannin on controlling faecal protein excretion in nematode-infected sheep: *in vivo* study. *Journal of American Science*, 7(5), pp.896-900.
- **Havsteen, B.H.**, 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 96(2-3), pp.67-202.
- **Heimler, D.**, Vignolini, P., Dini, M.G., Vincieri, F.F. and Romani, A., 2006. Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food chemistry*, 99(3), pp.464-469.
- **Heimler, D.**, Isolani, L., Vignolini, P. and Romani, A., 2009. Polyphenol content and antiradical activity of *Cichorium intybus* L. from biodynamic and conventional farming. *Food Chemistry*, 114(3), pp.765-770.

- **Hervás**, G., Frutos, P., Giráldez, F.J., Mantecón, Á.R. and Del Pino, M.C.Á., 2003. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology*, 109(1-4), pp.65-78.
- **Hess**, H.D., Monsalve, L.M., Lascano, C.E., Carulla, J.E., Diaz, T.E. and Kreuzer, M., 2003. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research*, 54(7), pp.703-713.
- **Hess**, H.D., Tiemann, T.T., Noto, F., Carulla, J.E. and Kreuzer, M., 2006, July. Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock. *International Congress series*, 1293, pp. 164-167.
- **Hiai**, S., Oura, H. and Nakajima, T., 1976. Color reaction of some saponins and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Medica*, 29(02), pp.116-122.
- **Holse**, M., Husted, S. and Hansen, Å., 2010. Chemical composition of maramba bean (*Tylosema esculentum*)-A wild African bean with unexploited potential. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), pp.648-657.
- **Holtshausen**, L., Chaves, A.V., Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., McAllister, T.A., Odongo, N.E., Cheeke, P.R. and Benchaar, C., 2009. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and Quillaja saponaria to decrease enteric methane production in dairy cows<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science*, 92(6), pp.2809-2821.
- **Hook**, S.E., Steele, M.A., Northwood, K.S., Wright, A.D.G. and McBride, B.W., 2011. Impact of high-concentrate feeding and low ruminal pH on methanogens and protozoa in the rumen of dairy cows. *Microbial ecology*, 62(1), pp.94-105.
- **Hostettmann**, K., & Marston, A. 1995. Chemistry and Pharmacology of Natural Products ; Saponins. Ed, Cambridge University Press. p.564.
- **Houmani**, M., 1998. Amélioration de la valeur alimentaire du foin de vesce-avoine par le traitement à l'urée. *Fourrages(Versailles)*, 154, pp.239-248
- **Houmani**, M., Houmani, Z. and Skoula, M., 2004. Intérêt de *Artemisia herba alba* Association dans l'alimentation du bétail des steppes algériennes. *Acta botanica gallica*, 151(2), pp.165-172.
- **Hu**, W.L., Liu, J.X., Ye, J.A., Wu, Y.M. and Guo, Y.Q., 2005. Effect of tea saponin on rumen fermentation *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 120(3-4), pp.333-339.
- **Hungate**, R.E., 1966. The rumen and its microbes. Ed, academic Press, New York and London.

- **Hutton**, P.G., Durmic, Z., Ghisalberti, E.L., Flematti, G.R., Duncan, R.M., Carson, C.F., Riley, T.V. and Vercoe, P.E., 2012. Inhibition of ruminal bacteria involved in lactic acid metabolism by extracts from Australian plants. *Animal feed science and technology*, 176(1-4), pp.170-177.

## I

- **INRA-AFZ**, 2007. Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage. INRA Editions. Paris. France.
- **IPCC.2007**. Climate Change 2007 : Synthesis report of working groups I, II and III to the fourth assesment report of intergouvermental panel on climate change, p.104. Gieneva, Switzerland.

## J

- **Jaakola**, L., Määttä-Riihinen, K., Kärenlampi, S. and Hohtola, A., 2004. Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta*, 218(5), pp.721-728.
- **Jan**, G., Kahan, M., Ahmad, M., Iqbal, Z., Afzal, A., Afzal, M., Shah, G.M., Majid, A., Fiaz, M., Zafar, M. and Waheed, A., 2011. Nutritional analysis, micronutrients and chlorophyll contents of *Cichorium intybus* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(12), pp.2452-2456.
- **Janssen**, P.H., & Kris, M. 2008. Structure of the archael community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, pp.3619–3625.
- **Janssen**, P.H., 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Animal Feed Science and Technology*, 160(1-2), pp.1-22.
- **Jaroslav**, F., Dvořák, R., 2009. Determination of the volatile fatty acid content in the rumen liquid: comparison of gas chromatography and capillary isotachopheresis. *Acta Veterinaria*. Brno, 78, pp.627–633.
- **Jarrige**, R., Grenet, E., Demarquilly, C and Beste, J.M., 1995. Les constituants de l'appareil végétatif des plantes fourragères. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (eds.). Nutrition des ruminants domestiques, pp. 25-81. INRA Editions, Paris, France.
- **Jayanegara**, A., Wina, E., Soliva, C.R., Marquardt, S., Kreuzer, M. and Leiber, F., 2011. Dependence of forage quality and methanogenic potential of tropical plants on their phenolic

fractions as determined by principal component analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 163(2-4), pp.231-243.

- **Jeun.** J. M., Annie, F; Chrystian, J. L, **2005**, *les composés phénoliques des végétaux*, Ed, Lausanne, PPUR. Suisse. pp.203-204.
- **Jenkins**, T. C., Wallace, R. J., Moate, P. J., Mosley, E. E., 2008. Board-Invited Review: recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Science*, 86 (2), pp.397-412.
- **Johnson**, K.A. and Johnson, D.E., 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of animal science*, 73(8), pp.2483-2492.
- **Johnson**, D.E. and Ward, G.M., 1996. Estimates of animal methane emissions. *Environmental monitoring and assessment*, 42(1-2), pp.133-141.
- **Jolly**, S. and Wallace, A., 2007. Best practice for production feeding of lambs: A review of the literature. *Productive Nutrition Pty Ltd*.
- **Jouany**, J.P., 1994. Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA Productions animales*, 7(3), pp.207-225.
- **Jouany**, J.P., Broudiscou, L., Prins, R.A and Komisarczuk-Bony, S. 1995. Métabolisme et nutrition de la population microbienne du rumen. In : Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (eds.). *Nutrition des ruminants domestiques. Ingestion et digestion*, pp. 349-381. INRA Editions, Paris, France.
- **Jouany**, J.P. and Lassalas, B., 1997. Study of the adaptation of the rumen ecosystem to the antimethanogenic effect of monensin measured *in vivo*. *Reproduction Nutrition Development*, 37, pp.69-70.
- **Jouany**, J.P. and Ushida, K., 1999. The role of protozoa in feed digestion-Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 12(1), p.113-128.
- **Jouany**, J.P., Gobert, J., Medina, B., Bertin, G. and Julliand, V., 2008. Effect of live yeast culture supplementation on apparent digestibility and rate of passage in horses fed a high-fiber or high-starch diet1. *Journal of animal science*, 86(2), pp.339-347.
- **Julien**, C., Marden, J.P., Bonnefont, C., Moncoulon, R., Auclair, E., Monteils, V. and Bayourthe, C., 2010. Effects of varying proportions of concentrates on ruminal-reducing power and bacterial community structure in dry dairy cows fed hay-based diets. *animal*, 4(10), pp.1641-1646.
- **Julve**, P., 1998. Baseflor. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France. <http://philippe.julve.pagesperso-orange.fr/catminat.htm>).

**K**

- **Kabran**, G.R., Mamyrbekova-Bekro, J.A., Pirat, J.L., Bekro, Y.A., Sommerer, N., Verbaere, A. and Meudec, E., 2014. Identification de composés phénoliques extraits de deux plantes de la pharmacopée ivoirienne. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 38, pp.57-63.
- **Kadi**, S.A. and Zirmi-Zembri, N., 2016. Valeur nutritive des principales ressources fourragères utilisées en Algérie. 2-Les arbres et arbustes fourragers. *Livestock Research for Rural Development*, 28 (6).pp.1-15.
- **Kamalak**, A., GÜRBÜZ, Y. and Finlayson, H., 2002. Comparison of in vitro dry matter degradation of four maize silages using the Menke gas production method. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 26(5), pp.1003-1008.
- **Kamra**, D.N., 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, 89 (1): p.124-131.
- **Kamra**, D.N., Pawar, M. and Singh, B., 2012. Effect of plant secondary metabolites on rumen methanogens and methane emissions by ruminants. In : **Patra**, A. K. (Eds.). *Dietary Phytochemicals and Microbes*, pp. 351-370. Springer, Dordrecht, the Netherlands.
- **Kamra**, D. N., Agarwal, N., & Chaudhary, L. C., 2006. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series*, 1293, pp. 156-163.
- **Karamenderes**, C., S. Konyalioglu Khan and I.A. Khan, 2007. Total phenolic contents, free radical scavenging activities and inhibitory effects of NF-kappa B of eight *Centaurea L.* species. *Phytotherapy Research*, 21, pp.488-491.
- **Katalinić**, V., Možina, S.S., Skroza, D., Generalić, I., Abramovič, H., Miloš, M., Ljubenkov, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinč, P. and Boban, M., 2010. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, 119(2), pp.715-723.
- **Keiji**, O and Soichi, I. 1981. Atlas of microbiology. Japan Scientific Societies. Press. Tokyo, pp. 56-85.
- **Khammar**, A. and Djeddi, S., 2012. Pharmacological and biological properties of some *Centaurea* species. *European Journal of Scientific Research*, 84(3), p.398-416.
- **Khazaal**, K., Dentinho, M.T., Ribeiro, J.M. and Ørskov, E.R., 1995. Prediction of apparent digestibility and voluntary intake of hays fed to sheep: comparison between using fibre components, in vitro digestibility or characteristics of gas production or nylon bag degradation. *Animal Science*, 61(3), pp.527-538.

- **Khennouf**, S., Bencheikh, D., Djidel, S., Dahamna, Smain, A., Charef, N., Baghiani, A., Harzallah, D. and Arrar, L., 2013. Polyphenols and antioxidant properties of extracts from *Mentha pulegium* L. and *Matricaria chamomilla* L. *Pharmacognosy Communications*, 3(2), pp.35.
- **Kennouche**, S., 2016. Étude phytochimique et biologique des espèces *Chrysanthemum segetum* L. (Asteraceae) et *Limonium pruinosum* (L.) Chaz. (Plumbaginaceae).Thèse de doctorat en chimie organique. pp.10-17.
- **Kim**, J. M., Chang, S. M., Kim, I. H., Kim, Y. E., Hwang, J. H., Kim, K. S. and Kim, W. S., 2007. Design of optimal solvent for extraction of bioactive ingredients from mulberry leaves. *Biochemical Engineering Journal*, 37, pp. 271-278.
- **Klieve**, A.V. and Bauchop, T., 1988. Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6), pp.1637-1641.
- **Klieve**, A.V., Hudman, J.F. and Bauchop, T., 1989. Inducible bacteriophages from ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(6), pp.1630-1634.
- **Klieve**, A.V., Bain, P.A., Yokoyama, M.T., Ouwerkerk, D., Forster, R.J. and Turner, A.F., 2004. Bacteriophages that infect the cellulolytic ruminal bacterium *Ruminococcus albus* AR67. *Letters in applied microbiology*, 38(4), pp.333-338.
- **Koffi**, E., Sea, T., Dodehe, Y. and Soro, S., 2010. Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 5(3), pp.550-558.
- **Koike**, S., Pan, J., Kobayashi, Y. and Tanaka, K., 2003. Kinetics of *in sacco* fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *Journal of Dairy Science*, 86(4), pp.1429-1435.
- **Kulivand**, M. and Kafilzadeh, F., 2015. Correlation between chemical composition, kinetics of fermentation and methane production of eight pasture grasses. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 37(1), pp.9-14.
- **Kumar**, R. and Vaithyanathan, S., 1990. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Animal feed science and technology*, 30(1-2), pp.21-38
- **Kumar**, A., Singh, S.P. and Bhakuni, R.S., 2005. Secondary metabolites of *Chrysanthemum* genus and their biological activities. *Current science*, pp.1489-1501.

