

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 Biochimie et Biologie

Cellulaire et Moléculaire

N° d'ordre :

N° de série :

THESE

Présentée à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1 pour l'obtention

du Diplôme de **Doctorat en Sciences**

Option: **Biochimie et Microbiologie Appliquées**

Soutenue publiquement par

MEDJEKAL Samir

Effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive, la production de méthane et de tannins condensés d'arbustes fourragers locaux. Essai de contrôle *in vitro* de la méthanogénèse ruminale d'ovins par l'utilisation de plantes médicinales.

Soutenu le: 17 /07/ 2016

Devant le Jury

Présidente :	MERAIHI Z.	Prof. à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1.
Rapporteur :	BOUSSEBOUA H.	Prof. à l'Ecole Nationale supérieure de Biotechnologie.
Examineurs :	KHELIFI D.	Prof. à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1.
	NIAR A.	Prof. à l'Université IBN Khaldoun Tiaret.

- Année 2015/2016-

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier « Allah » qui m'a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mon directeur de thèse, Professeur BOUSSEBOUA H., pour son encadrement et ses qualités scientifiques et pédagogiques qui m'ont permis de mieux structurer mes idées. Merci d'avoir assuré jusqu'au bout d'excellentes conditions matérielles qui m'ont permis de travailler dans un environnement favorable. Merci pour m'avoir fait confiance jusqu'à la fin de ma thèse et pour m'avoir dirigé sur ce sujet passionnant.

Mes remerciements les plus chaleureux et fraternels à la présidente du jury, MERAIHI Z., Professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine¹, d'avoir eu l'amabilité d'accepter volontairement et aimablement de critiquer et de juger ce travail. Je suis particulièrement reconnaissant et honoré par sa participation au jury.

Je tiens également à remercier les membres du jury, Messieurs les Professeurs KHELIFI D., Professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine¹ et Niar A., Professeur à l'université IBN Khaldoun de Tiaret d'avoir accepté de lire et de juger ce travail. Qu'ils trouvent ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.

Je remercie également le Professeur Secundino Lopez, directeur du Laboratoire de production animale de l'université à Léon, de m'avoir accueilli chaleureusement et permis la réalisation d'une grande partie de ce travail dans son laboratoire. Merci pour ses contributions et ses conseils avisés et pour l'intérêt porté à mes travaux.

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

Ma profonde reconnaissance à ma chère épouse pour son soutien sans faille, sa grande indulgence, sa compréhension et surtout sa contribution dans le partage de stress de la recherche.

Dédicaces

Je dédie cette thèse en premier lieu à mon grand-père. J'aurais tant aimé qu'il soit encore là pour assister à la fin de cette longue aventure. Je ne doute pas qu'il aurait été fier de moi.

A mon papa,

A ma maman,

A ma sœur,

A mes frères

Merci pour votre soutien tous les jours malgré la distance qui nous sépare. Merci d'avoir toujours cru en moi. C'est à vous que je dédie cette thèse.

A tous mes amis,

Pour leur soutien inconditionnel dans les pires et les meilleurs moments.

Table des Matières

Remerciements	I
Dédicace	II
Table des Matières	III
Liste des figures	VII
Liste des tableaux	VIII
Liste des abréviations	IX
Publications et communications	X
Résumé	XII
Abstract	XIII
المخلص	XIV
Introduction générale	1
Première Partie : Physiologie digestive des ruminants	
Chapitre I : Rappel sur la physiologie digestive des ruminants	
1- Particularités Digestives Chez le Ruminant : Un Rappel.....	4
2- Ecosystème microbien ruminal.....	5
2.1. Paramètres physico-chimiques du rumen.....	5
2.1.1. La teneur en eau.....	5
2.1.2. La température.....	6
2.1.3. L'anaérobiose.....	6
2.1.4. Le pH et le pouvoir tampon.....	6
2.1.5. Le potentiel d'oxydo-réduction.....	7
2.1.6. Les métabolites.....	7
2.2. Le microbiote digestif.....	7
2.2.1. Les bactéries.....	8
2.2.2. Les protozoaires.....	10
2.2.3. Les champignons.....	11
2.2.4. Les <i>Archaea</i> méthanogènes.....	12
2.2.5. Les bactériophages.....	13
2.3. Rôle des différents microorganismes du rumen dans la digestion.....	13
2.3.1. Le métabolisme glucidique.....	13
2.3.2. Le métabolisme azoté.....	16
2.2.3. Le métabolisme lipidique.....	18
3- Alimentation des ruminants.....	20
3.1. La paroi végétale.....	20
3.2. Constituants des parois végétales.....	21
3.2.1. La cellulose.....	21
3.2.2. Les hémicelluloses.....	22
3.2.3. La lignine.....	23
3.2.4. Les pectines.....	24
3.2.5. Les tannins.....	25
3.2.6. Autres constituants.....	26
3.3. Mise en place des parois au cours du développement cellulaire.....	26

Chapitre II : Stratégies pour réduire la production de méthane chez les ruminants

1-	La méthanogénèse dans le rumen.....	27
1.1.	Origines de la méthanogénèse.....	27
2-	Biotechnologies.....	29
2.1.	Probiotiques.....	29
2.2.	Défaunation.....	30
2.3.	Vaccins et anticorps.....	31
3-	Additifs chimiques.....	32
3.1.	Les nitrates.....	32
3.2.	Les composés anti-méthanogènes.....	33
4-	Acides organiques.....	34
4.1.	Extraits de plantes et huiles essentielles.....	34
4.2.	Les saponines.....	34
4.3.	Les tannins.....	36
4.4.	Les huiles essentielles.....	36
5-	Composition de la ration.....	37
5.1.	Proportion et nature du concentré dans la ration.....	37
5.2.	Apport de lipides.....	38

Deuxième Partie : Matériel et Méthodes

1-	Effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive des plantes fourragères.....	39
1.1.	Caractéristique du site expérimental.....	39
1.1.1.	Localisation géographique.....	39
1.1.2.	Sol et couvert végétal.....	39
1.2.	Climat de la région.....	40
1.2.1.	Les précipitations.....	40
1.2.2.	Les températures.....	40
1.3.	Matériel végétal.....	44
1.3.1.	Echantillons testés.....	44
1.3.2.	Echantillonnage et préparation du matériel végétal.....	44
1.4.	Caractéristiques chimique des fourrages.....	45
1.4.1.	Détermination de la matière sèche.....	45
1.4.2.	Détermination des sels minéraux.....	45
1.4.3.	Détermination de la matière azotée totale.....	46
1.4.4.	Détermination des composés de la paroi végétale.....	46
1.4.4.1.	Estimation de la fraction NDF (Neural Detergent Fibre).....	46
1.4.4.2.	Estimation de la fraction ADF (Acid Detergent Fibre).....	47
1.4.4.3.	Estimation de la fraction ADL (Acid Detergent Lignin).....	48
1.4.5.	Dosage de l'extrait éthéré.....	48
1.4.6.	Analyse des tannins.....	49
1.4.6.1.	Extraction des tannins condensés libres.....	49
1.4.6.2.	Extraction des tannins condensés liés aux protéines.....	50

1.4.6.3.	Extraction des tannins condensés liés à la fibre.....	50
1.4.6.4.	Analyse chimique.....	50
1.4.7.	Etude de la Digestibilité selon Tilley and Terry.....	51
1.4.8.	Technique de production de gaz <i>in vitro</i>	53
1.4.8.1.	Principe.....	53
1.4.8.2.	Estimation de l'énergie métabolisable.....	53
1.4.8.3.	Analyse du méthane.....	54
1.4.9.	Analyses statistiques.....	54
2-	Effet de trois plantes médicinales sur la production de méthane <i>in vitro</i>...	54
2.1.	Introduction.....	54
2.2.	Le matériel végétal.....	58
2.3.	Inoculum.....	58
2.4.	Fermentation <i>in vitro</i>	59
2.5.	Dosage et calculs.....	60
2.5.1.	Acides Gras Volatils.....	60
2.5.2.	Analyse du méthane.....	61
2.5.3.	Dosage de l'azote ammoniacal.....	61
2.6.	L'analyse statistique.....	62

Troisième partie : Résultats et discussion

1-	Effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive.....	63
1.1.	Effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive, la production de méthane et la teneur en tannins condensés de l' <i>Atriplex canescens</i>	63
1.1.1.	La composition chimique et les tannins condensés.....	63
1.1.2.	Fermentation et production de méthane <i>in vitro</i>	67
1.2.	Effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive, la production de méthane et la teneur en tannins condensés d' <i>Astragalus gombo</i>	68
1.2.1.	La composition chimique et les tannins condensés.....	68
1.2.2.	Fermentation et Production de méthane <i>in vitro</i>	72
1.3.	Effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive, la production de méthane et la teneur en tannins condensés de <i>Calobota saharae</i>	73
1.3.1.	Composition chimique et Tannins condensés.....	73
1.3.2.	Fermentation et Production de méthane <i>in vitro</i>	75
2-	Contrôle de la méthanogénèse ruminale par l'utilisation de plantes médicinales.....	78
2.1.	Aspects chimiques des substrats utilisés.....	78
2.1.1.	Composition chimique des plantes médicinales.....	78
2.1.2.	Composition chimique du milieu de base.....	80
2.2.	Effet des plantes médicinales sur la méthanogénèse et la fermentation <i>in vitro</i>	80
2.2.1.	Production de gaz 24 heures.....	81
2.2.2.	Production de Méthane.....	82
2.2.3.	Digestibilité.....	84
2.2.4.	Disparition de l'NDF.....	84
2.2.5.	Production d'azote ammoniacal (N-NH ₃).....	85

2.3.	Effet des plantes médicinales sur le pH et les acides gras volatiles.....	56
2.3.1.	Le pH.....	86
2.3.2.	Les acides gras volatiles.....	87
	Conclusions générales.....	90
	Références bibliographiques.....	94
	Annexe	

Liste des figures

Numéro	Intitulé	Page
Figure 1	: Tube digestif des ruminants	4
Figure 2	: Résumé des principales voies des fermentations ruminales des polymères glucidiques	14
Figure 3	: Dégradation des composés azotés dans le rumen	18
Figure 4	: Principales voies connues ou probables de la biohydrogénation ruminale des acides linoléique linoléinique	19
Figure 5	: Biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique: détail des voies du trans-11 et du trans-10	20
Figure 6	: Organisation de la paroi végétale	21
Figure 7	: Structure de la molécule cellulose	22
Figure 8	: Molécules de xyloglucane	23
Figure 9	: Les trois monomères principaux de la lignine	
Figure 10	: Processus de fermentation des glucides alimentaires dans le rumen conduisant à la production de méthane	29
Figure 11	: Localisation géographique de la zone d'étude	39
Figure 12	: Description phénotypique des plantes fourragères étudiées	43
Figure 13	: Description phénotypique des plantes médicinales étudiées	57
Figure 14	: Pression mètre	60
Figure 15	: Composition chimique du milieu de base	80

Liste des tableaux

Numéro	Intitulé	Page
Tableau 1	Principales espèces bactériennes du rumen, leurs substrats et produits de fermentation.	9
Tableau 2	Abondance relative des protozoaires du rumen chez des vaches recevant deux rations différentes.	11
Tableau 3	Substrats dégradés et fermentés par les principales espèces bactériennes du rumen.	15
Tableau 4	Principales bactéries protéolytiques du rumen.	16
Tableau 5	Répartition des moyennes de températures mensuelles en °C.	41
Tableau 6	Caractéristiques botaniques et phénotypiques des plantes fourragères étudiées.	42
Tableau 7	Caractéristiques botaniques et phénotypiques de plantes médicinales étudiées.	56
Tableau 8	Composition chimiques (g/kg MS) d' <i>Atriplex canescens</i> collecté sur trois saisons.	63
Tableau 9	Les paramètres de fermentation d' <i>Atriplex canescens</i> PG 24H (ml/g) le méthane (ml/g) IVD-TT (%) et EM (MJ/kg MS).	66
Tableau 10	Composition chimiques (g/kg MS) d' <i>Astragalus gombo</i> collecté sur trois saisons.	68
Tableau 11	Paramètres de fermentation d' <i>Astragalus gombo</i> PG 24h (ml/g) le méthane (ml/g) IVD-TT (%) et EM (MJ/kg MS).	72
Tableau 12	Composition chimiques (g/kg MS) de <i>Calobota saharae</i> collecté sur trois saisons.	74
Tableau 13	Les paramètres de fermentation <i>Calobota saharae</i> PG 24H (ml/g) le méthane (ml/g) IVD-TT (%) et EM (MJ/kg MS).	76
Tableau 14	Composition chimique (g/kg MS) des plantes médicinales utilisées.	80
Tableau 15	Effet de différentes plantes et du Monensin sur la fermentation <i>in vitro</i> (24 h d'incubation).	86
Tableau 16	Effet de différentes plantes et du Monensin sur le pH et la production des AGV <i>in vitro</i> .	88

Liste des principales abréviations

ADF	Acid detergent fibre	% MS
ADL	Acid detergent lignin	% MS
AG	Acide gras	
AGPI	Acides gras polyinsaturés	
AGV	Acide gras volatils	mmol/ g MS
ATP	Adénosine triphosphate	
BCM	Bromochlorométhane	
BES	Bromoéthanesulfonate	
CLA	Conjugated linoleic acids	
EE	Extrait d'éther	g/g MS
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique	
Eh	Potentiel d'oxydo-réduction	mV
GP24	Production de gaz cumulative à 24 heures	ml/g MS
HCDS	le Haut-Commissariat au Développement de la Steppe	
IVD -TT	<i>In vitro</i> digestibility of Tilley and Terry	g/g MS
MAT	Matière azotée totale	% MS
MS	Matière sèche	%
MM	Matière minérale	% MS
MO	Matière organique	% MS
MSI	Matière sèche ingérée	
NDF	Neutral detergent fibre	% MS
NDS	Neutral detergent solution	
PB	Protéines brutes	% MS
PM	Poids moléculaires	
ppm	Partie par million	
TCs	Tannins condensés	
THs	Tannins hydrolysables	
TCL	Tannins Condensés Libres	g/kg MS
TCLF	Tannins Condensé Liés à la Fibre	g/kg MS
TCLP	Tannins Condensés Liés à la Protéine	g/kg MS
TCL	Tannins condensés libres	g/kg MS
TCT	Tannins condensés totaux	g/kg MS
SEM	Erreur Standard des Moyennes	

Publications et Communications

Publications

1. **Medjekal, S.**, Guetouach, M., Bousseboua, H., (2015). Effect of Season on Potential Nutritive Value, Methane Production and Condensed Tannin Content of Fourwing Saltbush (*Atrilplex canescens*). *Global Veterinaria.*, 14(2): 166-172. DOI : 10.5829/idosi.gv.2015.14.02.9278
2. **Medjekal S.**, Ghadbane M., Bousseboua, H., (2015). Impact Of Season of Harvest on Potential Nutritive Value, Methane Production and Condensed Tannins Content of *Calobota Saharae* In M'Sila, North-Central Algeria, *EJPAU.*, 18(2), #03. <http://www.ejpau.media.pl/agronomy/index.html>
3. **Medjekal, S.**, Ghadbane, M., Bousseboua, H., (2015). Strategies to Mitigate Methane Emissions during the Digestive Process in Ruminants: A review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.*, 9 (27) : 9-18. http://ajbasweb.com/old/ajbas_August_2015.html
4. **Medjekal, S.**, Arhab, R., Bousseboua, H., (2011). Nutritive value assessment of some desert by-products by gas production and rumen fermentation *in vitro*, *Livestock research for Rural Development.*, 23 (03) 2011. <http://www.lrrd.org/lrrd23/3/medj23046.htm>

Communications

1. **Medjekal, S.**, Ghadbane, M., Benderradji, Laid., Bousseboua, H., (2015). Livestock and Climate Change: Mitigation Strategies To Reduce Methane Production. Xème congrès international QPE-TVR 10 au 12 Avril 2015. Mahdia-Tunisie. www.agendas.ovh/.../xeme-congres-international-qpe-tvr-2015
2. **Medjekal, S.**, Ghadbane, M., Bousseboua, H., (2015). Effects of selected medicinal plants on ruminal fermentation, fibre digestion and methane production *in vitro*. The 1st International Conference Microbial Ecology: An important Challenge for future Sétif-Algeria, December 12-14, 2015. <http://fsnv.univ-setif.dz/telecharger>
3. **Medjekal, S.**, Ghadbane, M., Bousseboua, H., (2015). Influence of seasonal variation on chemical composition and methane production of *Calobota saharae* in M'sila, north-central Algeria. Le Premier Séminaire International Sur : Systèmes de Production en Zones Semi-arides Diversité Agronomique et Systèmes de Cultures ; 04 et 05 novembre 2015. Université Mohamed Boudiaf-M'sila, Algérie. <http://virtuelcampus.univ-msila.dz/faculte-sciences/index.php?start=15>
4. **Medjekal, S.**, Bousseboua, H., (2015). Chemical composition and *in vitro* gas production of three local Poaceae in El djelfa's region, North-central Algeria. Séminaire International des Biotechnologies Constantine19, 20 & 21 Octobre 2015. Université Frères Mentouri Constantine. Algérie. <http://www.umc.edu.dz/index.php/component/k2/item/960-recceuil-des-resumes-sibc-19-20-21-octobre-2015>

Résumé

Cette thèse avait pour objectifs principaux l'étude, dans une première partie, de l'effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive, la teneur en tannins et la production de méthane de trois arbustes fourragers locaux : *Atriplex canescens*, *Astragalus gombo* et *Calobota saharae*, prélevés d'une zone aride d'Algérie sur trois saisons consécutives. Le travail a consisté à caractériser divers paramètres : la composition chimique des plantes, l'évaluation de leur potentiel nutritif par la mesure de leur fermentescibilité et leur digestibilité *in vitro*.

Dans une deuxième partie, un essai de réduction de la méthanogénèse ruminale *in vitro* a été testé en présence de trois plantes médicinales locales : *Nigella sativa*, *Rosmarinus officinalis*.L et *Zingiber officinale*. Les paramètres étudiés sont : le profil de la fermentation ruminale, la production de gaz totaux, la production de méthane et la digestibilité, de même que leur impact sur la production quantitative et qualitative d'acides gras volatiles.

L'analyse chimique révèle que la saison de collecte a un effet significatif sur tous les composants chimiques des trois arbustes étudiés, sauf en tanins condensés. *Atriplex canescens* détient une teneur très élevée en protéines brutes durant l'hiver qui atteint 200g/kgMS. Concernant sa teneur en constituants pariétaux, elle est très élevée en hiver et au printemps, par rapport aux valeurs d'été. Les mêmes variations en composition chimique sont enregistrées pour *Astragalus gombo*, contrairement à *Calobota saharae* dont les teneurs sont très élevées en été par rapport à l'hiver et au printemps. Cette situation est probablement due aux conditions climatiques qui règnent dans la région de M'sila, caractérisée par des températures élevées et une faible pluviométrie.

Du point de vue chimique, les variations temporelles démontrent que l'effet saison sur les différents résultats obtenus est significatif. Cet effet s'exerce par les variations climatiques qui lui sont associées. En effet, est enregistrée une variabilité nette pour la teneur en matière azotée totale et en constituants pariétaux. Malgré les caractéristiques exceptionnelles d'adaptation de la flore spontanée saharienne aux rudes conditions du milieu, il est évident que sa survie, sa prolifération et sa composition chimique dépendent étroitement des variations climatiques. Cette étude a des implications pratiques pour le développement des technologies agro-forestières. Les trois plantes étudiées ont un bon potentiel comme arbustes fourragers pour les projets de réhabilitation des écosystèmes dégradés dans les zones arides et semi-arides.

Les plantes médicinales représentent une source naturelle de molécules bioactives qui peuvent modifier positivement la fermentation ruminale. Une réduction significative de la production de méthane est observée avec le Monensin. Pour ce qui est du *Nigella sativa*, il est établi que cette plante est très riche en lipides et en stérols, cet état pourrait être à l'origine de son action anti-méthanogène. Quant aux autres traitements testés, ils sont sans effet.

Mots clés

Arbustes fourragers, analyse chimique, tannins condensés, fermentescibilité *in vitro*, digestibilité, méthanogénèse, plantes médicinales.

Abstract

The main objectives of this thesis were to study, in a first part, the effect of season collection or harvest on the nutritional value, tannin content and methane production of three forage shrubs, *Atriplex canescens*, *Astragalus* and *Calobota sahrae* taken from an arid area of Algeria during three different seasons, through several aspects: chemical characterization, evaluating their potential nutritive value by measuring their fermentation and digestibility *in vitro*.

In a second part, a reduction test of ruminal methanogenesis *in vitro* by the use of three medicinal plants selected according to their therapeutic characteristics in traditional medicine (*Nigella sativa*, *Rosmarinus officinalis*.L and *Zingiber officinale*), first, on ruminal fermentation parameters, gas production, methane and digestibility, and on the other hand, the impact of their use in the quantitative and qualitative production of volatile fatty acids.

Chemical analysis revealed that the collection season has a significant effect on all the chemical components of the three shrubs investigated herein, except on condensed tannins. *Atriplex canescens*, has a very high crude protein content during winter that can reach 200 (g / kg DM). Regarding its content of cell wall constituents, they are very high in winter and spring, compared to values obtained for the summer. The same variations in chemical composition were recorded with *Astragalus gombo*, unlike *Calobota sahrae* which has very high values in summer compared to winter and spring. This is probably due to climate conditions in M'sila region, characterized by high temperatures and low rainfall.

From the chemical point of view, the temporal variations show that the season effect on the different results obtained is significant. This is an effect of climate change associated with it. Indeed, we recorded a net variability for crude protein content and cell wall constituents. Despite the outstanding features of adaptation of spontaneous flora Sahara to harsh climatic conditions of their desert environment, it is clear that their survival, proliferation and their chemical compositions are highly dependent on climatic variations. This study has practical implications for the development of agro-forestry technologies. The three plants studied show good potential as fodder shrubs for ecosystem rehabilitation projects in degraded arid and semi-arid rangelands.

Medicinal plants are a natural source of chemical molecules that can positively alter rumen fermentation. In general, a high methane reduction was noted with Monensin and *Nigella sativa* and no effect was observed with the other treatments. This study again confirms that the Monensin significantly inhibits the production of CH₄ in the rumen. In terms of *Nigella sativa*, it is widely known that this plant is very rich in lipids and sterols, which could be the cause of the reduction. Information in the literature with respect to antimethanogenic effects of certain plant species and plant secondary metabolites and on secondary metabolites in these species can be described as a major interest for the interpretation of such results and discuss future research to identify the chemical components responsible for antimethanogenic activity.

Keywords:

Fodder shrubs, chemical analysis, condensed tannins, *in vitro* fermentation, digestibility, methanogenesis, medicinal plants.

المخلص

اهتمت هذه الأطروحة في جزئها الاول , بدراسة تأثير التغيرات الفصلية على القيمة الغذائية , محتوى التانين , و انتاج غاز الميثان المنبعث من ثلاث شجيرات علفية والمتمثلة في كل من: نبات القطف , القتاد ونبته المرخ اتخذت من منطقة جافة بالجنوب الجزائري خلال ثلاث مواسم مختلفة تمت دراستها من عدة جوانب : الخصائص الكيميائية , القيمة الغذائية عن طريق التخمر والهضم داخل المختبر .

في الجزء الثاني منها، تم اجراء تجارب للتخفيف من انتاج غاز الميثان مخبريا بواسطة استخدام ثلاث نباتات طبية وفقا لخصائصها العلاجية المعروفة في الطب التقليدي (حبة البركة , إكليل الجبل , وجذور نبتة الزنجبيل). الدراسة تمت بمتابعة معالم التخمر , انتاج الغاز والميثان و من جانب اخر أثرها على الإنتاج الكمي والنوعي من الاحماض الدهنية الطيارة .

كشف التحليل الكيميائي أن موسم الجمع له تأثير كبير على جميع المكونات الكيميائية للشجيرات الثلاثة قيد الدراسة , القطف يحتوي على نسبة معتبرة من البروتين الخام خلال فصل الشتاء يمكن أن يصل الى حدود 200 غ/كغ من المادة الجافة اما فيما يخص محتواها من مكونات الجدار الخلوي فهي مرتفعة في الشتاء والربيع . على العكس من ذلك فان نبتة القتاد والمرخ تملك قيم عالية من محتور الجدار الخلوي خلال فصل الصيف مقارنة مع الشتاء والربيع . ومن المقرر أنه ربما للظروف المناخية , من حرارة وقلة تساقط الأمطار , في المنطقة المسيلة , دور كبير في ذلك .

هذا هو تأثير تغير المناخ المرتبطة به . في الواقع، نحن سجلنا تغيرا صافيا لمحتوى البروتين الخام ومكونات جدار الخلية على الرغم من السمات البارزة لتكيف نباتات الصحراء العفوية للظروف المناخية القاسية للبيئة الصحراوية، فمن الواضح أن بقائهم على قيد الحياة، وانتشار التراكيب الكيميائية التي تعتمد إلى حد كبير على التغيرات المناخية . هذه الدراسة لها آثار عملية لتطوير تكنولوجيات الزراعية الغابية . النباتات الثلاثة المدروسة تظهر إمكانات جيدة كما الشجيرات العلفية لمشاريع إعادة تأهيل النظام البيئي في المناطق القاحلة وشبه القاحلة المتدهورة من حيث الغطاء النباتي .

النباتات الطبية هي مصدر طبيعي من جزيئات الكيميائية التي يمكن أن تغير إيجابيا في التخمر داخل كرش المجترات . بشكل عام، لوحظ وجود انخفاض الميثان بنسبة عالية مع المضاد الحيوي مونييسين وحبة البركة ولم يلاحظ أي تأثير مع العلاجات الأخرى . تؤكد هذه الدراسة مرة أخرى أن مونييسين يمنع إلى حد كبير من إنتاج الميثان في الكرش . أما فيما يخص حبة البركة، من المعروف على نطاق واسع أن هذا النبات غني جدا بالدهون، والتي يمكن أن تكون سببا في هذا التأثير . المعلومات البيولوجرافية فيما يخص التركيبة الكيميائية لهذه النباتات يمكن ان تكون مهمة جدا في تفسير مثل هذه النتائج ومناقشة البحوث المستقبلية لتحديد المكونات الكيميائية المسؤولة عن هذا النشاط .

الكلمات المفتاحية : الشجيرات العلفية , التحليل الكيميائي , التانين المكثف , التخمر المخبري , الهضم , انتاج الميثان , النباتات الطبية .

Introduction générale

La région méditerranéenne englobe, notamment au sud, de vastes zones arides et semi arides qui peuvent être définies comme des aires où les précipitations, par rapport au niveau de l'évapo-transpiration, sont insuffisantes pour assurer une bonne production des différentes cultures céréalières. La plupart de ces zones sont qualifiées de parcours d'élevage et sont, en outre, caractérisées aussi par une grande variabilité des précipitations et de la température (Abu-Zanat *et al.*, 2004).

En Algérie, le cheptel ovin et caprin compte un effectif de près de 24 millions de têtes (FAO, 2009). Cet important patrimoine zootechnique, en constant développement, risque à terme d'être menacé par la dégradation des écosystèmes. La steppe, avec la transhumance en zones céréalières, a constitué dans le passé la principale source de son alimentation. Mais ce système a subi d'importantes modifications. Actuellement, seuls 15% de l'effectif seraient concernés par la transhumance (Bourbouze, 2006), alors que la sédentarisation accrue a conduit à une surexploitation des parcours steppiques, désormais incapables de couvrir les besoins alimentaires du cheptel (Amghar *et al.*, 2012).

Les plantations d'arbustes fourragers constituent indéniablement un élément alternatif de stabilité dans l'alimentation des petits ruminants. Elles consolident la protection de l'environnement contre l'érosion et permettent la fixation du sol et sa protection contre l'érosion hydrique. *L'Atriplex canescens* est une espèce exotique introduite dans la steppe algérienne, choisie pour sa rapidité de croissance, sa résistance aux aléas climatiques et sa valeur fourragère élevée. L'objectif était qu'elle fournisse une alternative significative aux besoins fourragers du bétail pendant la longue saison sèche (Guangyou, 2011; Nadjimi, 2014). Cependant, il y a peu d'informations à propos de la valeur nutritive potentielle de cet arbuste, dans les conditions environnementales locales. Par ailleurs, peu de données sont disponibles sur l'impact des variations saisonnières sur la valeur nutritive d'arbustes légumineuses locales ou introduites, pâturées par les ruminants dans de telles régions.

La composition chimique, seule, est d'une utilité limitée pour évaluer la valeur nutritive des plantes, en particulier celles contenant des composés secondaires (El Hassan *et al.*, 2000). La technique de production de gaz *in vitro*, qui fournit des équations empiriques pour estimer la digestibilité et le contenu de l'énergie métabolisable de l'alimentation des ruminants (Menke et Steingass, 1988), a gagné aujourd'hui un grand intérêt et une large autorité dans le domaine de recherche sur l'évaluation nutritionnelle des aliments (Getachew *et al.*, 2005). En outre, la technique de production de gaz *in vitro* est largement utilisée pour

cribler les produits alimentaires et les plantes médicinales dans leur fonction potentiel de réduction du méthane chez les ruminants (Jayanegara *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2013).

Le méthane, naturellement érucé par les ruminants, représente d'une part une perte d'énergie et, d'autre part, un gaz à effet de serre très puissant. La limitation de ses émissions représente donc un double intérêt, économique et environnemental. Différentes stratégies sont déployées pour minimiser son émission. Elles s'intéressent essentiellement à la modification des conditions fermentaires et/ou à un changement de l'équilibre des populations microbiennes ruminales. Cependant, une série d'effets secondaires et d'interactions ont été observés, ce qui fait qu'aucune méthode ne semble à ce jour répondre convenablement à sa double problématique de gestion nutritionnelle et environnementale.

Les plantes médicinales sont utilisées depuis longtemps en remèdes de multiples maladies, elles constituent une source naturelle inépuisable de molécules chimiques telles que les métabolites secondaires qui représentent une variété très large de composés organiques, sans fonction directe à la croissance et au développement des plantes (Cowan, 1999 ; Combrinck *et al.*, 2007). A côté des secteurs utilisateurs traditionnels des plantes médicinales (pharmacie, parfumerie et secteur alimentaire), de nouvelles perspectives d'emploi se sont ouvertes dans le domaine de l'alimentation animale : substitution aux antibiotiques comme facteurs de croissance, réduction de l'éructation de méthane par les ruminants, et donc des gaz à effet de serre par leurs tannins, saponines et autres métabolites secondaires (Bodas *et al.*, 2008 ; García-González *et al.*, 2008 ; Rira *et al.*, 2014).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à évaluer l'effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive, les tannins condensés et la production de méthane par le microbiote d'ovins en présence de trois arbustes fourragers : *Atriplex canescens*, *Astragalus gombo* et *Calobota saharae*, prélevés d'une région semi-aride d'Algérie.

Dans un second volet, et en raison de l'intérêt désormais majeur porté actuellement à la réduction du méthane émis par les ruminants, a été engagée une étude *in vitro* de l'effet de trois plantes médicinales, choisies en fonction de leur caractéristiques thérapeutiques en médecine traditionnelle : *Nigella sativa*, *Rosmarinus officinalis* L et *Zingiber officinalis*. L'étude d'impact porte, d'une part, sur les paramètres de fermentation ruminale, donc la production de gaz total, la production de méthane et la digestibilité et, d'autre part, sur l'effet de leur présence dans le milieu sur la production quantitative et qualitative des acides gras volatiles.

La présentation de ce travail est organisée en trois parties : La première partie, scindée en deux chapitres, présente la composition du microbiote ruminale avec une présentation résumée des différentes réactions d'hydrolyses et de fermentations produites. Le second chapitre est consacré aux différentes stratégies pour réduire la production de méthane chez les ruminants : origine de la méthanogénèse, biotechnologies appliquées, additifs alimentaires et acides organiques, avec différents résultats d'applications *in vitro* et *in vivo*.

La seconde partie est consacrée à la présentation du matériel biologique utilisé, végétal et animal, aux techniques d'analyses fourragères et aux méthodes d'études *in vitro*. Elle est également scindée en deux parties, la première présente l'effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive, la teneur en tannins condensés et la production de méthane de trois arbustes fourragers. La deuxième partie, concerne les essais de trois plantes médicinales testées pour leur effet de réduction de la méthanogénèse *in vitro*. Par ailleurs, le plan d'échantillonnage adopté ainsi que les méthodes d'analyses statistiques employées, sont exposées. Enfin, les résultats sont présentés et discutés en fonction des données publiées dans la littérature scientifique internationale.

Première Partie

Etudes

Bibliographiques

Chapitre I : Rappel sur la physiologie digestive des ruminants

1. Particularités Digestives Chez le Ruminant : Un Rappel

Les herbivores, et particulièrement les ruminants, occupent dans le monde une place prépondérante parmi les animaux domestiques élevés à des fins de production. Leur contribution à la satisfaction des besoins alimentaires de l'humanité, par le lait et la viande qu'on leur fait produire, revêt une importance capitale. Le ruminant présente par rapport aux monogastriques l'avantage de pouvoir extraire et utiliser l'énergie contenue dans une biomasse végétale non-utilisable directement par l'homme, à cause de sa trop grande richesse en lignocellulose. A ce titre, le ruminant ne peut être considéré comme un concurrent direct de l'homme vis-à-vis de sa biomasse alimentaire (Barone, 1984).

Anatomiquement l'originalité réside dans la présence en amont du tube digestif, d'un estomac volumineux et compartimenté (**Figure 1**). Les deux premiers réservoirs, le rumen et le réticulum constituent un vaste réservoir pouvant être comparé à un fermenteur fonctionnant en continu dans lequel se déroule une véritable digestion biologique des aliments. L'abomasum est le 4^{ème} compartiment, c'est le véritable estomac du ruminant semblable à celui des monogastriques et c'est là que commence la digestion des résidus non hydrolysés dans le rumen (à l'exception des glucides pariétaux enrichis des synthèses microbiennes).

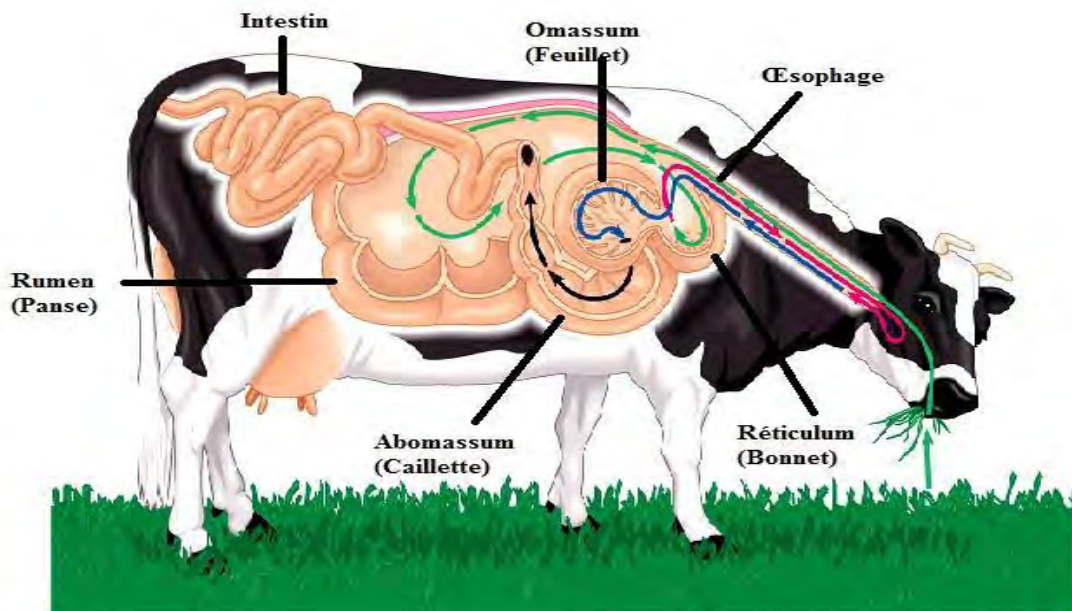


Figure 1 : Tube digestif des ruminants

Figure 1 : Tube digestif des ruminants ((Site internet N° 1).