- **Kumar**, S., Puniya, A.K., Puniya, M., Dagar, S.S., Sirohi, S.K., Singh, K. and Griffith, G.W., 2009. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9), pp.1557-1566.

## L

- **Larbi**, A., Smith, J.W., Kurdi, I.O., Adekunle, I.O., Raji, A.M. and Ladipo, D.O., 1998. Chemical composition, rumen degradation, and gas production characteristics of some multipurpose fodder trees and shrubs during wet and dry seasons in the humid tropics. *Animal Feed Science and Technology*, 72(1-2), pp.81-96.
- **Leng**, R.A., Steel, J.W. and Luick, J.R., 1967. Contribution of propionate to glucose synthesis in sheep. *Biochemical Journal*, 103(3), pp.785.
- **Lila**, Z.A., Mohammed, N., Kanda, S., Kamada, T. and Itabashi, H., 2003. Effect of sarsaponin on ruminal fermentation with particular reference to methane production in vitro. *Journal of Dairy Science*, 86(10), pp.3330-3336.
- **Liu**, Y. and Whitman, W.B. 2008. Metabolic, phlogenic and ecological diversity of the methanogenic Archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125, pp. 171-189.
- **Liu**, H., Vaddella, V. and Zhou, D., 2011. Effects of chestnut tannins and coconut oil on growth performance, methane emission, ruminal fermentation, and microbial populations in sheep. *Journal of dairy science*, 94(12), pp.6069-6077.
- **Long**, R.J., Apori, S.O., Castro, F.B. and Ørskov, E.R., 1999. Feed value of native forages of the Tibetan Plateau of China. *Animal Feed Science and Technology*, 80(2), pp.101-113.
- **Longuo**, H. F., Chehma, A., et Oulad belkhir, A., 1989. Quelques aspects botaniques et nutritionnels des pâturages du dromadaire en Algérie. *Option méditerranéenne*, 2, pp. 47-53.
- **López**, S., Makkar, H.P. and Soliva, C.R., 2010. Screening plants and plant products for methane inhibitors. In : Vercoe, P. E., Makkar, H. P.S., Schlink, A. C. (Eds.). *In vitro screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies*, pp. 191-231. Springer, Dordrecht. the Netherlands.
- **Lourenço**, M., Ramos-Morales, E., Wallace, R. J., 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal*, 4, pp.1008-1023.
- **Lovett**, G.M., Canham, C.D., Arthur, M.A., Weathers, K.C. and Fitzhugh, R.D., 2006. Forest ecosystem responses to exotic pests and pathogens in eastern North America. *BioScience*, 56(5), pp.395-405.

M

- **Macheix**, J.J., Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed, les presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, France. pp.86-87 : 203-204.
- **Machmüller**, A., Soliva, C. R., and Kreuzer, M. 2003(a). Methane-suppressing effect of myristic acid in sheep as affected by dietary calcium and forage proportion. *British Journal of Nutrition*, 90, pp.529- 540.
- **Machmüller**, A., Soliva, C.R. and Kreuzer, M., 2003(b). Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep. *Reproduction Nutrition Development*, 43(1), pp.41-55.
- **Mahmoudi**, S., Khali, M. and Mahmoudi, N., 2012. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*, 9, pp.35.
- **Maia**, M.D.O., Susin, I., Ferreira, E.M., Nolli, C.P., Gentil, R.S., Pires, A.V. and Mourão, G.B., 2012. Intake, nutrient apparent digestibility and ruminal constituents of sheep fed diets with canola, sunflower or castor oils. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(11), pp.2350-2356.
- **Makkar**, H.P., Blümmel, M. and Becker, K., 1995. In vitro effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69(4), pp.481-493.
- **Makkar**, H.P.S., 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small ruminant research*, 49(3), pp.241-256.
- **Manca**, R., 2014. Nutritional value and utilization of plants with antimicrobial properties as components of the diet of dairy sheep. Thèse de doctorat, option : Sciences et biotechnologie des systèmes agricoles et forestiers et des productions alimentaires. Université de Sassari, Sardaigne. Italie. p.122.
- **Mao**, H.L., Wang, J.K., Zhou, Y.Y. and Liu, J.X., 2010. Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livestock Science*, 129(1), pp.56-62.
- **Marden**, J. P., Bayourthe, C., Enjalbert, F., Moncoulon, R., 2005. A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cow. *Journal of Dairy Sciences.*, 88, pp.277-281.

- **Martin**, C., Morgavi, D. P., & Doreau, M., 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*, 4, pp.351-365.
- **Martiniello**, P. and Berardo, N., 2007. Residual fertilizer effects on dry-matter yield and nutritive value of Mediterranean pastures. *Grass and forage science*, 62(1), pp.87-99.
- **Mc Donald**, P., Greenhalgh, J.F., Edwards, R., Morgan, C., 1995. *Animal Nutrition*. Ed, Longmanns, London, UK.
- **McAllister**, T.A., Bae, H.D., Jones, G.A. and Cheng, K.J., 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of animal science*, 72(11), pp.3004-3018.
- **McAllister**, T.A., Cheng, K.J., Okine, E.K. and Mathison, G.W., 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*, 76(2), pp.231-243.
- **McIntosh**, F.M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R.J., Beever, D.A. and Newbold, C.J., 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), pp.5011-5014.
- **McKay**, D.L. and Blumberg, J.B., 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytotherapy research*, 20(7), pp.619-633.
- **McNeil**, M., Darvill, A.G., Fry, S.C. and Albersheim, P., 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual review of biochemistry*, 53(1), pp.625-663.
- **McSweeney**, C.S., Palmer, B., McNeill, D.M. and Krause, D.O., 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1-2), pp.83-93.
- **Mebirouk-Boudechiche**, L., Cherif, M., Boudechiche, L. and Sammar, F., 2014. Teneurs en composés primaires et secondaires des feuilles d'arbustes fourragers de la région humide d'Algérie. *Revue de Médecine. Vétérinaire*, 165, pp.11-12.
- **Mebirouk-Boudechiche**, L., Abidi, S., Cherif, M. and Bouzouraa, I., 2015. Digestibilité in vitro et cinétique de fermentation des feuilles de cinq arbustes fourragers du nord est algérien. *Revue Méditerranéenne Vétérinaire*, 166, pp.11-12.
- **Medila**, I., 2016. Caractérisation chimique et fermentescibilité *in vitro* en présence du microbiote ruminal de dromadaire de certaines plantes halophytes de la région d'El Oued. Thèse de doctorat, option : Biochimie appliquée. Université de Kasdi Merbah, Ouargla. p.61.
- **Medjekal**, S., Ghabbane, M., Bodas, R., Bousseboua, H. and López, S., 2016. Volatile fatty acids and methane production from browse species of Algerian arid and semi-arid areas. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), pp.44-49.

- **Menke**, K.H., Steingass, H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research Development*, 28, pp. 7-55.
- **Menke**, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. and Schneider, W., 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *The Journal of Agricultural Science*, 93(1), pp.217-222.

**Merdjane**, L. et Yakhlef, H., 2016. Le déficit fourrager en zone semi-aride : une contrainte récurrente au développement durable de l'élevage des ruminants. *Revue Agriculture*, 1, pp. 43 -51.

- **Mertens**, D.R., 1997. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *Journal of dairy science*, 80(7), pp.1463-1481.
- **Milek**, M. and Legáth, J., 2015. Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of Taraxacum officinale Extracts Obtained with Different Solvents. *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences*. 3 (6), pp.59-63
- **Min**, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T. and McNabb, W.C., 2003 (a). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 106(1-4), pp.3-19.
- **Miron**, J., Ben-Ghedalia, D., Morrison, M., 2001. Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of Dairy Sciences*, 84, pp.1294-1309.
- **Mohammedi**, Z. and Atik, F., 2011. Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from Tamarix aphylla (L.) karst. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2, pp.609-615.
- **Moran**, D., MacLeod, M., Wall, E., Eory, V., McVittie, A., Barnes, A., Rees, R.M., Topp, C.F.E., Pajot, G., Matthews, R., Smith, P., Moxey, A., 2011. Developing carbon budgets for UK agriculture, land-use, land-use change and forestry out to 2022. *Climatic Change*, 105, pp.529-553.
- **Morgavi**, D. P., Forano, E., Martin, C., & Newbold, C. J. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 4, pp.1024-1036.
- **Morrison**, I.M., 1979. Carbohydrate chemistry and rumen digestion. *Proceedings of the Nutrition Society*, 38(3), pp.269-274.
- **Mosoni**, P., Martin, C., Forano, E. and Morgavi, D.P., 2011. Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the

bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science*, 89(3), pp.783-791.

- **Moss**, A.R., Jouany, J.P. and Newbold, J., 2000, May. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de zootechnie*, 49(3), p. 231-253.
- **Moss**, A.R., Jouany, J.P. and Newbold, J., 2000, May. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de zootechnie*, 49(3), p. 231-253.
- **Mouffok**, S., Haba, H., Lavaud, C., Long, C. and Benkhaled, M., 2012. Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab. *Records of Natural Products*, 6(3), pp.292.
- **Moujahed**, N., Darej, C., Taghouti, M., Bouaziz, Y., Mustapha, C.B. and Kayouli, C., 2013. Chemical composition and in vitro fermentation characteristics of range species growing in Central Tunisia. *Option Méditerranéennes*, pp.121-125.
- **Mueller-Harvey**, I., 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), pp.2010-2037.
- **Mulinacci**, N., Prucher, D., Peruzzi, M., Romani, A., Pinelli, P., Giaccherini, C. and Vincieri, F.F., 2004. Commercial and laboratory extracts from artichoke leaves: estimation of caffeoyl esters and flavonoidic compounds content. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34(2), pp.349-357.

## N

- **Nacer**, A., Merza, J., Kabouche, Z., Rouati, S., Boustie, J., Richomme, P., 2012. Sesquiterpene lactones from *Centaurea tougourensis*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 43, pp.163-165.
- **Nagadi**, S., Herrero, M. and Jessop, N.S., 2000. The effect of fermentable nitrogen availability on in vitro gas production and degradability of NDF. *Animal Feed Science and Technology*, 87(3-4), pp.241-251.
- **Navarro-Villa**, A., O'Brien, M., López, S., Boland, T.M. and O'Kiely, P., 2011. In vitro rumen methane output of red clover and perennial ryegrass assayed using the gas production technique (GPT). *Animal Feed Science and Technology*, 168(3-4), pp.152-164.
- **Nayar**, N.M., 2006. World Spices Plants: Economic Usage, Botany and Taxonomy by Sidemann, *journal of plantation crops*, 34(2), pp.138.
- **Noziere**, P., Glasser, F. and Sauvant, D., 2011. In vivo production and molar percentages of volatile fatty acids in the rumen: a quantitative review by an empirical approach. *Animal*, 5(3), pp.403-414.