Le rumen, encore appelé panse ou réticule-rumen, est de loin le plus volumineux des réservoirs gastriques des ruminants. Le réticule-rumen est similaire à une grande cuve de

fermentation d'une capacité d'environ 200L chez les bovins et 20L chez et les ovins de race tempérée. Il contient les aliments ingérés, de l'eau, une population microbienne variée et très active et de l'urée salivaire recyclée. L'ensemble est soumis aux mouvements péristaltiques et tamponné par la salive qui maintient un pH voisin de 6,5 à une température de 39° C.

La physiologie digestive propre du ruminant se distingue de celle des monogastriques par la rumination. Pendant la prise de nourriture qui est rapide, les aliments sont mastiqués sommairement et immédiatement déglutis dans le rumen où ils subissent une imbibition et un ramollissement. Après un temps de séjour dans le rumen qui varie selon la nature de la ration entre 30 et 70 min chez la vache (Kolb, 1975), les aliments sont régurgités et subissent une seconde mastication.

2. Ecosystème microbien ruminal

L'appareil digestif du ruminant peut être considéré comme stérile à la naissance. La colonisation du tube digestif, en particulier du rumen, va se réaliser progressivement avec l'installation successive de différentes populations de micro-organismes dans un ordre bien défini (Fonty *et al.*, 1987; Krause *et al.*, 1999). En se développant, l'écosystème se complexifie jusqu'à atteindre un état d'équilibre dynamique. Il s'agit d'un état pour lequel l'écosystème est capable de s'autoréguler pour maintenir ses fonctions par ajustements incessants des populations microbiennes, un écosystème ne peut être stable (Lévêque, 2001).

Le rumen est un biotope ouvert, qui échange avec l'extérieur, dont les caractéristiques sont favorables au développement d'une biocénose anaérobie et diversifiée (Theodorou et France, 1993). Dans ces conditions les microorganismes extraient et captent l'énergie en mettant en œuvre une respiration anaérobie, c'est-à-dire un échange d'électrons où l'accepteur final n'est pas l'oxygène mais un produit issu du métabolisme fermentaire microbien (Doelle, 1969). Le rumen est un fermenteur, dont la régularité des processus est entretenue malgré un contenu qui varie en fonction de l'animal et de la ration. Le contenu ruminal peut être caractérisé par quelques paramètres physico-chimiques:

2.1. Paramètres physico-chimiques du rumen

2.1.1. La teneur en eau

La teneur en eau du contenu ruminal est comprise entre 85 et 90%. L'eau, apportée par les aliments, l'eau de boisson et la salive, est le support des molécules en solution et des particules en suspension avec lesquelles elle constitue la phase liquide du rumen. Celle-ci est

caractérisée par une pression osmotique comparable à celle du sang et comprise entre 200 et 300 mOsm/L chez l'animal sain. L'eau du rumen représente une masse importante en quantité et elle peut être utilisée, le cas échéant, comme réserve pour l'organisme (Brugère, 1983).

2.1.2. La température

La température ruminale est sensiblement supérieure à la température corporelle, elle est comprise entre 39°C et 41°C. Elle peut atteindre 41°C lorsque les fermentations sont très intenses mais aussi chuter de plusieurs degrés après ingestion de grandes quantités d'eau froide (Brugère, 1983).

2.1.3. L'anaérobiose

Le milieu ruminal est caractérisé par des conditions d'anaérobiose vraie. Les apports d'oxygène sont faibles (déglutition, diffusion à partir des vaisseaux des parois) mais des souches de bactéries aérobies facultatives le font vite disparaître (Bouazza, 2014). Les espèces bactériennes diffèrent selon leur sensibilité à l'oxygène. Les espèces reconnues pour être anaérobies strictes sont *Selenomonas ruminatum*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Lachnospira multiparus*, *Clostridium haemolyticum* et quelques espèces du genre *Treponema* (Loesche, 1969). Les espèces anaérobies modérées incluraient celles qui sont capables de croître en présence d'un pourcentage d'oxygène allant de 2 à 8% (Loesche, 1969). D'autre part, des souches de bactéries aérobies facultatives peuvent faire disparaître l'oxygène qui rentre dans le rumen (Zened, 2011).

2.1.4. Le pH et le pouvoir tampon

Il est généralement admis que le pH optimal du rumen se situe dans une fourchette comprise entre 6 et 7. Le pH du milieu ruminal est la résultante des productions acides, des tampons salivaires et des tampons propres de la ration (Giger-Reverdin *et al.*, 2002). Les mesures du pH faites dans les conditions de terrain conduisent souvent à établir des gammes beaucoup plus larges allant des valeurs parfois inférieures à 5 (état d'acidose) à des valeurs supérieures à 7,5 (état d'alcalose). De telles déviations du pH qui sortent de la zone dite de normalité, sont la conséquence de déviations fermentaires générées elles-mêmes par des déséquilibres alimentaires (Sauvant *et al.*, 1999).

2.1.5. Le potentiel d'oxydo-réduction

Le potentiel redox (Eh) d'un rumen sain et en fonctionnement est négatif et varie de -150 mV à -260 mV lorsqu'il est normalement mesuré par rapport à l'électrode standard à hydrogène (Marden *et al.*, 2005). Les micro-organismes du rumen maintiennent le caractère très réducteur de ce milieu par leurs activités fermentaires (Baldwin et Emery, 1960). Les valeurs négatives du Eh enregistrées dans le rumen traduisent le caractère hautement réducteur de ce milieu appauvri en oxygène, bien que quelques auteurs (Hillman *et al.*, 1985) aient mis en évidence la présence d'air ou d'oxygène dans le rumen, qui pénètre lors de l'ingestion des aliments, lors de la mastication mérycique et avec l'eau de boisson.

2.1.6. Les métabolites

Le métabolisme microbien conduit à la production de gaz, d'acides gras volatils (AGV) et d'ammoniac (N-NH₃). Les gaz présents dans le rumen sont constitués de CO₂ (65 %), de CH₄ (entre 25 et 30 %), d'azote (5 %) et d'hydrogène (< 1 %) (Vermorel, 1995). Des traces d'oxygène ont également été détectées.

Chez les bovins, les proportions des AGV produits dans le rumen sont en moyenne de 66 % pour l'acétate, 19 % pour le propionate, 11 % pour le butyrate et 4 % pour AGV mineurs (isobutyrate, valérate, isovalérate) pour des animaux nourris avec des rations riches en fourrages de qualité moyenne (Sauvant *et al.*, 2011). Le rapport acétate / propionate (C2 / C3) de ce profil est d'environ 3,5. Les AGV produits sont, soit absorbés au niveau de la paroi du rumen, mais de manière différentielle selon le type d'AGV (Dijkstra *et al.*, 1993), soit ils sortent du réticulo-rumen par l'orifice réticulo-omasal au sein de la phase liquide.

L'ammoniaque produit est issu de l'activité protéolytique, uréolytique et de désamination (acides aminés) des microorganismes. Le NH₃ peut être absorbé au niveau de la paroi du rumen pour être ensuite transformé en urée au niveau du foie. Il est majoritairement prélevé par les microorganismes du rumen comme substrat à leur croissance.

2.2. Le microbiote digestif

Les ruminants sont les meilleurs transformateurs de la biomasse végétale parmi les animaux domestiques. Ils utilisent très efficacement les glucides des parois végétales grâce à la présence d'un écosystème microbien ruminal performant. Le rumen constitue un écosystème anaérobie strict, dont les conditions de milieu favorisent le développement d'un

microbiote extrêmement important et diversifié (Hungate, 1966). On y trouve des bactéries, des protozoaires, des champignons, des *Archea* et des bactériophages (Jouany, 1994).

2.2.1. Les bactéries

Les bactéries sont les microorganismes les plus nombreux du rumen. Elles représentent 50 % de la biomasse microbienne et leur concentration peut atteindre 10^{11} cellules vivantes / mL de contenu ruminal (Hungate, 1966). La flore ruminale se caractérise par son extrême diversité liée autant au nombre d'espèce bactériennes colonisant le rumen qu'aux activités enzymatiques présentes (Koike *et al.*, 2010 ; Welkie *et al.*, 2010). Comparé aux protozoaires, aux champignons et aux bactériophages, les bactéries ont un rôle primordial au sein du rumen. Leur présence est essentielle pour la dégradation des aliments ingérés par les ruminants et le maintien des conditions physico-chimiques optimales au fonctionnement du rumen.

Dans le contenu ruminal, la distribution des bactéries est très hétérogène et fortement influencée par la stratification des digesta que l'on observe malgré le brassage continu du contenu (Michalet-Doreau *et al.*, 2001). Les bactéries associées à la phase solide du rumen et qui adhèrent solidement aux particules alimentaires, représentent de 50 à 75% du total et sont donc plus abondantes que les bactéries libres de la phase liquide ou faiblement associées aux petites particules (Cheng et Costerton, 1980).

Les bactéries peuvent être classées selon des critères morphologiques (forme et groupement des bactéries, présence ou absence de flagelle, nature de la paroi, type de mobilité, etc.) ou selon des critères physiologiques (voies métaboliques, types de substrats utilisés, etc.). Cette dernière classification conduit aux groupes fonctionnels suivants : fibrolytiques (cellulolytiques et hemicellulolytiques), amylolytiques, saccharolytiques, pectinolytiques, protéolytiques, lipolytiques, et bactéries utilisant les produits formés par d'autres microbes (**tableau 01**) (Fonty *et al.*, 1995). Les trois principales espèces bactériennes cellulolytiques sont : *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens*. Elles sont présentes à des concentrations variant de 10^8 à 10^9 cellules/ml (Coleman, 1975).

Tableau 1 : Principales espèces bactériennes du rumen, leurs substrats et produits de fermentation. (A : acétate, B : butyrate, E : éthanol, F : fumarate, L : lactate, P : propionate, H : hydrogène)

Espèces bactérienne	Substrats						Produits
	Cellulose	Hémicellulose	Dextrines	Amidon	Pectines	Sucres	
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	+	+	-	-	+	-	S, F, A
<i>Runinococcus albus</i>	+	+	-	-	-	-	A, F, E, H
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	+	+	-	-	-	-	S, F, A, H
<i>Butyvirbio fibrisolvens</i>	+	+	-	+	+	+	B, F, A, H
<i>Prevotella ruminicola</i>	-	+	-	+	+	+	S, F, A, P
<i>Streptococcus bovis</i>	-	-	-	+	+	+	L, A, P, B, F, H
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	-	-	-	+	-	-	L, A, F, E
<i>Succinomonas amyloplituca</i>	-	-	-	-	+	-	S, F, A, E
<i>Succinivibrio dextrinosolvans</i>	-	-	+	-	+	+	S, A, P
<i>Eubacterium ruminantium</i>	-	+	+	-	-	+	A, S, P
<i>Megasphaera elsdenii</i>	-	-	-	-	-	+	A, F, B, L

Les bactéries cellulolytiques représentent 10 % de la flore avec une ration fourrage et leur nombre diminue 4,5 fois après l'inclusion du concentré (Mosoni *et al.*, 2011). Les mêmes observations ont été faites par Tajima *et al.*, (2000) : un mois après la transition entre un régime à base de foin et un régime riche en concentré, le nombre de bactéries fibrolytiques a diminué, au profit des amylolytiques.

Les bactéries amylolytiques (*Streptococcus bovis*, *Succinomonas amylolytica*) peuvent représenter à elles seules plus de la moitié de la microflore totale lorsque les rations sont à forte proportion de produits amylicés, notamment des régimes riches en céréales. Moins exigeantes en matière d'anaérobiose (Perry et Briggs, 1955), elles supportent aussi des pH plus bas que les cellulolytiques.

D'autres espèces encore plus spécialisées telles que *Selenomonas ruminantium* et *Megasphaera elsdenii*, jouent par exemple un rôle déterminant sur le maintien d'un pH optimal dans le rumen. De par leur capacité à fermenter le lactate entre autres, ce sont deux bactéries anaérobies strictes. Représentante majoritaire dans certaines conditions et surtout lorsque le pH est très bas (état d'acidose), la bactérie *S. ruminantium* fermente l'acide lactique

en succinate puis en propionate dont les intermédiaires clés sont le malate et le fumarate (Sokatch, 1969). La bactérie *M. elsdenii* peut fermenter jusqu'à 97% du lactate présent dans le rumen (Elsden *et al.*, 1956), particulièrement lorsque le régime alimentaire induit une forte acidité dans le milieu ruminal. La bactérie utilise préférentiellement au glucose, le lactate comme substrat (Hino *et al.*, 1994). Elle fermente le lactate grâce aux enzymes lactate déshydrogénase et lactate racemase (Hino et Kuroda, 1993) qu'elle transforme en propionate par la voie de l'acrylate (Counotte *et al.*, 1982).

2.2.2. Les protozoaires

Les protozoaires sont des organismes eucaryotes unicellulaires, dont on distingue deux types : les flagellés et les ciliés. La majorité des protozoaires retrouvés dans le rumen appartiennent à l'embranchement des ciliés, anaérobies stricts et sont évalués entre 10^3 à 10^6 protozoaires / g de contenu ruminal par dénombrement sur cellule de comptage (Jouany, 1988; Williams et Coleman, 1997). Dans le rumen, les protozoaires flagellés sont peu nombreux. Quatre espèces ont été mises en évidence : *Chilomastix sp.*, *Monocercomonas sp.*, *Pentatrichomonas sp.* et *Tetratrichomonas sp.* (De Puytorac *et al.*, 1987) mais leur rôle est peu connu.

Les protozoaires ciliés du rumen appartiennent aux deux grands groupes: les entodiniomorphes et les holotriches. Dans le rumen chez l'adulte, on observe 9 genres de protozoaires appartenant au groupe des entodiniomorphes (*Entodinium*, *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Metadinium*, *Enoploplastron*, *Polyplastron*, *Epidinium* et *Ophryoscolex*). Le groupe des holotriches est majoritairement représenté dans le rumen par la famille Isotrichidaea avec deux genres prépondérants : *Isotricha* et *Dasytricha* (Williams et Coleman, 1997 ; Karnati *et al.*, 2003). Au sein de la phase liquide du rumen, deux genres sont identifiés *Entodinium* (69,6% des clones) et *Epidinium* (31,4% des clones), un certain nombre de clones n'étaient pas identifiables (30,4%) (Shin *et al.*, 2004a). Au niveau de la phase solide du rumen, le genre *Entodinium* est majoritaire et aucun *Epidinium* n'a été observé. Au niveau de l'épithélium ruminal, aucun protozoaire n'a été détecté (Shin *et al.*, 2004a).

Les protozoaires ciliés participent aussi au métabolisme glucidique dans le rumen car ils ingèrent les particules alimentaires et les digèrent à l'intérieur de leurs vacuoles (Ushida et Jouany, 1994). Les hémicelluloses sont fortement dégradées par les entodiniomorphes alors que les holotriches fermentent plutôt les sucres solubles excepté le mannose et la glucosamine (Jouany et Ushida, 1998). *Isotricha* possède une forte activité amylolytique (Gouet *et al.*,

1986) et la dégradation de l'amidon conduit à la formation d'acide butyrique, H₂, et CO₂ majoritairement et un peu d'acides propioniques et lactiques.

Tout comme pour les bactéries et les *Archaea*, le nombre et la diversité des protozoaires sont influencés par la ration alimentaire (**Tableau 02**) (Karnati *et al.*, 2003). Ceci peut être dû à la compétition entre les groupes de ciliés, mais également à l'impossibilité de certains groupes de s'adapter aux conditions physico-chimiques tel un pH bas (Bonhomme, 1990). Les phases liquide et solide du contenu ruminal présenteraient des populations différentes de ciliés suggérant des rôles spécifiques dans la fonction du rumen (Shin *et al.*, 2004a).

Tableau 2 : Abondance relative des protozoaires du rumen chez des vaches recevant deux rations différentes.

Abondance relative %	Fourrage : Concentré 1 :1	Luzerne
<i>Entodinium</i>	97.3	77.2
<i>Diplodinia</i> ^a	1.7	4.6
<i>Epidinium</i>	0.3	<0.5
<i>Ophryoscolex</i>	ND	0.9
<i>Isotricha</i>	<0.3	6.0
<i>Dasytricha</i>	0.7	11.2

^a Sous-famille, comprenant les genres *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Metadinium*, *Enoploplastron*, et *Polyplastron*. ND : non détecté (Karnati *et al.*, 2003)

2.2.3. Les champignons

Les champignons du rumen sont difficiles à dénombrer car les résultats sont largement influencés par la méthode utilisée (nombre de sporanges ou de zoospores). Malgré cette incertitude, Chez le ruminant adulte, la densité de champignons est comprise entre 10³ et 10⁴ champignons / mL de contenu ruminal (McAllister et Cheng, 1996). Des densités similaires ont été observées via des techniques de biologie moléculaire (Lwin *et al.*, 2011). Les champignons du rumen sont totalement anaérobies, ce qui est tout à fait exceptionnel dans le groupe des champignons, ils ne possèdent pas de mitochondries, pas de cytochromes et assurent uniquement la fermentation de tissus celluloseux. (McAllister et Cheng, 1996). Trois genres ont été bien identifiés : *Neocallimastix*, *Piromyces* et *Caecomyces*. *Neocallimastix* est pluri-flagellé, alors que les deux autres sont uniflagellés (Jouany, 1994).

La colonisation des tissus végétaux débute peu après l'ingestion des aliments par les animaux (15-30 minutes). Les champignons produisent de grandes quantités d'enzymes

impliquées dans la digestion des glucides de la paroi végétale (exocellulases, endocellulases, cellodextrinases) pour former du cellobiose qui est ensuite fermenté (Popova, 2011a).

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

2.2.4. Les *Archaea* méthanogènes

Les *Archaea* méthanogènes du rumen sont des anaérobies strictes et essentiellement des hydrogénotrophes, bien que certaines espèces peuvent occasionnellement utiliser le formate ou les méthylamines. En effet ces organismes complètent les fermentations des bactéries anaérobies en utilisant l'hydrogène (produit lors de la fermentation des glucides par les bactéries) présent dans le rumen pour synthétiser et produire du méthane (Wolin *et al.*, 1997).

La quantité d'*Archaea* au niveau du rumen a été évaluée entre 10⁸ et 10⁹ archées / g de contenu ruminal par des méthodes culturales. Chez les ruminants, 2 phyla sont retrouvés dans le rumen avec majoritairement le phylum *Euryarchaeota* et rarement le phylum *Crenarchaeota* (Shin *et al.*, 2004b). Les *Archaea* dans le rumen sont peu diversifiées et le genre majoritaire est *Methanobrevibacter* (Janssen et Kirs, 2008). Les genres *Methanomicrobium*, *Methanobacterium* et *Methanosarcina* sont aussi présents (Jarvis *et al.*, 2000 ; Wright *et al.*, 2008). Des études basées sur l'ADNr 16S, se sont intéressées à la phylogénie des archées et révèlent l'existence de nouveaux groupes d'archées appartenant au phylum *Euryarchaeota* (Tajima *et al.*, 2001 ; Whitford *et al.*, 2001).

Dans le rumen, les *Archaea* méthanogènes occupent les 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 et Kirs, 2008). 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 responsable de 9 à 25% du CH₄ produit dans le rumen (Newbold *et al.*, 1995)

2.2.5. Les bactériophages

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

2.3. Rôle des différents microorganismes du rumen dans la digestion

Les trois principales populations microbiennes possèdent l'équipement enzymatique nécessaire à la dégradation de l'ensemble des constituants de la ration, notamment des parois cellulaires des végétaux. Cependant, plusieurs facteurs conditionnent la dégradation ruminale des parois végétales : l'accessibilité des substrats aux microorganismes, leur adhésion aux particules et leur activité enzymatique (Cheng *et al.*, 1991).

2.3.1. Le métabolisme glucidique

Grâce à un équipement enzymatique très large mais spécifique des groupes bactériens concernés, les microorganismes du rumen sont capables de dégrader tous les constituants glucidiques contenus dans les végétaux (Hungate, 1966). Cette dégradation qui réduit la taille des molécules alimentaires aboutit à libérer dans le milieu ruminal des oses (hexoses ou pentoses).

Les bactéries cellulolytiques participent activement à la dégradation des polymères des plantes (**Figure 2**). Cette dégradation nécessite l'action d'enzymes spécialisées qui sont distribuées parmi les différents microorganismes fibrolytiques (Doré et Gouet, 1991). Ces différentes enzymes sont souvent regroupées au sein de complexes de hauts poids moléculaire

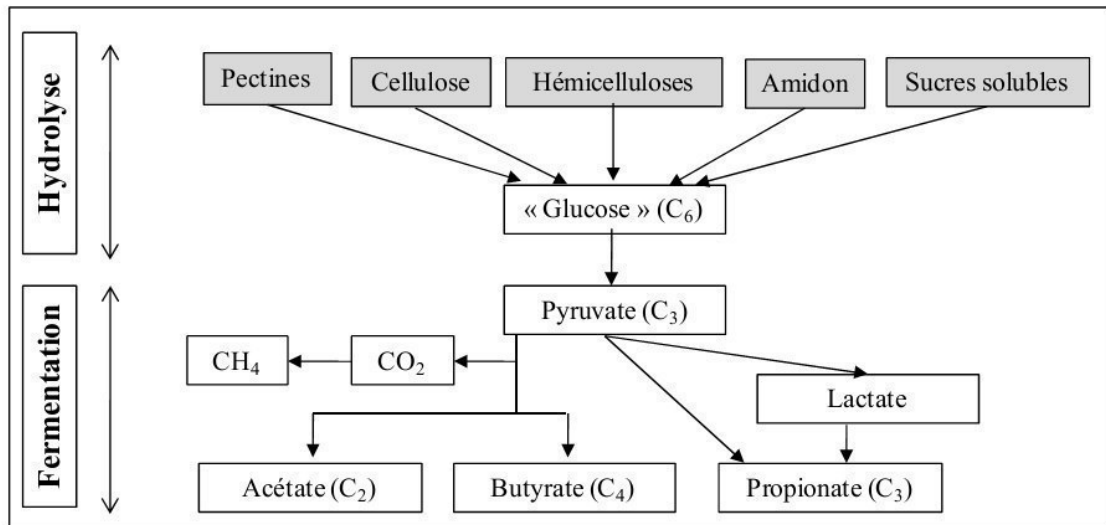


Figure 2: Résumé des principales voies des fermentations ruminales des polymères glucidiques. (Serment, 2012)

(cellulosome) qui leur permettent sûrement d'être plus efficaces (Fonty et Forano, 1999). L'hydrolyse de la cellulose se fait par l'action de cellulases classées en trois groupes: les endoglucanases, les exoglucanases et les bêta-glucosidases. De même, les hémicelluloses sont hydrolysées par trois groupes d'enzymes: des endoxylanases, des exoxylanases et des bêta-xylosidases (Forano *et al.*, 1996).

Les protozoaires ciliés et les champignons possèdent aussi ce potentiel enzymatique (Jouany et Ushida, 1990 ; Fonty et Joblin, 1991). Les ciliés (larges entodiniomorphes) peuvent ingérer des particules alimentaires et les digérer à l'intérieur de vacuoles (Ushida et Jouany, 1994). Ils possèdent une plus grande activité cellulastique que les ciliés Entodinium. L'activité cellulastique est associée à la fraction cytoplasmique des protozoaires. Leur activité cellulastique semblerait plus élevée que celle des bactéries (Conchie, 1954). Cependant, il est difficile de distinguer la contribution des bactéries fixées aux particules ingérées, de celle des protozoaires dans la dégradation de la cellulose (Fonty *et al.*, 1995). Les hémicelluloses sont aussi activement dégradés par les larges entodiniomorphes, tandis que les holotriches ont un rôle mineur dans la cellulolyse. Ce sont les trois principales bactéries cellulolytiques, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* et *Fibrobacter succinogenes* qui contribuent le plus à l'activité cellulolytique des microorganismes adhérant aux particules du rumen (Fonty *et al.*, 1995) (**Tableau 3**).

Les produits de la dégradation des polyholosides sont des oligosaccharides solubles et des sucres, qui sont ensuite fermentés pour générer des molécules d'ATP utilisées par les

différents microorganismes. La plupart des holotriches fermentent les sucres solubles, tandis que peu d'entodiniomorphes en sont capables (Jouany et Ushida, 1998). Cependant, certains sucres solubles ne sont pas fermentés par les holotriches (mannose, glucosamine).

Tableau 3 : Substrats dégradés et fermentés par les principales espèces bactériennes du rumen. La majorité des souches peuvent assurer cette fonction (+) ou (-) (Fonty *et al.*, 1995)

	Métabolites fermentaires											
	Formate	Acétate	Propionate	Butyrate	Valérate	Caproate	Ethanol	Succinate	Lactate	H ₂	CO ₂	CH ₄
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	+	+						+				
<i>Ruminococcus albus</i>	+	+					+			+	+	
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	+	+						+		+	+	
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	+	+		+							+	
<i>Prevotella ruminicola</i>	+	+	+					+				
<i>Seimonas ruminantium</i>		+	+						+			
<i>Streptococcus bovis</i>		+	-						+			
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	+	+						+				
<i>Succinomonas amylolytica</i>		+	+					+				
<i>Eubacterium ruminantium</i>	+	+		+							+	
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	+	+						+	+			
<i>Megasphaera elsdenii</i>		+		+		+				+	+	
<i>Lachnospira multiparus</i>	+	+					+		+	+	+	
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>		+	+					+				
<i>Veillonella alcalesens</i>			+									
<i>Methanobacterium ruminantium</i>												+
<i>Wolinella succinogenes</i>								+				
<i>Eubacterium limosum</i>		+		+								

L'amidon est ingéré sous forme de granules par les ciliés, surtout par *Isotricha* qui possède la plus grande activité amylolytique parmi l'ensemble des ciliés. Ceci contribue à limiter la diminution du pH, liée à la dégradation de l'amidon. Les espèces bactériennes amylolytiques du rumen, attachées aux grains d'amidon, sont souvent ingérées par les protozoaires. Les produits de la dégradation de l'amidon par les protozoaires sont: l'acide butyrique, H₂, CO₂ ainsi que de plus faibles quantité d'acide propionique et d'acide lactique (Eugene, 2002).

2.3.2. Le métabolisme azoté

Les protéines ingérées par l'animal sont dégradées par le microbiote ruminal et plus particulièrement par les bactéries et les protozoaires. Les bactéries ruminales ont une forte activité protéolytique par rapport aux protozoaires car cette activité est présente au niveau de leur paroi cellulaire à l'inverse des protozoaires dont l'activité protéolytique est intracellulaire (Nugent et Mangan, 1981 ; Coleman, 1983). Les champignons anaérobies ont une très faible activité protéolytique (Wallace et Joblin, 1985; Bonnemoy *et al.*, 1993).

Les principales bactéries protéolytiques sont présentées dans le **tableau 4**. Les protéases bactériennes sont principalement des cystéine - protéases, mais les serine - protéases et les métallo protéases sont aussi présentes (Brock *et al.*, 1982). Aucune des espèces bactériennes ne possède d'activité spécifique, mis à part *Streptococcus bovis* qui possède une très forte activité leucine amino-peptidase. Les protozoaires possèdent principalement des cystéine et aspartique-protéases. *Entodinium sp.* possède la plus forte activité, et beaucoup de protozoaires ont des protéases intracellulaires (Coleman, 1983).

Tableau 4 : Principales bactéries protéolytiques du rumen (Mackie et White, 1990)

Gram négatives	Gram positives
<i>Prevotella ruminicola</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
<i>Bacteroides amylophilus</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
<i>Megasphaera elsdenii</i>	<i>Lachnospira sp.</i>
<i>Selenomonas ruminantium</i>	<i>Eubacterium sp.</i>
<i>Succinivibrio sp.</i>	<i>Clostridium sp.</i>
	<i>Propionibacterium sp.</i>

Les peptides produits sont plus rapidement utilisés que les acides aminés libres correspondants (Wright, 1967). Ce sont principalement les bactéries du rumen qui les dégradent. Les produits de dégradation des peptides sont principalement extracellulaires, bien que la plupart des enzymes soient associées à la cellule (Wright, 1967). Les oligopeptides de faibles poids moléculaires sont préférentiellement intégrés aux protéines bactériennes, après avoir été hydrolysés en acides aminés au sein de la cellule bactérienne. Les acides aminés produits sont en faible concentration dans le rumen. Ils sont désaminés pour produire de l'ammoniaque et des acides gras volatils (AGVs) (Mackie et White, 1990) (**Figure 3**). Les protozoaires jouent un rôle primordial dans la mesure où leur activité spécifique de désamination des acides aminés est 3 fois supérieure à celle des bactéries (Hino et Russel, 1985).

L'ammoniaque produit est issu de l'activité protéolytique, uréolytique et de désamination (acides aminés) des microorganismes (Fonty *et al.*, 1995). Le recyclage de l'ammoniaque via l'urée dans le rumen est très important. De même, *in vitro*, le recyclage de l'azote bactérien, issu de la prédation des bactéries par les protozoaires peut représenter 90g de matière sèche / j chez le mouton (Coleman, 1975). L'ammoniaque est essentielle pour la croissance de nombreuses espèces bactériennes, qui l'assimilent grâce à une NAD/NADP glutamate déshydrogénase dans les conditions normales du rumen (Wallace et Cotta, 1988). La très forte affinité des bactéries, vis à vis de l'ammoniaque, leur confère la capacité de se développer à partir d'une concentration ruminale de NH_3 minimale, variable selon les auteurs, d'environ 50 mg $\text{NH}_3\text{-N}$ / ml (Satter et Slyter, 1974).

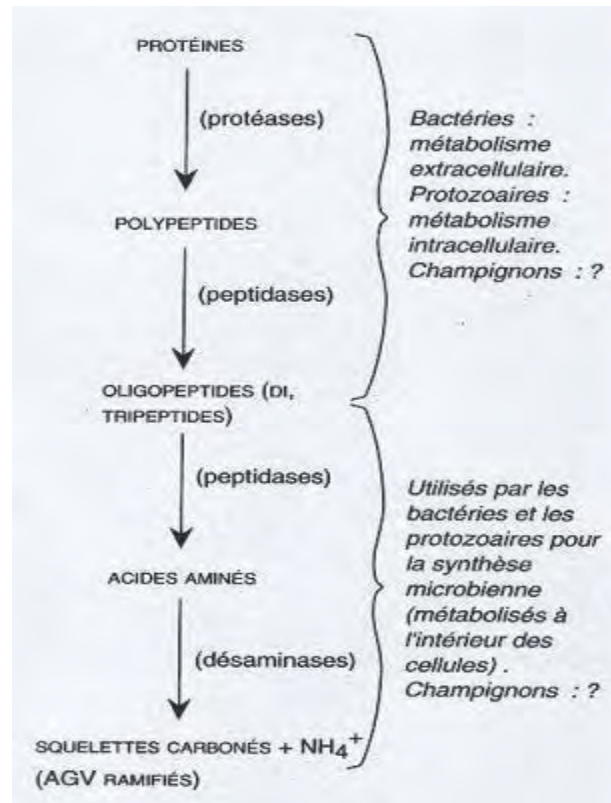


Figure 3 : Dégradation des composés azotés dans le rumen (Jouany, 1994)

2.2.3. Le métabolisme lipidique

Les lipides de la ration sont principalement composés de galactolipides, phospholipides (pour les fourrages) et de triglycérides (pour les aliments concentrés). Ces lipides subissent tout d'abord une lipolyse libérant les AG des triglycérides. *Anaerovibrio lipolytica* est la principale bactérie impliquée dans cette lipolyse (Lourenço *et al.*, 2010).

Les AG libres insaturés peuvent alors subir des réactions d'isomérisation et de biohydrogénation. Les isomérases transforment les liaisons cis en liaison trans. Les réductases saturent quant à elles les doubles liaisons. Les principales voies connues ou probables de la biohydrogénation ruminale des acides linoléique (cis-9, cis-12 C18:2), linoléique (cis-9, cis-12, cis-15 C18:3) et oléique (cis-9 C18:1) sont décrites dans la **Figure 4**. La biohydrogénation du cis-9, cis-12 C18:2 et du cis-9, cis-12, cis-15 C18:3 conduit à la formation d'acide stéarique (C18:0) suite à une isomérisation et une série de réductions. Les vitesses de réactions sont différentes, notamment la dernière réduction est plus lente et fonction du pH. Ainsi, les flux digestifs sortant du rumen contiennent plus de C18:1 trans que de C18:2 et C18:3 trans. Parmi les différentes voies métaboliques de biohydrogénation de ces AGPI, les voies du trans 11 et du trans 10 sont souvent rencontrées (**Figure 5**),

principalement celle du trans-11. La voie du trans-10 s'observe principalement avec des rations riches en amidon et / ou une supplémentation en huiles végétales ou de poisson (Bauman et Griinari, 2001; Shingfield et Griinari, 2007). L'hydrogénation entraîne la disparition de plus de 70 % du cis-9 C18:1, plus de 80 % du cis-9, cis-12 C18:2 et plus de 90 % des cis-9, cis-12, cis-15 C18:3 (Schmidely *et al.*, 2008).

Les bactéries responsables de la biohydrogénation peuvent être classées selon 2 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). Les bactéries *Butyrivibrio spp* ne sont pas responsables de l'hydrogénation de l'acide linoléique en trans-10, cis-12 C18:2 (**Figure 5**), qui est certainement due à *Propionibacterium acnes* et dans une moindre mesure à *Megasphaera elsdenii* (Lourenço *et al.*, 2010).

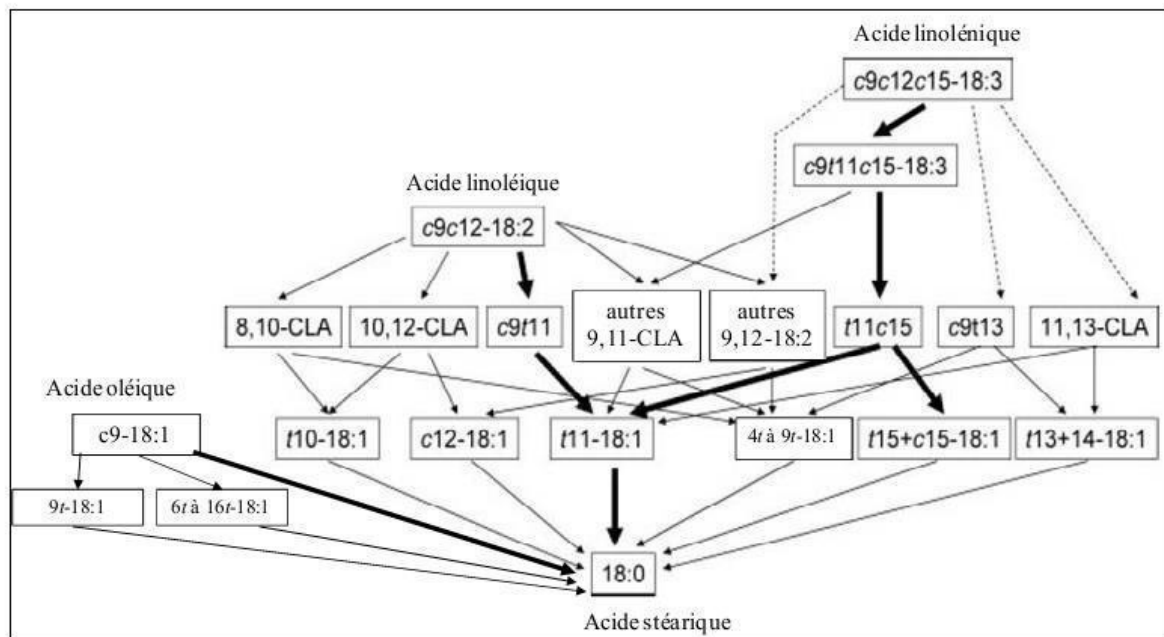


Figure 4 : Principales voies connues ou probables de la biohydrogénation ruminale des acides linoléique linoléique (Chilliard *et al.*, 2007). En gras : voies majeures ; en traits pleins : voies probables suggérées par les études in vitro ; en pointillés : voies probables avec des intermédiaires à préciser. Lorsque les configurations cis ou trans ne sont pas indiquées, toutes les combinaisons peuvent exister.