- **NRC**, 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Ed, the national academies Press, Washington, USA.

**O**

- **Ochocka**, R.J., Rajzer, D., Kowalski, P. and Lamparczyk, H., 1995. Determination of coumarins from *Chrysanthemum segetum* L. by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 709(1), pp.197-202.
- **Offner**, A. and Sauvant, D., 2006. Thermodynamic modeling of ruminal fermentations. *Animal Research*, 55(5), pp.343-365.
- **Öksüz**, S. and Wagner, H., 1982. Coumarins from *Chrysanthemum segetum*. *Journal of Natural Products*, 45(3), pp.374-374.
- **Oktay**, G. and Temel, S., 2015. Determination of annual fodder value of Ebu Cehil (*Calligonum polygonoides* L. ssp. *Comosum* (L'Hér.)) shrub. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 32(1), pp.30-36.
- **Olechnikov**, D.N. and Kashchenko, N.I., 2014. Componential profile and amylase inhibiting activity of phenolic compounds from *Calendula officinalis* L. leaves. *The Scientific World Journal*, 5, pp.1-9.
- **Olivares-Palma**, S.M., Meale, S.J., Pereira, L.G.R., Machado, F.S., Carneiro, H., Lopes, F.C.F., Maurício, R.M. and Chaves, A.V., 2013. In vitro fermentation, digestion kinetics and methane production of oilseed press cakes from biodiesel production. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 26(8), pp.1102.
- **Orpin**, C.G. and Munn, E.A., 1974. The occurrence of bacteriophages in the rumen and their influence on rumen bacterial populations. *Experientia*, 30(9), pp.1018-1020.
- **Ørskov**, E.R. and McDonald, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, 92(2), pp.499-503.
- **Ørskov**, E., Ryle, M., 1990. Nutrient supply to the newborn ruminant. In: Energy Nutrition in Ruminants. Elsevier Science (Eds.), New York, USA, pp. 10–28.
- **Oskoueian**, E., Abdullah, N. and Oskoueian, A., 2013. Effects of flavonoids on rumen fermentation activity, methane production, and microbial population. *BioMed research international*, 2013, pp.1-8.
- **Özelçam**, H., Kırkpınar, F. and Tan, K., 2015. Chemical Composition, In vivo Digestibility and Metabolizable Energy Values of Caramba (*Lolium multiflorum* cv.

caramba) Fresh, Silage and Hay. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 28(10), pp.1427.

- **Ozenda**, P., 1991. Flore et végétation du Sahara. Ed, C.N.R.S.Paris.p.662.

## **P**

- **Papachristou**, T.G., Nastis, A.S., Mathur, R. and Hutchings, M.R., 2003. Effect of physical and chemical plant defences on herbivory: implications for Mediterranean shrubland management. *Basic and Applied Ecology*, 4(5), pp.395-403.
- **Parlak**, A.O., Gökkus, A., Hakyemez, H. and Bayetekin, H., 2011. Forage yield and quality of kermes oak and herbaceous species throughout a year in Mediterranean zone of western Turkey. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 9(1), pp.510-515.
- **Pascual**, J.J., Cervera, C. and Fernández-Carmona, J., 2000. Comparison of different in vitro digestibility methods for nutritive evaluation of rabbit diets. *World Rabbit Science*, 8(2), pp.93-97.
- **Patra**, A.K., Kamara, D.N. and Agarwal, N., 2006. Effect of plant extracts on in vitro methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology*, 128(3-4), pp.276-291.
- **Patra**, A.K. and Saxena, J., 2009(a). Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96(4), pp.363-375.
- **Patra**, A.K. and Saxena, J., 2009(b). The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition Research Reviews*, 22(2), pp.204-219.
- **Patra**, A.K. and Saxena, J., 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71(11-12), pp.1198-1222.
- **Paulian de Felice**, L., 1967. Guide pour l'étude de quelques plantes tropicales. Ed, Gauthier-Villards, Paris. p.37.
- **Pavarini**, D.P., Pavarini, S.P., Niehues, M. and Lopes, N.P., 2012. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1-4), pp.5-16.
- **Pei**, C. X., Mao, S. Y., Cheng, Y. F., & Zhu, W. Y. (2010). Diversity, abundance and novel 16S rRNA gene sequences of methanogens in rumen liquid, solid and epithelium fractions of Jinnan cattle. *Animal*, 4, pp.20-29.

- **Pen, B., Takaura, K., Yamaguchi, S., Asa, R. and Takahashi, J., 2007.** Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* with or without  $\beta$  1–4 galacto-oligosaccharides on ruminal fermentation, methane production and nitrogen utilization in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 138(1), pp.75-88.
- **Pellikaan, W.F., Stringano, E., Leenaars, J., Bongers, D.J., van Laar-van Schuppen, S., Plant, J. and Mueller-Harvey, I., 2011.** Evaluating effects of tannins on extent and rate of in vitro gas and CH<sub>4</sub> production using an automated pressure evaluation system (APES). *Animal Feed Science and Technology*, 166, pp.377-390.
- **Pitt, R.E., Van Kessel, J.S., Fox, D.G., Pell, A.N., Barry, M.C. and Van Soest, P.J., 1996.** Prediction of ruminal volatile fatty acids and pH within the net carbohydrate and protein system. *Journal of animal science*, 74(1), pp.226-244.
- **Popova, M. 2012.** Structure et activité de la communauté des *Archaea* méthanogènes du rumen en relation avec la production du méthane chez les ruminants. Thèse de doctorat en médecine vétérinaire, INRA, Lyon, France. p.225.
- **Popova, M., Morgavi, D.P., Doreau, M. and Martin, C., 2011.** Production de méthane et interactions microbiennes dans le rumen. *Productions Animales*, 24(5), pp.447-460.
- pp.544-550.
- **Proestos, C., Boziaris, I. S., Nychas, G. J. and Komaitis, M., 2006.** Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 95(4), pp. 664-671.
- **Puchala, R., Min, B.R., Goetsch, A.L. and Sahlu, T., 2005.** The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science*, 83(1), pp.182-186.

## Q

- **Quansah, E.S. and MAKKAR, Y., 2012.** PS Use of lesser-known plants and plant parts as animal feed resources in tropical regions. FAO. *Animal Production and Health Working Paper*, 8, pp.1-32.
- **Quezel, P., Santa, S. and Schotter, O., 1962.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (volume 1). Ed, C.N.R.S, Paris. p.785.
- **Quezel, P. and Santa, S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (volume 2). Ed, C.N.R.S, Paris. p. 1087.

- **Quin, J.I.**, 1943. Studies on the alimentary tract of merino sheep in South Africa. 7. Fermentation in the forestomachs of sheep. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science*, 18, pp.91-112.

## **R**

- **Rahman, M.M.**, Salleh, M.A.M., Sultana, N., Kim, M.J. and Ra, C.S., 2013. Estimation of total volatile fatty acid (VFA) from total organic carbons (TOCs) assessment through in vitro fermentation of livestock feeds. *African Journal of Microbiology Research*, 7(15), pp.1378-1384.
- **Reeve, J. N.**, Nölling, J., Morgan, R. M., & Smith, D. R., 1997. Methanogenesis: genes, genomes, and who's on first. *Journal of Bacteriology*, 179, pp.59-75.
- **Rémond, B.**, Brugère, H., Poncet, C., Baumont, R., 1995. Le contenu du réticulo-rumen. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (eds.). *Nutrition des ruminants domestiques. Ingestion et digestion*, pp. 253-298. INRA Edition, Paris, France.
- **Rodhe, H.** 1990. A comparison of the contribution of various gases to the greenhouse effect. *Science*, 248(4960), p.1217-1219.
- **Romani, A.**, Pinelli, P., Cantini, C., Cimato, A. and Heimler, D., 2006. Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Food Chemistry*, 95(2), pp.221-225.
- **Romaschenko, K.**, Ertuğrul, K., Susanna, A., Garcia-Jacas, N., Uysal, T. and Arslan, E., 2004. New chromosome counts in the *Centaurea Jacea* group (*Asteraceae, Cardueae*) and some related taxa. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 145(3), pp.345-352.
- **Russell, J. B.**, Wallace, R. J., 1988. Energy yielding and consuming reactions. In: Hobson, P. N. (eds.). *The rumen microbial ecosystem*, pp. 185-215. Elsevier Applied Science, London and New York.

## **S**

- **Salem, H.B.**, Nefzaoui, A. and Salem, L.B., 2002. Supplementation of *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage-based diets with barley or shrubs from arid areas (*Opuntia ficus-indica* f. *inermis* and *Atriplex nummularia* L.) on growth and digestibility in lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 96(1-2), pp.15-30.
- **Salem, H.B.**, Abidi, S., Makkar, H.P.S. and Nefzaoui, A., 2005. Wood ash treatment, a cost-effective way to deactivate tannins in *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage and to improve digestion by Barbarine sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 122(1-2), pp.93-108.

- **Salem**, A.Z.M., Salem, M.Z.M., El-Adawy, M.M. and Robinson, P.H., 2006. Nutritive evaluations of some browse tree foliages during the dry season: secondary compounds, feed intake and in vivo digestibility in sheep and goats. *Animal Feed Science and Technology*, 127(3-4), pp.251-267.
- **Salem**, A.Z.M., López, S. and Robinson, P.H., 2012. Plant bioactive compounds in ruminant agriculture—Impacts and opportunities. *Animal Feed Science and Technology*.176 (4).pp.1-4.
- **Sánchez-Mata**, M.C., Loera, R.C., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Cámara, M., Marqués, C.D., Pardo-de-Santayana, M. and Tardío, J., 2012. Wild vegetables of the Mediterranean area as valuable sources of bioactive compounds. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(3), pp.431-443.
- **Santoso**, B., Saragih, E.W. and Hariadi, B.T., 2013. Effect of Water Extract of Plants Containing Tannin on in Vitro Methagonesis and Fermentation Characteristics of the Grass Pennisetum Purpureophoides. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 38(1), pp.47-54.
- **Saro Higuera**, C., 2013. Structure of ruminal microbial communities of sheep fed different diets .Thèse de doctorat en médecine vétérinaire, Université de Claude Bernard, Lyon. France.
- **Saunois**, M., Bousquet, P., Poulter, B., Peregon, A., Ciais, P., Canadell, J. G., *et al.* 2016. The global methane budget 2000-2012. *Earth System Science Data*, 8(2), 697.
- **Sautet**, J., 1995. L'appareil digestif et ses adaptations. In : Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M-H., Journet, M. (eds.). *Nutrition des ruminants domestiques. Ingestion et digestion*, pp. 183-222. INRA Edition, Paris, France.
- **Sauvant**, D., Chapoutot, P. and Archimède, H., 1994. La digestion des amidons par les ruminants et ses conséquences. *INRA Productions animales*, 7(2), pp.115-124.
- **Sauvant**, D., Grenet, E., Doreau, D., 1995. Dégradation chimique des aliments dans le réticulo-rumen : cinétique et importance. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (eds.). *Nutrition des ruminants domestiques*, pp. 383-406. INRA Editions, Paris, France.
- **Sauvant**, D., Giger-Reverdin, S. and Meschy, F., 2006. Le contrôle de l'acidose ruminale latente. *Productions animales*, 19(2), pp.69-78.