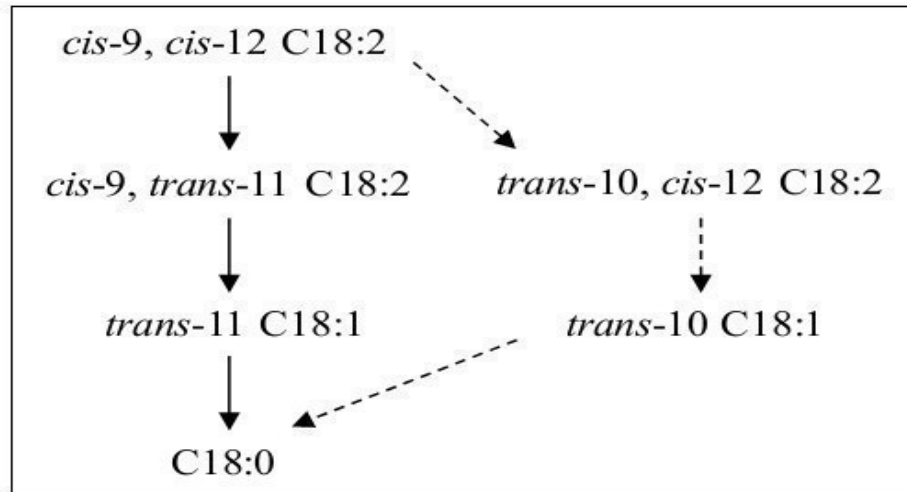


Figure 5 : Biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique: détail des voies du trans-11 et du trans-10 (Shingfield et Griinari, 2007)

3. Alimentation des ruminants

Un aliment unique est généralement insuffisant pour couvrir les besoins nutritifs de l'animal, d'où le besoin d'associer plusieurs aliments au sein d'une ration. Tous les aliments sont constitués d'eau, de matières minérales, de glucides, de lipides et de matières azotées. Les rations du bétail contiennent environ 70% à 80% de glucides (Hvelplund, 1991) surtout sous forme d'amidon, de cellulose et d'hémicellulose. Les glucides fournissent donc en moyenne près des trois quarts de l'énergie alimentaire des animaux de ferme. On distingue deux grandes catégories de glucides selon leur localisation dans la cellule végétale : cytoplasmiques (ou intracellulaires) et pariétaux.

Les glucides intracellulaires sont des sucres hydrosolubles, des fructosanes et des grains d'amidon. Les sucres hydrosolubles ne constituent que 10% de la matière sèche des aliments d'origines végétale. Les glucides pariétaux constituent les parois des cellules végétales; ils comportent des glucides proprement dit (polyosides) et des constituants non glucidiques qui leurs sont associés (lignine). Parmi les polyosides on distingue : cellulose (longues chaînes de molécules de glucose), hémicellulose (molécules de pentoses), substances pectiques (polymère de galacturonane) et lignine (composé d'alcools).

3.1. La paroi végétale

La paroi est l'enveloppe la plus externe de la cellule végétale. Elle est essentiellement composée de polymères glucidiques, cellulose et pectine, de protéines pariétales et

éventuellement d'autres composés de nature phénolique (lignine et subérine). La paroi est composée de trois parties (**Figure 6**) :

La paroi primaire, de nature pecto-cellulosique, n'existe seule que dans les cellules juvéniles; elle est extensible, ce qui permet la croissance cellulaire,

La paroi secondaire apparaît lors de la différenciation cellulaire. Elle permet de renforcer la rigidité de la cellule et de l'imperméabiliser. Elle est subdivisée en trois sous-couches : S1 (externe), S2 (médiane) et S3 (interne),

La lamelle moyenne est la partie la plus externe de la paroi et elle est commune à deux cellules contiguës (Christophe, 2007).

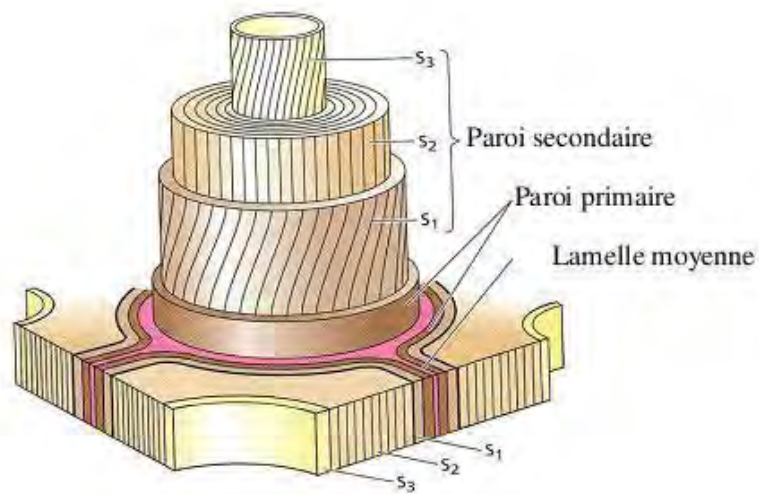


Figure 6 : Organisation de la paroi végétale (Béguin et Aubert, 1994)

3.2. Constituants des parois végétales

Les parois contiennent toutes les mêmes constituants de base : eau, cellulose, hémicellulose, lignine, protéines (enzymes, glycoprotéines de structure), substances pectiques, substances inorganiques d'incrustation (CaCO₃, silicates, oxalates), substances lipophiles d'incrustation (cires, cutine, subérine). Cependant la composition varie selon l'espèce ; dans une même espèce elle est variable selon le tissu et selon l'étape de développement. En effet, la proportion des parois végétales et leur degré de lignification augmentent avec l'âge de la plante.

3.2.1. La cellulose

La cellulose est la molécule renouvelable la plus abondante à la surface de la terre, elle représente plus de la moitié de la biomasse terrestre et est le matériau recyclable le plus

exploité dans l'industrie. C'est un homopolymère non ramifié constitué de longues chaînes linéaires d'unités de D-glucose liées entre elles par une liaison glycosidique β -1,4 (**Figure 7**). Son degré de polymérisation peut monter jusqu'à 15000 molécules de glucose (Breet et Waldron, 1996). Structuralement, l'unité élémentaire qui se répète dans la cellulose est le cellobiose (dimère de glucose), l'unité cellobiose mesurant 1.03 nm (Fengel et Wegener, 1984).

Des liaisons hydrogènes intermoléculaires favorisent l'organisation des chaînes parallèles en domaines cristallins appelés cristallites. La régularité de la structure favorise la formation de réseaux cristallins. Ces régions très cristallines, difficilement dégradables par les organismes cellulolytiques (Chesson, 1982) sont séparées par des régions amorphes que les enzymes hydrolysent plus facilement. Le degré de cristallinité de la cellulose est variable. Il est faible dans les cellules jeunes (parois primaires) et peut atteindre 70% dans les cellules matures (parois secondaires).

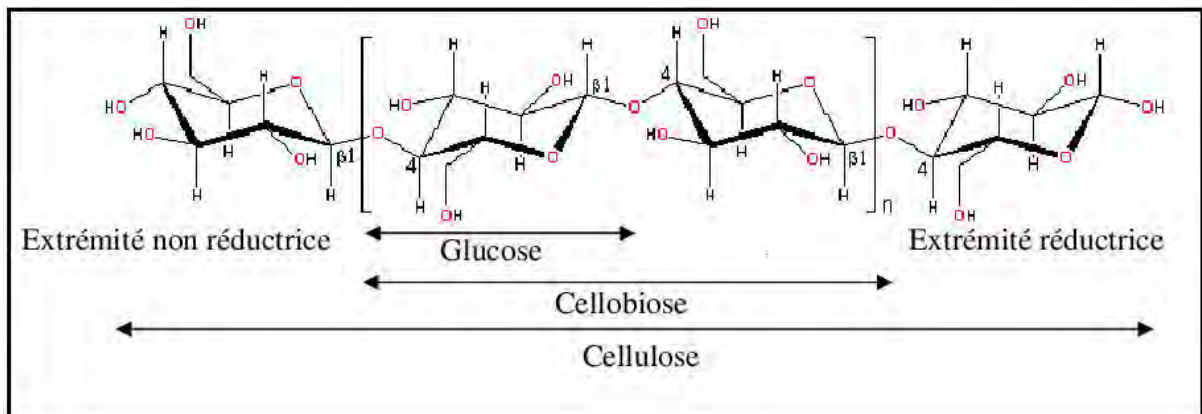


Figure 7 : Structure de la molécule cellulose (Christophe, 2007)

3.2.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses, contrairement à la cellulose, sont des hétéropolymères amorphes composés d'hexoses (glucose, mannose, galactose) et surtout de pentoses (xylose, arabinose). Elles constituent donc une chaîne de β -glucose liée en 1,4 avec de courtes chaînes latérales de xylose, galactose, mannose. Ces chaînes latérales peuvent être méthylées ou acétylées et jouent un rôle important dans la flexibilité et la plasticité des parois végétales (Christophe, 2007).

Les hémicelluloses peuvent être de type homopolymère (D-xylane, D-mannane,...etc.) ou hétéropolymère (xyloglucane, glucomannane,...etc.). Les chaînes de ces macromolécules sont relativement courtes. Elles constituent une matrice polysaccharidique souvent associée à

des constituants phénoliques qui entourent les fibrilles de la cellulose (Thomson, 1983). La classe la plus fréquente correspond aux xyloglucanes. Ils sont constitués d'une chaîne de glucose (β -1,4) et de courtes chaînes latérales de xylose, galactose et fucose (**Figure 8**). Les xyloglucanes peuvent contracter des liaisons hydrogènes avec la cellulose. A cause de la présence de chaînes latérales, ils ne sont pas eux-mêmes susceptibles de constituer des fibrilles. Ils peuvent ainsi jouer un rôle fondamental dans le maintien d'une architecture pariétale organisée en liant les fibrilles de cellulose entre elles (Christophe, 2007).

Les hémicelluloses diffèrent de la cellulose par trois aspects importants. Premièrement, elles contiennent différentes unités de sucres, deuxièmement elles présentent un degré considérable de branchement des chaînes, tandis que la cellulose est un polymère strictement linéaire. Troisièmement, le degré de polymérisation de la cellulose est dix à cent fois plus élevé que celui des hémicelluloses (Bledzki et Gassan, 1999). Les hémicelluloses sont globalement le constituant pariétal le moins résistant : ces polymères se biodégradent rapidement, présentent un taux d'absorption d'humidité élevé, et se dégradent chimiquement à des températures relativement basses.

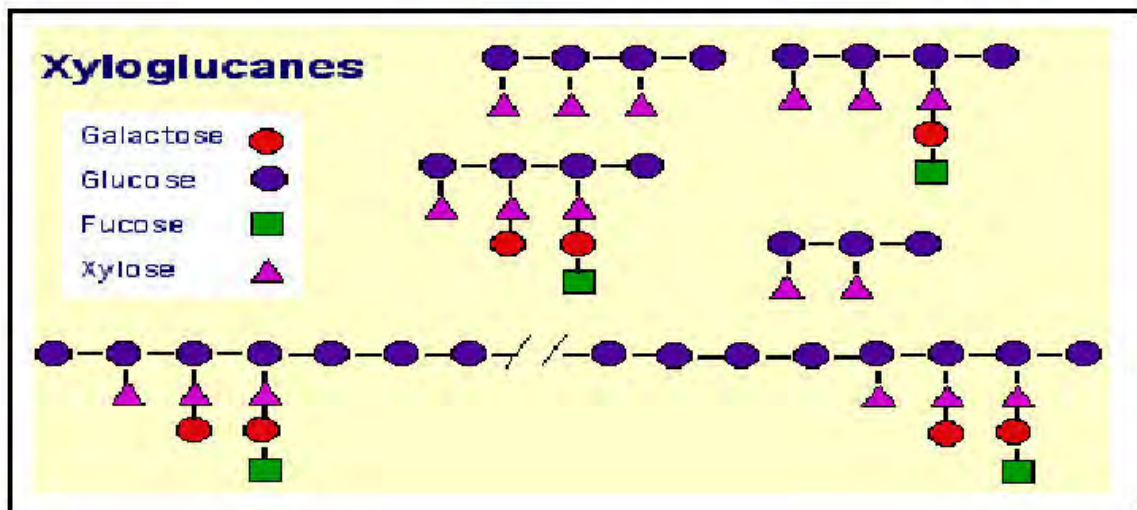


Figure 8 : Molécules de xyloglucane (Christophe, 2007)

3.2.3. La lignine

La présence de lignine est une caractéristique rencontrée chez la plupart des végétaux (fougères, gymnospermes et angiospermes). Ce polymère représente 15 à 36% de la masse sèche des angiospermes (Baucher *et al.*, 1998). Elle est responsable de la rigidité des végétaux, de la conduction des solutés et de la résistance face aux agents pathogènes. Elle a

aussi, une action inhibitrice vis -à-vis à la dégradation des polysides pariétaux dans le rumen (Jung et Deetz, 1993).

La lignine est un hétéropolymère phénolique ramifié de haute masse moléculaire, qui résulte de la copolymérisation de trois monomères : alcool coumarylique, alcool coniférylique et alcool sinapylique (**Figure 9**). Elle est liée aux hémicelluloses mais les liaisons lignine/hémicelluloses ne sont pas connues avec précision. L'organisation s'effectue autour des microfibrilles de cellulose et aboutit à un treillis dense (Angelidaki *et al.*, 2000).

La teneur en lignine est plus élevée dans la matière sèche des tiges que dans celle des feuilles, tant chez les graminées que chez les légumineuses (Bourquin et Fahey, 1994). Au sein de la paroi végétale, la teneur en lignine diminue depuis la lamelle moyenne jusqu'à la paroi secondaire (Wilson, 1994). Chez les graminées, la lignification augmente fortement à certaines périodes de croissance de la plante (Ballet, 1989). A l'inverse, les parois des légumineuses ont une teneur en lignines qui évolue peu au cours de la croissance (Martens *et al.*, 1988).

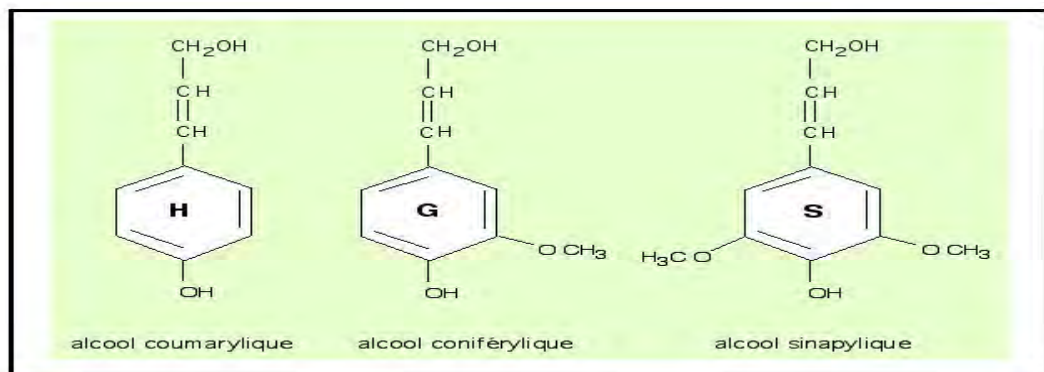


Figure 9 : Les trois monomères principaux de la lignine (Roger, 2012)

3.2.4. Les pectines

Les pectines sont des polysaccharides complexes que l'on retrouve principalement dans la lamelle moyenne et la paroi primaire des plantes supérieures (Alkorta *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 1999). Elles jouent un rôle important dans l'adhésion et le maintien des cellules des tissus végétaux en formant un ciment rattachant les cellules les unes aux autres (Iwasaki *et al.*, 1998). La structure principale des pectines est formée de chaînes faiblement polymérisées d'acides galacturoniques liés en α -(1→4), appelé acide polygalacturonique, sur lesquelles s'insèrent des résidus de L-rhamnose. Chaque unité rhamnose introduit dans la chaîne un coude et confère donc à l'ensemble une configuration en zig-zag (Bonnin *et al.*, 2002).

3.2.5. Les tannins

- **Généralités et définition :** Les tannins (ou tanins) sont des substances d'origine végétale qui ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible, le cuir (Bruneton, 1999). Cette propriété de tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène de la peau. D'un point de vue biochimique, une première définition a été proposée par Bate-Smith (1973) : « des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3 000 Da qui présentent, à coté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines ». Même si cette définition reste valable, elle a été complétée grâce aux méthodes d'analyse récentes qui ont permis d'éclaircir la structure de ces polyphénols. Ainsi, les tannins sont désormais définis comme des polyphénols de masse moléculaire allant jusqu'à 20 000 Da (Hagerman, 2002). Selon leur structure biochimique, il est usuel de distinguer deux classes de tannins : les tannins hydrolysables (THs) et les tannins condensés (TCs).
- **Les propriétés biologiques:** Les propriétés biologiques des tannins découlent de leurs propriétés physicochimiques. L'une des conséquences directes de la capacité des tannins à complexer les protéines est l'inactivation des enzymes soit directement, par fixation aux sites actifs, soit indirectement par l'encombrement stérique créé par la fixation des molécules de tannins sur l'enzyme (Zimmer et Cordesse, 1996). Certaines drogues à tannins présenteraient des effets antimicrobiens (Hatano *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2006), antifongiques (Baba- Moussa *et al.*, 1999; Bruneton, 1999) ou antiviraux (Yamaguchi *et al.*, 2002). Néanmoins, les applications actuelles en thérapeutique restent restreintes (Bruneton, 1999).
- **Classification biochimique :** Chez les végétaux supérieurs, il est usuel de distinguer deux groupes de tannins selon leur structure biochimique: les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Bruneton, 1999; Hagerman, 2002). Les tannins hydrolysables (THs) sont des oligo- ou poly-esters d'un sucre, en général le glucose, et de molécules d'acide-phénol (Bruneton, 1999; Mueller-Harvey, 2001). En général, les THs ont un faible PM. Cependant, des couplages oxydatifs entre THs peuvent produire des polymères de PMs importants (Mueller-Harvey, 2001). Les tannins condensés (TCs) sont appelés proanthocyanidines parce que leur oxydation en milieu alcool-acide

entraîne la formation de pigments anthocyanidiques tels que les cyanidines (à partir de procyanidines) et les delphinidines (à partir de prodelphinidines) (Brunet, 2008).

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

3.2.6. Autres constituants

La silice est particulièrement abondante dans les parois des Graminées par leur inclusion dans certaines cellules de l'épiderme, périderme et d'autres cellules spécialisées de la racine (Carpita, 1996; Currie et Perry, 2007). Les subérines, cutines et des cires, à caractère hydrophobe (acides gras et phénols) sont caractéristiques aussi de certaines cellules spécialisées de l'épiderme qui rendent ces tissus plus imperméables (Carpita, 1996).

3.3. Mise en place des parois au cours du développement cellulaire

La constitution de la paroi cellulaire est variable avec l'âge de la cellule. Cette paroi évolue au cours du développement, passant ainsi d'une paroi primaire non lignifiée à une paroi qui s'épaissit et se secondarise en se lignifiant de plus en plus. Ainsi au cours du développement, la composition de la paroi se modifie, ainsi que la structure et les teneurs en ses différents constituants. L'évolution au cours du développement de la composition des parois peut être abordée en étudiant des plantes prélevées à différents stades de développement (Boon *et al.*, 2008; Boon *et al.*, 2012) ou bien encore les entre nœuds d'une

même plante (les entre nœuds du haut étant les moins matures) prélevés à différents niveaux (Chabbert *et al.*, 1994a,b).

Après la formation de la lamelle moyenne, la paroi primaire est la première à se former d'épaisseur très fine de 0,03 à 1 μm (Wilson et Hatfield, 1997). La paroi primaire est douée de plasticité et permet la croissance de la cellule. En effet, lors du processus d'élongation cellulaire, la paroi primaire se déforme pour permettre la croissance. La paroi primaire est essentiellement composée de polysaccharides, sous forme de microfibrilles de cellulose et d'une matrice complexe d'hémicelluloses et de pectines (Cosgrove, 2005). Les microfibrilles de cellulose sont les principaux déterminants de l'orientation de l'expansion cellulaire : les cellules s'allongent difficilement dans la direction parallèle à la spirale de cellulose (Marga *et al.*, 2005; Kutschera et Nikas, 2007). Aux stades précoces de développement, la teneur en monosaccharides d'origine non cellulosique (arabinose, galactose, mannose et xylose) est élevée (Morrison *et al.*, 1998), les hémicelluloses sont déposées principalement dans les lamelles moyennes et parois primaires pendant ces stades. Comme mentionné, chez les graminées, les xylanes des parois primaires présentent généralement des arabinoses en chaînes latérales et sont appelés arabinoxylanes (Zhang, 2012).

CHAPITRE II: Stratégies pour réduire la production de méthane chez les ruminants

1. La méthanogénèse dans le rumen

Chez le ruminant, le CH_4 est un produit formé naturellement pendant le processus de fermentation microbienne des aliments dans le rumen, situé au début du tube digestif. Le méthane ainsi produit est rejeté dans l'atmosphère par voie orale (95%), au cours d'éructions régulières et par les poumons après passage dans le sang, mais très peu par flatulences (5%) contrairement à une affirmation courante (Martin *et al.*, 2006).

Outre l'aspect environnemental, le méthane éructé constitue pour le ruminant une perte en énergie sous forme gazeuse estimée à environ 6-10% de l'énergie brute ingérée. La réduction de la méthanogénèse présente donc non seulement un intérêt environnemental pour l'homme et la planète, mais aussi un intérêt nutritionnel pour le ruminant.

1.1. Origines de la méthanogénèse

Les aliments ingérés par les ruminants séjournent pendant 20 à 70 heures dans le rumen où vit une population microbienne anaérobie dense ($> 10^{11}$ cellules/ml) et variée

(plusieurs milliers d'espèces de bactéries, de protozoaires et de champignons). Environ 70% de la digestion totale a lieu dans le rumen, ce qui donne à cet organe un rôle majeur dans l'utilisation des aliments par le ruminant.

Les micro-organismes colonisent les particules alimentaires en quelques minutes et, grâce à leurs dépolymérase, dégradent les polysides végétaux (cellulose, hémicelluloses, pectines, et amidon) en oses (glucose, xylose) qui sont ensuite fermentés pour produire des acides gras volatils (acétate, propionate, butyrate), du CO₂ et de l'hydrogène (**figure 10**). Dès sa formation, l'hydrogène est rapidement utilisé par des micro-organismes hydrogénotrophes appelés *Archaea* méthanogènes qui appartiennent à une branche particulière dans la classification systématique des bactéries, pour former du CH₄. L'orientation des fermentations microbiennes joue un rôle déterminant sur le métabolisme de l'hydrogène dans le rumen. La formation d'acétate s'accompagne d'une production d'hydrogène et donc de méthane alors que celle du propionate est consommatrice d'hydrogène. La production du butyrate à partir de l'acétate utilise également de l'hydrogène (Martin *et al.*, 2006).

En milieu anaérobie comme le rumen, les réactions d'oxydation nécessaires à la genèse de l'ATP conduisent à la production d'hydrogène métabolique (2H). Ce dernier doit être éliminé au fur et à mesure de sa production car une élévation de la pression partielle en hydrogène dans le milieu inhiberait l'action des déshydrogénases dans le processus d'oxydation. L'utilisation continue de l'hydrogène dans le rumen est assurée par les micro-organismes hydrogénotrophes (*Archaea* méthanogènes) pour réduire une partie du CO₂ en méthane. On peut donc considérer que la méthanogénèse est une voie métabolique essentielle dans l'élimination de l'hydrogène ruminal. Il est admis qu'une réduction de 20% 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 métabolisé par d'autres voies, conduisant par exemple à la synthèse de propionate ou de butyrate (**figure 10**) (Popova *et al.*, 2011b).

Comme la méthanogénèse, la production d'acétate par la voie de l'acétogénèse réductrice correspond à une réduction du CO₂ par H₂ [$2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{-COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$]. Elle a été mise en évidence dans le gros intestin du ruminant mais n'intervient qu'à un niveau faible dans le rumen. En revanche, elle est dominante dans le tube digestif de l'homme, du rat, des hamsters et des lapins.

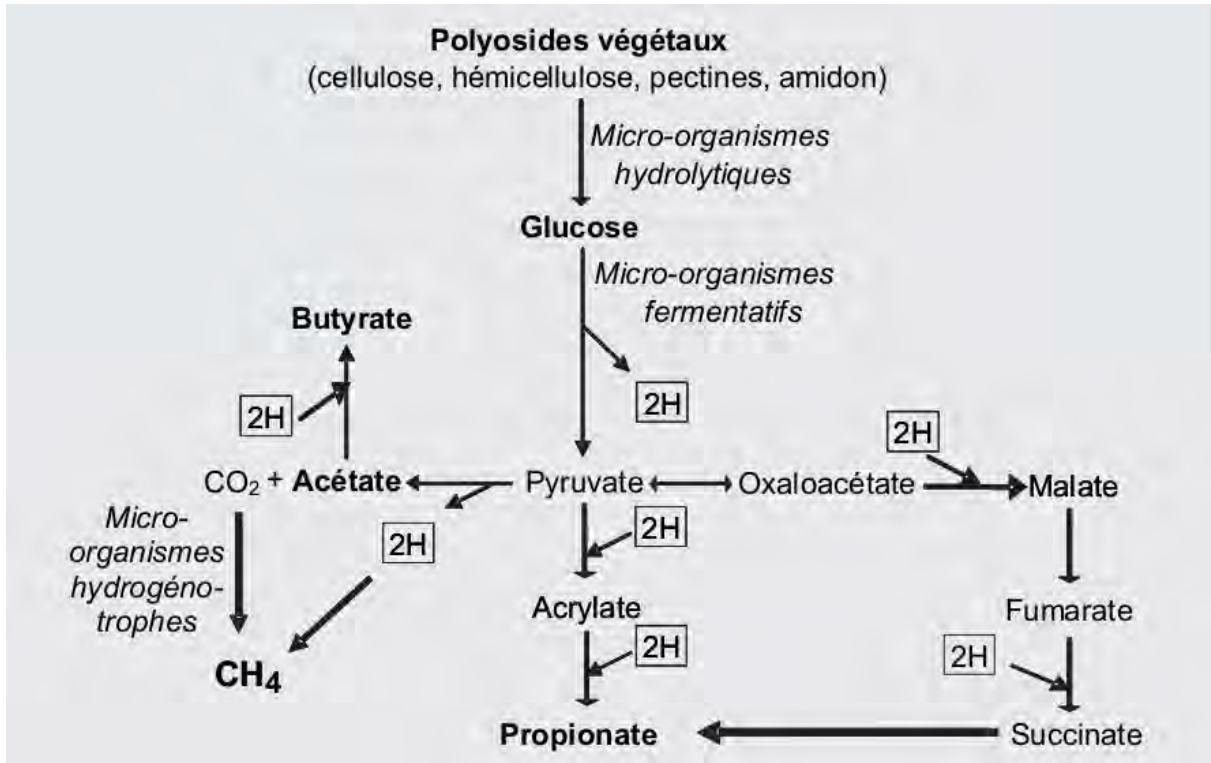


Figure 10: Processus de fermentation des glucides alimentaires dans le rumen conduisant à la production de méthane (Martin *et al.*, 2006).

Le rôle central de l'H₂ dans le métabolisme ruminal a été souligné dans la plupart des études menées pour explorer les stratégies de réduction des émissions de CH₄ par les ruminants. Parmi ces stratégies, la plupart concerne la manipulation de l'écosystème microbien par des additifs et des biotechnologies (défaunation, probiotiques, additifs chimiques, acides organiques...) ou par l'alimentation (modification des éléments constitutifs de la ration, apport d'additifs alimentaires tels que les lipides) (Popova *et al.*, 2011b).

2. Biotechnologies

2.1. Probiotiques

Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités appropriées et régulières, ont un effet bénéfique sur l'hôte. L'utilisation de probiotiques dans l'alimentation des ruminants, dans le but ciblé de réduire la méthanogénèse, a fait l'objet de peu d'études jusqu'à maintenant (Chaucheyras-Durant *et al.*, 2008) et les rares résultats obtenus *in vivo* ne sont pas convaincants (Doreau et Dollé., 2011). McGinn *et al.* (2004) ont rapporté que le produit de levures commerciales Procreatin-7 (Saf Agri) a provoqué une diminution non significative de 3 % de la production du CH₄, exprimée en pourcentage de la matière sèche ingérée alors que Levucell SC (Lallemand Inc) n'a eu aucun effet.

Par ailleurs, Chaucheyras-Durand et Durand (2010) ont suggéré que *S. cerevisiae* pourrait stimuler la croissance des bactéries acétogènes capables d'utiliser l' H_2 dans le rumen, le détournant ainsi de la méthanogénèse. L'acétogénèse réductrice est une voie particulière de biosynthèse de l'acétate par réduction de 2 moles de CO_2 par 4 moles d' H_2 . La flore acétogène est naturellement présente dans le rumen, mais ne peut pas exprimer son potentiel hydrogénotrophe en présence d'*Archaea* méthanogènes du fait de la moindre affinité pour l' H_2 . En absence de méthanogènes, l'acétogénèse réductrice est la principale voie hydrogénotrophe (Fonty *et al.*, 2007) et peut être stimulée par des probiotiques. Pour obtenir des réductions satisfaisantes de la méthanogénèse dans le rumen, il faudrait parallèlement inhiber les méthanogènes et stimuler les acétogènes. La piste des additifs microbiens mérite d'être approfondie. L'avenir des probiotiques pour réduire la méthanogénèse est lié à une meilleure connaissance de leurs modes d'action et à la mise au point de souches microbiennes plus efficaces, ce qui est envisageable grâce aux progrès des biotechnologies.

2.2. Défaunation

Les principaux AGV produits par les protozoaires du rumen sont le butyrate et l'acétate, donc des voies métaboliques productrices d' H_2 . Il n'est donc pas étonnant que les *Archaea* méthanogènes aient été retrouvés attachés à la surface des protozoaires ou encore à l'intérieur des cellules. Les *Archaea* méthanogènes associés aux protozoaires seraient responsables de 9 à 25 % du CH_4 produit dans le rumen (Newbold *et al.*, 1995). D'un autre côté, une baisse moyenne de 10% des émissions de CH_4 est observée après défaunation, cette valeur pouvant varier en fonction du régime alimentaire du ruminant (Morgavi *et al.*, 2010).

La présence des protozoaires assure la stabilité du pH ruminal (Eugène *et al.*, 2004) en régulant les fermentations ruminales comme mentionné précédemment. Les réductions les plus significatives de la méthanogénèse après l'élimination des protozoaires ont été observées avec des rations riches en amidon (Morgavi *et al.*, 2010) et peuvent donc être partiellement attribuées à la corrélation positive entre la production de CH_4 et le pH ruminal (Lana *et al.*, 1998). En effet, le pH optimal pour la croissance des *Archaea* méthanogènes fluctue entre 6,1 et 7,8 en fonction des espèces (Miller et Lin, 2002).

D'un autre côté, il a été montré que le nombre des méthanogènes associés aux protozoaires augmente juste après la prise alimentaire et diminue rapidement après (Tokura *et al.*, 1997). Stumm *et al.*, (1982) ont montré que quand la contribution relative des protozoaires à la production totale d' H_2 dans le rumen diminue, le nombre d'association ectosymbiotiques

avec les *Archaea* méthanogènes diminue également. De plus, des effets inhibiteurs de la moindre disponibilité en H₂ sur l'activité méthanogène dans le rumen de moutons défaunés ont été démontrés en mesurant l'expression du gène fonctionnel *mcrA* (Popova, 2011a).

L'élimination des protozoaires est souvent associée à une augmentation de la proportion molaire du propionate aux dépens de celles de l'acétate et surtout du butyrate (Eugène *et al.*, 2004). Comme discuté précédemment, ces réorientations fermentaires sont à l'origine d'une moindre disponibilité de l'H₂ pour la méthanogénèse. Elles peuvent être attribuées au métabolisme des protozoaires (producteurs importants de butyrate), mais également à leur activité prédatrice envers les bactéries. En effet, en absence de protozoaires, le nombre des bactéries est plus élevé (Ozutsumi *et al.*, 2005; Mosoni *et al.*, 2011) ; la croissance et le maintien de la biomasse bactérienne exige également une réorientation de l'H₂ vers la synthèse de nouvelles cellules, mais aussi de protéines bactériennes. Certaines études ont suggéré une activité prédatrice sélective envers les *R. albus* et *R. flavefaciens* (Ozutsumi *et al.*, 2006) dont le nombre augmente avec l'élimination des protozoaires, bien qu'il puisse également s'agir, comme suggéré par Mosoni *et al.*, (2011), d'une compétition pour le substrat entre protozoaires et bactéries fibrolytiques. Les réductions observées dans les émissions de CH₄ chez les animaux défaunés ne peuvent pas a priori être expliquées par une communauté méthanogène moins abondante. Des changements dans la diversité ont été observés, mais l'implication des différentes espèces d'*Archaea* méthanogènes (en présence ou absence de protozoaires) doit encore être démontrée. La diminution de la quantité d'H₂ disponible pour la méthanogénèse est le point commun entre les différentes études.

2.3. Vaccins et anticorps

La vaccination des animaux contre les *Archaea* méthanogènes permettrait de diminuer la production de CH₄ sans altérer la digestion, la performance animale ou la qualité des produits (Wright *et al.*, 2004b). Il s'agit d'une stimulation du système immunitaire de l'animal afin de produire des anticorps anti-méthanogènes qui via la salive rejoindront le rumen où ils inhiberont les *Archaea*. Parmi les trois vaccins formulés à ce jour (Wright *et al.*, 2004b ; Williams *et al.*, 2009), un seul a réussi à baisser les émissions de CH₄ de 8 % (Wright *et al.*, 2004b). Dans cette dernière étude, il a été déterminé a posteriori que les animaux traités avaient reçu un vaccin ne ciblant que 20% des espèces d'*Archaea* méthanogènes présents dans le rumen ; donc en ciblant une plus grande proportion de la population, la diminution des émissions de CH₄ devrait être plus importante. Ceci implique que la composition du vaccin

soit prédéterminée par la composition (espèces, souches) précise de la communauté méthanogène des animaux à traiter.

L'adaptation de la population méthanogène est un point important à prendre en compte afin de prévoir l'efficacité d'un vaccin ou d'un anticorps à long terme. Egalement, la formulation de molécules «universelles» nécessite encore des recherches. Une autre difficulté de cette stratégie est la production d'une réponse immunitaire adéquate, ainsi que le mode d'administration des vaccins ou des anticorps dans le rumen en conditions d'élevage.

3. Additifs chimiques

3.1. Les nitrates

Des additifs chimiques, notamment le nitrate et le sulfate, ont été expérimentés comme accepteurs d'électrons à la place du CO₂ (Weimer *et al.*, 1999). D'un point de vue thermodynamique, les réductions successives du nitrate en nitrite puis en ammoniacque fournissent plus d'énergie que la réduction du CO₂ en CH₄. Ces processus pourraient être une voie intéressante d'élimination d'H₂ si le nitrate est disponible en quantité suffisante dans le rumen. La réduction du nitrate en ammoniacque consomme 8 électrons et ainsi chaque mole de nitrate réduit pourrait diminuer la production de CH₄ d'une mole. L'ammoniacque générée sera disponible pour l'anabolisme et serait un apport important d'azote avec des régimes alimentaires pauvres en protéines qui peuvent limiter la synthèse des protéines microbiennes (Popova *et al.*, 2011b).

Toutefois, la supplémentation de la ration avec des nitrates peut se révéler toxique pour l'animal. Les nitrates contenus dans certaines plantes ne constituent pas en soi un problème pour les microorganismes du rumen qui possèdent les enzymes nécessaires pour décomposer le nitrate en ammoniacque. Cependant de fortes charges en nitrates alimentaires peuvent submerger la capacité des microorganismes du rumen à dégrader complètement le nitrate en ammoniacque et le niveau du nitrite, un composé intermédiaire, peut augmenter. Le nitrite est le vrai problème car il est toxique pour les bactéries cellulolytiques (Sar *et al.*, 2004).

Les nitrates sont donc une piste intéressante à explorer pour réduire les émissions de CH₄. Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre si les réductions observées dans la méthanogénèse sont dues à une action directe (toxique) sur les *Archaea* méthanogènes. Il est également possible que ce soit le résultat d'un effet indirect, comme la

réorientation de l'H₂ vers d'autres voies métaboliques via la stimulation de communautés microbiennes particulières.

3.2. Les composés anti-méthanogènes

L'utilisation de composés anti-méthanogènes (bromochlorométhane (BCM), bromoéthanesulfonate (BES), chloroforme) a des effets drastiques sur les *Archaea* du rumen, en perturbant spécifiquement la méthanogenèse (Ungerfeld *et al.*, 2004). Le BCM est un analogue halogéné du méthane qui réagit avec la vitamine B₁₂ et inhibe ainsi une étape cobalamine-dépendante de la voie métabolique de la méthanogenèse. Le BES est un analogue de structure du 2-mercaptoéthanesulfonate (coenzyme M, CoM) et interfère dans la méthanogenèse en inhibant la déméthylation réductive de CH₃-S-CoM. Le chloroforme est connu pour inhiber l'action des enzymes cobalamine-dépendantes, telles que la méthyl-CoM réductase qui catalyse l'étape ultime de la méthanogenèse. L'ajout de BCM *in vitro* fait passer la quantité de CH₄ produit, de 30% des gaz totaux à des traces, en éliminant complètement la population méthanogène (Goel *et al.*, 2009). Le BES réduit *in vitro* la quantité de CH₄ produit de 86% en réduisant de presque 10 fois le nombre des méthanogènes (Guo *et al.*, 2007).

Bien que ces inhibiteurs soient considérés comme spécifiques aux *Archaea* méthanogènes, *in vitro* en revanche ces molécules stimulent le développement de la population bactérienne. La croissance de *F. succinogenes* a été stimulée aussi bien par le BCM (+68 %, Goel *et al.*, 2009) que par le BES (+ 50 %, Guo *et al.*, 2007). *F. succinogenes* est le plus important producteur de succinate dans des régimes à base de foin (Moss *et al.*, 2000) ; le succinate est ensuite métabolisé en propionate par d'autres espèces bactériennes dans le rumen. La prolifération de *F. succinogenes* peut s'expliquer par la disparition des *Archaea* méthanogènes, concurrents pour l'H₂ qui devient toute de suite plus disponible pour la synthèse de succinate et de propionate.

In vivo, l'ajout de BCM diminue la production de CH₄ de 59%, et le nombre des *Archaea* méthanogènes de 34% (Denman *et al.*, 2007). La concentration des AGV n'a pas été affectée par le traitement, ce qui suggère que même si on peut s'attendre à une accumulation d'H₂ dans le milieu ruminal, celle-ci n'a pas inhibé les fermentations ruminales.

Les réductions observées de la méthanogenèse lors de l'utilisation d'additifs anti-méthanogènes seraient reliées à une communauté méthanogène moins abondante. Cependant, des changements dans la diversité de cette communauté sont également observés dans

certaines études ; on peut donc s'attendre à ce que l'utilisation de cette stratégie à long terme donne lieu à des adaptations microbiennes.

4. Acides organiques

Les acides organiques tels le fumarate et le malate sont des intermédiaires importants dans la production de propionate : le malate est déshydraté en fumarate qui est réduit en succinate en utilisant l' H_2 ; le succinate est décarboxylé en propionate. *In vitro*, l'utilisation des acides organiques diminue la méthanogenèse en stimulant la production d'AGV, en particulier du propionate menant à baisser le ratio molaire acétate : propionate (Doreau *et al.*, 2011).

Les émissions de CH_4 ont diminué, n'ont pas changé ou ont augmenté avec l'ajout de fumarate (Ungerfeld *et al.*, 2007). Mais actuellement, à notre connaissance, il n'y a pas d'étude publiée sur les effets de la supplémentation des rations avec du fumarate sur l'écosystème microbien *in vivo* et en particulier sur les *Archaea* méthanogènes. Il serait intéressant i) de voir si les bactéries réductrices de fumarate réussissent à long terme à prendre le dessus sur les *Archaea* méthanogènes dans le cadre d'un apport de fumarate seul ; ii) de contrôler s'il n'y a pas un changement dans la population méthanogène essentiellement hydrogénotrophe dans les conditions normales, vers une population préférentiellement utilisatrice de formate.

4.1. Extraits de plantes et huiles essentielles

Ces dernières années, l'exploration de phytomolécules bioactives en tant qu'additifs alimentaires naturels a reçu une grande attention de la part des nutritionnistes et des microbiologistes du rumen pour modifier favorablement les fermentations (Patra et Saxena, 2009 ; Vakili *et al.*, 2013; Gunal *et al.*, 2013 ; Foskolos *et al.*, 2015). Un grand nombre de molécules végétales, telles que les saponines, les tannins, de même que les huiles essentielles ont sollicité l'intérêt des chercheurs par leur capacité à inhiber la méthanogénèse, améliorer le métabolisme des protéines et la productivité animale ou encore augmenter le contenu d'acide linoléique conjugué dans des produits alimentaires d'origine animale.

4.2. Les saponines

Les saponines sont des détergents naturels qui possèdent des propriétés membranolytiques. Elles forment des complexes avec les stérols des membranes cellulaires

essentiellement des eucaryotes (protozoaires et champignons dans le rumen) et provoquent la lyse cellulaire. La réduction des émissions de CH₄ observée quand les animaux reçoivent des rations riches en saponines (Beauchemin *et al.*, 2009 ; Martin *et al.*, 2010) peuvent partiellement être attribuées à la toxicité de ces molécules envers les protozoaires du rumen. *Yucca schidigera* (une plante riche en saponines), broyée et administrée via la canule à faibles (20 g/jour) ou fortes (60 g/jour) doses, a diminué la population de protozoaires de 42% chez des génisses (Hristov *et al.*, 1999) sans effet dose. En revanche, Benchaar *et al.*, (2008) ont supplémenté la ration de vaches laitières avec 6 g/j de saponines de *Y. schidigera*, sans observer d'effets négatifs sur les protozoaires. Hormis ces quelques divergences, qui pourraient s'expliquer par des quantités administrées ou méthodes d'administration différentes, l'activité anti-protozoaire des saponines est l'effet le plus fréquemment rapporté dans les études (Patra et Saxena, 2009).

L'activité inhibitrice des saponines sur les *Archaea* (*in vitro*) varie en fonction de la nature de la molécule. Les effets de *S. sesban* sur la méthanogenèse étaient plus prononcés avec une ration riche en concentré qu'avec une ration à base de fourrage (Goel *et al.*, 2008). Les saponines des fruits de *S. rarak* ajoutées à hauteur de 4 mg/mL ont réduit *in vitro* le nombre des ARNr 16S des *Archaea* ; les concentrations plus basses n'ont pas eu d'effets significatifs (Wina *et al.*, 2005). La paroi cellulaire des *Archaea* diffère de celle des autres procaryotes, mais aussi de celle des eucaryotes par sa composition en lipides et protéines unique dans le monde vivant. Il est possible que cette particularité leur confère une résistance à certaines saponines. L'ajout de la saponine du thé dans des cultures pures de *Methanobrevibacter ruminantium* n'a pas eu d'effet ni sur la production de CH₄, ni sur le nombre des cellules ou sur leur activité métabolique (Guo *et al.*, 2008). A l'inverse, la saponine de thé a baissé la production de CH₄ de 8 % dans des cultures mixtes du rumen sans affecter le nombre des méthanogènes, mais en diminuant leur activité métabolique de 76 % (Guo *et al.*, 2008). Ces résultats divergents peuvent être dus à une efficacité différente des espèces méthanogènes dans la production de CH₄. A notre connaissance, des études de diversité des méthanogènes n'ont pas été réalisées avec des rations riches en saponines. Il serait intéressant de voir si des espèces particulières ne sont pas sélectionnées parce qu'elles sont résistantes aux saponines.

4.3. Les tannins

Les tannins sont des composés hydrosolubles polyphénoliques qui peuvent précipiter les protéines. Les études relatives aux effets sur les protozoaires sont contradictoires. Dans certaines études le nombre des ciliés ne change pas (Newbold *et al.*, 1997), alors que dans d'autres, il était significativement réduit (Hristov *et al.*, 2003 ; Rira *et al.*, 2014). Les effets sur la faune ruminale de tannins provenant d'une quinzaine d'arbres différents ont été testés *in vitro* ; uniquement 3 des molécules étudiées ont présenté des activités inhibitrices (Monforte-Briceno *et al.*, 2005). Les mécanismes d'action des tannins sur les *Archaea* méthanogènes et en particulier *M. ruminantium* ont été étudiés par Tavendale *et al.*, (2005). Les résultats de cette étude suggèrent que la baisse des émissions de CH₄ observée avec des rations contenant des tannins (Patra et Saxena, 2009; Martin *et al.*, 2010; Rodehutsord, 2013) peut être due à une inhibition directe des méthanogènes, qui dépendrait toutefois de la structure chimique des tannins condensés. Il est également nécessaire de mener des études à long terme pour s'assurer que des espèces résistantes de méthanogènes n'apparaîtront pas. Les bactéries tannins-tolérantes (genre *Streptococcus*) présentent un autre problème potentiel. La tolérance dans certains cas de figure est due à leur capacité à modifier ou dégrader les tannins (Smith *et al.*, 2005), ce qui permet d'éliminer les tannins du milieu ruminal.

4.4. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des liquides concentrés en composés aromatiques volatils obtenus par distillation ou extraction dans des solvants de plantes. Ces composés sont généralement abondants dans les herbes et les épices et à moindre degré chez les autres plantes, et ils jouent un rôle protecteur contre les attaques bactériennes, fongiques ou d'insectes. Les huiles essentielles sont lipophiles et interagissent avec les membranes cellulaires ce qui est à l'origine de leur toxicité et de leurs propriétés antimicrobiennes particulièrement à l'égard des bactéries à Gram positif. Des concentrations basses d'huiles essentielles (<100 ppm) ont inhibé la croissance de presque toutes les cultures pures de bactéries du rumen (McIntosh *et al.*, 2003). Parmi elles, *S. bovis* s'est révélée être la souche la plus résistante ; la souche la plus sensible était *P. ruminicola* bien que finalement elle ait développé une résistance. En ce qui concerne le nombre de protozoaires, il n'est pas influencé (Benchaar *et al.*, 2008 ; Kobayashi, 2010) ou diminue significativement (Ando *et al.*, 2003) avec l'ajout d'huiles essentielles dans la ration de bovins.

Très peu de données concernant les effets des huiles essentielles sur la population méthanogène sont disponibles dans la littérature et aucune étude n'a été réalisée *in vivo*. En culture, la croissance de *M. smithii* a été inhibée seulement avec une concentration en huiles supérieure à 1000 ppm (McIntosh *et al.*, 2003). Dans l'étude *in vitro* d'Agarwal *et al.*, (2009), l'inclusion d'huile de menthe à hauteur de 0,33 mL/L a multiplié par deux le nombre des méthanogènes, alors que la production de CH₄ avait diminué de 20%, sans affecter la concentration totale des AGV. Des doses plus fortes (1 et 2 mL/L) ont eu un effet toxique sur les *Archaea* s'accompagnant d'une baisse de la méthanogénèse.

L'utilisation des extraits de plantes pour réduire la méthanogénèse est une piste intéressante par son caractère «naturel» apprécié par les consommateurs, mais aussi parce qu'elle est facilement applicable en pratique. Cependant, vu le nombre élevé de molécules potentiellement intéressantes et les réponses divergentes de l'écosystème microbien observées dans les différentes études, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour identifier les meilleures cibles.

5. Composition de la ration

5.1. Proportion et nature du concentré dans la ration

Il est admis d'une manière générale que la production de CH₄ (CH₄g/kg de matière sèche ingérée) avec une ration riche en cellulose est plus importante qu'avec une ration riche en amidon (Doreau *et al.*, 2011). En comparaison avec des animaux recevant des rations riches en amidon, la diversité des méthanogènes est plus importante chez des ovins au pâturage (Wright *et al.*, 2004a). De même, la communauté méthanogène dans le rumen de bovins était plus riche et plus diverse chez des animaux recevant un concentré fibreux comparés à des animaux recevant un concentré riche en amidon et en lipides (Popova *et al.*, 2011). L'amidon et/ou les lipides exerceraient une pression sélective sur les méthanogènes du rumen (Popova *et al.*, 2011b).

La sélection des méthanogènes serait réalisée en raison d'une moindre disponibilité du substrat H₂, car avec des régimes riches en amidon, une réorientation des voies fermentaires vers la production de propionate aux dépens de l'acétate est souvent observée (Beauchemin *et al.*, 2009, Martin *et al.*, 2010). La réduction de la méthanogénèse serait alors la conséquence d'un effet direct de la baisse du pH ruminal sur les microorganismes du rumen, en particulier sur les protozoaires et les *Archaea* (Martin *et al.*, 2010).

5.2. Apport de lipides

A 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. La réduction des émissions de CH₄ 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 du substrat H₂ (Doreau *et al.*, 2011). Les lipides ont des effets toxiques sur les protozoaires (Doreau et Ferlay, 1995), donc la disponibilité réduite de l'H₂ peut également être expliquée par une production d'H₂ plus faible.

En ce qui concerne la population méthanogène, *in vitro*, dans l'étude de Dohme *et al.*, (2001) utilisant les fermenteurs RUSITEC, son nombre n'est pas affecté par l'ajout de 50 g/kg MS de substrat d'acides gras saturés à chaîne courte à longue (C_{8:0} à C_{18:0}); en revanche la population se trouve significativement réduite (- 78 %) dans l'étude de Soliva *et al.*, (2003) avec l'ajout de l'acide laurique (C_{12:0}; 30 mg/100 mL contenu ruminal). Zhang *et al.*, (2008) ont observé une croissance de la population méthanogène avec des petites doses (35 g/kg MS de substrat ajouté) d'acides gras à chaîne longue saturés (C_{18:0}) ou mono-insaturés (C_{18:1}) et une inhibition par des faibles (35 g/kg MS substrat) et fortes (70 g/kg MS substrat) doses d'acides gras à chaîne longue polyinsaturée (C_{18:2}, C_{18:3}).

In vivo, la concentration des *Archaea* méthanogènes dans le liquide ruminal des animaux dépourvus de protozoaires était multipliée par 3 avec la supplémentation de la ration avec 50 g/kg de MSI d'huile de coprah (Machmüller *et al.*, 2003). *In vitro*, avec un apport d'acide laurique (30 mg), le nombre des *Methanococcales* a régressé plus significativement que celui des *Methanobacterales*, *Methanosarcinales* ou des *Methanomicrobiales* (Soliva *et al.*, 2003). En accord avec les essais *in vitro*, la supplémentation de la ration avec de l'huile de coprah (riche en acide laurique) chez des ovins défaunés, s'est accompagnée d'une baisse du signal de la sonde ciblant l'ARNr 16S des *Methanococcales* (Machmüller *et al.*, 2003).

L'apport de lipides pour diminuer la méthanogenèse est une piste intéressante et facilement applicable en pratique. Les études menées jusqu'à présent indiquent une sensibilité différente des méthanogènes en fonction de la nature et/ou la quantité du supplément lipidique. Cet élément sera à considérer pour choisir les molécules les mieux adaptées et efficaces à long terme.

Deuxième Partie

Matériel

Et

Méthodes

1. Effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive des plantes fourragères

1.1. Caractéristique du site expérimental

1.1.1. Localisation géographique

La Wilaya de M'Sila se situe à 35°40' latitude Nord et 04°30' longitude Est, sur une altitude d'environ 500 m. Elle est située au Sud Est d'Alger, limitée au Nord par les Wilaya de Médéa, Bordj Bou-Arredj, Sétif et Bouira ; à L'Ouest par Djelfa ; à l'Est par Batna et au Sud par la wilaya de Biskra. Son territoire ne présente aucune homogénéité géographique (A.N.A.T, 2002).

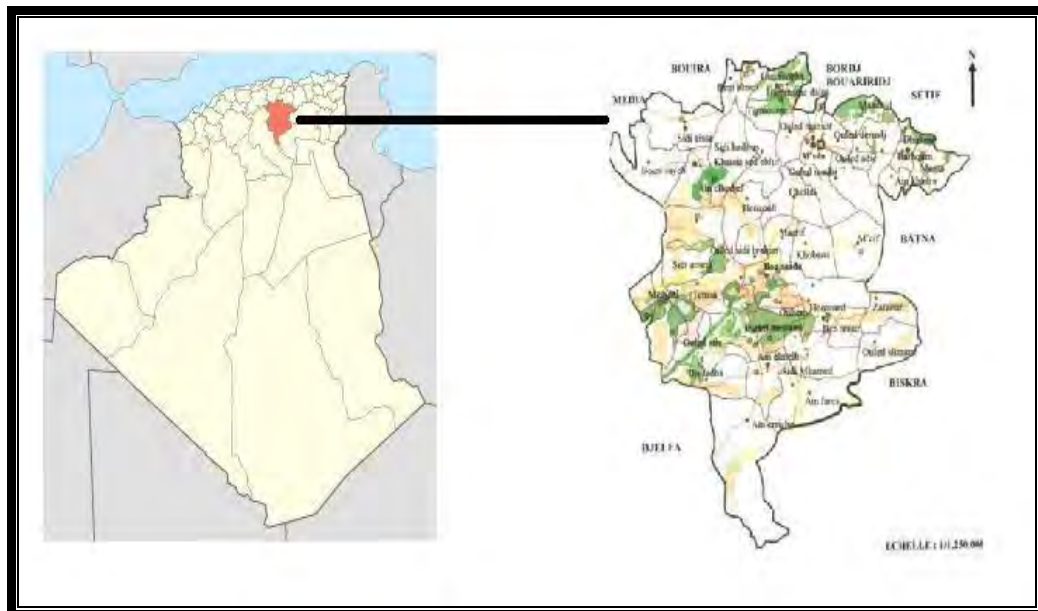


Figure 11: Localisation géographique de la zone d'étude (Medjekal *et al.*, 2015)

1.1.2. Sol et couvert végétal

Le territoire de la wilaya constitue une zone charnière entre deux grandes chaînes de montagnes, l'Atlas Saharien et l'Atlas Tellien, ce qui lui donne une configuration géographique caractérisée par une zone.

- de montagne de part et d'autre du chott El-Hodna,
- centrale constituée essentiellement de plaines et de hautes plaines,
- de Chott (Chott El-Hodna) au centre,
- de dunes de sables éoliens.

La majeure partie de la Wilaya est couverte par la steppe (environ 63% du territoire), formée essentiellement d'Alfa et d'armoïse. Au Nord, les parcours steppiques sont assez bien développés, par contre, au Sud ils sont beaucoup plus dégradés. Cette steppe est connue comme espace de nomadisme et d'élevage ovin par excellence, 80 % du cheptel algérien (ovin et caprin) y est concentré (Bouaza, 2012). La flore à usage thérapeutique est aussi relativement importante. Parmi les principales plantes figurent de nombreuses Lamiacées, largement utilisées dans la pharmacopée locale : Astéracées, Fabacées et Zygophyllacées (Benkheira *et al.*, 2005).

1.2. Climat de la région

Le climat de la région de M'Sila est caractérisé par un été sec très chaud et un hiver très froid avec une pluviométrie faible et irrégulière de l'ordre de 260 mm/an (Inspection de l'environnement, 2002).

1.2.1. Les précipitations

Une précipitation moyenne annuelle de 260 mm contribue à la détermination du caractère aride de la région, accentué par l'extrême irrégularité de la répartition des pluies au cours de l'année. La nature orageuse des pluies constitue l'autre facteur explicatif de la sévérité du régime pluviométrique qui se traduit par une dominance du ruissellement. Les configurations topographiques des bas-fonds permettent cependant la rétention d'une grande partie des eaux de pluies (Rammade, 2003).

1.2.2. Les températures

La température représente un facteur limitant de première importance car elle conditionne la répartition de la totalité des espèces végétales (Rammade, 2003). Les températures moyennes minimales et maximales (1988-2007) sont consignées dans le tableau 05.

Tableau 5 : Répartition des moyennes de températures mensuelles en °C (Rammade, 2003).

Station Mois		Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Jui	Jut	Aou	Sep	Oct	Nov	Déc	Moy
M'sila 1988- 2007	m	0,35	04,3	07,7	10,6	15,5	21	24,4	24,1	19,2	14,6	08,4	04,7	13,1
	M	13,9	16,1	20,2	22,9	27,9	34,7	38,5	38	32,2	25,7	18,9	14,2	25,2

m : moyennes mensuelles des températures minimales

M : moyennes mensuelles des températures maximales

Tableau 6 : Caractéristiques botaniques et phénotypiques des plantes fourragères étudiées

Famille	Substrat	Nom local	Description botanique
Dicotylédons			
Chenopodiaceae	<i>Atriplex canescens</i>	El-Gtef américain	<i>L'Atriplex canescens</i> est un arbuste buissonnant de 1 à 3 m de hauteur, à port plus ou moins étrié, formant des touffes de 1 à 3 m de diamètre. Les rameaux blanchâtres sont étalés, ascendants ou arqués, retombants vers l'extrémité. Les feuilles courtement pétiolées ou sub-sessiles, sont alternes, et leur limbe linéaire, lancéolé et uninervé est vert grisâtre. Il peut atteindre 3 à 5 cm de longueur et 0,3 à 0,5 cm de largeur. Des feuilles axillaires plus petites (0,5 à 1,5 sur 0,1 à 3 cm) sont aussi présentes le long de l'axe feuillé (Johnson, 1999).
Fabaceae - Leguminosae	<i>Astragalus gombo</i>	Foulet El-bel	C'est une plante vivace et endémique dans les pâturages arides et désertiques de sable de l'Algérie (Quezel et Santa, 1963) à tiges dressées. Longues feuilles composées de petites folioles ovoïdes. Fleurs jaune verdâtre petites, sessiles à l'aisselle des feuilles. Le fruit est une gousse à bec court couverte de poils laineux
	<i>Calobota saharae</i>	El-Merckh	C'est un arbrisseau rétamioïde de 0,8-2 m de hauteur, rameux dès la base, dressé. Les jeunes rameaux sont presque tous florifères, plus ou moins densément pubescents, vert. Les rameaux d'un an et plus sont glabrescents, verts et cylindriques, tous effilés et presque toujours aphyllés. Les feuilles alternes sont toutes unifoliolées sessiles, les folioles sont fugaces, linéaires-oblongues, entières et subaiguës. Les ramules florifères sont alternes, très nombreux formant des grappes lâches (Lograda, 2010)



Atriplex canescens (a)



Atriplex canescens (b)



Astragalus gombo (a)



Astragalus gombo(b)



Calobota saharae (a)



Calobota saharae (b)

Figure 12: Description phénotypique des plantes fourragères étudiées (stade normale **a** et à la floraison **b**)

1.3. Matériel végétal

1.3.1. Echantillons testés

Parmi les espèces fourragères choisis, 03 plantes sont retenues pour cette étude : *Atriplex canescens* Purch Nutt. Espèce introduite (Le Houérou, 2000), elle appartient à la famille des *Chenopodiaceae*. Elle semble particulièrement intéressante en raison de sa plus grande résistance au froid. Cette espèce originaire d'Amérique du Nord (Mulas et Mulas, 2004) est une plante fourragère exceptionnelle grâce à sa valeur nutritive, sa bonne adaptabilité et son feuillage persistant (Kitchen et McArthur, 2001). De plus, c'est un important arbuste pour la réhabilitation des sols dégradés et elle s'adapte facilement hors de son habitat naturel (Sanderson et Mc Arthur, 2004). L'utilisation des plantations pastorales à *Atriplex canescens*, par le Haut-Commissariat au Développement de la Steppe (HCDS), constitue une approche prometteuse dans la lutte contre la désertification. Outre sa qualité fourragère, l'*Atriplex* possède un système racinaire très développé fixant les couches supérieures du sol et elle peut être utilisée comme moyen de lutte contre la désertification. *Astragalus gombo* (Cos. & Dur), est une plante endémique, appartenant à la famille des *Fabaceae - Leguminosae*, de grande importance économique, elle est une source de protéines végétales pour l'alimentation animale ou humaine. *Calobota saharae* (Cos. & Dur) Boatwr. & B.-E.van Wyk. est un arbuste spontanée indigène du Sahara, il joue un rôle écologique important dans la préservation et la fertilité des sols pauvres et érodés. La sélection et la collecte des différentes espèces sont basées sur la connaissance des éleveurs locaux. En effet, après des investigations faites auprès des éleveurs sur les préférences nutritionnelles avérées des ruminants de la région, nous avons sélectionné ces trois plantes fourragères, collectées respectivement aux alentours de la ville de Boussaâda.

1.3.2. Echantillonnage et préparation du matériel végétal

Notre étude a été réalisée durant l'année 2009 et des prélèvements ont été effectués pendant trois saisons consécutives. L'année est divisée en trois saisons qui correspondent aux périodes de variations climatiques importantes de la zone d'étude : l'hiver saison des pluies et des froids qui va de Novembre à Février où l'on note de faibles précipitations, le printemps la saison du gél et du froid avec quelques précipitation qui s'étalent de Mars à Mai et la saison sèche et chaude qui couvre les mois de Juin à Novembre. Trois prélèvements ont été effectués

sur les mêmes plantes, à mi-Janvier pour la première saison, mi-Mai pour la deuxième et la fin du mois de Juillet pour la troisième saison.

Entre 06 et 10 spécimens de chaque espèce végétale sont prélevés afin d'obtenir un échantillon représentatif de la biomasse végétale. La partie aérienne des plantes, feuilles, rameaux minces (jeunes tiges) et quelques fleurs (quand elles existent) sont coupés avec des ciseaux et pris immédiatement au laboratoire où les échantillons provenant de différents spécimens sont regroupés et séchés au four à 60 ° C pendant 48 heures. Les échantillons sont ensuite broyés grossièrement au laboratoire à l'aide d'un hachoir puis broyés une seconde fois avec un broyeur muni d'un tamis de 1 mm pour les analyses chimiques et les expériences de la fermentation et de digestibilité *in vitro*.

1.4. Caractéristiques chimique des fourrages

L'analyse chimique est la méthode la plus simple pour évaluer les produits alimentaires des ruminants (Palmisano et Barlaz, 1996). La plupart des informations existantes concernent la composition chimique des aliments, elles sont basées sur des analyses approximatives développées par Henneberg et Stohman (Mc Donald *et al.*, 1995). Devenues archaïques et imprécises elles ont été soumises à de nombreuses critiques concernant les fibres brutes, la matière sèche et la matière azotée (Mc Donald *et al.*, 1995). L'alternative pour l'estimation des fibres proposée par Van Soest est maintenant la plus acceptée. Elle a été développée comme procédure pour quantifier les constituants de la paroi cellulaire, principalement au niveau du matériel végétal.

1.4.1. Détermination de la matière sèche

La matière sèche est déterminée par dessiccation d'1 g d'échantillons à 65 °C dans une étuve ventilée jusqu'à poids constant. Le poids du résidu après 48 heures caractérise la teneur en matière sèche de l'échantillon.

1.4.2. Détermination des sels minéraux

Cette analyse permet le calcul des sels minéraux contenus dans l'échantillon. 3g de substrat préalablement séchés, sont placés dans un creuset en porcelaine, taré puis incinéré dans un four à moufle à 550°C pendant 6 heures. La perte de poids observée au cours de la calcination correspond à la matière organique et le résidu à la matière minérale.

1.4.3. Détermination de la matière azotée totale

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

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

-Transformation de l'azote ammoniacal en ammoniacque : Cette réaction chimique est réalisée à l'aide d'une unité de distillation (marque Buchi K-314, Allemagne). Elle est faite en présence d'une base forte (NaOH, 10N). L'ammoniacque est récupéré par condensation à la vapeur d'eau, reprise dans 25ml d'une solution d'acide borique à 4% (m/v) contenant un indicateur coloré (rouge de méthyle et bleu de méthylène). Cette solution est titrée par une solution d'HCl (0,1N). La teneur en azote est obtenue à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\text{Vol (Hcl)(ml)} * 14 * 01}{\text{Prise d'essai} * \text{MS}(\%)}$$

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

1.4.4. Détermination des composés de la paroi végétale

La teneur en parois végétales est une caractéristique importante qui détermine pour partie la valeur alimentaire (digestibilité et ingestibilité) des fourrages. La détermination des composés de la paroi végétale est réalisée selon le procédé décrit par Van Soest *et al*, (1991).

1.4.4.1. Estimation de la fraction NDF (Neural Detergent Fibre)

La fraction NDF (fibres insolubles dans les détergents neutres) correspond à la teneur en parois totales des fourrages (cellulose, hémicelluloses et lignine) et des cendres. Cette méthode repose sur la solubilisation à pH neutre des protéines par le lauryl sulfate de sodium et des substances pectiques par l'EDTA. L'appareil utilisé est un appareil de digestion automatique du type Fiber analysis (marque ANKOM TECHNOLOGY CORPORATION,

USA). Le traitement avec la solution NDF permet de solubiliser les polymères de glucose non cellulosique.

➤ **Réactifs**

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

➤ **Préparation de la solution NDS (Neural Detergent Solution)**

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

➤ **Préparation de l'échantillon**

Dans des sacs Daisy, libellées, sont introduits 500mg du substrat préalablement séchés. Les sacs sont scellés par une thermoscelleuse (heat sealer). L'appareil est rempli de 02 litres de la solution NDS. Les sacs sont introduits dans l'appareil et portés à ébullition pendant une heure. L'appareil est ensuite vidangé de la solution NDS. Les sacs sont alors rincés 03 fois avec de l'eau distillée à 80°C environ pendant 10 minutes. Les sacs sont ensuite lavés à l'acétone et mis pour séchage jusqu'à poids constant dans une étuve réglée à 105°C.

1.4.4.2. Estimation de la fraction ADF (Acid Detergent Fibre)

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

➤ **Réactifs**

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

➤ **Préparation de la solution ADS (Acid Detergent Solution)**

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

➤ **Préparation de l'échantillon**

Les mêmes sacs Daisy sont utilisés, l'appareil est rempli de 02 litres de la solution ADS. Ensuite, les sacs sont introduits dans l'appareil et portés à ébullition pendant 01 heure. L'appareil est alors vidangé et les sacs rincés 03 fois avec de l'eau distillée chaude pendant 10 minutes. Les sacs sont ensuite lavés à l'acétone et mis pour séchage jusqu'à poids constant dans une étuve réglée à 105°C.

1.4.4.3. Estimation de la fraction ADL (Acid Detergent Lignin)

La détermination de la lignine à partir du résidu ADF peut se faire par traitement avec de l'acide sulfurique concentré. Le résidu correspond, en plus des cendres, à la lignine brute. Les sacs récupérés, après analyse ADF, sont traités par l'acide sulfurique concentré à 72% pendant 03 heures. Les sacs sont rincés 03 fois avec de l'eau distillée chaude pendant 10 minutes. Ils sont ensuite lavés à l'acétone et mis pour séchage jusqu'à poids constant dans une étuve réglée à 105°C.

1.4.5. Dosage de l'extrait éthéré

Les matières grasses des aliments sont obtenues par extraction directe au moyen d'un solvant, puis élimination du solvant par distillation et dessiccation. La méthode Soxhlet utilisée est la méthode de référence utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les aliments solides déshydratés. C'est une méthode gravimétrique, puisqu'on pèse l'échantillon au début et la matière grasse à la fin de l'extraction.

L'aliment solide est pesé et placé dans une capsule de cellulose. L'échantillon est extrait en continu par de l'éther éthylique à ébullition (P.E. 35°C) qui dissout graduellement la matière grasse. Le solvant contenant la matière grasse retourne dans le ballon par déversements successifs causés par un effet de siphon dans le coude latéral. Comme seul le solvant peut s'évaporer de nouveau, la matière grasse s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète. Une fois l'extraction terminée, l'éther est évaporé, généralement sur un évaporateur rotatif, et la matière grasse est pesée. Les capsules de

cellulose sont perméables au solvant et à la matière grasse qui y est dissoute. Ces capsules sont à usage unique.

$$\% \text{ lipides} = \frac{M(\text{lipides})}{M(\text{échantillon})} \times 100$$

1.4.6. Analyse des tannins

La présence de facteurs antinutritionnels est mise en évidence quantitativement, selon les méthodes décrites par Terrill *et al.* (1992). Tous les échantillons employés pour l'extraction et l'analyse de tannins sont broyés avec un moulin à marteaux pourvu d'une maille de 1 mm.

1.4.6.1. Extraction des tannins condensés libres

La technique de dosage et d'extraction est déterminée selon le procédé de Terill *et al.* (1992).

➤ **Réactifs:**

-Solution acétone (70%)

-Acide ascorbique (0,1%)

-Solution éther diéthylique.

➤ **Procédé d'extraction :** le but est d'extraire les tannins condensés et libres présent dans les plantes fourragères qui diffusent dans la phase liquide. Pour chacune des espèces fourragères testées, des échantillons en double de 500 mg de matière sèche finement broyée sont pesés dans des tubes de centrifugation de 50 ml (Falcon, USA) à fermeture à vis. Ils sont extraits trois fois avec un mélange de 20 ml (7: 3 v l'acétone / eau) contenant 0,1% d'acide ascorbique et de 10 ml d'éther diéthylique (4,7: 2,0: 3,3 v acétone/eau/ éther diéthyle). Les tubes sont agités par un mélangeur vortex et centrifugés à 27000 g pendant 15 minutes, pour séparer les phases liquides et solides. Les surnageants sont combinés dans un ballon conique de 100 ml. A ce rapport de l'éther diéthylique à l'acétone et de l'eau, une séparation en deux phases a lieu avec une phase supérieure / éther diéthylique et de l'acétone combiné et une phase aqueuse inférieure. La phase supérieure est éliminée par aspiration et jetée. La phase aqueuse, contenant les tannins condensés subit une évaporation en Rota-vapeur à 40°C pour éliminer les traces de solvant, puis centrifugée à

27000 g pour éliminer les débris non-tannins. Le surnageant est porté à 100 ml volume total d'eau distillée et placé dans un récipient de stockage.