- **Sauvant, D.**, & Giger-Reverdin, S. 2007. Empirical modelling by meta-analysis of digestive interactions and CH<sub>4</sub> production in ruminants. 2<sup>nd</sup> EAAP International Symposium on energy and protein metabolism and nutrition, 124. Wageningen Academic Publisher.
- **Sauvant, D.**, Giger-Reverdin, S., Meschy, F., 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux et valeurs des aliments. Tables INRA 2007. Ed, Quae, Versailles, France. pp. 137-148.
- **Sauvant, D.**, Giger-Reverdin, S., Serment, A., Broudicou, L. P., 2011. Influence des régimes et de leur fermentation dans le rumen sur la production de méthane par les ruminants. *INRA Production Animale*, 24, pp. 433-446.
- **Schneider, A.**, & Huyghe, C., 2015. Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires. Ed Quae. Versailles, Cedex.
- **Schofield, P.** and Pell, A.N., 1995. Validity of using accumulated gas pressure readings to measure forage digestion in vitro: a comparison involving three forages. *Journal of Dairy Science*, 78(10), pp.2230-2238.
- **Searle, P.L.**, 1984. The Berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen. A review. *Analyst*, 109(5), pp.549-568.
- **Selmi, H.**, Abdelwahed, Z., Amraoui, M. and Rouissi, H., 2013. Composition chimique, valeur alimentaire et digestibilité de quelques arbustes fourragers du Nord Tunisien. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants*, N° : 20.
- **Serment, A.**, 2012. Dynamique et intensité de biotransformation dans le rumen. Thèse de doctorat, option : Sciences agricoles. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement. Paris. France. p.32.
- **Sheaffer, C.C.**, Peterson, M.A., McCaslin, M., Volenec, J.J., Cherney, J.H., Johnson, K.D., Woodward, W.T. and Viands, D.R., 1995. Acid detergent fiber, neutral detergent fiber concentration and relative feed value. Standart Tests to Characterize Alfalfa Cultivars. In : *North American Alfalfa Improvement Conference*, Minneapolis. USA. <http://www.naaic.org/stdtests/acidfiber.htm>
- **Shin, E. C.**, Cho, K. M., Lim, W. J., Hong, S. Y., An, C. L., Kim, E. J., Kim, Y.K., B.R. Choi, B.R., An, J.M., Kang, J.M., Kim, H., & Yun, H. D. (2004). Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. *Journal of Applied Microbiology*, 97, pp.378-383.
- **Singer, M.D.**, Robinson, P.H., Salem, A.Z.M. and DePeters, E.J., 2008. Impacts of rumen fluid modified by feeding *Yucca schidigera* to lactating dairy cows on in vitro gas

production of 11 common dairy feedstuffs, as well as animal performance. *Animal Feed Science and Technology*, 146(3-4), pp.242-258.

- **Singh**, B., Gautam, S.K., Verma, V., Kumar, M. and Singh, B., 2008. Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: Potential biotechnological prospects. *Anaerobe*, 14(3), pp.138-144.
- **Singleton**, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, pp. 152-178.
- **Skillman**, L.C., Toovey, A.F., Williams, A.J. and Wright, A.D.G., 2006. Development and validation of a real-time PCR method to quantify rumen protozoa and examination of variability between Entodinium populations in sheep offered a hay-based diet. *Applied and environmental microbiology*, 72(1), pp.200-206.
- **Śliwiński**, B.J., Soliva, C.R., Machmüller, A. and Kreuzer, M., 2002. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 101(1-4), pp.101-114.
- **Smith**, A.H., Zoetendal, E. and Mackie, R.I., 2005. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial ecology*, 50(2), pp.197-205.
- **Soares**, P.C., Martinele, I., D'Agosto, M., Maruta, C.A., Sucupira, M.C.A., Antonelli, A.C., Mori, C.S. and Ortolani, E.L., 2008. Effect of an energy-deficient diet on populations of ciliate protozoans in bovine rumen. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60(1), pp.148-155.
- **Soliva**, C.R., Zeleke, A.B., Clement, C., Hess, H.D., Fievez, V. and Kreuzer, M., 2008. In vitro screening of various tropical foliages, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. *Animal feed science and technology*, 147(1-3), pp.53-71.
- **Solomon**, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K. B., Tignor, M., and Miller, H.L. 2007. The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change, pp.235-337.
- **Soltan**, Y.A., Morsy, A.S., Sallam, S.M.A., Louvandini, H. and Abdalla, A.L., 2012. Comparative in vitro evaluation of forage legumes (prosopis, acacia, atriplex, and leucaena) on ruminal fermentation and methanogenesis. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 21(4).pp.757-772.

- **Sparg, S.**, Light, M.E. and Van Staden, J., 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of ethnopharmacology*, 94(2-3), pp.219-243.
- **SPSS**, 2009. Statistical Package for the Social Sciences. Version 17.0.0.3.
- **Srivastava, J.K.** and Gupta, S., 2009. Extraction, characterization, stability and biological activity of flavonoids isolated from chamomile flowers. *Molecular and cellular pharmacology*, 1(3), pp.138.
- **Stewart, C.S.** and Bryant, M.P. 1988. The rumen bacteria. In: Hobson, P.N (eds.). The rumen microbial ecosystem, pp : 21–75. Elsevier Applied Science, New York, USA.
- **Stich, K.**, Halbwirth, H., Wurst, F. and Forkmann, G., 1997. UDP-glucose: flavonol 7-O-glucosyltransferase activity in flower extracts of *Chrysanthemum segetum*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 52(3-4), pp.153-158.
- **Stiling, P.** and Cornelissen, T., 2007. How does elevated carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) affect plant–herbivore interactions? A field experiment and meta-analysis of CO<sub>2</sub>-mediated changes on plant chemistry and herbivore performance. *Global Change Biology*, 13(9), pp.1823-1842.
- **Stumm, C.K.**, Gijzen, H.J. and Vogels, G.D., 1982. Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *British Journal of Nutrition*, 47(1), pp.95-99.
- **Sylvester, J. T.**, Karnati, S. K. R., Yu, Z., Newbold, C. J., & Firkins, J. L., 2005. Evaluation of a real-time PCR assay quantifying the ruminal pool size and duodenal flow of protozoal nitrogen. *Journal of dairy science*, 88(6), pp.2083-2095.
- **Sytar, O.**, Bruckova, K., Hunkova, E., Zivcak, M., Konate, K. and Brestic, M., 2015. The application of multiplex fluorimetric sensor for the analysis of flavonoids content in the medicinal herbs family Asteraceae, Lamiaceae, Rosaceae. *Biological research*, 48(1), pp.1-5.

## T

- **Tajima, K.**, Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M. and Benno, Y., 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and environmental microbiology*, 67(6), pp.2766-2774.
- **Tan, H.Y.**, Siew, C.C., Abdullah, N., Liang, J.B., Huang, X.D. and Ho, Y.W., 2011. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 169(3-4), pp.185-193.
- **Tarakanov, B.V.**, 1971 . Bacteriophages in the contents of cattle rumen. *Mikrobiologiya* 40,

- **Tavendale**, M.H., Meagher, L.P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G.T. and Sivakumaran, S., 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*, 123, pp.403-419.
- **Tefera**, S., Mlambo, V., Dlamini, B.J., Dlamini, A.M., Koralagama, K.D.N. and Mould, F.L., 2008. Chemical composition and in vitro ruminal fermentation of common tree forages in the semi-arid rangelands of Swaziland. *Animal feed science and technology*, 142(1-2), pp.99-110.
- **Telli**, A., Mahboub, N., Boudjeneh, S., Siboukeur, O. E. K. and Moulti-Mati. F., 2010. Optimisation des conditions d'extraction des polyphenols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera* l) variété *ghars*. *Annales des Sciences et Technologie*, 2(2), pp.107-115.
- **Temel**, S. and Tan, M., 2011. Fodder values of shrub species in maquis in different altitudes and slope aspects. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 21(3), pp.508-512.
- **Temel**, S. and Pehlivan, M., 2015. Evaluating orchard and poplar leaves during autumn as an alternative fodder source for livestock feeding. *Ciencia e investigación agraria*, 42(1), pp.27-33.
- **Thauer**, R.K., 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson: 1998 Marjory Stephenson prize lecture. *Microbiology*, 144(9), pp.2377-2406.
- **Thauter**, R.K., Kaster, A.K., Seedorf, H., Buckel, W and Hedderich, R. 2008. Methanogenic Archaea, ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology*, 6, pp.579-591.
- **Theodorou**, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B. and France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal feed science and technology*, 48(3-4), pp.185-197.
- **Theodorou**, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B. and France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal feed science and technology*, 48(3-4), pp.185-197.
- **Tokura**, M., Ushida, K., Miyazaki, K. and Kojima, Y., 1997. Methanogens associated with rumen ciliates. *FEMS Microbiology Ecology*, 22(2), pp.137-143.
- **Tokura**, M., Chagan, I., Ushida, K. and Kojima, Y., 1999(a). Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. *Current microbiology*, 39(3), pp.123-128.

- Tokura, M., Tajima, K. and Ushida, K., 1999(b). Isolation of *Methanobrevibacter* sp. as a ciliate-associated ruminal methanogen. *The Journal of general and applied microbiology*, 45(1), pp.43-47.
- **Tomme**, P., Warren, R.A.J. and Gilkes, N.R., 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. In *Advances in microbial physiology*, (37), pp. 1-81.
- **Triki**, S., Benmessaoud, N.E. and Ghozlane, F., 2010. Valeur alimentaire comparée de la paille de céréales traitées à l'urée ou à l'ammoniac. *Livestock Research for Rural Development*, 22 (1). <http://www.lrrd.org/lrrd22/1/trik22017.htm>.
- **Tubiello**, F.N., Salvatore, M., CórdorGolec, R.D., Ferrara, A., Rossi,S., Biancalani, R. Federici, H., Jacobs, A. and Flammini. 2014. Agriculture, Forestry and Other Land Use Emissions by Sources and Removals by Sinks, 1990-2011 Analysis. Food and agriculture organization (FAO) of the united nations.ESS/14-02.p.30.
- **Turkoglu**, A., Duru, M.E., Mercan, N., Kivrak, I. and Gezer, K., 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 101(1), pp.267-273.
- **Tymensen**, L.D., Beauchemin, K.A. and McAllister, T.A., 2012. Structures of free-living and protozoa-associated methanogen communities in the bovine rumen differ according to comparative analysis of 16S rRNA and *mcrA* genes. *Microbiology*, 158(7), pp.1808-1817.

## U

- **Ungerfeld**, E.M., Rust, S.R. and Burnett, R., 2003. Use of some novel alternative electron sinks to inhibit ruminal methanogenesis. *Reproduction Nutrition Development*, 43(2), pp.189-202.
- **Ungerfeld**, E.M., 2015. Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: a meta-analysis. *Frontiers in microbiology*, 6 (37),pp.1-17.
- **Ushida**, K., Jouany, J.P. and Thivend, P., 1986. Role of rumen protozoa in nitrogen digestion in sheep given two isonitrogenous diets. *British journal of nutrition*, 56(2), pp.407-419.
- **Ushida**, K., Jouany, J.P. and Demeyer, D.I., 1991. Effects of presence or absence of rumen protozoa on the efficiency of utilization of concentrate and fibrous feeds. In : Tsuda, T., Sasaki, y. and Kawashima, R. (eds.). *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminant*. pp.625-654. Academic Press, Tokyo.Japan.