1.4.6.2. Extraction des tannins condensés liés aux protéines

- **Réactifs :** Solution de sodium dodecyl sulfate (SDS) (10g /l).
- **Procédé d'extraction :** Pour extraire les tannins liés aux protéines, 15 ml de solution SDS (10g/l) sont ajoutés au résidu solide de la première extraction. Les tubes sont agités par un mélangeur vortex et placés dans un bain-marie bouillant (100°C) pendant 45 min. Les tubes sont enlevés, refroidis à température ambiante et centrifugés à 27000 g pendant 15 min, et le surnageant est versé dans un autre tube de centrifugeuse de 50 ml. Ce processus est répété et les surnageants combinés et centrifugés à 27000 g pendant 15min pour enlever les débris non-tannins. Le surnageant est porté à 100ml de volume par la solution de SDS et placé dans un récipient de stockage.

1.4.6.3. Extraction des tanins condensés liés à la fibre

- **Réactifs:**
 - Solution méthanol (800ml/l)
 - n-butanol
- **Procédé d'extraction :** Le résidu de l'extraction de SDS est lavé et centrifugé avec deux fois 5ml de méthanol (800ml/l) et une fois avec du butanol, afin d'éliminer toute trace de SDS. L'analyse de ces résidus en tannins représente la fraction de tannins liés à la fibre de l'échantillon.

1.4.6.4. Analyse chimique

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

- **Réactifs**
 - n butanol (Biochem).
 - Acide chlorhydrique concentré (37-38%) HCl (Biochem).
 - Sulfate ferrique ammoniac FeNH₄ (SO₄) 2.12H₂O (Sigma).

-Standard: quebracho purifié.

➤ Préparation de solutions

-Solutions Butanol-HCl (95:5 v/v) : 950 ml du n-butanol sont mélangés avec 50 ml de HCl concentré (37-38%).

-Réactif Fer (2% de Sulfate Ferrique Ammoniaque en HCl 2N) : une solution HCl (2N) est d'abord préparée avec 16,6 ml de HCl concentré dans une fiole jaugée de 100 ml, puis elle est ajustée au trait de jauge. La solution est maintenue dans un flacon de verre foncé.

- Partie étalon: Préparation de la gamme standard Hagerman (1992)

➤ Réactif : Le solvant utilisé est une solution d'acétone à 70% (v/v).

➤ Préparation de la solution mère : 25 mg du quebracho purifié sont pesés dans une fiole jaugée de 25 ml (on note le poids précis) et complétés au trait de jauge avec le solvant. Afin de préparer la gamme étalon, des dilutions sont reprises à partir de cette solution mère (**Annexe 01**).

➤ **Partie essai**

➤ Dans des tubes libellés et pourvus de bouchon, 250 µl sont pipetés des extraits (tannins libres, lié aux protéines et liés à la fibre) chaque type d'extrait appart et 250 µl du solvant acétone, 70% sont ajoutés. Trois répétitions pour chaque tube sont réalisées.

➤ 3 ml du réactifs butanol-HCl et 0,1 ml de la solution Fer réactive sont ajoutés pour chaque tube. Les tubes sont ensuite fermés à l'aide de bouchons et ils sont agités vigoureusement.

➤ Les tubes sont réchauffés dans un bain d'eau en ébullition à 100°C pendant 60 min puis refroidis à l'abri de la lumière.

➤ Les absorbances respectives de ces solutions sont déterminées à 550 nm.

1.4.7. Etude de la Digestibilité selon Tilley and Terry

L'inoculum (Jus de rumen) est prélevé de quatre brebis adultes de race merinos, pesant environ 50 kg et munies de canules permanentes (60mm de diamètre). Les animaux sont nourris au foin de luzerne (167g CP, 502g NDF, 355g ADF and 71g ADL kg⁻¹ DM). Les rations sont distribuées en deux repas égaux par jour, à des horaires fixes. L'eau et les

vitamines sont disponibles *ad libitum*. La digestibilité *in vitro* de la matière sèche est déterminée selon la procédure ANKOMDAISY (Ammar *et al.*, 1999) et selon le protocole proposé par Tilley and Terry (1963). Un milieu de culture contenant les solutions macro et micro minérales est préparé selon les compositions décrites dans les tableaux (**Annexe 02**). La solution de résazurine et la solution tampon bicarbonate sont préparées selon la procédure décrite par Van Soest *et al.* (1966). Le milieu est maintenu à 39°C et saturée en CO₂. L'Oxygène du milieu est réduit par l'ajout d'une solution réductrice contenant de la cystéine-HCl et du Na₂S, selon la procédure décrite par Van Soest *et al.* (1966). Le mélange de couleur bleu est chauffé jusqu'à virage de la couleur vers le rose.

La solution est barbotée avec un flux continu de CO₂, ce qui entraîne la réduction de la salive artificielle, indiquée par le virage de la couleur du rose au transparent. A cette étape, le jus de rumen est ajouté dans le milieu dans la proportion (1V/4V). 400 mg de substrat sec sont pesés dans des sacs Daisy composés de fibres artificielles (taille de 5cm × 5cm, taille des pores de 20 μ). Quatre répétitions sont réalisées pour chaque substrat. Ces sacs sont ensuite thermo scellés avec un Heat sealer et placés dans des jarres d'incubation. Chaque jarre est un récipient étanche en verre de 5L de capacité.

La jarre est fermée avec un couvercle en plastique muni d'une vanne unique de manière à éviter l'accumulation des gaz de fermentation. Chaque jarre d'incubation est remplie avec 2 litres de jus de rumen tamponné. Les jarres sont ensuite placées à 39°C dans l'appareil (Ankom Daisy II digestion system, ANKOM Technology Corp., Fairport, NY, USA) qui permet une rotation continue afin de faciliter l'immersion effective des sacs Daisy dans la solution ruminale. Après 48h d'incubation, les sacs sont retirés des jarres et lavés à l'eau froide puis rincés abondamment avec de l'eau distillée. Ils sont ensuite soumis à une digestion pepsine-HCl (2g pepsine/1000ml HCl, 0,1N), selon la procédure décrite par Tilley et Terry (1963). Ils sont ensuite rincés à l'eau froide puis lavés à l'aide d'une machine à laver pendant 5min. Ils sont alors pesés après séchage dans une étuve à 100°C pendant 48h. Cette mesure permet de calculer la digestibilité apparente *in vitro* (AIVD), selon la méthode originale de Tilley et Terry (1963). La digestibilité apparente de la matière sèche organique des fourrages est déterminée selon la formule:

$$AIVD(\%) = 100 * \frac{(MSi - MSr) - MSb}{MSi}$$

Où :

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

1.4.8. Technique de production de gaz *in vitro*

1.4.8.1. Principe

La technique de production de gaz *in vitro* est une simulation de la dégradation des aliments par la microflore du rumen. A l'origine, elle a été développée par Menke *et al.*, (1979), dans des seringues de verre, remplacées au laboratoire par des seringues en plastique (Arhab, 2006). La technique a ensuite été modifiée par Menke et Steingass (1988). Theodoreau *et al.* (1994), par le remplacement des seringues par des flacons en verre. A la fin de la fermentation, le gaz est mesuré à l'aide d'un pression-mètre (Spec Scientific LTD., Scottsdale, AZ, USA) et une seringue graduée. C'est une technique simple et peu coûteuse, basée donc sur la mesure de la production de gaz (méthane et gaz carbonique), induit par la production des acides gras volatils (Blümmel et Orskov, 1993; Mould, 2003).

Dans notre étude, la fermentation est réalisée dans des flacons en verre (batch) de 120 ml de capacité (Theodoreau *et al.*, 1994). Ce type de système permet l'accumulation des gaz fermentaires dans l'atmosphère intérieure du flacon dont la pression est mesurée à différents intervalles de temps à l'aide d'un pression mètre. L'avantage majeur de l'utilisation de ce type de système réside dans la facilité qu'il présente pour la détermination de la digestibilité réelle.

1.4.8.2. Estimation de l'énergie métabolisable

L'équation proposée par Menke *et al.*, (1979) est utilisée pour le calcul de l'énergie métabolisable (EM) :

$$EM \text{ (MJ/kg MS)} = 2.20 + 0.136 \text{ GP} + 0.057 \text{ CP}$$

Avec GP est exprimée en ml et CP en g/kg MS

1.4.8.3. Analyse du méthane

La production de méthane est analysée par chromatographie en phase gazeuse (HP 5890 Hewlett Packard Series II gas chromatograph, Waldbronn, Germany). La température du four de l'injecteur est de 130°C, celle du four de la colonne est de 100°C et celle du détecteur FID est de 120°C. La colonne est une colonne capillaire de 25 mètres de longueur et de 0,2 mm de diamètre intérieur (polyethylene glycol column), remplie avec une phase stationnaire du type 60-80 mesh Carboxen 1000. Le volume injecté varie de 100 à 200 µl. Le gaz vecteur est l'hélium (Pression 100 kPa). Le mode d'élution se fait à débit constant. La concentration du gaz est déterminée par l'utilisation d'une courbe-étalon établie grâce à un gaz standard certifié (Alphagaz, N° 0735562.00). Après 24h d'incubation, les flacons sont placés dans un bain de glace afin d'interrompre la fermentation. Un système de seringues graduées munies d'une valve est utilisé d'une part pour permettre la mesure de la pression en millilitre et, d'autre part, pour permettre le prélèvement d'un échantillon de gaz en vue de son analyse chromatographique. Le volume du dioxyde de carbone est calculé par différence entre le gaz total enregistré et le volume du méthane produit.

1.4.9. Analyses statistiques

Une analyse de la variance (Steel et Torrie, 1980) est réalisée sur les données de la composition chimique, les fractions pariétales, les tannins condensés, les paramètres de fermentation *in vitro* et la digestibilité de Tilley et Terry, avec prise en compte de la saison de collecte comme source de variation pour les trois plantes fourragère étudiées. 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 ($P < 0,05$).

2. Effet de trois plantes médicinales sur la production de méthane *in vitro*

2.1. Introduction

Le méthane est un puissant gaz à effet de serre produit notamment dans le rumen du bétail pendant le processus normal de la digestion des aliments. D'un point de vue nutritionnel, le méthane (CH₄) est un sous-produit des fermentations des aliments ayant lieu dans le premier compartiment digestif, le rumen. Le méthane produit dans le rumen est relâché par le ruminant dans l'atmosphère par éructation (55 %), respiration (25 %) et flatulences (20 %). Cette élimination est une perte significative d'énergie pour le ruminant et

elle contribue largement à l'aggravation du problème général de l'effet de serre atmosphérique.

Le méthane de la fermentation ruminale peut être diminuée jusqu'à 25% avec des antibiotiques, en particulier les ionophores qui inhibent les espèces bactériennes productrices d'hydrogène et donc limitant l'alimentation des Archées méthanogènes en hydrogène. Cependant, l'utilisation d'ionophores comme additifs alimentaires a été interdite, ce qui impose la recherche d'autres alternatives à l'utilisation des antibiotiques dans l'alimentation des ruminants mais avec un potentiel de réduction de la production de méthane et plutôt de réorientation du processus fermentaire vers la production d'AGV's et d'autres métabolites énergétiquement valorisables par le ruminant.

Les plantes et leurs extraits avec des concentrations élevées de composés secondaires semblent être aussi des candidats potentiels pour réduire la méthanogénèse ruminale. A cet effet, plusieurs plantes ont été étudiés en tant que sources potentielles d'alimentation (Soliva *et al.*, 2008 ; Abdellah *et al.*, 2012). Des études avec ces plantes et leurs extraits bioactifs ont confirmé un impact sur le modèle de fermentation ruminal et donc leur aptitude à modifier la méthanogénèse (Bodas *et al.*, 2008; García-González *et al.*, 2008; Rira *et al.*, 2015).

Dans ce contexte, notre travail a pour objectif de faire un screening de trois plantes médicinales, connues par leur richesse en composés secondaire ayant un effet toxique avéré sur différents types de microorganismes.

Tableau 07: Caractéristiques botaniques et phénotypiques de plantes médicinales médicinales étudiées

Nom Latin	Nom Arabe	Caractéristiques
<i>Nigella sativa</i>	Sinouj, Sanouz, Shunez, Habbah sauda	La graine de nigelle, originaire d'Asie occidentale, est une plante herbacée, annuelle, à tige dressée, côtelée, anguleuse et rameuse d'une soixantaine de centimètres de hauteur, portant des feuilles inférieurs pétiolées et des feuilles supérieurs sessiles. Les pétales des fleurs sont petits, blanches et mêlées de bleu. Les pétales sont au nombre de cinq et présentent une tache verte au sommet. Le fruit est une capsule largement ovoïde et couverte de tubercules granuleux. Il est formé de 3 à 6 carpelles soudées entre elles et renferment des graines noires triangulaires et ridées transversalement (Benhaddou-Andaloussi, 2009).
<i>Rosmarinus Officinalis L.</i>	Iklil Aljabal	Le romarin est un arbrisseau de la famille des labiées, peut atteindre jusqu'à 1,5 mètre de hauteur, il est facilement reconnaissable en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétiole, coriaces beaucoup plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous. La floraison commence dès le mois de février (ou janvier parfois) et se poursuit jusqu'au avril – mai. La couleur des fleurs varie du bleu pâle au violet (on trouve plus rarement la variété à fleurs blanches <i>Rosmarinus officinalisalbiflorus</i>). Le calice velu à dents bordées de blanc, elles portent deux étamines ayant une petite dent vers leur base. Comme pour la plupart des Lamiacées, le fruit est un tetrakène (Tormal <i>et al.</i> , 2014)
<i>Zingiber Officinale</i>	Skenjbîr Zanjabîl	Le gingembre est une plante vivace tropicale herbacée, à port de roseau, qui mesure jusqu'à 3 m de haut (Faivre <i>et al.</i> , 2006). La partie souterraine utilisée est le rhizome, celui-ci se divise dans un seul plan et il est constitué de tubercules globuleux ramifiés (Gigon, 2012). Le rhizome est noueux et parfumé, peau beige pâle, chair jaune pâle juteuse et parfumée. Il devient de plus en plus fibreux avec l'âge, couvert de feuilles écailleuses et pourvu à sa partie inférieure de racines cylindriques. Ses feuilles sont persistantes bisériées, longues, étroites, lancéolées, pointues et longues de 20 cm. Elle possède deux sortes de tiges : tiges hautes stériles servant à l'assimilation chlorophyllienne et des tiges plus courtes (20 cm environ) portant des fleurs irrégulières en épi (Krim, 2014).



Nigella sativa (Site internet N° 2)



Rosmarinus Officinalis L. (Site internet N° 3)



Zingiber Officinale (Site internet N° 4)

Figure13: Description phénotypique de plantes médicinales étudiées

2.2. Le matériel végétal

Trois plantes médicinales font l'objet de notre étude. La nigelle, de son nom scientifique *Nigella sativa*, ou cumin noir est une plante annuelle de la famille des *Renonculacées*, elle est originaire du sud-ouest de l'Asie. Les graines sont utilisées comme remède traditionnel ou comme épice dans de nombreux pays du monde (particulièrement dans le monde musulman). Le romarin du nom scientifique *Rosmarinus Officinalis* est utilisé pour le traitement et la prévention de nombreuses maladies. Il recèle de nombreux composés organiques dont les rôles sont très diversifiés. Entre autres, il contient différentes essences dont le pinène, le camphène et le bornéol. La troisième plante est le gingembre, nom scientifique *Zingiber Officinale*, d'origine asiatique, le gingembre est connu depuis l'antiquité pour son rhizome aromatique aux mille vertus, aussi bien condimentaires que thérapeutiques.

Les trois plantes étudiées sont prélevées auprès des herboristes dans la wilaya de M'sila, séchées puis broyées avec un broyeur à marteaux puis passées par un tamis de 1mm de diamètre. Les plantes broyées sont stockées à l'abri de la lumière dans des bouteilles en plastiques.

Les plantes médicinales étudiées ainsi que le milieu de base formulé font l'objet d'analyses chimiques de leur composition pariétale, en utilisant les méthodes classiques de l'AOAC. La matière organique (la méthode ID 942.05), l'azote total par l'appareil de Kjeldhal (méthode ID 984.13) et la détermination des composés de la paroi végétale est réalisée selon le procédé décrit par Van Soest *et al*, (1991).

2.3. Inoculum

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

2.4. Fermentation *in vitro*

Les effets des échantillons de plantes étudiés ont été examinés *in vitro* en utilisant des cultures mixtes de microorganismes du rumen. Le substrat de base utilisé pour les cultures en discontinu est un mélange de foin de luzerne (500g/ g), du foin (400g/kg) et le grain d'orge (100g/kg) qui a été broyé pour passer un tamis de 1mm. La teneur en matière organique, NDF et les protéines brutes étaient 921, 450 et 133 g / kg de matière sèche (MS), respectivement.

Les incubations ont été réalisées dans des flacons en verre (batch) de 120 ml de capacité dans lesquelles 500mg de matière sèche de substrat de base et 50 mg de chaque plante ont été pesé. Ensuite, chaque flacon reçoit 50ml du liquide ruminal dilué (10ml du jus de rumen et 40ml de salive artificielle, préparée selon Menke et Steingas (1988). Les flacons sont ensuite fermés avec des bouchons en butyl, puis sertis avec une capsule en aluminium. Les flacons sont secoués et placés dans l'incubateur à 39°C. Les bouteilles sont ensuite laissées dans une étuve à 39°C pendant 24h. Les incubations sont réalisées en trois séries en employant trois jus de rumen différents. Chaque jus de rumen provient de deux animaux. Chaque série est réalisée en deux répétitions (deux flacons/substrat/jus de rumen). Soit 6 répétitions pour chaque échantillon. Afin de faire les corrections nécessaires, des flacons témoins (control négatif) sont aussi incubés. Pour cela, six flacons ne contenant que l'inoculum liquide du rumen sont incubés pour être utilisés pour déterminer la production de gaz en l'absence de substrat et l'utiliser en compensation des flacons contenant le substrat étudié ainsi que six flacons contenant 50 mg d'un antibiotique Monensin connu pour son effet de réduction sur le méthane (MON ; M5273 Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, MO, USA) comme control positif .

Après 24h d'incubation, les flacons sont placés dans un bain marie réglé à 39°C pour mesurer la pression de gaz (Theodorou *et al.*, 1994) à l'aide d'un Pression-mètre (**Figure. 14**) muni d'une sonde (Delta Ohm DTP704-2BGI, Herter Instruments SL, Barcelona). Un système de seringues graduées munies d'une valve est utilisé d'une part pour permettre la mesure de la pression en millilitre et, d'autre part, pour permettre le prélèvement d'un échantillon de gaz en vue de son analyse chromatographique pour déterminer le volume de méthane produit.

Par la suite, les bouteilles sont placées dans un bain à glace afin d'interrompre la fermentation et sont ouverts pour mesurer le pH de leur contenu à l'aide d'un pH-mètre (pH mètre HI 4521-02). Après refroidissement et dans des tubes Ependorff de 2 ml, préalablement

libellées, 0,5ml de la solution étalon interne et 0,8ml de la solution de jus de rumen sont introduits et conservés dans le congélateur pour le dosage ultérieur des AGV.

A la fin des incubations, les contenus des flacons sont filtrés sous vide en creusets de verre fritté, préalablement tarés puis séchés à 105°C pendant 48 heures, afin d'estimer le potentiel de disparition de la matière sèche.



Figure 14 : Pression mètre

2.5. Dosage et calculs

2.5.1. Acides Gras Volatils

Les acides gras volatils détectés sont l'acide acétique (C_2), l'acide propionique (C_3) et l'acide butyrique (C_4). Ils sont dosés par chromatographie en phase gazeuse. Les échantillons sont d'abord décongelés et subissent une première centrifugation de 15min à 4000 tr/min afin d'éliminer les éléments grossiers de l'échantillon. Ensuite, 1ml du surnageant obtenu est mélangé à 200 μ l d'acide métaphosphorique pour le déprotéiner. Une deuxième centrifugation de 15min est réalisée à 20000g, (élimination des particules fines : mitochondries, lysosomes, ...). Enfin, 100 μ l de ce surnageant sont dilués dans 900 μ l d'eau distillée et mélangés à 75 μ l de solution étalon (témoin de passage).

La composition et les concentrations des acides gras volatils, présents dans le jus de rumen sont déterminés par chromatographie en phase gaz de type gaz-liquide, muni d'un injecteur automatique (SHIMADZU AOC-20I), Jouany (1982). Le type du détecteur est à ionisation de flamme (FID). Contrairement au TCD (détecteur à conductibilité thermique) où on emploie un seul gaz (gaz vecteur), le détecteur FID exige l'utilisation de trois gaz. Un gaz vecteur (phase mobile), généralement l'azote ou l'hélium, un gaz carburant (l'hydrogène) et un

gaz comburant (air). La spécificité du FID est que l'échantillon brûle dans une flamme. Pour cela, l'échantillon doit être obligatoirement organique. Les AGV sont séparés selon leur coefficient de partage entre la phase mobile et la phase stationnaire. La méthode de dosage choisie est celle de l'étalon interne (Harvey, 2005). Cette technique exige l'introduction d'une certaine quantité de l'étalon interne à la fois à la partie étalon et à la partie essai. De ce fait, cette méthode donne des résultats beaucoup plus fiables que la méthode de l'étalon externe qui requiert seulement deux surfaces (surface étalon et surface de l'échantillon). En effet, avec la méthode de l'étalon interne, on utilise pour le calcul des concentrations des AGV quatre surfaces : surface de l'étalon interne (dans la partie étalon), surface du standard dans la partie étalon), surface de l'étalon interne (dans la partie essai), surface de l'échantillon. L'étalon interne utilisé est l'acide crotonique (**Annexe 03**).

2.5.2. Analyse du méthane

La production de méthane est analysée par chromatographie en phase gaz (SHUMADZU GC-14B) selon la technique de Van Nevel *et al*, (1970). La température du four de l'injecteur est de 130°C, celle du four de la colonne est de 100°C et celle du détecteur FID est de 120°C. La colonne est une colonne capillaire de 23 mètres de longueur et de 2,1 mm de diamètre intérieur (stainless steel column), remplie d'une phase stationnaire du type 60-80 mesh carboxen 1000. Le volume injecté varie de 100 à 200 µl. Le gaz vecteur est l'hélium (Pression 100 kPa). Le mode d'élution se fait à débit constant. La concentration du gaz est déterminée par utilisation d'une courbe étalon, établie grâce à un gaz standard certifié (Alphagaz, N° 0735562.00).

2.5.3. Dosage de l'azote ammoniacal

L'azote ammoniacal est dosé par colorimétrie, selon la méthode décrite par Weatherburn (Weatherburn, 1967) basée sur la réaction de Berthelot. L'ion ammonium (NH_3) se fixe en position para sur une molécule de salicylate de sodium, en présence du chlore en milieu alcalin ($10,5 < \text{pH} < 12,5$). La réaction est catalysée par le nitroprussiate de sodium. Il se forme alors une coloration bleue en présence d'une molécule para-aminée et d'une molécule de salicylate de sodium. Le complexe formé, de type indophénol, est mesuré par spectrophotométrie à 660 nm.

2.6. Analyse statistique

La Comparaison des différents paramètres mesurés dans le test de dépistage est établie par le test t de Student (Steel et Torrie, 1980) entre la valeur moyenne des six bouteilles contenant des espèces végétales et la valeur moyenne des bouteilles témoins incubées dans le même lot. Les effets de chaque additif végétal sur un paramètre de fermentation (par exemple, à partir de la différence témoin) est l'augmentation relative (positive) ou une diminution (négatif) par rapport à la valeur moyenne des témoins utilisés dans la même série d'incubation.

Troisième Partie

Résultats

Et

Discussion

1. Effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive

1.1. Effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive, la production de méthane et la teneur en tannins condensés de l’*Atriplex canescens*

1.1.1. La composition chimique et les tannins condensés

Tableau 8 : Composition chimiques (g/kg MS) d’*Atriplex canescens* collecté sur trois saisons

Nutriments	Saisons de collecte				SEM	Signification
	Hiver	Printemps	Eté			
PB	200,89 ^a	167,68 ^b	171,08 ^b	5,553	***	
NDF	400,75 ^a	352,49 ^b	282,19 ^c	18,01	***	
ADF	172,70 ^a	152,17 ^a	101,19 ^b	11,28	***	
ADL	64,06 ^a	63,75 ^a	47,05 ^b	2,834	***	
Hémi	228,05 ^a	229,28 ^a	181,00 ^b	11,01	***	
MM	197,3 ^c	243,8 ^a	212,00 ^b	6,859	***	
EE	12,65 ^c	12,18 ^a	12,42 ^b	0,589	***	
TCL	12,56	12,18	12,42	0,119	NS	
TCLP	2,14 ^{ab}	4,69 ^a	1,71 ^b	0,625	***	
TCLF	20,46 ^a	12,23 ^b	12,91 ^b	1,669	***	
TCT	35,16 ^a	29,10 ^b	27,04 ^b	1,511	***	

ADF: Acid Detergent Fibre; **ADL:** Acid Detergent Lignin; **EE :** Extrait Ethéré ; **Hémi:** Hemicellulose; **MM :** Matière Minérale ; **PB :** Protéines Brutes; **NDF:** Neutral Detergent Fibre; **NS :** Non Significative ; **SEM:** Erreur Standard des Moyennes ; **TCL :** Tannins Condensés Libres ; **TCLP :** Tannins Condensés Liés à la Protéine ; **TCLF :** Tannins Condensé Liés à la Fibre ; **TCT :** Tannins Condensés Totaux.

a, b, c, moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distincts (P < 0,05).

La composition chimique globale, dont les tannins condensés, de *Atriplex canescens* (ATCA) sont présentés dans le **tableau 8**. Comme attendu, il y a des différences significatives

($P < 0,05$) entre les trois saisons de croissance dans tous les composants chimiques de l'ACTA, sauf en tannins condensés libres. Le contenu en PB est plus faible ($P < 0,05$) au printemps (167,68 g / kg MS) et en été (171,08 g / kg MS), comparativement à sa valeur en hiver (200,89 g / kg MS). L'ATCA a des teneurs plus élevées ($P < 0,05$) en NDF, ADF, ADL et HCL en hiver et au printemps, par rapport aux valeurs obtenues pour l'été. Pour toutes les saisons, les tannins condensés et le contenu en EE sont généralement faibles, alors que la teneur en cendres est extrêmement élevée ($P < 0,05$), avec (243,8 g / kg MS) à la fois au printemps et (197,3 g / kg MS) en hiver.

La réduction de la teneur en PB de l'ACTA en été, par rapport à l'hiver, est compatible avec d'autres études. Par exemple, le niveau de PB, EE et de l'ENF diminue tandis que CF le contenu en cendres et la MS augmente de la saison des pluies à la saison sèche (El Shaer, 2010). Toutefois, le contenu en PB de l'ACTA restent relativement élevés (171,08 g / kg MS) en été, ce qui suggère la possibilité que l'ACTA peut être utilisé comme fourrage de saison sèche et / ou comme aliments complémentaire aux régimes de faible valeur nutritive. En plus, les valeurs de la teneur en PB obtenues restent supérieures au minimum en PB aux 7% nécessaires aux ruminants, requis pour fournir l'ammoniac de croissance des microorganismes du rumen. Selon les travaux de Paterson *et al.*, (1996), les fourrages aux teneurs en matière azotée inférieures à 70 mg/g de MS exigent une supplémentation azotée pour améliorer leur ingestion par les ruminants. Norton *et al.*, (2003) notent que ce type de fourrage ne peut pas fournir les minima d'azote nécessaires au microbiote ruminal pour assurer une activité métabolique maximum. D'après Cabiddu *et al.*, (2000), la plupart des plantes arbustives fourragères du pourtour méditerranéen ont une faible valeur nutritive, à cause, entre autre, d'une teneur faible en PB.

Les contenus en PB obtenus dans la présente étude sont comparables à ceux de Van Niekerk *et al.* (2009) qui ont observé que le taux de PB variaient de 187 g / kg MS à 206 g / kg MS en ATCA, avec des prélèvements sur deux régions différentes. Cependant, Mellado *et al.*, (2012) ont rapporté des valeurs de 141, 172 et 146 g / kg / MS, respectivement pour le printemps, l'été et l'automne. L'augmentation des niveaux de PB mesurés pendant l'hiver est probablement due à l'augmentation des niveaux d'humidité du sol, suite aux petites pluies enregistrées durant cette saison (Johnson *et al.*, 1998).

La diminution marquée de l'ADF, NDF, ADL et HCL de l'hiver à l'été peut être expliquée par l'évolution dans le stade de maturité de l'ACTA, où la floraison se produit

généralement entre Mai et Septembre. Cette période peut varier, cependant, avec le génotype et l'emplacement (Hamilton et Hamilton, 2003). Le niveau élevé de la teneur en fibres dans l'ACTA pourrait être expliqué en partie par les conditions environnementales dans la région de Bousaada, où des températures élevées et de faibles précipitations ont tendance à augmenter la fraction de la paroi cellulaire et de diminuer la teneur soluble des plantes (Pascual *et al.*, 2000). Nos valeurs sont similaires à celles d'autres plantes fourragères (Salem *et al.*, 2000; Boufennara *et al.*, 2012; Bouazza *et al.*, 2012), avec quelques différences entre toutes les études, certainement engendrées par les différentes proportions de feuillage et de tiges dans les échantillons et les différentes étapes phénologiques des plantes lors de l'échantillonnage. La teneur en paroi cellulaire dans les arbustes fourragers est négativement corrélée à l'appétence, à la consommation volontaire de la matière sèche et à sa digestibilité potentiel (Kaito *et al.*, 1998; Larbi *et al.*, 1998).

Les tannins condensés dans les fourrages jouent un rôle important mais dépendant de leur quantité. D'une part, en faible quantité (2-3% de MS) ils peuvent avoir un effet bénéfique puisque leur niveau dans les régimes empêche la dégradation extensive des protéines par la formation de complexes protéine-tannins (Barry, 1987). D'autre part, un niveau élevé de tannins (5% de la MS) dans l'alimentation des ruminants peut entraîner l'indigestion des protéines en raison de la formation excessive de complexes tannins-protéines (Kumar et Singh, 1984; Kaplan *et al.*, 2014).

Comme le montre le **tableau 8**, les tannins condensés enregistrés durant les trois saisons de collecte sont d'une faible ampleur. Par conséquent, peu de tannins condensés dans l'ATCA semblent avoir un potentiel d'effet bénéfique lorsqu'ils sont inclus dans l'alimentation des ruminants car ils peuvent augmenter le taux de protéines brutes qui échappent à la dégradation dans le rumen sans pour autant diminuer la digestibilité des plantes fourragères. En outre, le manque de techniques de laboratoire précises et fiables et des composés à utiliser comme normes pour la réalisation des courbes d'étalonnage pour le dosage des différents tannins, sont des difficultés majeures dans leur analyse, des tannins condensés en particulier. En effet, les méthodes colorimétriques doivent être utilisées avec prudence lors des dosages quantitatifs. Les différences entre nos valeurs de tanins et celles rapportées dans la littérature (Boufennara *et al.*, 2012; Bouazza *et al.*, 2012) pourraient être dues à la nature des tests utilisés, à la nature diverse des tannins dans les différentes espèces fourragères, aux normes

utilisées pour la quantification, au stade de croissance de la plante et à l'influence des conditions pédologiques et climatiques (Rubanza *et al.*, 2005).

Le **tableau 9** indique que la saison de collecte a un effet significatif sur la production de gaz, la production de méthane, l'IVD.TT et la ME. La production de gaz et le méthane à 24 heures d'incubation varient de 47 à 67,66 ml et de 4,67 à 8,70 ml, respectivement et diminuent de façon significative ($P < 0,05$) au printemps. Le IVD.TT et la ME d'ATCA varient de 73,05 et de 79,34% et 9,65 et 12,38 MJ / kg MS, respectivement. La baisse marquée de la production de gaz, la production de méthane, la ME et l'IVD-TT au printemps sont étroitement associées à une augmentation des teneurs en fractions cellulaires moins digestibles (NDF et ADF) mais aussi à une diminution remarquable en PB de l'ACTA. La production de gaz après 24 heures d'incubation est plus élevée en été et en hiver ($p < 0,05$), par rapport au printemps et en accord avec la concentration en parois cellulaires. En effet, la production de gaz est étroitement associée à la quantité de substrat fermentescible dans les régimes alimentaires. Conformément à notre résultat, Haddi *et al.*, (2003) ont rapporté des différences significatives dans la PG à 24h entre les cinq arbustes halophytes, y compris *Atriplex halimus*, *Salsola vermiculata* et *Sueada mollis*.

Tableau 9: Les paramètres de fermentation d'*Atriplex canescens* PG 24H (ml/g) le méthane (ml/g) IVD-TT (%) et EM (MJ/kg MS)

Paramètres de fermentation	Saisons de collecte				
	Hiver	Printemps	Eté	SEM	Signification
PG24h (ml/g)	60,50 ^a	47,00 ^b	67,66 ^a	6,336	***
CH ₄ 24h (ml/g)	8,70 ^a	4,67 ^b	7,94 ^a	0,6631	***
IVD-TT (%)	73,05 ^b	74,05 ^b	79,34 ^a	0,9246	***
EM (MJ/kg MS)	11,58 ^a	9,65 ^b	12,38 ^a	0,4643	***

a, b, c Row means with common superscripts do not differ ($P < 0,05$); **E.S.M:** erreur standard moyenne; **PG24:** la production de gaz 24 heure (ml/g), **CH₄:** la production de méthane à 24 heure (ml/g), **IVD-TT:** la digestibilité *in vitro* de Tilley et Terry (%), **EM:** énergie métabolisable (MJ/kg MS).

a, b, c, moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distincts ($P < 0,05$).

1.1.2. Fermentation et production de méthane *in vitro*

Le méthane est l'un des gaz à effet de serre les plus puissants et il contribue de manière significative à la pollution de l'environnement. L'élevage contribue à environ 20% (microbiote ruminal et fermentation des déchets d'origine animale). Selon Lopez *et al.*, (2010), le potentiel de réduction du méthane de tout aliment peut être estimé à partir du pourcentage de méthane dans la production de gaz *in vitro* et les aliments peuvent être divisés en trois groupes : à faible potentiel (% de méthane dans le gaz entre $> 11\%$ et $\leq 14\%$), à potentiel modéré (% de méthane dans le gaz entre $> 6\%$ et $< 11\%$), à fort potentiel (% de méthane dans le gaz entre $> 0\%$ et $< 6\%$) (Kaplan *et al.*, 2014). Par conséquent, l'ATCA a un faible potentiel de réduction du méthane puisque son pourcentage pour les trois saisons de collecte est estimé entre 11 et 14%. Les différences entre l'ATCA durant les trois saisons reflètent les différences observées dans les concentrations ADF, NDF, HCL et ADL. Elles pourraient également se rapporter à des différences dans les concentrations des composés secondaires tels que des tannins dans le fourrage (Nsahlai *et al.*, 1994; Ventura *et al.*, 2004), ainsi que des différences dans la configuration des polysaccharides de la paroi cellulaire.