## V

- **Valant-Vetschera**, K.M., Wollenweber, E., Faure, R. and Gaydou, E., 2003. New exudate flavonoids of species from the *Chrysanthemum* complex (Asteraceae-Anthemideae). *Biochemical systematics and ecology*, 31(5), pp.545-548.
- **Van Nevel**, C.J., and Demeyer, D.I., 1977. Effect of monensin on rumen metabolism *in vitro*. *Applied Environmental Microbiology*, 34, pp.251–257.
- **Van Soest**, P.J., Wine, R.H. and Moore, L.A., 1966. Estimation of the true digestibility of forages by the *in vitro* digestion of cell walls. Estimation of the true digestibility of forages by the *in vitro* digestion of cell walls. *Proceedings of the 10th International Grassland Congress*, 10, pp. 438-441. Helsinki, Finland.
- **Van Soest**, P.V., Robertson, J.B. and Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science*, 74(10), pp.3583-3597.
- **Van Soest**, P., 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Ed, Cornell University Press, Ithaca, NY.
- **Vermorel**, M., 1995. Productions gazeuses et thermiques résultant des fermentations digestives. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M.(eds.). *Nutrition des ruminants domestiques. Ingestion et digestion*, pp. 649-670. INRA Editions, Paris, France.
- **Vogels**, G.D., Hoppe, W.F. and Stumm, C.K., 1980. Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(3), pp.608-612.

## W

- **Waghorn**, G., 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 147(1-3), pp.116-139.
- **Wallace**, R.J. and Joblin, K.N., 1985. Proteolytic activity of a rumen anaerobic fungus. *FEMS Microbiology Letters*, 29(1-2), pp.19-25.
- **Wallace**, R.J. and Munro, C.A., 1986. Influence of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* on the proteolytic activity of a defined mixture of rumen bacteria growing on a solid substrate. *Letters in applied microbiology*, 3(2), pp.23-26.
- **Wallace**, R. J., Cotta, M. A., 1988. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: Hobson, P. N. (eds.). *The rumen microbial ecosystem*, pp. 217-249. Elsevier Applied Science, London and New York.

- **Wang**, C.T., Yang, C.M.J. and Chen, Z.S., 2012. Rumen microbial volatile fatty acids in relation to oxidation reduction potential and electricity generation from straw in microbial fuel cells. *biomass and bioenergy*, 37, pp.318-329.
- **Wattiaux**, M.A. and Armentano, L.E., 2011. Carbohydrate metabolism in dairy cows. *Dairy Essentials*, pp.9-12.
- **Williams**, A. G. and Withers, S.E. 1981. The Production of plant cell wall polysaccharides-degrading enzymes by hemicellulolytic rumen bacterial isolates grown on a range of carbohydrate substrates. *Journal of Applied Bacteriology*, 52 : pp.377-387.
- **Williams**, A.G. and Coleman, G.S., 1997. The rumen protozoa. In : Williams, A.G. and Coleman, G.S. (eds). *The rumen microbial ecosystem*, pp. 73-139. Springer, Dordrecht, the Netherlands.
- **Williams**, C.A., Greenham, J. and Harborne, J.B., 2001. The role of lipophilic and polar flavonoids in the classification of temperate members of the Anthemideae. *Biochemical systematics and ecology*, 29(9), p.929-945.
- **Wina**, E., Muetzel, S. and Becker, K., 2006. The dynamics of major fibrolytic microbes and enzyme activity in the rumen in response to short-and long-term feeding of *Sapindus rarak* saponins. *Journal of applied microbiology*, 100(1), pp.114-122.
- **Woese**, C.R., Kandler, O and Wheelis, M.L., 1990. Toward a natural system of organisms : proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceeding of the national academy of sciences of the united states of america*, 87, pp. 4576-4579.
- **Wolin**, M. J., Miller, T. L., & Stewart, C. S., 1997. Microbe-microbe interactions. In : Hobson, P.N. and Stewart, C.S. (eds.). *The rumen microbial ecosystem*, pp. 467-491. Springer, Dordrecht, the Netherlands.
- **Wright**, A. D. G., Williams, A. J., Winder, B., Christophersen, C. T., Rodgers, S. L., & Smith, K. D., 2004. Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, pp.1263-1270.
- **Wu**, J.Y., Gardner, B.H., Kushner, N.N., Pozzi, L.A.M., Kensil, C.R., Cloutier, P.A., Coughlin, R.T. and Newman, M.J., 1994. Accessory cell requirements for saponin adjuvant-induced class I MHC antigen-restricted cytotoxic T-lymphocytes. *Cellular immunology*, 154(2), pp.393-406.

## Y

- **Yanagita**, K., Kamagata, Y., Kawaharasaki, M., Suzuki, T., Nakamura, Y. and Minato, H., 2000. Phylogenetic analysis of methanogens in sheep rumen ecosystem and detection of

Methanomicrobium mobile by fluorescence in situ hybridization. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(8), pp.1737-1742.

○ **Yu, Z.**, Yu, M. and Morrison, M., 2006. Improved serial analysis of V1 ribosomal sequence tags (SARST-V1) provides a rapid, comprehensive, sequence-based characterization of bacterial diversity and community composition. *Environmental Microbiology*, 8(4), pp.603-611.

## **Z**

○ **Zhou, Y.Y.**, Mao, H.L., Jiang, F., Wang, J.K., Liu, J.X. and McSweeney, C.S., 2011. Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 166, pp.93-100.

○ **Zimmer, N.** and Cordesse, R., 1996. Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *Productions Animales* 3 (9), pp.167-179.

○ **Zitouni, H.**, Arhab, R., Boudry, C., Bousseboua, H. and Beckers, Y., 2014. Chemical and biological evaluation of the nutritive value of Algerian green seaweed *Ulva lactuca* using in vitro gas production technique for ruminant animals. *International Journal of Advanced Research*, 2(4), pp.916-925.

# **Annexes**

## Composition des solutions utilisées pour l'estimation des fractions pariétales »

### ➤ Solution NDS (Neutral Detergent Solution)

#### ✚ *Solution 1*

- Peser 300 g de Lauryl Sulfate de Sodium dans un ballon de 10 L ;
- Ajouter 5L d'eau distillée ;
- Ajouter 100 ml d'éther monoéthylique de l'éthylène glycol (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>).

#### ✚ *Solution 2*

- Peser 68.1 g de di-Sodium tétraborate décahydraté (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O) dans un bécher de 2L;
- Ajouter 186.1 g de Kestranal 2S (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.2H<sub>2</sub>O, disodium éthylène diamine tétraacétate ou EDTA).

#### ✚ *Solution 3*

- Peser 45.6 g de di-sodium hydrogénophosphate anhydre (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) dans un bécher de 2L ;
- Ajouter de l'eau distillée chaude et agiter jusqu'à l'obtention d'une solution transparente ;
- Mélanger les solutions 2 et 3 à la solution 1, agiter et porter au trait le lendemain avec de l'eau distillée. Le pH de la solution doit être compris entre 6.9 et 7.1.

### ➤ Solution ADS (Acid Detergent Solution)

- Remplir une fiole de 5L d'eau distillée
- Peser 490.4 g de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré à 100%
- Verser la quantité lentement par petites fractions dans une fiole préalablement placée dans un évier rempli d'eau froide (mélanger entre les ajouts avec risque d'échauffement)
- Ajouter 200 g de CTAB (Cetyl Triméthylammonium Bromide)
- Après refroidissement complet, porter au trait avec de l'eau distillée et agiter

**Protocol expérimental suivi pour l'extraction de l'ADN en utilisant le Kit Fast DNA SPIN kit pour sol, Q-BIO gène, Québec, Canada)**

1. 300 mg du culot microbien obtenu à l'issue de la centrifugation de 1.5 ml du liquide ruminal est repris dans 978 µl de tampon de phosphate de sodium (PBS) inclus dans le kit ;
2. La suspension ainsi obtenue est transférée dans un tube de lysing matrix E (inclus dans le kit) contenant des fines billes de verre ;

**Note 01** : Pour les culots congelés, éviter de les décongeler avant d'y avoir ajouté le PBS

3. Vortexer jusqu'à homogénéisation complète de la suspension afin d'obtenir une concentration maximale en ADN ;
4. Ajouter 122 µl de tampon de lyse MT afin de dégrader les membranes microbiennes ;
5. Homogénéiser le tube Lysing Matrix E dans FastPrep®Instrument (gène Q-BIO, Québec, Canada) pendant 30 secs à une vitesse de 6 ;
6. Centrifuger à 14 000 x g pendant 10 min ;

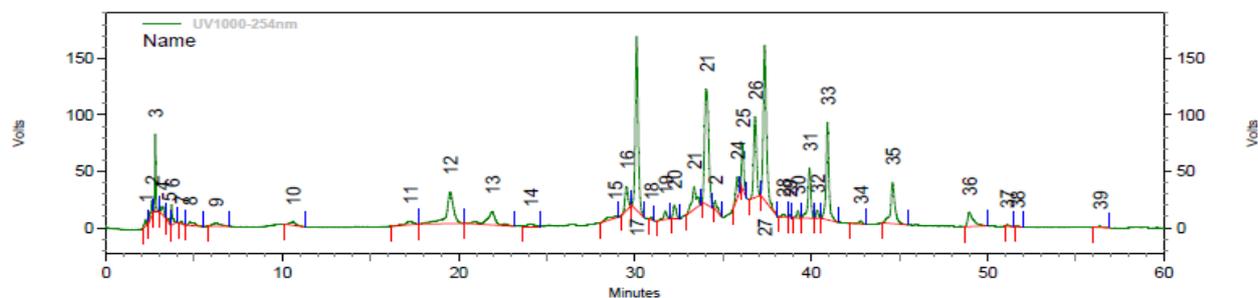
**Note 02** : Le temps de centrifugation est allongé à 15 min dans les échantillons destinés à l'isolement de l'ADN des protozoaires.

7. Transférer le surnageant dans un tube Eppendorf de 2 ml, puis ajouter 250 µl de la solution de précipitation des protéines (PPS) ;
8. Le mélange ainsi obtenu est agité par inversion puis centrifugé à 14 000 x g pendant 5 min ;
9. Transférer le surnageant à un tube propre de 5 ml, le culot contenant les protéines est éliminé ;
10. Ajouter 800 µl de la suspension de matrice de purification (Binding Matrix suspension) contenant de la silice présentant une forte affinité pour l'ADN ;
11. Agiter doucement le tube par inversion pendant 2 min pour permettre la liaison de l'ADN à la silice, le tube est, par la suite immobilisé 3 à 5 min pour laisser décanter la matrice de la silice ;
12. Éliminer 500 µl du surnageant puis la matrice de fixation de l'ADN est re-suspendue dans le volume restant ;
13. Transfert environ 600 µl du mélange à un filtre SPIN™ et centrifuger à 14 000 x g pendant 1 min pour faire isoler la silice, sur laquelle l'ADN est retenu, de la phase liquide ;
14. Videz le tube de récupération et ajoutez le mélange restant au filtre SPIN™ et centrifuger à nouveau (1 min à 14 000 x g), puis vider le tube encore une fois ;
15. L'ADN est ensuite précipité par ajout de 500 µL de solution de lavage sel-éthanol (SEWS-M) et centrifugation pendant 1 min à 14 000 x g ;
16. Une centrifugation supplémentaire de 2 min à 14 000 x g est réalisée afin de supprimer l'éthanol résiduel et d'obtenir une matrice sèche.
17. Les échantillons de l'ADN obtenus pour les deux communautés sont stockés à -20°C.

## External Standard Report

Chrysanthemum segetum L.

Method Name: C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\Ephedra Methode.met  
 Data: C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\24-03-2014 HPLC\serine\plante07005.dat  
 User: System  
 Acquired: 04/03/2013 11:50:41  
 Printed: 28/02/2018 10:55:38



UV1000-254nm  
 Results (System  
 (28/02/2018  
 10:53:28)  
 (Reprocessed))

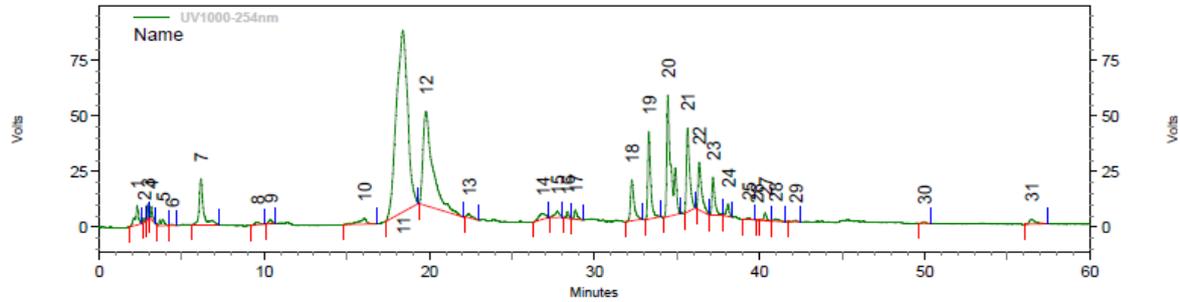
PK #	Name	Retention Time	Area	Concentration
1	1	2,253	43842	0,000
2	2	2,600	81712	0,000
3	3	2,792	269980	0,000
4	4	3,170	86965	0,000
5	5	3,540	18785	0,000
6	6	3,715	97472	0,000
7	7	4,283	22620	0,000
8	8	4,742	70143	0,000
9	9	6,207	88169	0,000
10	10	10,582	74268	0,000
11	11	17,238	91826	0,000
12	12	19,522	825592	0,000
13	13	21,897	420531	0,000
14	14	24,068	52207	0,000
15	15	28,865	84400	0,000
16	16	29,518	260340	0,000
17	17	30,092	1742745	0,000
18	18	30,910	16828	0,000
19	19	31,723	94691	0,000
20	20	32,235	144024	0,000
21	21	33,355	366779	0,000
22	21	34,048	1649761	0,000
23	2	34,543	86153	0,000
24	24	35,810	188581	0,000
25	25	36,102	334445	0,000
26	26	36,815	820740	0,000
27	27	37,357	1737972	0,000
28	28	38,423	24578	0,000
29	29	38,782	17959	0,000
31	31	39,902	504617	0,000
32	32	40,337	60959	0,000
33	33	40,920	965318	0,000
34	34	42,802	44658	0,000
35	35	44,612	618563	0,000
36	36	48,965	279375	0,000
37	37	51,115	15883	0,000
38	38	51,678	9648	0,000
39	39	56,367	16253	0,000

Totals			12389513	0,000
--------	--	--	----------	-------

## External Standard Report

Chamaemelum nobile L.

Method Name: C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\Ephedra Methode.met  
 Data: C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\24-03-2014 HPLC\serine\serine2002.dat  
 User: System  
 Acquired: 28/01/2013 11:08:59  
 Printed: 28/02/2018 08:28:25



UV1000-254nm  
 Results (System  
 (28/02/2018  
 08:25:58)  
 (Reprocessed))

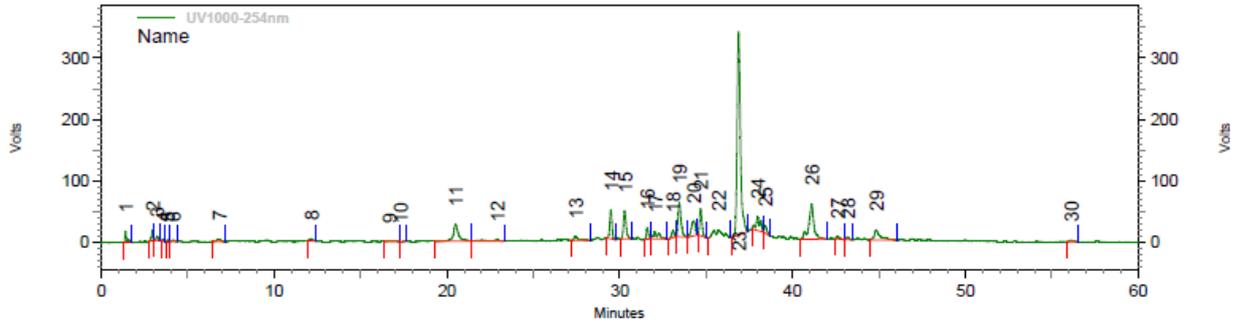
PK #	Name	Retention Time	Area	Concentration
1	1	2,297	123333	0,000
2	2	2,705	10285	0,000
3	3	2,922	20766	0,000
4	4	3,162	45576	0,000
5	5	3,847	47242	0,000
6	6	4,388	6595	0,000
7	7	6,162	362430	0,000
8	8	9,578	23461	0,000
9	9	10,367	26458	0,000
10	10	16,058	92722	0,000
11	11	18,397	3877090	0,000
12	12	19,793	1718116	0,000
13	13	22,378	34334	0,000
14	14	26,865	73418	0,000
15	15	27,747	54731	0,000
16	16	28,378	27073	0,000
17	17	28,842	48692	0,000
18	18	32,265	276808	0,000
19	19	33,293	478797	0,000
20	20	34,447	994908	0,000
21	21	35,638	504395	0,000
22	22	36,343	319547	0,000
23	23	37,178	206217	0,000
24	24	38,093	64545	0,000
25	25	39,323	9313	0,000
26	26	39,832	7728	0,000
27	27	40,335	34318	0,000
28	28	40,960	21222	0,000
29	29	42,187	7367	0,000
30	30	49,955	8190	0,000
31	31	56,462	54525	0,000

Totals			9580202	0,000
--------	--	--	---------	-------

## External Standard Report

Centaurea pulata L.

Method Name: C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\Ephedra Methode.met  
 Data: C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\24-03-2014 HPLC\serine\plante05002.dat  
 User: System  
 Acquired: 03/03/2013 10:06:52  
 Printed: 28/02/2018 10:27:40



UV1000-254nm  
 Results (System  
 (28/02/2018  
 10:26:29)  
 (Reprocessed))

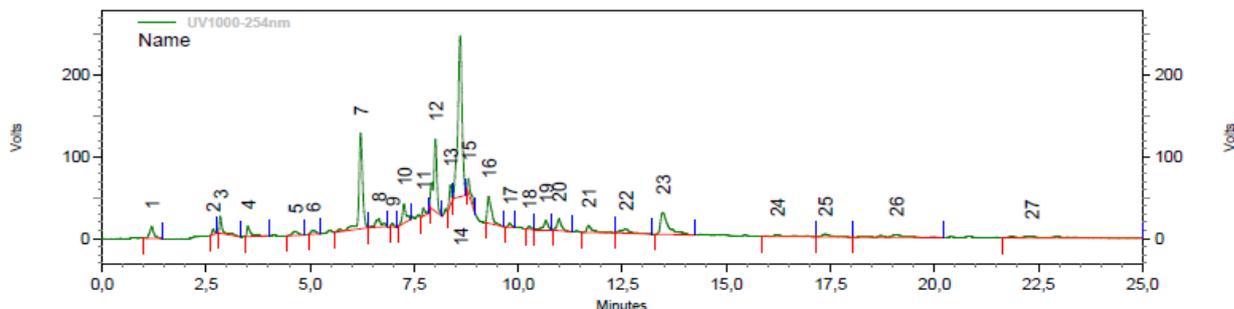
Pk #	Name	Retention Time	Area	Concentration
1	1	1,400	114730	0,000
2	2	2,955	87049	0,000
3	3	3,222	55295	0,000
4	4	3,560	16538	0,000
5	5	3,830	10594	0,000
6	6	4,157	25147	0,000
7	7	6,818	59491	0,000
8	8	12,143	44450	0,000
9	9	16,662	23056	0,000
10	10	17,305	2452	0,000
11	11	20,500	577570	0,000
12	12	22,907	88433	0,000
13	13	27,443	124100	0,000
14	14	29,488	415175	0,000
15	15	30,285	489637	0,000
16	16	31,597	147313	0,000
17	17	32,030	245742	0,000
18	18	33,092	105201	0,000
19	19	33,450	670456	0,000
20	20	34,275	372234	0,000
21	21	34,685	429225	0,000
22	22	35,723	469285	0,000
23	23	36,883	4403422	0,000
24	24	37,982	387726	0,000
25	25	38,425	133535	0,000
26	26	41,110	1158052	0,000
27	27	42,623	43588	0,000
28	28	43,188	38548	0,000
29	29	44,838	402095	0,000
30	30	56,125	35165	0,000

Totals	11175304	0,000
--------	----------	-------

## External Standard Report

Taraxacum officinales L.

Method Name: C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\Ephedra Methode.met  
 Data: C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\24-03-2014 HPLC\serine\plante x002.dat  
 User: System  
 Acquired: 07/07/2013 11:56:40  
 Printed: 28/02/2018 11:33:44



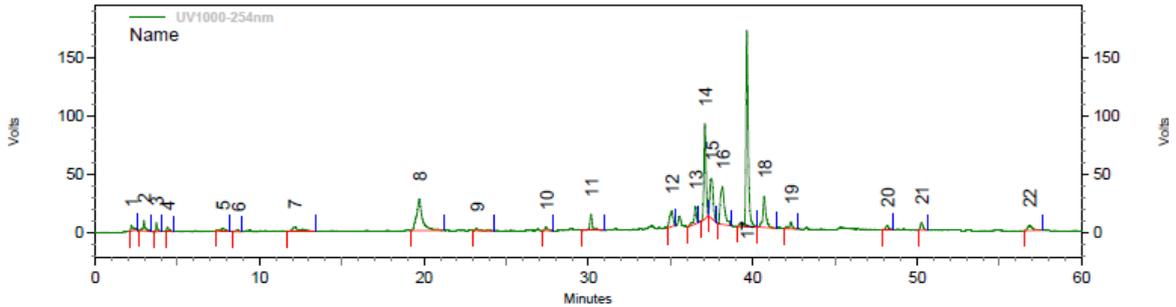
UV1000-254nm  
 Results (System  
 (28/02/2018  
 11:32:44)  
 (Reprocessed))

Pk #	Name	Retention Time	Area	Concentration
1	1	1,198	100690	0,000
2	2	2,670	24184	0,000
3	3	2,843	112916	0,000
4	4	3,503	82907	0,000
5	5	4,637	51518	0,000
6	6	5,068	38895	0,000
7	7	6,217	728988	0,000
8	8	6,648	101076	0,000
9	9	6,978	17897	0,000
10	10	7,258	143412	0,000
11	11	7,727	43231	0,000
12	12	8,012	533475	0,000
13	13	8,375	87147	0,000
14	14	8,608	1395646	0,000
15	15	8,803	103155	0,000
16	16	9,292	233382	0,000
17	17	9,797	23686	0,000
18	18	10,267	19520	0,000
19	19	10,667	85645	0,000
20	20	10,978	103845	0,000
21	21	11,692	87416	0,000
22	22	12,580	77100	0,000
23	23	13,475	354398	0,000
24	24	16,227	57565	0,000
25	25	17,372	55485	0,000
26	26	19,085	124817	0,000
27	27	22,335	118648	0,000
Totals			4906644	0,000

## External Standard Report

Senecio Jacobaea L.