1.2. Effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive, la production de méthane et la teneur en tannins condensés d'*Astragalus gombo*

1.2.1. La composition chimique et les tannins condensés

Tableau 10 : Composition chimiques (g/kg MS) d'*Astragalus gombo* collecté sur trois saisons

La composition chimique et les teneurs en tanins condensés d'*Astragalus gombo* (ASGO), collecté sur trois saisons, sont présentés dans le **tableau 10**. On y observe des variations significatives ($p < 0,05$) entre les trois saisons de collecte dans tous les composants chimiques d'ASGO, sauf en tannins condensés liés aux protéines (TCLP). La plante étudiée présente des valeurs de PB très variables. Le taux le plus faible de PB est noté chez ASGO collecté durant l'été avec une valeur de 165, 52 g/kg MS, alors que la valeur la plus élevée est enregistrée chez ASGO prélevé en hiver (284,70 g/kg MS). Beaucoup de fourrages méditerranéens ont une faible valeur nutritive et ne jouent pas habituellement un rôle important en production animale pour cette raison mais aussi pour d'autres facteurs, comme la teneur basse en PB (protéines brutes totales) de quelques espèces arbustives (Cabiddu *et al.*,

2000). La teneur en PB des fourrages est plus élevée que le niveau minimum de 7-8% MS requis pour un fonctionnement normal du rumen et une alimentation considérés convenable des ruminants (Van Soest, 1994).

Saisons de collecte					
Nutriments	Hiver	Printemps	Été	SEM	Signification
PB	284,70 ^a	206,99 ^b	165,52 ^c	6,643	***
NDF	435,87 ^{ab}	456,32 ^a	414,64 ^b	15,25	***
ADF	303,08 ^a	306,20 ^a	263,33 ^b	12,15	***
ADL	131,29 ^a	48,67 ^c	64,73 ^b	2,565	***
Hémi	132,78 ^b	150,21 ^a	151,30 ^a	8,15	***
MM	200,88 ^a	100,32 ^b	140,47 ^b	5,175	***
EE	9,31 ^c	18,54 ^b	24,70 ^a	0,456	***
TCL	13,91 ^a	12,50 ^b	12,68 ^b	0,125	***
TCLP	1,60	1,49	1,55	0,130	NS
TCLF	8,46 ^a	5,01 ^b	3,87 ^c	0,185	***
TCT	24,20 ^a	19,01 ^b	18,63 ^b	0,982	***

ADF: Acid Detergent Fibre; **ADL**: Acid Detergent Lignin; **EE** : Extrait Ethéré ; **Hémi**: Hemicellulose; **MM** : Matière Minérale ; **PB** : Protéines Brutes; **NDF**: Neutral Detergent Fibre; **NS** : Non Significative ; **SEM**: Erreur Standard des Moyennes ; **TCL** : Tannins Condensés Libres ; **TCLP** : Tannins Condensés Liés à la Protéine ; **TCLF** : Tannins Condensé Liés à la Fibre ; **TCT** : Tannins Condensés Totaux.

a, b, c, moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distincts (P < 0,05).

Le faible contenu en PB dans ASGO prélevé l'été peut résulter des proportions élevées de feuilles mûres dans l'échantillon. En effet, les fourrages légumineux et les arbustes sont employés pendant des années comme aliments pour le bétail dans beaucoup de régions du monde, principalement en raison de leur haute teneur en valeur protéique (Tolera *et al.*,

1997; Ammar *et al.*, 2004). Cette caractéristique peut être attribuée à la faculté de ces fourrages à fixer l'azote atmosphérique grâce aux apports des *Rhizobia* associés à leurs nodosités.

Cependant, une grande différence en PB a été notée entre les trois fractions d'ASGO étudiées, probablement dues aux différences dans l'accumulation de l'azote durant les stades de croissance car la récolte a été réalisée sur trois saisons complètement différentes. Ceci dit et compte tenu du contenu élevé en PB, l'utilisation de cette légumineuse est indiquée comme supplément protéique aux fourrages de mauvaise qualité et aux sous-produits fibreux. Mais cette proposition devrait être envisagée avec précaution car la digestibilité de l'azote est dépendante des composés phénoliques et en particuliers, les tannins. (Tolera *et al.*, 1997).

Toutefois, la teneur élevée en PB de certains fourrages doit être considérée avec précaution car elle peut se révéler en paramètre trompeur, du fait que toutes les protéines sont en principe dégradées mais les facteurs anti-nutritifs peuvent réduire leur disponibilité en dessous de la concentration nécessaire. Par conséquent, la teneur en matière azotée ne devrait pas être le seul critère pour juger des caractéristiques d'une plante fourragère. En effet, des résultats obtenus par quelques auteurs (Waghorn *et al.*, 1994; Arhab, 2006) indiquent que la réactivité, la structure, le poids moléculaire des végétaux et les interactions de leurs différents métabolites secondaires sont plus importants que les niveaux contenus dans la détermination de l'aptitude d'une espèce végétale donnée comme complément protéique (Boufennara *et al.*, 2012).

Globalement, la composition de la fraction pariétale de l'ASGO sur les trois saisons présente une composition très différente ($P < 0,05$). La fraction qui représente la paroi totale (cellulose + hémicellulose + lignine) NDF varie entre 414,64 et 456,32 g/Kg MS. La teneur la plus élevée est notée pour l'ASGO collecté pendant l'hiver et la plus faible pour l'été. Ces teneurs sont comparables aux valeurs de la fraction pariétale rapportées par Larbi *et al.*, (1998) pour des fourrages tropicaux (542 g/kg MS), par Ammar *et al.* (2005) pour des fourrages méditerranéens (383-572 g/kg MS), par Gasmi-Boubaker *et al.* (2005) pour des fourrages tunisiens collectés des zones arides (360-551 g/kg MS) et Salem *et al.* (2006) pour des fourrages autochtones des zones arides égyptiennes (368-651 g/kg MS). Cependant, ces mêmes valeurs sont inférieures à celles de plusieurs auteurs (Bahman *et al.*, 1997; Genin *et al.*, 2004), elles restent approximativement identiques aux mesures de Pascual *et al.* (2000).

Les différences observées dans nos échantillons pourraient s'expliquer par les conditions environnementales régnant dans la région d'étude : haute température et faibles précipitations. En effet, Pascual *et al.*, (2000) indiquent que les mêmes paramètres tendent à augmenter la fraction pariétale (NDF) et à diminuer le contenu soluble des végétaux.

La teneur en MM de l'ASGO présente une variation significative en fonction de la période de récolte. La plus faible teneur est observée au printemps et en été, avec des fourchettes allant de 100,32 à 200,88 (g/kg MS). Selon Spear (1994). La concentration des éléments minéraux dans les plantes varie aussi fortement avec le type de sol, le climat, le stade de maturité et la saison de récolte. En plus de ces facteurs et dans notre cas, l'éventuelle contamination des parties aériennes par la silice peut aussi expliquer ces taux élevés de MM (Boufennara, 2012). De plus, le développement du système racinaire est considéré comme un des facteurs déterminants de la variation intra et interspécifique de la tolérance à la sécheresse et par conséquent de la variabilité des teneurs en MM (Dione, 1991 ; Traore, 1998). En effet, des espèces, comme ASGO, possèdent un système racinaire très ramifié permettant un plus grand contact avec le sol et par conséquent une plus grande surface d'échanges. La perte des feuilles pendant la saison sèche est également un facteur d'une meilleure adaptation aux conditions difficiles de sécheresse (Traore, 1998).

Cette étude montre également que les teneurs en tannins varient en fonction de la saison de récolte ($P < 0,05$). De faibles teneurs en tannins condensés totaux sont enregistrées avec de faibles variations d'une saison à l'autre. Globalement, les tannins varient de 19,01 à 24,20 (g/kg MS). Ces différences en concentration peuvent être attribuées à la saison de collecte (Makkar *et al.*, 2007). Les variations saisonnières en polyphénols, d'une manière générale, suivent des modèles différents pour chaque espèce végétale (Hagerman, 1992). Vaithyanathan et Singh (1989) rapportent que les feuilles de diverses espèces d'arbres répondent différemment aux variations saisonnières, de par leur teneur en tannins. Certaines espèces montrent une augmentation de la teneur en tannins en été et d'autres en hiver.

Le stress hydrique induit des augmentations de teneur en tannins condensés (Anuraga *et al.*, 1993) mais la répartition entre les tannins libres et liés ou non aux protéines dépend du stress subi durant la croissance de la plante (Iason *et al.*, 1995). Il existe aussi une relation positive entre l'intensité lumineuse et la quantité de polyphénols produits par une plante (Mole et Waterman 1987). Lees *et al.*, (1994) observent une augmentation de la teneur en

tannins condensés dans le Lotier pédonculé Cav. (*Lotus uliginosus*) quand la température est de 30°C, comparée à 20°C, alors qu'il n'en est pas de même pour le *Lotier corniculé*.

Les variations entre les différentes fractions des tannins peuvent être liées non seulement aux saisons de collecte elles mêmes mais aussi à la méthode d'analyse. Avec des plantes riches en tannins, une difficulté majeure est le manque de techniques de laboratoire précises pour leurs dosages (Palmer et Mc Sweeney, 2000). Les méthodes colorimétriques doivent être utilisées avec prudence, car elles ne donnent pas un dosage quantitatif précis. Les différences entre les valeurs observées et celles de la littérature, concernant les concentrations en tannins, pourraient résulter de la nature des tests utilisés, de la nature des tannins dosés dans les différentes espèces fourragères, du stade de croissance mais également de l'influence des facteurs édaphiques et climatiques (Rubanza *et al.*, 2005).

1.2.2. Fermentation et Production de méthane *in vitro*

Tableau 11: Paramètres de fermentation d'*Astragalus gombo* PG 24h (ml/g) le méthane (ml/g) IVD-TT (%) et EM (MJ/kg MS)

Paramètres de fermentation	Saisons de collecte				
	Hiver	Printemps	Eté	SEM	Signification
PG24h (ml/g)	68,50 ^a	50,83 ^b	70,33 ^a	5.263	***
CH₄ 24h (ml/g)	9,70 ^a	5.68 ^b	8.65 ^a	0,785	***
IVD-TT (%)	67,24 ^a	60,88 ^b	60,43 ^b	1,256	***
EM (MJ/kg MS)	12,70 ^a	8,90 ^b	13,45 ^a	0,350	***

a, b, c Row means with common superscripts do not differ ($P < 0.05$); **E.S.M:** erreur standard moyenne; **PG24:** la production de gaz 24 heure (ml/g), **CH₄:** la production de méthane à 24 heure (ml/g), **IVD-TT:** la digestibilité *in vitro* de Tilley et Terry (%), **EM:** énergie métabolisable (MJ/kg MS).

a, b, c, moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distincts ($P < 0,05$).

Comme le montre le **tableau 11**, la saison de collecte a un effet significatif sur la production de gaz, la production de méthane, la digestibilité IVD.TT et EM. L'ASGO prélevé

durant l'hiver et l'été est le plus producteur de gaz, avec 68,50 et 70,33 ml/g MS respectivement. Il est suivi de l'ASGO du printemps avec 50,83 ml/kg MS. Il faut rappeler que la méthode de production de gaz *in vitro* de Menke *et al.*, (1979) est aujourd'hui largement utilisée pour estimer la digestibilité et l'énergie métabolisable des aliments pour les ruminants (Getachew *et al.*, 2004). Nos valeurs sont globalement inférieures à celles rapportées par Bouazza (2014) pour *Vicia faba* (200,6 ml/kg MS) mais comparables à celles de *Acacia Albida* (71,7ml/kg MS) rapportées par le même auteur. Les faibles valeurs de digestibilité d'ASGO ont été enregistrées durant l'été et le printemps (60,43 et 60,88 %) respectivement et une valeur de 67,24 % a été notée pour l'hiver. Nos résultats pourraient s'expliquer par la variation des composants chimiques des substrats, résultant essentiellement des variations climatiques.

1.3. Effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive, la production de méthane et la teneur en tannins condensés de *Calobota saharae*

1.3.1. Composition chimique et tannins condensés

Les changements dans la composition chimique de *Calobota saharae* (CASH) à différentes saisons de récolte sont présentés dans le **tableau 12**. Il y a des différences significatives ($p < 0,05$) entre les trois saisons de croissance dans les cendres, les composants de la paroi cellulaire, PB, EE et les tannins condensés. Le contenu en PB est plus faible en été (96,84 g / kg MS) par rapport au printemps (138,85 g / kg MS) et l'hiver avec une valeur de (139,42 g / kg MS). En hiver, CASH avait des teneurs faibles ($p < 0,05$) en NDF, ADF, ADL et HCL en été, des valeurs intermédiaires sont observées au printemps. En revanche, des valeurs élevées de cendres, EE et TCT sont observées au cours du printemps par rapport à l'été et l'hiver avec des valeurs comprises entre 39,23 et 54,47, 20,64 et 23,79 et 25,33 et 34,72 (g / kg MS) respectivement.

Dans notre étude, de grandes différences dans la valeur nutritive de CASH (évaluée par la production de gaz et la digestibilité de la matière sèche) sont observées, elles sont principalement le résultat de changements dans la maturité des feuilles collectées. La réduction de la teneur en PB de CASH en été, par rapport aux autres saisons, est compatible avec d'autres études, comme le constat que la teneur minimale en PB des arbres fourragers enregistrée durant la saison sèche est plus de deux fois celle de graminées de la saison des pluies (Skarpe *et al.*, 1986 ; Evitayani *et al.*, 2004). Toutefois, le contenu en PB de CASH est

resté relativement élevé (96,84 g / kg MS) pendant l'été, plus élevé que le niveau minimum de 7-8% MS requis pour le fonctionnement optimal du rumen et de la prise alimentaire admis pour les ruminants (Van Soest, 1994). En outre, la teneur en PB élevé (193,42 g / kg MS) pendant l'hiver par rapport aux deux autres saisons peut s'expliquer par les teneurs plus élevées en humidité du sol où l'absorption d'azote est plus rapide que l'accumulation de matière sèche, ce qui est en accord avec plusieurs travaux antérieurs (Bamualim *et al.*, 1980 ; Larbi *et al.*, 1997) qui ont constaté des variations saisonnières se produisant entre espèces végétales et entre saisons avec des valeurs plus élevées pour les saisons humides. Le contenu de PB inférieur pendant l'été peut être en grande partie dû au stress hydrique subi par CASH, pendant cette période où la plante tend à accumuler des structures fibreuses lignocellulosiques au détriment des composés azotés (Anele *et al.*, 2009).

Tableau 12 : Composition chimiques (g/kg MS) de *Calobota saharae* collecté sur trois saisons

Nutriments	Saisons de collecte				
	Hiver	Printemps	Eté	SEM	Signification
PB	139,42 ^a	138,85 ^a	96,84 ^b	7,212	***
NDF	526,24 ^b	463,05 ^c	616,82 ^a	22,52	***
ADF	402,17 ^b	352,27 ^c	488,21 ^a	19,98	***
ADL	128,84 ^b	121,19 ^c	151,73 ^a	4,656	***
Hémi	124,10 ^a	110,78 ^b	128,59 ^a	2,922	***
MM	39,67 ^b	54,47 ^a	39,23 ^b	0,254	***
EE	22,18 ^{ab}	23,79 ^a	20,64 ^b	0,567	***
TCL	15,30 ^a	13,92 ^{ab}	12,83 ^b	0,403	***
TCLP	1,06 ^{ab}	1,41 ^a	0,98 ^b	0,080	***
TCLF	11,98 ^b	19,39 ^a	11,46 ^b	1,283	***
TCT	28,34 ^b	34,72 ^a	25,33 ^c	1,407	***

ADF: Acid Detergent Fibre; **ADL**: Acid Detergent Lignin; **EE** : Extrait Ethéré ; **Hémi**: Hemicellulose; **MM** : Matière Minérale ; **PB** : Protéines Brutes; **NDF**: Neutral Detergent Fibre; **NS** : Non Significative ; **SEM**: Erreur Standard des Moyennes ; **TCL** : Tannins Condensés Libres ; **TCLP** : Tannins Condensés Liés à la Protéine ; **TCLF** : Tannins Condensé Liés à la Fibre ; **TCT** : Tannins Condensés Totaux.

a, b, c, moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distincts ($P < 0,05$).

Les grandes variations dans les NDF, ADF, ADL et HCL contenus de CASA en hiver et en été sont compatibles avec les résultats de Onwuka *et al.*, (1989), sur les espèces ligneuses dans les terres basses et humides d'Afrique de l'Ouest et dans d'autres régions des tropiques (Topps, 1992 ; Dzewela *et al.*, 1995). Les différences saisonnières dans les constituants de la paroi cellulaire peuvent s'expliquer par les variations dans les éléments météorologiques des saisons et par leurs effets sur la lignification de la paroi cellulaire ainsi que sur la translocation des éléments nutritifs des feuilles vers d'autres parties de la plante (Larbi *et al.*, 1998). De plus, la concentration de la paroi cellulaire en arbustes fourragers est négativement corrélée à la palatabilité (Kaitho *et al.*, 1998 ; Larbi *et al.*, 1998). Par conséquent, les différences observées dans les NDF, ADF, ADL et HCL entre les saisons de récolte pourraient avoir des implications pour l'utilisation de CASH comme arbuste fourrager.

Les tannins condensés ont un rôle important dans les plantes fourragères, lié à leur concentration. En effet, les tannins à concentration basse (2-3% du MS) peuvent avoir un effet bénéfique, puisque leur niveau empêche la dégradation extensive des protéines par le microbiote ruminale par la formation de complexes protéines-tannins (Barry, 1987). De plus, les tannins condensés dans les arbres et les arbustes fourragers pourraient aussi contribuer à la lutte contre les parasites gastro-intestinaux car ils présentent des propriétés biologiques qui diminuent le nombre d'œufs fécaux chez les moutons et les chèvres, de même que le taux d'éclosion et le développement des larves dans les selles (Min et Hart, 2003). D'autre part, le niveau élevé de tannins (5% de la MS) dans l'alimentation peut entraîner l'indigestion des protéines, en raison de la formation excessive de complexes tannins-protéines (Kumar et Singh, 1984). Comme on peut le voir dans le tableau 12, les niveaux de tannins condensés enregistrés de CASH récoltés en trois saisons différentes sont d'une faible ampleur. Par conséquent, ce niveau de tannins condensés semble avoir un potentiel d'effet bénéfique, lorsqu'il est inclus dans le régime des ruminants car il peut augmenter la quantité de protéines disponibles pour l'animal.

1.3.2. Fermentation et Production de méthane *in vitro*

La production de gaz total (PG 24h), le méthane (CH₄ 24h), la digestibilité *in vitro* de Telly et Terry pour chaque saison sont représentés dans le **tableau 13**. Une nette diminution de la production de gaz total, du méthane et de l'IVD-TT est constatée en passant du printemps à l'été. En réalité, la production de gaz est étroitement associée à la quantité de substrat fermenté dans le rumen et dans le système de fermentation *in vitro* (Blummel et Orskov, 1993). La production de gaz basse pour CASH pendant la saison sèche (l'été) peut être attribuée à la teneur relativement plus élevée en NDF, ADF, ADL et à la faible teneur en PB. Notre observation est similaire à celle d'Evitayani *et al*, (2004), qui constatent une production de gaz *in vitro* et une digestibilité *in vitro* de la matière sèche de certaines espèces de légumineuses plus élevées en saison humide (hiver) par rapport à la saison sèche (été). Des observations similaires à notre étude sont également notées par Kamalak *et al*, (2005) pour le foin dit, *Gundelia tournifortii*, et par Kaplan *et al*, (2014) pour le foin mineur *Sanguisorba*. Par contre, il n'y a aucune différence dans l'EM de CASH obtenus dans l'étude actuelle, ce qui pourrait être dû aux petites variations de la production de gaz entre les trois saisons, sachant que les valeurs de l'EM énergétiques sont estimées par la production de gaz et le contenu en PB. Selon Fagg et Stewart (1994), les légumineuses indigènes des régions arides, telle CASH, en raison de leur fixation symbiotique de l'azote avec des bactéries nodulant les légumineuses (appelés collectivement les rhizobiums) contribuent dans leur majorité à la fertilisation des sols en augmentant leurs teneurs en azote et en matière organique. Ils fournissent également du fourrage de haute qualité, préviennent l'érosion et contribuent à la stabilisation des sols et à la restauration des écosystèmes arides et semi-arides.

Le méthane est un produit de fermentation microbienne, en particulier dans le rumen. À la fin d'une interaction complexe de processus microbiologiques et biochimiques, les archées méthanogènes utilisent l'hydrogène pour réduire le CO₂ et produire le CH₄ (Mills *et al.*, 2001). Comme il a été montré avec ATCA et par conséquent, l'arbuste CASH n'a pas un potentiel de réduction du méthane puisque le pourcentage de méthane pour toutes les saisons se situe entre 10 à 13%. Mais les recherches conduites au cours des deux dernières décennies ont permis de montrer que certains additifs alimentaires peuvent être utilisés pour réduire la méthanogenèse ruminale (Jouany et Morgavi, 2007).

Tableau 13: Les paramètres de fermentation *Calobota saharae* PG 24H (ml/g) le méthane (ml/g) IVD-TT (%) et EM (MJ/kg MS)

Paramètres de fermentation	Saisons de collecte				
	Hiver	Printemps	Eté	SEM	Signification
PG24h (ml/g)	71,25 ^b	77,75 ^a	65,75 ^c	2,798	***
CH₄ 24h (ml/g)	6,50 ^b	10,17 ^a	7,78 ^b	0,713	***
IVD-TT (%)	53,41 ^b	57,41 ^a	53,17 ^b	0,742	***
EM (MJ/kg MS)	6,40	6,61	5,97	0,269	NS

a, b, c Row means with common superscripts do not differ ($P < 0.05$); **E.S.M:** erreur standard moyenne; **PG24:** la production de gaz 24 heure (ml/g), **CH₄:** la production de méthane à 24 heure (ml/g), **IVD-TT:** la digestibilité *in vitro de* Tilley et Terry (%), **EM:** énergie métabolisable (MJ/kg MS).

a, b, c, moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distincts ($P < 0,05$).

2. Contrôle de la méthanogénèse ruminale par l'utilisation de plantes médicinales

2.1. Aspects chimiques des substrats utilisés

2.1.1. Composition chimique des plantes médicinales

La composition chimique des plantes médicinales étudiées est exposée dans le tableau 14. Il en ressort que les plantes étudiées renferment une teneur élevée en matière sèche (MS) et en matière organique (MO), avec des valeurs allant de 927 à 933 (g/kg MS) et de 816 à 822 (g/kg MS), respectivement. Généralement, les trois plantes enregistrent des valeurs voisines pour ces deux paramètres avec une légère différence. Il est important de remarquer que les trois échantillons étudiés sont prélevés à l'état sec, auprès d'herboristes dans la wilaya de M'Sila qui se caractérise par un climat aride qui explique ces taux élevés en MS et MO.

Les plantes étudiées présentent des teneurs en protéines brutes (PB) très variables. Le taux le plus faible de PB est observé chez *Rosmarinus officinalis*, avec une valeur de (79,9 g/kg MS), la valeur la plus élevée est enregistrée chez *Nigella sativa* (350,5 g/kg MS). Cette différence peut s'expliquer en partie par la partie phénologique qu'occupe chaque substrat, à

savoir : graine, feuilles et rhizome respectivement pour la nigelle, le romarin et le gingembre et la variation interspécifique d'autre part.

L'analyse approximative des graines complètes et mature de *Nigella sativa* montre que le taux d'humidité varie de 38 à 74 g/kg MS, les lipides de 220 à 534 g/kg MS, la matière minérale de 37 à 48 g/kg MS, les hydrates de carbones de 249 à 340 g/kg MS et les protéines brutes de 206 à 312 g/kg MS (El-Dhaw et Abdel-Munaem Nadia, 1996 ; Takruri et Dameh, 1998 ; Atta, 2003). Selon Al-Gaby (1998), les graines de *Nigella sativa* sont très riches en protéines (environ 200 g/kg MS), avec une dominance d'acide glutamique (22,4%), d'acide aspartique (10,05%) et d'arginine (9,18%). Dans notre cas, le taux de protéines brutes est très élevé par rapport à plusieurs données de la littérature. Cette différence peut être liée à la variation des cultures ainsi qu'à la variation des climats des différentes régions de culture. Ce résultat indique aussi que les graines de *Nigella sativa* représentent une très bonne source de protéines.

En ce qui concerne la teneur en matière minérale (MM), on constate que les trois plantes enregistrent des valeurs relativement élevées. Elles varient entre (178 g/kg MS) dans le *Zingiber officinale* et (184 g/kg MS) dans *Nigella sativa*, comparativement au *Rosmarinus officinalis* qui présente une valeur intermédiaire de (181 g/kg MS). Selon Spear (1994), la concentration des éléments minéraux dans les plantes varie fortement avec le type de sol, le climat, le stade de la maturité et la saison de la récolte. En plus de ces facteurs, dans notre cas l'éventuelle contamination des parties aériennes ainsi que des parties souterraines par la silice peut expliquer les taux élevés de MM.

D'une manière générale, on constate que les trois substrats étudiés présentent une composition pariétale variable mais qui reste pour leur majorité modérée par rapport aux constituants totaux de la cellule. Pour la fraction NDF, qui représente la paroi totale (cellulose + hémicellulose + lignine), elle varie entre 292 et 346 g/kg MS. Ces teneurs sont inférieures aux valeurs de la fraction pariétale rapportées pour des fourrages tempérés (600 g/kg MS) et qui varient de 530 à 690 (g/kg MS) (Rubanza *et al.*, 2005 ; Kumara Mahipala *et al.*, 2009). Par contre, nos valeurs sont similaires à celles rapportées par Boufennara (2012) et Bouazza (2012) pour des plantes fourragères collectées sur la région de M'sila et Djelfa et M'sila et Constantine respectivement. En plus de l'espèce, il y a certainement une influence de la région climatique car, selon Pascual *et al.*, (2000), les températures élevées et les faibles précipitations tendent à augmenter la fraction pariétale (NDF) et à diminuer le contenu soluble

des végétaux. Les teneurs de la fraction ADF (lignocellulose) sont distinctes aussi entre les substrats étudiés. La valeur la plus élevée est notée pour *Rosmarinus officinalis* (255 g/kg MS) et la plus faible chez *Zingiber officinale* (74 g/kg MS). *Rosmarinus officinalis* se révèle plus riche en lignine (ADL), avec une valeur de (134.1 g/kg MS). Par contre, les teneurs les plus basses se rencontrent chez *Zingiber officinale* et *Nigella sativa*, avec des valeurs, relativement proches de 9,1 g/kg MS et 26,8 g/kg. La lignine est un composé phénolique synthétisé par la plante pendant les périodes les plus avancées de la croissance et elle intervient dans la rigidité de la structure végétale. La différence en NDF, ADF et ADL pourrait être due à des différences spécifiques. L'accumulation de fibres dans la cellule est sous le contrôle du génotype et le stade de croissance est un facteur à prendre en considération (Bouazza, 2012).

Tableau 14 : Composition chimique (g/kg MS) des plantes médicinales utilisées

Espèce	MS (g/kg)	OM	PB	MM	NDF	ADF	ADL	Hémi	Cellu
<i>Nigella sativa</i>	933	816	350,5	184	292	120	26,8	172	93,2
<i>Rosmarinus officinalis L.</i>	938	819	79 ,9	181	329	255	134,1	74	120,9
<i>Zingiber officinale</i>	927	822	95,4	178	346	74	9,1	272	64,9

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

2.1.2. Composition chimique du milieu de base

La Composition chimique du milieu de base (g/kg MS) est présentée dans le tableau 14. On y observe des taux de matière organique de (889,4 g/kg MS) et une valeur de la matière minérale relativement élevée de (110,6 g/kg MS). Le taux de protéines brutes (140 g/kg MS) est convenable pour assurer les besoins azotés du microbiote ruminale. La composition en paroi cellulaire varie entre 52,2 et 510 g/kg MS pour l'ADL et la paroi totale NDF respectivement. La teneur en ADL est relativement faible ce qui permet aux microorganismes du rumen d'accéder facilement à la cellulose et à l'hémicellulose et à assurer par conséquent une bonne fermentation des constituants de la paroi cellulaire.

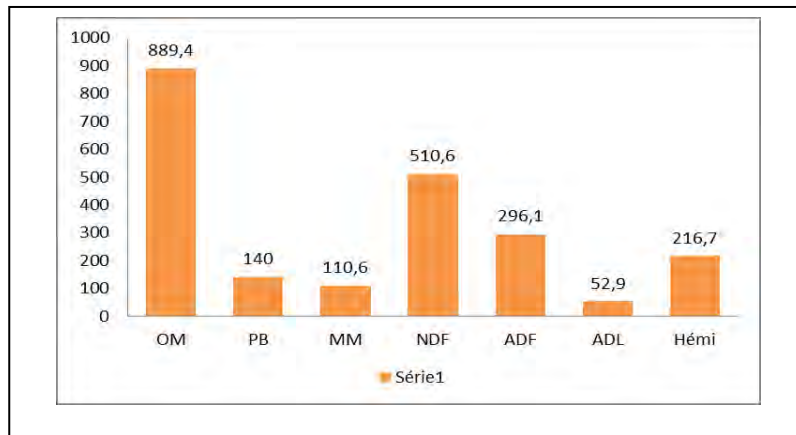


Figure 15 : Composition chimique du milieu de base

OM : Organic matter ; PB : protéines brute ; MM : matière minérale ; NDF :Neutral Detergent fiber;
ADF : Acid detergent fiber :ADL :Acid Detergent Lignnin ; Hemi : hémicellulose

2.2. Effet des plantes médicinales sur la méthanogénèse et la fermentation *in vitro*

Les valeurs moyennes de la production totale de gaz, de méthane, la digestibilité de la matière sèche, la disparition des NDF et la production d'azote ammoniacal (N-NH₃) sont mentionnées dans le **tableau 15**. De manière générale, il y a une différence significative entre l'essai de contrôle (CNTR) et les différents traitements utilisés. Les éléments les plus remarquables sont les effets du Monensin (MONE) et de *Nigella sativa* (NGSA) sur la production de gaz et la réduction du méthane. Pour la MONE la réduction de la production de méthane est associée à une forte réduction en production totale de gaz, par contre la NGSA réduit la quantité de méthane tout en gardant une production de gaz significative.

2.2.1. Production de gaz 24 heures

La production de gaz *in vitro* après 24 de fermentation dans le système batch est présentée dans le **tableau 15**. Il en ressort qu'elle est significativement différente ($P < 0,0001$) par rapport aux différents traitements étudiés. Après 24 heures d'incubation, *Zingiber officinale* (ZNOF) engendre la plus grande quantité de gaz (6,41 mmoles/g MS) et le MONE la quantité la plus faible, avec 2,90 mmoles/g MS. Les autres traitements présentent des quantités de gaz proches de celle de ZNOF : 5,27, 5,70 et 5,62 mmoles/g MS, respectivement pour le CNTR, NGSA et *Rosmarinus officinalis* (RSOF).

Quand un substrat est incubé *in vitro* en présence de jus de rumen et une solution tampon, les glucides sont fermentés en acides gras volatiles (Blümmel and Orskov, 1993), en gaz (essentiellement CO₂ et CH₄) et en biomasse microbienne. La production de gaz à partir des protéines est relativement faible, comparativement aux polysaccharides (Getachew *et al.*, 1998), alors que la contribution des lipides est considérée négligeable. Les gaz (CO₂) libérés par le système tampon neutralisent les acides gras (production indirecte) (Mould, 2003). Dans notre étude le MONE réduit la production totale de gaz, ce qui est en accord avec toute la littérature concernant cet ionophore. En effet, le MONE est l'ionophore le plus couramment utilisé dans la nutrition des ruminants, bien qu'il ait été développé à l'origine comme un coccidiostatique pour les volailles (Chapman *et al.*, 2010; Rodehutsord, 2013). Il est considéré comme un promoteur de croissance en raison de ses effets favorables sur la fermentation dans le rumen, y compris la réduction du méthane, l'amélioration de propionate et la réduction de l'ammoniac. Avec également des effets préventifs sur les coccidioses, le ballonnement et l'acidose lactique. Ces effets sont attribués à une action antimicrobienne sélective sur les microbes du rumen. Des rapports antérieurs indiquent que la réduction de méthane par le MONE s'étale de 4 à 31% (Schelling *et al.*, 1984; Rumpler *et al.*, 1986). Un rapport récent indique que l'administration à long terme de MONE chez des bovins laitiers de manière stable réduit le méthane de 7% et que cette réduction persiste pendant six mois, sans effet négatif sur la production de lait (Odongo *et al.*, 2007; Kobayashi, 2010). Mais il apparaît que d'autres investigations sont nécessaires pour vérifier si le MONE est capable de réduire la production de méthane, sans effets néfastes sur la fermentation dans le rumen et de clarifier son effet sur la synthèse des protéines microbiennes sur la base des aliments couramment utilisés dans la production de ruminants.

Pour ce qui est du ZNOF, une amélioration de la production totale de gaz est observée, cela peut être attribué à la composition chimique de cette plante. Comme il a été précédemment dit, ZNOF présente une teneur considérable en hémicellulose, substrat potentiellement dégradable par le microbiote ruminale et de faible teneur en lignine, un facteur majeur limitant la digestibilité de la plante *in vitro* (Ford, 1983).

2.2.2. Production de Méthane

Les quantités de méthane produites par les différents traitements sont présentées dans le **tableau 15**. De manière générale, une forte réduction de méthane est notés avec le MONE et

le NGSA et aucun effet n'est observé avec les autres traitements. Les quantités de méthane produites après 24 heures de fermentation varient entre 0,28 et 1,12 mmoles/g MS. Le MONE entraîne le pourcentage de réduction le plus élevé, avec une valeur de 75 % tandis que NGSA enregistre une valeur de réduction de 20 %.

Des études ont montré que le MONE inhibe significativement la production de CH₄ dans le rumen (Sauer *et al.*, 1998). Cette inhibition est le résultat indirect d'une diminution de la production d'ions hydrogène. Cependant, une certaine adaptation des microorganismes méthanogènes aux ionophores a déjà été rapportée dans la littérature. En effet, une reprise totale de la production de CH₄ a été observée après deux semaines de traitement aux ionophores chez des bovins recevant une ration riche en concentrés (Rumpler *et al.*, 1986).

Des informations dans la littérature par rapport aux effets antiméthanogènes de certaines espèces végétales et métabolites secondaires des plantes, et sur les métabolites secondaires chez ces espèces, sont d'un intérêt majeur pour l'interprétation de tels résultats et permettent d'aborder de futures recherches pour identifier les composants chimiques spécifiquement responsables de l'activité antiméthanogène.

Pour ce qui est du NGSA, il est largement connu que cette plante est très riche en lipides et en stérols, ce qui pourrait être à l'origine de cette réduction. En effet, les graines de NGSA renferment environ 0,4-2,5% d'huile essentielle, plus de 30% d'huiles fixes (Dominiczak *et al.*, 1991) et 38% de lipides totaux dont les phospholipides (Martin *et al.*, 2001). Les acides oléique et linoléique sont les deux acides gras majeurs de l'huile de NGSA, ils constituent 75% des acides gras totaux (Abdelal et Attia, 1993).