Method Name: C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\Ephedra Methode.met  
 Data: C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\24-03-2014 HPLC\serine\serine1001.dat  
 User: System  
 Acquired: 28/01/2013 10:00:33  
 Printed: 27/02/2018 13:23:16



UV1000-254nm  
 Results (System  
 (27/02/2018  
 13:15:44)  
 (Reprocessed))

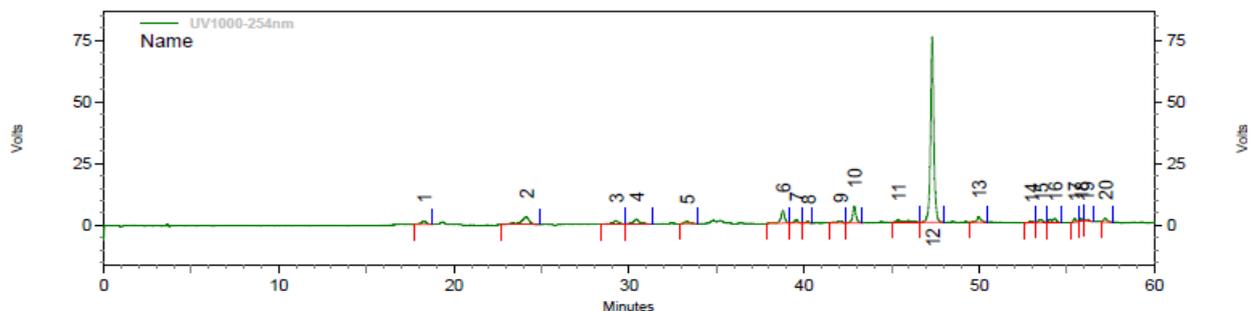
Pk #	Name	Retention Time	Area	Concentration
1	1	2,200	47653	0,000
2	2	2,965	79223	0,000
3	3	3,723	40241	0,000
4	4	4,405	29254	0,000
5	5	7,748	48889	0,000
6	6	8,680	16164	0,000
7	7	12,122	104778	0,000
8	8	19,723	667543	0,000
9	9	23,203	35409	0,000
10	10	27,438	30813	0,000
11	11	30,162	154002	0,000
12	12	35,072	195413	0,000
13	13	36,512	154040	0,000
14	14	37,095	726095	0,000
15	15	37,482	471399	0,000
16	16	38,163	582238	0,000
17	17	39,647	1599401	0,000
18	18	40,698	333925	0,000
19	19	42,320	78142	0,000
20	20	48,177	43471	0,000
21	21	50,270	68953	0,000
22	22	56,827	88091	0,000

Totals			5595137	0,000
--------	--	--	---------	-------

## External Standard Report

Anacyclus clavatus (Desf.) Pers.

Method Name: C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\Ephedra Methode.met  
 Data: C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\24-03-2014 HPLC\serine\plante06003.dat  
 User: System  
 Acquired: 04/03/2013 09:27:44  
 Printed: 28/02/2018 10:44:53



UV1000-254nm  
 Results (System  
 (28/02/2018  
 10:43:19)  
 (Reprocessed))

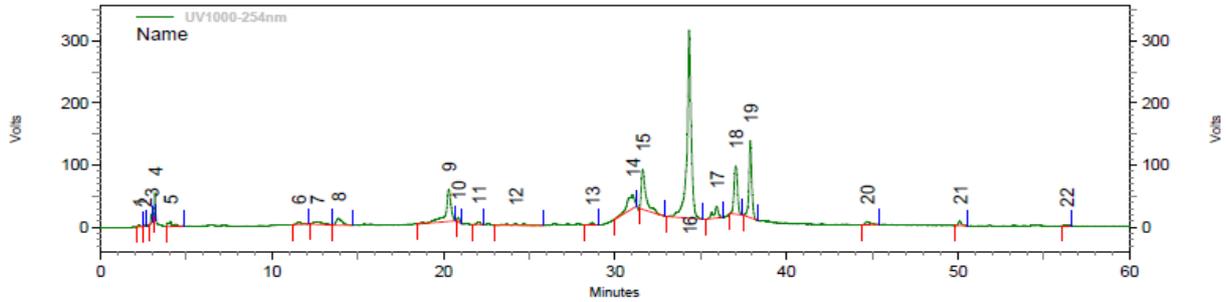
Pk #	Name	Retention Time	Area	Concentration
1	1	18,273	26672	0,000
2	2	24,120	109628	0,000
3	3	29,260	28685	0,000
4	4	30,413	40863	0,000
5	5	33,287	19960	0,000
6	6	38,790	77644	0,000
7	7	39,543	18716	0,000
8	8	40,212	7828	0,000
9	9	42,058	18810	0,000
10	10	42,868	92128	0,000
11	11	45,373	36001	0,000
12	12	47,317	976826	0,000
13	13	49,973	36622	0,000
14	14	52,953	7687	0,000
15	15	53,528	18047	0,000
16	16	54,315	37070	0,000
17	17	55,457	14534	0,000
18	18	55,818	9317	0,000
19	19	56,118	7999	0,000
20	20	57,192	21011	0,000

Totals		1606048	0,000
--------	--	---------	-------

## External Standard Report

Chichorium intybus L.

Method Name: C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\Ephedra Methode.met  
 Data: C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\24-03-2014 HPLC\serine\plante08004.dat  
 User: System  
 Acquired: 04/03/2013 10:47:28  
 Printed: 28/02/2018 11:01:57



UV1000-254nm  
 Results (System  
 (28/02/2018  
 11:01:00)  
 (Reprocessed))

Pk #	Name	Retention Time	Area	Concentration
1	1	2,243	25040	0,000
2	2	2,560	11565	0,000
3	3	2,957	58996	0,000
4	4	3,180	141638	0,000
5	5	4,073	165110	0,000
6	6	11,545	81792	0,000
7	7	12,615	169206	0,000
8	8	13,872	259982	0,000
9	9	20,308	1124277	0,000
10	10	20,858	67773	0,000
11	11	22,040	55132	0,000
12	12	24,192	149713	0,000
13	13	28,670	46856	0,000
14	14	31,020	691767	0,000
15	15	31,617	1185107	0,000
16	16	34,325	5193202	0,000
17	17	35,930	333732	0,000
18	18	37,042	1080394	0,000
19	19	37,892	1387366	0,000
20	20	44,693	100632	0,000
21	21	50,105	83934	0,000
22	22	56,353	26291	0,000

Totals			12439505	0,000
--------	--	--	----------	-------

# Résumés

## Résumé

L'objectif du présent travail est focalisé sur l'évaluation de trois *Asteracées* (*C.nobile*, *C.pulata* et *C. segetum*) d'un point de vue nutritionnel via des procédés chimiques (analyse fourragère), phytochimiques (contenu phénolique et terpénique) et biologique (fermentescibilité *in vitro* par le microbiote ruminal de bovins). L'aspect environnemental consistait à la détermination de l'effet antiméthanogénique de ces mêmes plantes ainsi que de leurs extraits respectifs. Cet axe est consolidé par des analyses moléculaires (PCR en temps réel) de deux communautés microbiennes impliquées directement dans la méthanogénèse ruminale (*Archaea* méthanogènes et protozoaires). La finalité pratique de la combinaison de ces deux approches est partagée entre la formulation des régimes alimentaires à base de plantes et/ou de leurs extraits dans le but de proposer des alternatives alimentaires au cheptel local, d'un côté et de contrôler et de réduire les émissions atmosphériques du méthane entérique par les ruminants, d'autre côté.

Les analyses chimiques et phytochimiques permettent de classer *C.nobile* et *C.pulata* comme des substrats de bonne qualité nutritionnelle. Cela s'explique par leur contenu appréciable en parois totale, leur richesse en énergie et en protéines et la présence modérée de substances antinutritionnelles. Néanmoins, le taux élevé en substance bioactives et la faible teneur en protéines notés pour *C. segetum* propose que cette plante pourrait être valorisée comme source naturelle de substances bioactives et faiblement recommandée comme aliment pour bétail.

Les résultats de l'évaluation de la fermentescibilité *in vitro* des substrats étudiés, en termes de la digestibilité, de la production du gaz *in vitro* et du profil fermentaire (acides gras volatils), concordent parfaitement avec ceux des analyses précédentes. En outre, leur profil fermentaire indique globalement que leur contenu en substances secondaires n'influe pas l'activité du microbiote ruminal. En effet, les fractions tannoïde et flavonoïque n'affectent pas les différents paramètres fermentaires après 24h de fermentation.

L'aspect environnemental de l'étude présenté par la détermination de l'effet antiméthanogénique des plantes et de leurs extraits révèle que la fermentation de la centaurée augmente la production du méthane entérique *in vitro*. La camomille noble et le chrysanthème présentent un potentiel antiméthanogénique tangible avec des taux de réductions importantes (-24 et -27%, respectivement). Cependant, l'effet antiméthanogénique est augmenté (-39 et -50%, respectivement) en présence de leurs extraits respectifs. L'approche de la biologie moléculaire nous a permis d'avoir un regard global et rapide sur les principales communautés microbiennes impliquées directement dans le processus de la méthanogénèse ruminale. Les résultats révèlent l'absence d'une relation entre la biomasse des *Archaea* méthanogènes et la production du méthane dans le rumen, et leur existence avec la communauté des protozoaires. La relation symbiotique entre ces deux communautés pourrait justifier ce constat.

De ce qui précède, il ressort que l'inclusion de *C.nobile* dans l'alimentation des ruminants en tant qu'un fourrage de base est fortement préconisée. *C.pulata* est recommandée comme un supplément énergétique, ce qui permet de les proposer comme des bons candidats pour une éventuelle exploitation dans l'alimentation animale et un probable réaménagement des parcours dans les zones steppiques. L'effet notable des extraits étudiés sur la réduction de la production du méthane et surtout l'absence des effets sur les paramètres fermentaires (AGV et ammoniac) permettent de les classer en tant que des additifs alimentaires pour lutter contre le fameux effet de serre.

**Mots clés:** *Asteraceae*, *C.nobile*, *C.segetum*, *C.pulata*, extraits, valeur nutritive, méthanogénèse, qPCR, *Archaea*, Protozoaires.

## Abstract

The objective of the present work is focused on the evaluation of three *Asteraceae* (*C. nobile*, *C. pulata* and *C. segetum*) from a nutritional point of view via chemical processes (forage analysis), phytochemicals (phenolic and terpenic content) and biological (fermentability *in vitro* by the ruminal microbiota of cattle). The environmental aspect consisted in determining the antimethanogenic effect of these same plants as well as their respective extracts. This axis is consolidated by molecular analyzes (real-time PCR) of two microbial communities directly involved in ruminal methanogenesis (*Archaea* methanogens and protozoa). The practical purpose of the combination of these two approaches is shared between the formulation of dietary diets based on herbs and / or their extracts in order to provide food alternatives to local livestock, on the one hand and to control and reduce atmospheric emissions of enteric methane by ruminants, on the other hand.

The chemical and phytochemical analyzes make it possible to classify *C. nobile* and *C. pulata* as substrates of good nutritional quality. This is explained by their appreciable content in total walls, their energy and protein richness and the moderate presence of antinutritional substances. Nevertheless, the high bioactive content and low protein content noted for *C. segetum* suggests that this plant could be valued as a natural source of bioactive substances and poorly recommended as a livestock feed.

The results of the evaluation of the *in vitro* fermentability of the substrates studied, in terms of digestibility, *in vitro* gas production and fermentative profile (volatile fatty acids), are in perfect agreement with those of previous analyzes. In addition, their fermental profile indicates globally that their content of secondary substances does not influence the activity of the ruminal microbiota. Indeed, the tannoid and flavonoid fractions do not affect the different fermentation parameters after 24 hours of fermentation.

The environmental aspect of the study presented by the determination of the antimethanogenic effect of plants and their extracts reveals that the fermentation of centaury increases the production of enteric methane *in vitro*. Noble chamomile and chrysanthemum have a tangible antimethanogenic potential with significant reduction rates (-24 and -27%, respectively). However, the antimethanogenic effect is increased (-39 and -50%, respectively) in the presence of their respective extracts. The approach of molecular biology has allowed us to have a global and rapid look at the main microbial communities directly involved in the process of ruminal methanogenesis. The results reveal the absence of a relationship between the biomass of *Archaea* methanogens and the production of methane in the rumen, and their existence with the protozoan community. The symbiotic relationship between these two communities could justify this finding

Overall, it appears that the inclusion of *C. nobile* in the feeding of ruminants as basic forage is strongly recommended. *C. pulata* is recommended as an energy supplement, which makes it possible to propose them as good candidates for a possible exploitation in the animal feed and a probable reorganization of the courses in the steppic zones. The notable effect of the extracts studied on the reduction of methane production and especially the absence of effects on fermentative parameters (AGV and ammonia) make it possible to classify them as food additives to fight against the famous greenhouse effect.

**Keywords:** *Asteraceae*, *C. nobile*, *C. segetum*, *C. pulata*, extracts, nutritive value, méthanogenesis, qPCR, *Archaea*, Protozoa.

## ملخص

يتركز الهدف من هذا العمل على تقييم ثلاثة استراسيا (*C. segetum* و *C. pulata*، *C. nobile*) من الناحية التغذوية بواسطة طرق كيميائية (تحليل العلف)، فيتو كيميائية (المحتوى الفينولي والتيربيني) وبيولوجية (التخمير في المختبر عن طريق جراثيم الكرش البقري). يتمثل الجانب البيئي في تحديد عامل تأثير "مضاد لانبعاث الميثان" لهذه النباتات وكذا مستخلصاتها. دراسة هذا المحور عززت بالاعتماد على التحليلات الجزيئية (PCR وقت الحقيقي) لاثنتين من المجمعات الميكروبية المتدخلة مباشرة في عملية إنتاج الميثان في الكرش (بكتيريا الكرش المنتجة للميثان و البر وتوزوا). الغرض العملي من الجمع بين هذين الجانبين ينقسم بين صياغة نظام غذائي اساسه نباتات و / أو مستخلصاتها من أجل توفير بدائل غذائية للماشية المحلية من جهة ، وللسيطرة والحد من انبعاثات الميثان المعوي في الغلاف الجوي من المجترات من جهة أخرى.

التحليلات الكيميائية والفيتو كيميائية تجعل من الممكن تصنيف *C. nobile* و *C. pulata* كركائز ذات جودة غذائية جيدة. ويفسر ذلك من خلال محتواها الملموس من الجدران الكلية ، وغناها بالطاقة والبروتين ، والوجود المعتدل للمواد المضادة للتغذية. خلاف ذلك. ارتفاع معدل المادة النشطة بيولوجيا وكذا العجز البروتيني المسجل لدى *C. Segetum* يشير إلى أن هذا النبات يمكن تثمينه كمصدر طبيعي للمواد النشطة بيولوجيا و يُنصح به بشكل ضعيف كعلف للماشية.

نتائج تقييم التخمير في المختبر من للركائز المدروسة درس من ناحية قابلية الهضم. إنتاج الغاز في المختبر والموصفات التخمرية (الأحماض الدهنية المتطايرة)، يتوافق تماما مع التحليلات السابقة. بالإضافة إلى ذلك ، مواصفاتها التخمرية تشير مجملا إلى أن محتواها من المواد الثانوية لا يؤثر على نشاط الجراثيم الكرش. في الواقع ، لا يؤثر الجزء الثانوي والفلافونويدي على معايير التخمير المختلفة بعد 24 ساعة من التخمير.

يوضح الجانب البيئي للدراسة التي قدمها تحديد عامل "مضاد لانبعاث الميثان" للنباتات ومستخلصاتها أن تخمر *centaurée* يزيد من إنتاج الميثان المعوي في المختبر. يحتوي البايونج النبيل والأقحوان على إمكانات مضادة لانبعاث الميثان ملموسة مع معدلات تخفيض كبيرة (-24 و -27% على التوالي). بيد أن، عامل "مضاد لانبعاث الميثان" قد ارتفع (-39% و -50% ، على التوالي) في وجود مستخلصات كل منها . لقد سمح لنا نهج البيولوجيا الجزيئية بإلقاء نظرة عامة وسريعة على المجمعات الميكروبية الرئيسية التي تشارك بشكل مباشر في عملية تكوين الميثان. يكشف عملنا عدم وجود علاقة واضحة بين الكتلة الحيوية للبكتيريا المنتجة للميثان وإنتاج الميثان في الكرش ، ووجود نفس العلاقة مع مجمع البر وتوزوا. يمكن للعلاقة التكافلية بين هذين المجتمعين أن تبرر هذه النتيجة.

من ما سبق ، يبدو أن إدراج *C. nobile* في تغذية المجترات كعلف أساسي يوصى به بشدة. يوصى باستخدام *C. pulata* كمكمل طاقة ، مما يجعل من الممكن اقتراحهما كمرشحين ذوا نوعية جيدة للإستغلال المحتمل في العلف الحيواني وإعادة تنظيم محتلم للدورات في مناطق السهوب. إن التأثير الملحوظ للمستخلصات التي تم دراستها على الحد من إنتاج الميثان وخاصة عدم وجود تأثيرات على معايير التخمير (AGV والأمونيا) تجعل من الممكن تصنيفها كمضافات غذائية لمحاربة ظاهرة الاحتباس الحراري المعروفة.

## الكلمات المفتاحية:

التقييم الغذائي *C. nobile*، *C. segetum*، *C. pulata*، الوقت الحقيقي PCR. البكتيريا المنتجة للميثان. البر وتوزوا. العائلة المركبة عملية إنتاج الميثان

<b>Université Des Frères Mentouri Constantine -Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie</b>	
<b>Département de Microbiologie</b>	
<b>Nom : AMOKRANE</b>	Date de soutenance :
<b>Prénom : Serine</b>	
Evaluation du potentiel nutritif et antiméthanogénique des plantes médicinales ( <i>Asteraceae</i> ) par des procédés phytochimiques, biologiques et moléculaires.	
<b>Résumé</b>	
<p>L'objectif du présent travail est focalisé sur l'évaluation de trois <i>Asteracées</i> (<i>C.nobile</i>, <i>C.pulata</i> et <i>C. segetum</i>) d'un point de vue nutritionnel via des procédés chimiques (analyse fourragère), phytochimiques (contenu phénolique et terpénique) et biologique (fermentescibilité <i>in vitro</i> par le microbiote ruminal de bovins). L'aspect environnemental consistait à la détermination de l'effet antiméthanogénique de ces mêmes plantes ainsi que de leurs extraits respectifs. Cet axe est consolidé par des analyses moléculaires (PCR en temps réel) de deux communautés microbiennes impliquées directement dans la méthanogénèse ruminale (<i>Archaea</i> méthanogènes et protozoaires). La finalité pratique de la combinaison de ces deux approches est partagée entre la formulation des régimes alimentaires à base de plantes et/ou de leurs extraits dans le but de proposer des alternatives alimentaires au cheptel local, d'un côté et de contrôler et de réduire les émissions atmosphériques du méthane entérique par les ruminants, d'autre côté.</p> <p>Les analyses chimiques et phytochimiques permettent de classer <i>C.nobile</i> et <i>C.pulata</i> comme des substrats de bonne qualité nutritionnelle. Cela s'explique par leur contenu appréciable en parois totale, leur richesse en énergie et en protéines et la présence modérée de substances antinutritionnelles. Néanmoins, le taux élevé en substance bioactives et la faible teneur en protéines notés pour <i>C. segetum</i> propose que cette plante pourrait être valorisée comme source naturelle de substances bioactives et faiblement recommandée comme aliment pour bétail.</p> <p>Les résultats de l'évaluation de la fermentescibilité <i>in vitro</i> des substrats étudiés, en termes de la digestibilité, de la production du gaz <i>in vitro</i> et du profil fermentaire (acides gras volatils), concordent parfaitement avec ceux des analyses précédentes. En outre, leur profil fermentaire indique globalement que leur contenu en substances secondaires n'influe pas l'activité du microbiote ruminal. En effet, les fractions tannoïde et flavonoïque n'affectent pas les différents paramètres fermentaires après 24h de fermentation.</p> <p>L'aspect environnemental de l'étude présenté par la détermination de l'effet antiméthanogénique des plantes et de leurs extraits révèle que la fermentation de la centaurée augmente la production du méthane entérique <i>in vitro</i>. La camomille noble et le chrysanthème présentent un potentiel antiméthanogénique tangible avec des taux de réductions importantes (-24 et -27%, respectivement). Cependant, l'effet antiméthanogénique est augmenté (-39 et -50%, respectivement) en présence de leurs extraits respectifs. L'approche de la biologie moléculaire nous a permis d'avoir un regard global et rapide sur les principales communautés microbiennes impliquées directement dans le processus de la méthanogénèse ruminale. Les résultats révèlent l'absence d'une relation entre la biomasse des <i>Archaea</i> méthanogènes et la production du méthane dans le rumen, et leur existence avec la communauté des protozoaires. La relation symbiotique entre ces deux communautés pourrait justifier ce constat.</p> <p>De ce qui précède, il ressort que l'inclusion de <i>C.nobile</i> dans l'alimentation des ruminants en tant qu'un fourrage de base est fortement préconisée. <i>C.pulata</i> est recommandée comme un supplément énergétique, ce qui permet de les proposer comme des bons candidats pour une éventuelle exploitation dans l'alimentation animale et un probable réaménagement des parcours dans les zones steppiques. L'effet notable des extraits étudiés sur la réduction de la production du méthane et surtout l'absence des effets sur les paramètres fermentaires (AGV et ammoniac) permettent de les classer en tant que des additifs alimentaires pour lutter contre le fameux effet de serre.</p>	
<b>Mots clés:</b> <i>Asteraceae</i> , <i>C.nobile</i> , <i>C.segetum</i> , <i>C.pulata</i> , extraits, valeur nutritive, méthanogénèse, qPCR, <i>Archaea</i> , Protozoaires.	
<b>Mots clés :</b> <i>Asteraceae</i> , <i>C.nobile</i> , <i>C.segetum</i> , <i>C.pulata</i> , extraits, valeur nutritive, méthanogénèse, qPCR, <i>Archaea</i> , Protozoaires.	
Laboratoires de recherche :	
*Laboratoire d'analyse des aliments, CRBt ;	
*Laboratoire d'analyse et contrôle qualité, CRBt ;	
*Laboratoire de Biochimie, CRBt ;	
*Laboratoire des analyses alimentaires et de la nutrition animale, Napoli, Italie.	