Plusieurs composés secondaires de certaines plantes médicinales ont été rapportés comme agents de diminution de la production de méthane à partir de la fermentation ruminale, y compris l'ail, le clou de girofle, le fenouil (Patra *et al.*, 2006), *Acacia angustissima*, *Sesbania sesban* (Zelege *et al.*, 2006), *Sapindus* spp., *Populus tremuloides*, *Syzygium zromaticum*, *Psidium guayaba*, *Terminalia chebula* (Kamra *et al.*, 2006), la prêle (*Equisetum arvense*) et la sauge (*Salvia officinalis*) (Broudiscou *et al.*, 2002). L'identification des fractions phytochimiques spécifiquement impliquées dans la réduction de la production de méthane est difficile (Scehovic, 1999). Les tannins (Hess *et al.*, 2003), les saponines (Lila *et al.*, 2003), les flavonoïdes (Broudiscou et Lassalas, 2000), le thymol, le carvacrol ou l'eugénol (Chiquette et Benchaar, 2005) ont tous été suggérés responsables de cet effet.

Les tannins réduisent la méthanogénèse chez les ovins (Rira *et al.*, 2014), les ovins et les bovins (Waghorn *et al.*, 2002), probablement par des effets directs sur l'activité des *Archaea* méthanogènes et des effets indirects sur la digestion des fibres. Les saponines également diminuent la méthanogénèse *in vitro* (Lila *et al.*, 2003), bien que leur mode d'action reste incertain. Newbold et Rode (2006), suggèrent un effet lié à l'activité anti-protozoaires. Les flavonoïdes sont connus pour interagir avec les microorganismes du rumen, positivement ou négativement, et les produits de dégradation des flavonoïdes peuvent également modifier le métabolisme microbien dans le rumen (Broudiscou et Lassalas, 2000).

Les réductions de la production de méthane ont été liées à des effets néfastes sur la dégradation du substrat (Beauchemin et McGinn, 2006). Cependant, certaines espèces de plantes diminuent la production de méthane et stimulent parallèlement le métabolisme microbien (Broudiscou *et al.*, 2002). L'absence d'effets sur la dégradation de substrats en réponse à certains extraits de plantes ayant réduit la production de méthane a également été rapportée (Sliwinski *et al.*, 2002). Dans notre expérience, la plante candidate NGSA ne cause pas de modifications substantielles du profil général de fermentation, à l'exception de la production de méthane, ce qui suggère que ce composé ne porte pas atteinte à la dégradation du substrat et n'est pas toxique pour les micro-organismes du rumen à la dose utilisée.

2.2.3. Digestibilité

La digestibilité apparente de la matière sèche après 24 heures d'incubation est exposée dans le **tableau 15**. La digestibilité apparente en présence du MONE est significativement distincte ($P < 0.0001$) de celle du CNTR et de celle des autres traitements, elle varie entre 0,3371 et 0,6037 g/g MS incubée. La valeur la plus élevée est notée pour ZNOF et la plus faible pour le MONE. La classification des traitements sur la base de la digestibilité apparente de la matière sèche est alors la suivante : **ZNOF > CNTR > NGSA > RSOF > MONE**. Un cas similaire est signalé par Bodas *et al.* (2008), avec d'autres plantes médicinales incubées dans le même système batch *in vitro* avec des valeurs de digestibilité apparente entre 0,662 et 0,678 g/g MS incubée. De plus, Garcia-Gonzalez *et al.*, (2008) rapportent des valeurs de digestibilité apparente de la matière sèche de : 0,740, 0,710, 0,701 et 0,755 respectivement pour le contrôle, *Rheum officinale*, *Frangula alnus* et *Allium sativum*.

Le MONE réduit la digestibilité de la matière sèche *in vitro* des traitements qui se répercute directement sur la réduction de la digestibilité des NDF. Les effets négatifs sur la

digestion, suite à l'addition du MONE, sont en accord avec des études *in vitro* dans lesquelles le MONE réduit la digestibilité de la matière sèche à des doses de 2 à 33 mg/L (Wallace *et al.*, 1981; Russell et Strobel, 1988). Cependant, des études *in vivo* à des doses faibles (2 à 5 mg/L) de MONE n'affectent pas la digestion des nutriments, ce qui suggère que la dose de 10 mg/L peut être toxique pour les bactéries du rumen. Cet effet du MONE sur la digestion des fibres est attribué à l'inhibition des bactéries cellulolytiques du rumen, comme *Ruminococcus cellulolytique* et *Butyrivibrio fibrisolvens*, particulièrement sensibles aux ionophores (Russell et Strobel, 1989).

2.2.4. Disparition des NDF

La disparition de la fraction NDF est statistiquement différente entre les traitements appliqués ($P < 0.0309$). Après 24 heures d'incubation, les disparitions de la fraction NDF *in vitro* sont comprises entre 0,2737 et 0,3137 g/g MS incubée. La valeur la plus élevée est enregistrée pour RSOF alors que le MONE renferme la teneur la plus faible. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Garcia-Gonzalez *et al.*, (2008) (0,274 et 0,368 g/g MS incubée) mais ils restent inférieurs par rapport aux travaux de Foskolos *et al.*, (2015) (1,3 et 22,2 %). Ces différences sont probablement dues à la différence de la nature du substrat de fermentation.

2.2.5. Production d'azote ammoniacal (N-NH₃)

La concentration en azote ammoniacal, mesurée après 24 heures d'incubation dans le surnageant des fermenteurs en batch, est significativement distincte ($P < 0,0001$) entre les différents traitements étudiés. La production d'ammoniac la plus élevée est notée pour RSOF (52,73 mg/100ml) et la plus faible pour le MONE (31,15 mg/100ml). Ces résultats sont comparables aux travaux de Castillejos *et al.*, (2008) (32,25 et 36,04 mg/100ml) mais ils restent supérieurs à ceux de De Castillejos *et al.*, (2005) (3,01 et 8,64 mg/100ml).

La présente expérience a montré que les concentrations en azote ammoniacal diminuent lorsque le fluide ruminal est incubé avec le MONE, ce qui est cohérent avec les rapports précédents (Callaway *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2006). Cette situation suggère que les bactéries de fermentation des acides aminés pourraient être plus sensibles au MONE, contrairement aux autres traitements (Oeztuerk *et al.*, 2010). Dans une autre étude, avec des

vaches de race Holstein, Yang et Russel (1993) enregistrent une diminution allant jusqu'à 50% de l'ammoniac dans le rumen, elle est causée par le MONE et associée à une diminution décimale du nombre de bactéries qui dégradent les acides aminés. Cardozo *et al.* (2004) rapportent que l'huile d'ail réduit l'azote ammoniacal et augmente les concentrations des petits peptides, en culture continue dual-flow, ce qui suggère que la désamination est inhibée. Ferme *et al.* (2004), sur des échantillons de Cardozo *et al.* (2004), indiquent que l'huile d'ail modifie le profil de la population microbienne, par la réduction de la population de *Prevotella* spp. (Principalement *P. ruminicola* et *P. bryantii*), soit les bactéries protéolytiques les plus abondantes et les plus désaminantes du rumen (Falconer et Wallace, 1998). Cependant, Busquet *et al.* (2005a, b) ne notent que des effets faibles et variables des composés de l'huile d'ail sur la dégradation des protéines dans le rumen.

Tableau 15 : Effet de différentes plantes et du Monensin sur la fermentation *in vitro* (24 h d'incubation)

Les paramètres de fermentation	CNTR	MONE	NGSA	RSOF	ZNOF	S.E.M	P
PG 24 (mmol/g MS incubée)	5,27 ^b	2,90 ^c	5,70 ^b	5,62 ^b	6,41 ^a	0,123	<0,0001
CH ₄ (mmol/g MS incubée)	1,09 ^{ab}	0,28 ^c	0,86 ^b	1,03 ^{ab}	1,23 ^a	0,065	<0,0001
Digestibilité (g/g MS incubée)	0,5741 ^a	0,3371 ^b	0,5599 ^a	0,5405 ^a	0,6037 ^a	0,0135	<0,0001
NDF disp g/g MS incubée	0,2883 ^{ab}	0,2737 ^b	0,2967 ^{ab}	0,3137 ^a	0,2909 ^{ab}	0,0332	<0,0309
Ammoniac (mg/100ml)	45,51 ^{ab}	31,15 ^b	48,36 ^{ab}	52,73 ^a	45,10 ^{ab}	1.125	<0,0001

CNTR: Control; **MONE:** Monensin; **NDF disp :** la disparition des NDF ; **NGSA:** *Nigella sativa*; **PG 24:** production de gaz à 24 heures d'incubation; **RSOF:** *Rosmarinus officinalis*.L ; **S.E.M:** erreur standard des moyennes ; **ZNOF:** Zingibar officinale;

2.3. Effet des plantes médicinales sur le pH et les acides gras volatils

2.3.1. Le pH

Les paramètres de fermentation ruminale, pH et AGV, sont présentés dans le **tableau 16**. On observe que le pH de fermentation est plus élevé (P=0,0044) en présence de MONE

qu'avec le CNTR et les autres plantes. Le pH enregistré dans chaque batch, après 24 heures d'incubation, est compris entre 6,40 et 6,63. La valeur la plus élevée est obtenue pour la MONE, dont la fermentation est faible. La valeur la plus basse est enregistrée pour NGSA, RSOF et ZNOF, l'acidification du milieu résulte essentiellement de l'accumulation des acides gras volatiles (AGV). Pour l'ensemble des traitements, les valeurs de pH restent au-dessus du seuil critique d'inhibition (pH=6) de la croissance et de l'activité cellulolytique du microbiote ruminal (Rémond *et al.*, 1995).

Dans les conditions normales, le rumen sain et fonctionnel est caractérisé par un pH légèrement acide. Le pH du milieu ruminal est la résultante des productions acides, des tampons salivaires et des tampons propres de la ration (Giger-Reverdin *et al.*, 2002). Bien qu'il soit difficile de définir avec certitude une gamme précise, il est généralement admis que dans les conditions normales de fonctionnement du rumen, le pH se situe entre 6,0 et 7,0 (Rémond *et al.*, 1995). Les déviations de pH en dehors de cette norme résultent principalement d'un déséquilibre de la fermentation des aliments présents dans la ration. La relation directe entre la ration, le pH ruminal et la concentration en AGV est bien connue. Avec une ration riche en glucides rapidement fermentescibles (GRF), la baisse du pH ruminal observée est d'abord liée à une augmentation importante des AGV dans le rumen (Patra *et al.*, 1996). Les acides produits ont une chaîne carbonée plus longue, c'est-à-dire avec plus de propionate (C₃), plus de butyrate (C₄) et moins d'acétate (C₂).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Carla *et al.*, (2011) qui enregistrent des valeurs entre 6,40 et 6,51 pour différents composés naturels et synthétiques, dont l'acide garlic, pour ce qui est de leurs effet sur la fermentation ruminale dans le RUSITEC. De plus, Rira *et al.*, (2014) rapportent des fourchettes de pH entre, 6,2 et 6,7 pour l'effet *in vivo* de plantes riches en tannins et ce pour des brebis de races Texel et Blackbelly. Néanmoins, ils sont inférieurs à ceux de plusieurs auteurs (Bodas *et al.*, 2008 ; Soltan, 2012), avec des valeurs de 6,60 à 6,80 et 6,87 à 6,98, respectivement.

2.3.2. Les acides gras volatiles

Les proportions d'acétate, propionate et butyrate sont significativement différentes entre les traitements (p<0,0001). Les concentrations d'acétate sont comprises entre 16,50 et 29,42 mmol/g MS. La teneur la plus élevée est notée pour ZNOF et la plus faible pour la MONE. La même tendance est constatée pour les proportions de butyrate, elles sont les plus

élevées pour ZNOF et RSOF (4,55 et 3,36 mmol/g MS respectivement). Contrairement à l'acétate et au butyrate, le propionate suit une autre tendance. Il est le plus élevé pour NGSA avec une valeur de 14,46 (mmol/g MS) et le plus faible pour le MONE. Les autres traitements enregistrent des valeurs intermédiaires entre 8,78 et 10,10 (mmol/g MS), respectivement pour RSOF et ZNOF. Selon Mc Donald *et al.* (1995), la fermentation d'aliments riches en amidon tend à produire plus de propionate, tandis que celle des substrats fibreux aboutit à la formation plus importante d'acétate. Chez les ruminants, les AGV contribuent pour environ 70 % des besoins en énergie des animaux (Bergman, 1990). 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). Ce résultat confirme ceux obtenus précédemment et relatif à la fois à la production de gaz et à la digestibilité (Bodas *et al.*, 2008; García-González *et al.*, 2008). Selon, Zeenat *et al.* (2005), les AGVt augmentent et l'ammoniac diminue en présence de la Sarsaponin. Ces changements dans la fermentation ruminale suggèrent que la Sarsaponin se comporte comme les ionophores, son ajout au milieu peut améliorer l'efficacité de la production de ruminants. En outre, les changements dans la proportion molaire des AGV, accompagnant la diminution de la production de méthane, indiquent un changement du profil spécifique de la fermentation. La légère dépression de l'activité fermentaire pourrait être la conséquence d'une altération de la méthanisation, ce qui est observé avec d'autres additifs ayant des effets similaires sur la fermentation ruminale, tels que le MONE. Plusieurs études ont examiné les actions pharmacologiques de différents composés bioactifs de NGSA (*Nigella sativa*), révélant, entre autres, des effets laxatifs, des propriétés anti-bactériennes, anti-virales et anti-inflammatoires (Mousavi *et al.*, 2010 ; Chaieb *et al.*, 2011 ; Okeola *et al.*, 2011).

La production en AGV totaux est significativement inférieure ($p < 0,0001$) entre le MONE et le CNTR mais les autres traitements n'ont aucun effet sur la production des AGVt. ZNOF a le total en AGV le plus élevé (45,16 mmol/g MS), il est suivi de NGSA (41,47 mmol/g MS), alors que la plus faible production revient au MONE (27,69 mmol/g MS) (**Tableau 16**).

Les ratios acétate/propionate (C_2/C_3), soit les deux acides gras volatiles majeurs, sont significativement différents entre les traitements ($p < 0,0001$). Ces ratios sont compris entre 1,54 et 2,98. Le CNTR affiche le ratio le plus élevé et NGSA le plus faible. Ces ratios sont comparables aux travaux de Garcia-Gonzalez *et al.*, (2008) qui observent des valeurs situées

entre 1,29 et 1,92 pour la MONE et le CNTR respectivement. Néanmoins, un ratio C₂/C₃ de 3,0 et 4,1 *in vivo* est rapporté par de nombreux auteurs (Depeters *et al.*, 1997 ; Depeters *et al.*, 2000). La diminution du ratio C₂/C₃ avec l'augmentation des proportions de propionate sont rapportées pour *Prosopis* et *Leucaena*, sans aucun effet notable sur les AGVt et le pH. Cela confirme que la réduction du CH₄ est le résultat de la redirection des molécules d'hydrogène de la voie de la méthanogénèse vers la production du propionate (Demeyer et Van nevel, 1975). Ces résultats suggèrent que les réponses en profil fermentaire des deux substrats sont similaires à la réduction de CH₄ induite par les ionophores (Goodrich *et al.*, 1984).

Tableau 16 : Effet de différentes plantes et du Monensin sur le pH et la production des AGV *in vitro*

Les acides gras volatils	CNTR	MONE	NGSA	RSOF	ZNOF	S.E.M	P
pH	6,50 ^{ab}	6,63 ^a	6,40 ^b	6,41 ^b	6,41 ^b	0,018	0,0044
Acétate	26,37 ^{ab}	16,50 ^c	22,02 ^b	27,29 ^a	29,42 ^a	0,623	<0,0001
Propionate	9,93 ^b	9,65 ^b	14,46 ^a	8,78 ^b	10,1 ^b	0,325	<0,0001
Butyrate	3,3 ^b	1,05 ^c	3,7 ^b	3,36 ^b	4,55 ^a	0,135	<0,0001
AGVt	39,72 ^a	27,69 ^b	41,47 ^a	40,29 ^a	45,16 ^a	0,785	<0,0001
Acet/Prop	2,98 ^a	1,71 ^b	1,54 ^b	3,11 ^a	2,95 ^a	0,125	<0,0001

AGV : acide gras volatils ; AGVt : acides gras volatils totaux, ^{a, b, c, d} moyenne dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinct (P<0,05). S.E.M. : erreur standard des moyennes.

Conclusions

générales

Cette thèse avait pour objectifs principaux d'étudier en préambule l'effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive, la teneur en tannins et la production de méthane de trois arbustes fourragers : *Atriplex canescens*, *Astragalus gombo* et *Calobota saharae*, prélevés d'une zone aride d'Algérie sur trois saisons consécutives. Plusieurs aspects ont été étudiés : la caractérisation chimique des plantes, l'évaluation de leur potentiel nutritif par la mesure de leur fermentescibilité et de leur digestibilité *in vitro*.

Dans une seconde partie, un essai de réduction de la méthanogénèse ruminale *in vitro* a été engagé par l'utilisation de trois plantes médicinales d'usage thérapeutique traditionnel : *Nigella sativa*, *Rosmarinus officinalis*.L et *Zingiber officinale*. Leur impact a également été établi sur divers paramètres de fermentation ruminale et d'interactions avec l'hôte : production totale de gaz fermentaire, production de méthane, digestibilité du substrat, production quantitative et qualitative des acides gras volatiles.

L'analyse chimique révèle que la saison de collecte a un effet significatif sur tous les composants chimiques de l'*Atriplex canescens*, sauf en tanins condensés libres. Cet arbuste détient une teneur très élevée en protéines brute durant l'hiver, jusqu'à 200g/kgMS, il en conserve durant les trois saisons une teneur considérable (un peu plus de 150g/kg MS). Ce qui permet d'envisager cette plante comme un supplément additif en azote avec des fourrages ou des sous-produits fibreux. De ce fait, il serait intéressant d'évaluer l'activité métabolique du microbiote ruminal vis-à-vis de mélanges d'*Atriplex canescens* (source d'azote) et de graminées (source d'énergie) pour le développement d'un nouveau système d'alimentation, basé sur la complémentarité et la synergie de substrats locaux. Concernant sa teneur en constituants pariétaux, cet arbuste semble riche en parois totales, avec des teneurs modérées en lignine. De plus, les variations saisonnières ont des effets significatifs sur sa composition en constituants pariétaux qui s'avèrent très élevés en hiver et au printemps, par rapport aux valeurs obtenues pour l'été. Ceci est probablement dû aux conditions climatiques qui règnent dans la région de M'sila, caractérisée par des températures élevées et de faibles pluviométries.

Les tanins condensés enregistrés durant les trois saisons de collecte sont faibles (2-3% de MS). Par conséquent, peu de tanins condensés dans l'*Atriplex canescens* semblent avoir un potentiel bénéfique lorsqu'ils sont inclus dans l'alimentation des ruminants car ils peuvent augmenter le taux de protéines brutes qui échappent ainsi à la dégradation dans le rumen, sans pour autant diminuer la digestibilité des plantes fourragères. Néanmoins, l'effet des tanins sur l'activité métabolique du microbiote ruminale dépend non seulement de leur concentration mais également de leurs propriétés structurales et réactionnelles. D'où l'importance de

signaler que les méthodes d'analyses chimiques des tanins restent controversées et leurs résultats à considérer avec précautions.

Les essais de fermentescibilité et de digestibilité *in vitro* confirment raisonnablement l'effet de la saison de collecte sur la qualité fourragère de *L'A.canescens*. La baisse marquée de la production de gaz, de la production de méthane, de l'énergie métabolisable et de digestibilité (selon Tilly et Terry) au printemps sont étroitement associées à une augmentation des teneurs en fractions cellulaires moins digestibles (NDF et ADF) mais aussi à une diminution remarquable en PB de *L'A.canescens*.

Le méthane est l'un des gaz à effet de serre les plus puissants et il contribue de manière significative à la pollution de l'environnement. L'élevage contribue pour environ 20% à ses émissions, par le biais des microbiotes de ruminants et des fermentations des déchets d'origine animale. *L'A.canescens* a un faible impact sur la réduction de méthane, puisque son pourcentage pour les trois saisons de collecte est estimé entre 11 et 14%. Les différences entre *L'A.canescens*, durant les trois saisons, reflètent les différences observées dans les concentrations ADF, NDF, HCL et ADL.

A.canescens est une plante précieuse qui fournit un habitat faunique et la nourriture pour le bétail. Sa valeur nutritive est significativement affectée par la saison de collecte. Elle diminue au printemps et augmente durant l'été et l'hiver. *A.canescens* devrait être pâturée ou récoltée pendant l'hiver et l'été, étant donné qu'à ces deux saisons cet arbuste a une grande valeur d'énergie métabolisable et une forte teneur en protéines brutes. En outre, *A.canescens* peut être un élément de fourrage très efficace dans les régimes mixtes et en complémentarité pour le bétail, principalement en hiver et en été.

Cette étude montre également l'effet de la saison de collecte sur les caractéristiques chimiques de *Astragalus gombo*. Cette plante vivace, endémique des pâturages arides et désertiques de sable d'Algérie, détient une teneur très élevée en protéines brutes durant l'hiver (plus 280g/kgMS) qui chute jusqu'à 165g/kgMS en saison sèche. La faible teneur en PB d'*Astragalus gombo*, prélevé l'été, peut être probablement due aux proportions élevées de feuilles mûres dans l'échantillon. En effet, les fourrages légumineux et les arbustes sont usuellement employés comme aliments pour le bétail dans beaucoup de régions du monde, principalement en raison de leur haute teneur en valeur protéique.

Globalement, la composition de la fraction pariétale d'*Astragalus gombo* sur les trois saisons présente une composition très différente. Cette différence, observée dans nos échantillons, pourrait s'expliquer par les conditions environnementales régnant dans la région

d'étude : haute température et faibles précipitations. En effet, plusieurs auteurs indiquent que les mêmes paramètres tendent à augmenter la fraction pariétale (NDF) et à diminuer le contenu soluble des végétaux.

Cette étude montre également que les teneurs en tanins varient en fonction de la saison de récolte. Elles sont faibles avec des variations de même type d'une saison à l'autre. Le stress hydrique induit des augmentations de teneur en TC mais la répartition entre les tannins libres et liés ou non aux protéines dépend du stress subi durant la croissance de la plante. Les variations entre les différentes fractions des tanins peuvent être liées, non seulement aux saisons de collecte mais aussi à la méthode d'analyse. Avec des plantes riches en tanins, une difficulté majeure est le manque de techniques de laboratoire précises pour leur dosage.

L'Astragalus gombo, par sa richesse en protéines brutes et ses faibles teneurs en lignine, montre un bon potentiel nutritif pour les ruminants des zones arides. Soit en pâturage libre sur les parcours pastoraux, ou bien en complémentation des rations riches en fibres.

Dans notre étude, de grandes différences dans la valeur nutritive de *Calobota saharae*, évaluées par la production de gaz et la digestibilité de la matière sèche, sont observées. Elles résultent principalement du changement dans la maturité des feuilles collectées.

Une nette réduction en protéines brutes est associée à une augmentation des différents constituants pariétaux pendant l'été. Cette variation peut s'expliquer, en grande partie, par le stress hydrique subi par *Calobota saharae* pendant cette période où la plante tend à accumuler des structures fibreuses lignocellulosiques au détriment des composés azotés.

Les résultats présentés dans cette étude indiquent clairement que les différences majeures dans la valeur nutritive de *Calobota saharae*, en termes de composition chimique et de fermentation microbienne ruminale, sont causées par l'effet de la saison de croissance. *Calobota saharae* devrait être pâturée ou récoltée pendant l'hiver et le printemps, période où cet arbuste présente des valeurs importantes en énergie métabolisable et en protéines brutes, valorisables par les ruminants. Cette étude a aussi des implications pratiques pour le développement des technologies agro-forestières. *Calobota saharae* montre un bon potentiel comme arbuste fourrager significatif pour les projets de réhabilitation des écosystèmes dégradés dans les zones arides et semi-arides.

Du point de vue chimique, les variations temporelles démontrent que l'effet saison sur les différents résultats obtenus est significatif. Il s'exerce par les variations climatiques qui lui sont associées. En effet, on enregistre une variabilité nette pour la teneur en matière azotée totale et en constituants pariétaux, plus élevés au printemps par l'augmentation du rapport

feuilles/tige en cette saison. Par ailleurs, les fortes températures et la sécheresse de l'été engendrent une augmentation des composés pariétaux et de la cellulose brute.

On peut donc noter que, malgré les caractéristiques exceptionnelles d'adaptation de la flore spontanée saharienne aux conditions climatiques très rudes de leur milieu désertique, il est évident que leur survie, leur développement et leurs compositions chimiques dépendent étroitement des variations climatiques.

Les plantes médicinales représentent une source naturelle de molécules chimiques qui peuvent modifier positivement la fermentation ruminale. L'objectif assigné à cette partie de notre travail est l'étude de l'effet de trois plantes médicinales sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Dans cette optique ont été testées trois plantes médicinales choisies en fonction de leur caractéristiques thérapeutiques en médecine traditionnelle (*Nigella sativa*, *Rosmarinus officinalis*.L et *Zingiber officinale*). De manière générale, une forte réduction de méthane a été remarquée avec *Nigella sativa*. Un même résultat est constaté avec le Monensin mais et aucun effet n'est observé avec les autres traitements.

Cette étude confirme encore une fois donc que le Monensin inhibe significativement la production de CH₄ dans le rumen. Cette inhibition est le résultat indirect d'une diminution de la production d'ions hydrogène. Pour ce qui est de *Nigella sativa*, il est largement connu que cette plante est très riche en lipides et en stérols, ce qui pourrait être à l'origine de cette réduction. En effet, les graines de *Nigella sativa* renferment environ 0,4-2,5% d'huile essentielle, plus de 30% d'huiles fixes et 38% de lipides totaux, dont les phospholipides.

L'utilisation des plantes médicinales pour réduire la méthanogénèse est une piste intéressante par son caractère «naturel» apprécié par les consommateurs mais aussi parce qu'elle est facilement applicable en pratique. Cependant, vu le nombre élevé de molécules potentiellement intéressantes que pourraient contenir ces plantes et les réponses divergentes de l'écosystème microbien observées dans les différentes études, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour identifier les meilleures cibles ainsi que la détermination des molécules bioactives responsables.

Cette étude mérite d'être complétée par d'autres investigations *in vitro*, pour déterminer l'effet dose de *Nigella sativa* et aussi des études par le RUSITEC afin de s'assurer de la stabilité dans le temps des effets observés *in vitro*.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

- (A.N.A.T.), (2002). Agence Nationale pour l'Aménagement du Territoire. Plan d'aménagement de la wilaya de M'sila. Tome 1 Alger : 4-9.
- Abdel-aal, E., Aattia, R., (1993). Characterization of Black cumin (*Nigella sativa*) seeds. Alexandria Science Exchange Journal., 14: 497-482.
- Abdellah, A.L., Louvandani, H., Sallam, S. M. A. H. S., Bueno, I. C. S., Tsal, S. M., Figueira, A. V. O., (2012). *In vitro* evaluation, *in vivo* quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. Tropical Animal Health and Production., 44: 953-964.
- Abu-Zanat, M.W., Ruyleb, G.B., Abdel-Hamid, N.F., (2004). Increasing range production from fodder shrubs in low rainfall areas. Journal of Arid Environment., 59: 205-216.
- Agarwal, N., Shekhar, C., Kumar, R., Chaudhary, L.C., Kamra, D.N., (2009). Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. Animal Feed Science and Technology., 148: 321-327.
- Al-Gaby, A., (1998). Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with *Nigella sativa* cake protein. Die Nahrung., 42: 290-294.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Liama, M.J., Serra, J.L., (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. Process Biochemistry., 33: 21-28.
- Amghar, F., Forey, E., Margerie, P., Langlois, E., Brouri, L., Kadi-Hanifi, H., (2012). Grazing exclosure and plantation: a synchronic study of two restoration techniques improving plant community and soil properties in arid degraded steppes (Algeria). Revue d'Ecologie ., (7): 257-269.
- Ammar, H., Lopez, S., Gonzalez, J.S., (2005). Assessment of the digestibility of some Mediterranean shrubs by *in vitro* techniques. Animal Feed Science and Technol., 119: 323-331.
- Ammar, H., López, S., Bochi, O., Garcia, R., Ranilla, M.J., (1999). Composition and *in vitro* digestibility of leaves and stems of grasses and legumes harvested from permanent mountain meadows at different maturity stages. Journal Animal Feed Science., 8: 599-610.
- Ammar, H., Lopez, S., Gonzalez, J.S., Ranilla, M.J., (2004). Seasonal variations in the chemical composition and *in vitro* digestibility of some Spanish leguminous shrub species. Animal Feed Science and Technology., 115: 327-340.
- Ando, S., Nishida, T., Ishida, M., Hosoda, K., Bayaru, E., (2003). Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. Livestock Production Science., 82: 245-248.
- Anele, U.Y., Arigbede, O.M., Südekum, K.H., Oni, A.O., Jolaosho, A.O., Olanite, J.A., Adeosun, A.I., Dele, P.A., Ike, K.A., Akinola, O.B., (2009). Seasonal chemical composition, *in vitro* fermentation and *in sacco* dry matter degradation of four indigenous multipurpose tree species in Nigeria. Animal Feed Science and Technology., 154: 47-57.
- Angelidaki, I., Mogensen, A.S., Ahring, B.K., (2000). Degradation of organic contaminants found in organic wastes. Biodegradation., 11: 377-83.
- Anuraga, M., Duarsa, P., Hill, M. J. and Lovett, J. V., (1993). Soil moisture and temperature affect condensed tannin concentrations and growth in *Lotus corniculatus* and *Lotus pedunculatus*. Australian Journal of Agricultural Research., 44:1667.
- AOAC., (2005). Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed. Washington, D.C.
- Arhab, R., (2006). Etude 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. Université Mentouri de Constantine, 150p.
- Atta, M.B., (2003). Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. Food Chemistry., 83:63-68.

- Ayres, M.P., Clausen, P.H., Maclean, S.F., Redman, A.M., Reichart, P.B., (1997). Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. *Ecology.*, 78 (6): 1696-1712.
- Baba-Moussa, F., Akpagana, K., Bouchet, P., (1999). Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology.*, 66: 335-338.
- Bahman, A.M., Topps, J.H., Rooke, J.A., (1997). Use of date palm leaves in high concentrate diets for lactating Friesian and Holstein cows. *Journal of Arid Environments.*, 35: 141-146.
- Baldwin, R.L., Emery, R.S., (1960). The oxidation-reduction potential of rumen contents. *Journal of Dairy Science.*, 43: 506-511.
- Ballet, N., (1989). Contribution à l'étude cinétique de la lignification et à l'étude de l'action d'un inhibiteur de ce processus chez le blé et le maïs. Mesures obtenues par voies biochimiques et histologiques. D.E.A., Université Blaise-Pascal, Clermont -Ferrand, France.
- Bamualim, A., Jones, R.J., Murray, R.M., (1980). Nutritive value of tropical browse legumes in the dry season. *Proceeding of the Australian Society of Animal Production.*, 13: 229-232.
- Barone, R., (1984). Splanchnologie I. Appareil digestif, Appareil respiratoire. Tome 3. In: Anatomie comparée des mammifères domestiques. 2^{ème} édition. Eds. Vigot, Paris. pp 333-379.
- Barry, T.N., (1987). Secondary compounds of forages. In: Nutrition of Herbivores, Hacker, J-B., Ternouth, J-H., (Eds). Academic Press, Sydney; pp: 91-120.
- Bate-Smith, E., (1973). Tannins of herbaceous leguminosae. *Phytochemistry.*, 12: 1809 -1812.
- Baucher, M., Monties, B., Montagu, M.V., Boerjan, W., (1998). Biosynthesis and Genetic Engineering of Lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences.*, 17: 125-197.
- Bauman, D.E., Griinari, J. M., (2001). Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livestock Production Science.*, 70: 15-29.
- Beauchemin, K.A., McAllister, T.A., McGinn, S.M., (2009). Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Reviews: Perspectives in Agric. Veterinary science nutrition nat. Resources.*, CABI, Wallingford, Royaume-Uni. 4: 1-18.
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., (2006). Effects of various feed additives on the methane emissions from beef cattle. *International Congress Series.*, 1293: 152-155.
- Béguin, P., Aubert, J.P., (1994). The biological degradation of cellulose. *Microbiology Reviews.*, 13:25-58.
- Benchaar, C., McAllister, T.A., Chouinard, P.Y., (2008). Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. *Journal of Dairy Science.*, 91: 4765-4777.
- Benhaddou-Andaloussi, A., (2009). Étude des propriétés antidiabétiques de *Nigella sativa* : sites d'action cellulaires et moléculaires. Thèse (PhD) en Pharmacologie Université de Montréal. 249 p
- Benkheira, A., Ouboussad, S. et Bessah, G., (2005). Plan de gestion du site Mergueb. Wilaya de M'Sila. Direction générale des forêts : 86-88.
- Bennick, A., (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine.*, 13 (2): 184-196.
- Bergman, E. N., (1990). Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiology Review.*, 70: 567-590.
- Blanco, P., Sieiro, C., Villa, G.T., (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters.*, 175:1-9.
- Bledzki, A.K., Gassan, J., (1999). Composites reinforced with cellulose based fibres. *Progress in Polymer Science.*, 24 : 221-274.

- Blummel, M., Orskov, E.R., (1993). Comparison of an *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*., 40: 109-119.
- Bobe, G., Young, J.W., Beitz, D.C., (2004). Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science*., 87: 3105-3124.
- Bodas, R., Lopez, S., Fernandez, M., Gacia-Gonzalez, R., Rodriguez, A.B., Wallace, R.J., Gonzalez, J.S., (2008). *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*., 145:245-258.
- Bonhomme, A., (1990). Rumen ciliates: their metabolism and relationships with bacteria and their hosts. *Animal Feed Science and Technology*., 30:203-266.
- Bonnemoy, F., Fonty, G., Michel, V., Gouet, P., (1993). Effect of anaerobic fungi on the ruminal proteolysis in gnotobiotic lambs. *Reproduction Nutrition and Development*., 33: 551-555.
- Bonnin, E., Dolo, E., Le Goff, A., Thibault, JF., (2002). Characterisation of pectin subunits released by an optimised combination of enzymes. *Carbohydrate Research*., 337: 1687-1696.
- Bourbouze, A., (2006). Systèmes d'élevage et production animale. *Sécheresse*., 17(1-2) : 31-46.
- Boon, E.J.M.C., Struik, P.C., Engels, F.M., Cone, J.W., (2012). Stem characteristics of two forage maize (*Zea mays* L.) cultivars varying in whole plant digestibility. IV. Changes during the growing season in anatomy and chemical composition in relation to fermentation characteristics of a lower internode. *Njas-Wageningen Journal of Life Sciences*., 59: 13-23.
- Boon, E.J.M.C., Struik, P.C., Tamminga, S., Engels, F.M., Cone, J.W., (2008). Stem characteristics of two forage maize (*Zea mays* L.) cultivars varying in whole plant digestibility. III. Intra-stem variability in anatomy, chemical composition and *in vitro* rumen fermentation. *Njas Wageningen Journal of Life Sciences*. 56: 101-122.
- Bouazza, L., (2014). Etude de la valeur nutritive de légumineuses arbustives du genre *Acacia*. Effets spécifiques de leurs hautes teneurs en tannins condensés sur la méthanogénèse ruminale d'ovins. Thèse de doctorat en Sciences. Université Constantine 1, 154 p.
- Bouazza, L., Bodas, R., Boufennara, S., Bousseboua, H., Lopez, S., (2012). Nutritive evaluation of foliage from fodder trees and shrubs characteristic of Algerian arid and semi-arid areas. *Journal of Animal Feed Science*., 21:521-536.
- Boufennara, S., (2012). Effet des tanins sur la fermentescibilité *in vitro* et la digestibilité *in sacco* de végétaux et de sous-produits de l'agronomie des zones arides. Essai de modélisation des fermentations du microbiote ruminal. Thèse de doctorat en Sciences. Université Mentouri de constantine.
- Boufennara, S., Lopez, S., Bousseboua, H., Bodas, R., Bouazza, L., (2012). Chemical composition and digestibility of some browse plant species collected from Algerian arid rangelands. *Spanish Journal of Agricultural Research*., 10:88-98.
- Bourquin, C.D., Fahey, J.G.C., (1994). Ruminal digestion and glycolyse linkage patterns of cell wall compounds from leaf and stem fractions of alfalfa or chardgrass and wheat straw. *Journal of Animal Science*., 72: 1362-1374.
- Breet, C.T., Waldron, K., (1996). *Physiology and biochemistry of plant cell walls*, 2nd ed. Chapman & Hall.
- Brock, F.M., Forsberg, C.W., Buchanan-Smith, J.G., (1982). Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. *British Journal of Nutrition*., 50: 769-782.
- Broudiscou, L.P., 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: 431-440.

- Broudiscou, L.P., Papon, Y., 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: 183–189.
- Brugère, H., (1983). Biochimie du rumen – Aspects physiologiques. *Bull. GTV.*, 3: 5-22.
- Bruneton, J., (1999). Les tanins. Ed. Editions médicales internationales, Paris, 369-404.
- Brunet, S., (2008). Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestifs des ruminants. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse. 246 p.
- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. (2005b). Screening for the effects of natural plant extracts and secondary metabolites on rumen microbial fermentation in continuous culture system. *Animal Feed Science and Technology.*, 123–124 : 597-613.
- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, P. W. Cardozo, and C. Kamel. (2005a). Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *Journal of Dairy Science.*, 88:2508-2516.
- Cabiddu, A., Decandia, M., Sitzia, M., Molle, G., (2000). A note on the chemical composition and tannin content of some Mediterranean shrubs browsed by Sarda goats. In: Ledin, I., orandFehr, P. (Eds.), *Sheep and Goat Nutrition: Intake, Digestion, Quality of Products and Rangelands. Cahiers Options Méditerranéennes.*, 52:175-178.
- Callaways, T.R., Carneiro de Melo, A.M.S., Russel, J.N., (1997). The effect of nisin and monensin on ruminal fermentations in vitro. *Current microbiology.*, 35: 90-96.
- Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., (2004). Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science.*, 82: 3230-3236.
- Carla, R. S., Sergej, L. Chanka, A., Stéphane, M., D, Michael, K., (2011). Ruminal methane inhibition potential of various pure compounds in comparison with garlic oil as determined with a rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition .*, 106: 114-122.
- Carpita, N.C., (1996). Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.*, 47: 445-476.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A., Losa, R., (2005). Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. *Animal Feed Science and Technology.*, 119:29-41.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Martín-Ereso, J., Ter Wijlen, H., (2008). *In vitro* evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. *Animal Feed Science and Technology.*, 145:259-270.
- Chabbert, B., Tollier, M.T., Monties, B., Barriere, Y., Argillier, O., (1994a). Biological variability in lignification of maize: expression of the brown midrib bm2 mutation. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 64: 455-460.
- Chabbert, B., Tollier, M.T., Monties, B., Barriere, Y., Argillier, O., (1994b). Biological variability in lignification of maize: expression of the brown midrib bm3 mutation in three maize cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 64: 349-355.
- Chaieb, K., Kouidhi, B., Jrah, H., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., (2011). Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *Complementary and Alternative Medicine.*, 11:29.
- Chapman, H.D., Jeffers, T.K., Williams, R.B., (2010). Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. *Poultry Science.*, 89:1788-1801.
- Chaucheyras-Durand, F., Durand, H., (2010). Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes.*, 1: 3-9.
- Chaucheyras-Durand, F., Walker, N.D., Bach, A., (2008). Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Animal Feed Science and Technology.*, 145: 5-26.

- Cheng, K.J., Costerton, J.W., (1980). Adherent rumen bacteria -their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. In: Digestive physiology and metabolism in ruminants Ruckebush, Y.T.P. (Ed.). Falcon house, Lancaster, England, pp. 227-250.
- Cheng, K.J., Forsberg, C.W., Minato, H., Costerton, J.W., (1991). Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. In: Tsuda, T., Sasaki, Y., Kawashima, R. (Eds.), Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. Proc 7th int. symp. ruminant physiology, Sendai, Japan, Academic Press, Inc, pp. 595-624.
- Chesson A., Steward C.S., Wallace R.J., (1982). Influence of plant phenolics acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. Applied Environmental Microbiology., 44: 597-603.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., Doreau, M., (2007). Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. European Journal of Lipid Science and Technology., 109: 828-855.
- Chiquette, J., Benchaar, C., (2005). Effects of different dose levels of essential oils compounds on in vitro methane production by mixed ruminal bacteria. Journal of Animal Science., 83(1): 306.
- Christophe, G., (2007). Étude de *Fibrobacter succinogenes* en bioréacteur anaérobie en vue de la dégradation de déchets végétaux. Thèse de doctorat université Blaise Pascal.
- Coleman, G.S., (1975). The interrelationship between rumen ciliate protozoa and bacteria. In: Mc Donald, W., Warner, A.C.I. (Eds.), Digestion and metabolism in the ruminant. The university of New England publ, Armidale, USA, pp. 149-164.
- Coleman, G.S., (1983). Hydrolysis of fraction I leaf protein and casein by rumen entodiniomorphid protozoa. Journal of Applied Bacteriology., 55: 111-118.
- Collingborn, F.M.B., Gowen, S.R., Mueller-Harvey, I., (2000). Investigations into the biochemical basis for nematode resistance in roots of three Musa cultivars in response to *Radopholus similis* infection. Journal of Agriculture and Food Chemistry., 48: 5297-5301.
- Combrinck, S., Du Plooy, G.W., Mccrindle, R.I., Botha, B.M., (2007). Morphology and Histochemistry of the Glandular Trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). Annals of Botany., 99 (6): 1111-1119.
- Conchie, J., (1954). b-Glucosidase from rumen liquor. Preparation, assay and kinetics of action. Biochemistry Journal., 58: 552-560.
- Cosgrove, D.J., (2005). Growth of the plant cell wall. Nature Reviews Molecular Cell Biology., 6: 850-861.
- Counotte, G.H.M., Lankhorst, H., Prins, R.A., (1982). Role of DL-lactic as an intermediate in rumen metabolism of dairy cows. Journal of Animal Science., 56: 1222-1235.
- Cowan, M.M., (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews., 12 : 564-582.
- Currie, H.A., Perry, C.C., (2007). Silica in plants: Biological, biochemical and chemical studies. Annals of Botany., 100: 1383-1389.
- De Puytorac, P.J. Grain, Mignot, J.P., (1987). Précis de parasitologie. Boubée éd.
- Demeyer, D., Van Nevel, C.J., (1975). Methanogenesis, an integrated part of carbohydrate fermentation and its control. In: Mcdonald, L.W., Warner, A.C.I. (Ed.). Digestion and metabolism in the ruminant. Armidale, Australia: University of New England Publishing Unit, p. 366-382.
- Denman, S.E., Tomkins, N.W., McSweeney, C.S., (2007). Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. FEMS Microbiology Ecology., 62: 313-322.

- DePeters, E.J., Fadel, J.G., Arana, M.J., Ohanesian, N., Etchebarne, M.A., Hamilton, C.A., (2000). Variability in chemical composition of seventeen selected by-products feedstuffs used by the California dairy Industry. *Professional Animal Science.*, 15 : 1-31.
- DePeters, E.J., Fadel, J.G., Arosemena, A., (1997). Digestion kinetics of neutral detergent fiber and chemical composition within some selected by-product feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology.*, 67: 127-140.
- Dijkstra, J., Boer, H., Van Bruchem, J., Bruining, M., Tamminga, S., (1993). Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. *British Journal of Nutrition.*, 69: 385-396.
- Dione, D., (1991). Etude de deux mécanismes physiologiques d'adaptation à la sécheresse chez deux variétés d'arachide (57-422 et CHICO) : croissance racinaire et absorption hydrique. DEA Biologie Végétale. Faculté des Sciences et Technologies., Université Cheikh A Diop Dakar-620.
- Doelle, H.W., (1969). Chemosynthesis- Anaerobic respiration. In: *Bacterial Metabolism*. Academic Press, New York and London. pp 89-127.
- Dohme, F., Machmüller, A., Wasserfallen, A., Kreuzer, M., (2001). Ruminant methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. *Letters in Applied Microbiology.*, 32: 47-51.
- Dominiczak, A., Lazar, D., Das, A., Bohr, D., (1991). Lipid Bilayer in genetic Hypertension. *Hypertension.*, 18 : 748-757.
- Doré, J., Gouet, P., (1991). Microbial interactions in the rumen. In: Jouany, J.P. (Ed.), *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*. Paris, France, pp. 71-88.
- Doreau, M., Dollé, J.B., (2011). Strategies for reducing greenhouse gas emissions in dairy production. A European perspective. *Proc. Eastern Nutr. Conf.*, Montréal, Canada.12-13.
- Doreau, M., Ferlay, A., (1995). Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a review. *Livestock Production Science.*, 43: 97-110.
- Dzowela, B.H., Hove, L., Topps, J.H., Mafongoya, P.L., (1995). Nutritional and anti-nutritional characters and rumen degradability of dry matter and nitrogen for some multi-purpose tree species with potential for agroforestry in Zimbabwe. *Animal Feed Science and Technology.*, 55: 207-214.
- El Hassan, S.M., Lahlou-Kassi, A., Newbold, C.J., Wallace, R.J., (2000). Chemical composition and degradation characteristics foliage of some African multipurpose trees. *Animal Feed Science and Technology.*, 86: 27- 37.
- El Shaer, H.M., (2010). Halophytes and salt-tolerant plants as potential forage for ruminants in the Near East region: Review. *Small Ruminants Research.*, 91: 3-12.
- El-Dhaw, Z.Y., Abdel-Munaem Nadia, M., (1996). Chemical and biological values of black cumin seeds. *Journal of Agricultural Science El-Mansoura University.*, 21:4149-4159.
- Elsden, S.R., Volcani, B.E., Gilchrist, F.M.C., Lewis, D., (1956). Properties of a fatty acid forming organism isolated from the rumen of sheep. *Journal of Bacteriology.*, 72: 681-689.
- Eugene, M., (2002). Effets de la defaunation des ruminants sur les performances de production, en fonction de la ration ingérée. Etude de la variation de la protéosynthèse et de la cellulolyse microbienne ruminale. Thèse de doctorat, institut national agronomique Paris-Grignon.
- Eugène, M., Archimède, H., Sauvart, D., (2004). Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. *Livestock Production Science.*, 85: 81-97.
- Evitayani Warly, L., Fariani, A., Ichinohe, T., Abdulrazak, S.A., Fujihara, T., (2004). Comparative rumen degradability of some legumes forages between wet and dry seasons in west Sumatra, Indonesia. *Asian-Austral Asian Journal of Animal Science.*, 17: 1107-1111.
- FAO., (2009). FAOSTAT statistical database. Rome (available at faostat.fao.org).

- Fagg, C.W., Stewart, J.L., (1994). The value of Acacia and Prosopis in arid and semi-arid environments. *Journal of Arid Environment.*, 27: 3-25.
- Faivre, C.I., Lejeune, R., Staub, H., Goetz, P., (2006). *Zingiber officinale* Roscoe. *Phytothérapie.*, 4(2): 99-102.
- Falconer, M.L., Wallace, R.J., (1998). Variation in proteinase activities in the rumen. *Journal of Applied Microbiology.*, 84: 377-382.
- Fengel, D., Wegener, G., (1984). Distribution of the component within the wood cell wall. in: Fengel, D., Wegener, G. (Eds.), *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Verlag Kessel, pp. 227-239.
- Ferme, D., Banjac, M., Calsamiglia, S., Busquet, M., Kamel, C., Avgustin, G. (2004). The effects of plant extracts on microbial community structure in a rumen-simulating continuous-culture system as revealed by molecular profiling. *Folia Microbiol.*, 49:151-5.
- Feucht, W., Treutter, D. (1999). The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defense. In: *Principles and practices in chemical ecology*, PRESS et BOCA RATON (Eds.), pp. 307-338.
- Finlay, B.J., Esteban, G., Clarke, J.K., Williams, G.A., Embley, T.M., Hirt, R.P., (1994). Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters.*, 117: 157-161.
- Fonty, G., Forano, E., (1999). Ecologie de la dégradation et de la fermentation des polyholsides constitutifs des parois végétales dans le rumen. *Cahiers Agricultures.*, 8: 21-35.
- Fonty, G., Gouet, P., Jouany, J., Senaud, J., (1987). Establishment of the Microflora and Anaerobic Fungi in the Rumen of Lambs. *Journal of General Microbiology.*, 133: 1835-1843.
- Fonty, G., Joblin, K., Chavarot, M., Roux, R., Naylor, G., Michallon, F., (2007). Establishment and development of ruminal hydrogenotrophs in methanogen-free lambs. *Applied Environmental Microbiology.*, 73: 6391-6403.
- Fonty, G., Joblin, K.N., (1991). Rumen anaerobic fungi : their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fibre digestion. In: Tsuda, T., Sasaki, Y., Kawashima, R. (Eds.), *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 655-679.
- Fonty, G., Jouany, J.P., Forano, E., Gouet, P.H., (1995). L'écosystème microbien du réticulo-rumen. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (Eds.), *Nutrition des ruminants domestiques, ingestion et digestion*. Paris, France, pp. 299-348.
- Forano, E., Broussolle, V., Durand, R., (1996). Degradation of plant cell wall polysaccharides by rumen bacteria and fungi. *Annales de Zootechnie.*, 45: SUPP1.
- Ford, C.V., (1983). Effect of particle size and delignification on the rate of digestion of hemicellulose and cellulose by the cellulase in the mature pangola grass species. *Australian Journal of Agricultural Research.*, 34: 241-248.
- Foskolos, A., Siurana, A., Rodriguez-Prado, M., Ferret, A., Bravo, D., Calsamiglia, S., (2015). The effects of a garlic oil chemical compound, propyl-propane thiosulfonate, on ruminal fermentation and fatty acid outflow in a dual-flow continuous culture system. *Journal of Dairy Science.*, 98:1-10.
- García-González, R., López, S., Fernández, M., Bodas, R., González, J. S., (2008). Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology.*, 147: 36-52.
- Gasmi-Boubaker, A., Kayouli, C., Buldgen, A., (2005). In vitro gas production and its relationship to in situ disappearance and chemical composition of some mediterranean browse species. *Animal Feed Science and Technology.*, 124: 303- 311.
- Genin, D., Kadria, A., Khorchani, T., Sakkal, K., Belgacem, F., Hamadi, M., (2004). Valorisation of date palm by-products for livestock feeding in southern Tunisia. Potentialities and traditional utilization. In: *Nutrition and feeding Strategies of sheep and goats under harsh*

- climates. Ben salem, H., Nefzaoui, A., Morand-Fehr, P., (Eds.), CIHEAM, Cahiers Options Méditerranéennes., 59 : 221-226.
- Getachew, G., Blummel, M., Makkar, H.P.S., Becker, K., (1998). *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*., 72: 261-281.
- Getachew, G., DePeters, E.J., Robinson, P.H., Fadel, J.G., (2005). Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. *Animal Feed Science and Technology*., (123-124): 547-559.
- Getachew, G., Robinson, P.H., DePeters, E.J. and Taylor, S.J., (2004). Relationships between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*., 111 : 57-71.
- Giger-Reverdin, S., Duvaux-Ponter, C., Sauvant, D., Martin, O., Nunes Do Prado, I., Muller, R., (2002). Intrinsic buffering capacity of feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*., 96, 83-102.
- Gigon, F., (1997). Le gingembre, une épice contre la nausée. *Phytothérapie*., 2012 ; 10(2) :87-91.
- Goel, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., (2008). Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. *Animal Feed Science and Technology*., 147: 72-89.
- Goel, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., (2009). Inhibition of methanogens by bro-mochloromethane: effects on microbial communities and rumen fermentation using batch and continuous fermentations. *British Journal of Nutrition*., 101: 1484-1492.
- Goodrich, R.J., Garnett, J.E., Gast, D.R., Kirick, M.A., Larson, D.A., Meiske, J.C., (1984). Influence of monensin on the performance of cattle. *Journal of Animal Science*, Albany., 58: 1484-1498.
- Gouet, P.H., J. Grain, H.C., Dubourguier, Albagnac, G., (1986). Interactions entre espèces microbiennes anaérobies dans le rumen. *Reproduction Nutrition and Développement*., 26 : 147-149.
- Guangyou, H., (2011). "Effect of polyploidy on ecophysiology of fourwing saltbush: implications for its sustainable use in agriculture and degraded land reclamation." CID Research Fellow and Graduate Student Working Paper No. 52. Center for International Development at Harvard University, August.
- Gunal, M., Ishlak, A., Abughazaleh, A.A., (2013). Evaluating the effects of six essential oils on fermentation and biohydrogenation in *in vitro* rumen batch cultures. *Czech Journal of Animal Science*., 6: 243-252.
- Guo, Y.Q., Liu, J.X., Lu, Y., Zhu, W.Y., Denman, S.E., McSweeney, C.S., (2008). Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen microorganisms. *Letters in Applied Microbiology*., 47: 421-426.
- Guo, Y.Q., Liu, J.X., Zhu, W.Y., McSweeney, C., (2007). Shifts of rumen microbial population detected by real-time PCR when methanogenesis is inhibited. *Journal of Animal Feed Science*., 16: 107-112.
- Haddi, M.L., Filacorda, S., Meniai, K., Rollin, F., Susmel, P., (2003). *In vitro* fermentation kinetics of some halophyte shrubs sampled at three stages of maturity. *Animal Feed Science and Technology*., 104:215- 332.
- Hagerman, A.E., (2002). Tannin Chemistry (www.users.muohio.edu/hagermae).
- Hagerman, A.E., Robbins, C.T., Weerasuriya, Y., Wilson, T.C., McArthur, C., (1992). Tannins chemistry in relation to digestion. *Journal of Range Management*., 45: 57-62.
- Hamilton, C., Hamilton, R., (2003). Fourwing saltbush. ScienceViews.com. [Online] Available at 334 <http://scienceviews.com/plants/fourwingsaltbush.html> (verified 25 October 2014).
- Harvey, D., (2005). Modern analytical chemistry. Depauw University. USA.

- Hatano, T., Kusuda, M., Inada, K., Ogawa, T.-O., Shiota, S., Tsuchiya, T., Yoshida, T., (2005). Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 66: 2047-2055.
- Hess, H.D., Kreuzer, M., Diaz, T.E., Lascano, C.E., Carulla, J.E., Soliva, C.R., Machmuller, A., (2003). Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology*, 109: 79-94.
- Hillman, K., Lloyd, D., Williams, A.G., (1985). Use of a portable quadrupole mass spectrometer for the measurement of dissolved gas concentrations in ovine rumen liquor in situ. *Current Microbiology*, 12: 335-340.
- Hino, T., Kuroda, S., (1993). Presence of lactate dehydrogenase and lactate racemase in *Megasphaera elsdenii* grown on glucose or lactate. *Applied Environmental Microbiology*, 59: 255-259.
- Hino, T., Russel, J.B., (1985). Effect of reducing-equivalent disposal and NADH / NAD on deamination of amino acids by intact rumen micro-organisms and their cell extracts. *Applied Environmental Microbiology*, 50: 1368-1374.
- Hino, T., Shimada, K., Marruyama, T., (1994). Substrate preferences in a strain of *Megasphaera elsdenii*, a ruminal bacterium, and its implications in propionate production and growth competition. *Applied Environmental Microbiology*, 60:1827-1831.
- Hristov, A.N., Ivan, M., Neill, L., McAllister, T.A., (2003). Evaluation of several potential bioactive agents for reducing protozoal activity *in vitro* . *Animal Feed Science and Technology*, 105: 163-184.
- Hristov, A.N., McAllister, T.A., Van Herk, F.H., Cheng, K.J., Newbold, C.J., Cheeke, P.R., (1999). Effect of *Yucca schidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in heifers. *Journal of Animal Science*, 77: 2554-2563.
- Hungate, R.E., (1966). The rumen bacteria. In: Hungate, R.E. (Ed.). *The rumen and its microbes*. Academic Press INC, New York and London, pp. 8-10.
- Hvelplund, T., (1991). Volatile fatty acids and protein production in the rumen. In *rumen microbial metabolism and ruminant digestion*, pp. 165-178. Edited by J.P. Jouany. Paris: INRA.
- Iason G.R., Hodgson J., Barry T., (1995). Variation in condensed tannin concentration of a temperate grass (*Holcus Lanatus*) in relation to season and reproductive development. *Journal of Chemistry and Ecology*, 21: 1103-1112.
- Inspection de l'environnement. (2002). Rapport sur l'état de l'environnement de la wilaya de M'sila.
- Iwasaki, K., Inoue, M., Matsubara, Y., (1998). Continuous hydrolysis of pectate by immobilized endo-polygalacturonase in a continuously stirred tank reactor. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62: 262-272.
- Janssen, P.H., Kirs, M., (2008). Structure of the *Archaeal* Community of the rumen. *Applied environmental Microbiology*, 74: 3619-3625.
- Jarvis, G.N., Strompl, C., Burgess, D. M., Skillman, L. C., Moore, E. R. B., Joblin, K. N., (2000). Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. *Current Microbiology*, 40: 327-332.
- Jayanegara, A., Wina, E., Soliva, C.R., Marquardt Kreuzer, M., Leiber, F., (2011). Dependence of forage quality and methanogenic potential of tropical plants on their phenolic fractions as determined by principal component analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 163 (2-4): 231-243.
- Johnson, F. L., Hoagland B.W., (1999). Catalog of the woody plants of Oklahoma: description and range maps. Oklahoma biological survey. (www.biosurvey.ou.edu/shrub/shrubndx.htm).
- Johnson, J.A., Caton, J.S., Poland, W., Dhuyvetter, D.V., (1998). Influence of season on dietary composition, intake, and digestion by beef steers grazing mixed-grass prairie in the northern great plains. *Journal of Animal Science*, 76:1682-1690.

- Jouany, J.P., (1982). Dosage des acides gras volatils dans les contenus digestifs, les jus d'ensilage, les cultures bactériennes et les contenus de fermenteurs anaérobies. *Sciences des Aliments.*, 2: 131-144.
- Jouany, J.P., (1988). Effect of diet on populations of rumen protozoa in relation to fibre digestion. In :Nolan, J.V., Leng, R.A., Demeyer, D.I. The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion. Penambul Books, Armidale, NSW, 59-74.
- Jouany, J.P., (1994). Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. INRA (France), *Productions Animales.*, 7 (3): 207-225.
- Jouany, J.P., Morgavi, D.P., (2007). Use of "natural" products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal.*, 1: 1443-1466.
- Jouany, J.P., Ushida, K., (1998). The role of protozoa in feed digestion. *Asian-Australasian Journal of Animal Science.*, 12: 113-128.
- Jouany, J.P., Ushida, K., (1990). Protozoa and fibre digestion in the rumen. In: Hoshino, S., Onodera, R., Minato, H., Itabashi, H. (Eds.), *The rumen ecosystem. The microbial metabolism and its regulation.* Japan, pp. 139-150.
- Jung, H.G., Deetz, D.A., (1993). Cell wall lignification and degradability. p. 315-346, In Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., Ralph, J. eds . *Forage Cell Wall Structure and Digestibility.* ASA-CSSA-SSSA, Madis on, WI, USA.
- Kaitho, R.J., Nsahlai, I.V., Williams, B.A., Umunna, N.N., Tamminga, S., Van Bruchen, J., (1998). Relationship between preference, rumen degradation, gas production and chemical composition of browses. *Agroforestry Systems.*, 39: 129-144.
- Kamalak, A., Canbolat, O., Gurbuz, Y., Erol, A., Ozay, O., (2005). Effect of maturity stage on chemical composition, *in vitro* and *in situ* dry matter degradation of tumbleweed hay (*Gundelia tournefortii* L). *Small Ruminant Research.*, 58: 149-156.
- Kamra, D.N., Agarwal, N., Chaudhary, L.C., (2006). Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series.*, 1293: 156-163.
- Kaplan, M., Kamalak, A., Kzsra, A.A., Guven, İ., (2014). Effect of Maturity Stages on Potential Nutritive Value, Methane Production and Condensed Tannin Content of *Sanguisorba minor* Hay. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi.*, 20: 445-449.
- Karnati, S.K., Yu, Z., Sylvester, J.T., Dehority, B.A., Morrison, M., Firkins, J.L., (2003). Technical note: Specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. *Journal of Animal Science.*, 81:812-815.
- Kitchen, S.G., Mc Arthur, E.D., (2001). Native or not: Subjective labels and their application in wildland plantings. *Native plant journal.*, 2:21-23.
- Klieve, A.V., Bain, P.A., Yokoyama, M.T., Ouwerkerk, D., Forster, R.J., Turner, A.F., (2004). Bacteriophages that infect the cellulolytic ruminal bacterium *Ruminococcus albus* AR67. *Letters of Applied Microbiology.*, 38: 333-338.
- Klieve, A.V., Bauchop, T., (1988). Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. *Applied and Environmental Microbiology.*, 54: 1637-1641.
- Klieve, A.V., Swain, R.A., (1993). Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pulsed-field gel electrophoresis and laser densitometry. *Applied and Environmental Microbiology.*, 59: 2299-2303.
- Kobayashi, Y., (2010). Abatement of Methane Production from Ruminants: Trends in the Manipulation of Rumen Fermentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Science.*, 23(3):410-416.
- Koike, S., Handa, Y., Goto, H., Sakai, K., Miyagawa, E., Matsui, H., Ito, S., Kobayashi, Y., (2010). Molecular monitoring and isolation of previously uncultured bacterial strains from the sheep rumen. *Applied Environmental Microbiology.*, 76:1887-1894.

- Kolb, E., (1975). Physiologie de la digestion et de l'absorption. Chapitre IV. In: Physiologie des animaux domestiques. Editeurs Vigot Frères, Paris, France. pp 251-284.
- Krause, D.O., Smith, W.J., Ryan, F.M., Mackie, R.I., McSweeney, C.S., (1999). Use of 16S-rRNA Based Techniques to Investigate the Ecological Succession of Microbial Populations in the Immature Lamb Rumen: Tracking of a Specific Strain of Inoculated Ruminococcus and Interactions with Other Microbial Populations *in Vivo*. *Microbial Ecology.*, 38 (4) : 365-376.
- Krim, M., (2014). L'importance des antioxydants (Gingembre) dans la réduction des effets toxiques induits par les chromates chez les rats Doctorat 3ème cycle Université Badji Mokhtar – Annaba. 170p.
- Kumara Mahipala, M.B.P., Krebs, G.L., McCafferty, P., Gunaratne, L.H.P., (2009). Chemical composition, biological effects of tannin and *in vitro* nutritive value of selected browse species grown in the West Australian Mediterranean environment. *Animal Feed Science and Technology.*, 153: 303-215.
- Kumar, R., Singh, M., (1984). Tannins: Their adverse role in ruminant nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 32: 447-453.
- Kutschera, U., Nikas, K.J., (2007). The epidermal-growth-control theory of stem elongation: An old and a new perspective. *Journal of Plant Physiology.*, 164: 1395-1409.
- Lana, R.P., Russel, J.B., Van Amburg, M.E., (1998). "The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production", *Journal of Animal Science.*, 76: 2190-2196.
- Larbi, A., Smith, J.W., Kurdi, I.O., Adekunle, I.O., Raji, A.M., Ladipo, D.O., (1998). Chemical composition, rumen degradation and gas production characteristics of some multipurpose fodder tree and shrubs during wet and dry season in the humid tropics. *Animal Feed Science and Technology.*, 72: 81-96.
- Larbi, A., Smith, J.W., Raji, A.M., Kurdi, I.O., Adekunle, I.O., Ladipo, D.O., (1997). Seasonal dynamics in dry matter degradation of browse in cattle, sheep and goats. *Small Ruminant Research.*, 25: 129-140.
- Le Houérou, H.N., (2000). Use of fodder trees and shrubs in the arid and semi-arid zones of West Asia and North Africa: history and perspectives. In: Gintzburger, G., M. Bounejmate, Nefzaoui, A (eds.). *Fodder Shrub Development in Arid and Semi-arid Zones. Proceedings of the Workshop on Native and Exotic Fodder Shrubs in Arid and Semi-arid Zones, 27 October-2 November 1996, Hammamet, Tunisia. ICARDA, Aleppo (Syria). Vol. I: 9-53.*
- Lees G.L., Hinks C.F., Suttill N.H., (1994). Effect of high temperature on condensed tannin accumulation in leaf tissues of big trefoil (*Lotus uliginosus* Schkur). *Journal of Science of Food and Agriculture.*, 65: 415-421.
- Lévêque, C., (2001). *Ecologie. De l'écosystème à la biosphère.* Masson Sciences. Dunod, Paris. 502p.
- Lin, B., Wang, J.H., Lu, Y., Liang, Q., Liu, J.X., (2013). *In vitro* rumen fermentation and methane production are influenced by active components of essential oils combined with fumarate. *Animal Physiology and Animal Nutrition.*, 97 (1): 1-9.
- Lila, Z.A., Mohammed, N., Kanda, S., Kamada, T., Itabashi, H., (2003). Effect of sarsaponin on ruminal fermentation with particular reference to methane production *in vitro*. *Journal of Dairy Science.*, 86: 3330-3336.
- Loesche, W.J., (1969). Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. *Applied Microbiology.*, 18 : 723-727.
- Lograda, T., (2010). Etude caryologique et phytochimique de six espèces endémiques du genre *Genista* L. en Algérie. Thèse de Doctorat en Science, Université Ferhat Abbas-Sétif. 150p.
- Lopez, S., Makkar, H.P.S., Soliva, C.R., (2010). Screening plants and plant products for methane inhibitors. In, Vercoe PE, Makkar HPS, Schlink A (Eds): *In vitro* Screening of Plant Resources for Extra-nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies. pp.191-231, London, New York.

- Lourenço, M., Ramos-Morales, E., Wallace, R. J., (2010). The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal.*, 4: 1008-1023.
- Lwin, K.O., Hayakawa, M., Ban-Tokuda, T., Matsui, H., (2011). Real-Time PCR Assays for monitoring anaerobic fungal biomass and population size in the rumen. *Current Microbiology.*, 62(4): 1147-51.
- Machmüller, A., Soliva Carla, R., Michael, K., (2003). Methane-suppressing effect of myristic acid in sheep as affected by dietary calcium and forage proportion. *British Journal of Nutrition.*, 90 : 529-540.
- Mackie, R.I., White, B.A., (1990). Symposium: Rumen microbial ecology and nutrition. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism : potential impact on nutrient output. *Journal of Dairy Science.*, 73: 2971-2995.
- Makkar, H.P.S., (2003). Quantification of Tannins: a laboratory Manual, 2nd edition, International Center for Agricultural Research in the dry areas, Aleppo, Syria.
- Makkar, H.P.S., Francis, G., Becker, K., (2007). Bioactivity of phytochemicals in some lesserknown plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. *Animals.*, 1:1371-1391.
- 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 Science.*, 88: 277-281.
- Marga, F., Grandbois, M., Cosgrove, D.J., Baskin, T.I., (2005). Cell wall extension results in the coordinate separation of parallel microfibrils: evidence from scanning electron microscopy and atomic force microscopy. *Plant Journal.*, 43: 181-190.
- Martens, G.C., Buxton, D.R., Barnes, R.F., (1988). Feeding value (forage quality). In: Alfalfa and Alfalfa Improvement. Hanson, A.A., Barnes, R.F., Jill, R.R. (Eds.), Madison, Wisconsin, USA. pp, 463-492.
- Martin, C., Morgavi, D., Doreau, M., Jouany, J.P., (2006). Comment réduire la production de méthane chez les ruminants ? *Fourrages.*, 187: 283-300.
- Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M., (2010). Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal.*, 4: 351-365.
- Martin, G., Duez, H., Blanquart, C., Berezowski, V., Poulain, P., Fruchart, J.C., Najib-Fruchart, J., Glineur, C., Staels, B., (2001). Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *Journal of Clinical Investigation.*, 107: 1423-1432.
- Mc Donald, P., Greenhalgh, J.F.D., Edwards, R.A., Morgan, C.A., (1995). *Animal nutrition*. 5th, Longmanns, London.
- McAllister, T.A., Cheng, K.J., (1996). Microbial strategies in the ruminal digestion of cereal grains. *Animal Feed Science and Technology.*, 62: 29-36.
- McGinn, S.M., Beauchemin, K.A., Coates, T., Colombatto, D., (2004). Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *Journal Animal Science.*, 82: 3346-3356.
- McIntosh ,F.M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R.J., Beaver, D.A., Newbold, C.J., (2003). Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied Environmental Microbiology.*, 69: 5011-5014.
- Medjekal, S., Ghadbane, M., Bousseboua, H., (2015). Impact of season of harvest on potential nutritive value, methane production and condensed tannins content of *Calobota saharae* in m'sila, north-central algeria, *ejpau* 18(2), #03.
- Mellado, M., Rodriguez, A., Lozano, E.A., Duenez, J., Aguilar, C.N., Arévalo, J.R., (2012) The food habits of goats on rangelands with different amounts of fourwing saltbush (*Atriplex canescens*) cover. *Journal of Arid Environment.*, 84:91-96.

- 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*. *Journal of Agricultural Science.*, 93: 217-222.
- 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: 7-55.
- Michalet-doreau, B., Fernandez, I., Peyron, C., Millet, L., Fonty, G., (2001). Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reproduction Nutrition and Development.*, 4: 187-194.
- Miller, T.L., Lin, C., (2002). Description of *Methanobrevibacter gottschalkii* sp. nov., *Methanobrevibacter thaueri* sp. nov., *Methanobrevibacter woeseisp.* nov. and *Methanobrevibacter wolinii* sp. nov. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 52: 819-822.
- Mills, J.A.N., Dijkstra, J., Bannink, A., Cammell, S.B., Kebreab, E., France, J.P., (2001). A mechanistic model of whole-tract digestion and methanogenesis in the lactating dairy cow: model development, evaluation, and application. *Journal of Animal Science.*, 79: 1584-1597.
- Min, B.R., Hart, S.P., (2003). Tannins for suppression of internal parasites. *Journal of Animal Science.*, 81: E102–E109.
- Mole S., Waterman P.G., (1987). Tannic acid and proteolytic enzymes : enzyme inhibition or substrate deprivation. *Phytochemistry.*, 26 : 99- 102.
- Monforte-Briceno, G.E., Sandoval-Castro, C.A., Ramirez-Aviles, L., Capetillo Leal, C.M., (2005). Defaunating capacity of tropical fodder trees: Effects of polyethylene glycol and its relationship to *in vitro* gas production. *Animal Feed Science and Technology.*, 123: 313-327.
- Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C., Newbold, C.J., (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal.*, 4: 1024-1036.
- Morrison, T.A., Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., (1998). Cell-wall composition of maize internodes of varying maturity. *Crop Science.*, 38: 455-460.
- Mosoni, P., Martin, C., Forano, E., 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. *Journal of animal Science.*, 89(3):783-791.
- Moss, A.R., Jouany, J.P., Newbold, J., (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie.*, 49: 231-253.
- Mould, F.L., (2003). Predicting feed quality-chemical analysis and *in vitro* evaluation. *Field Crops Research.*, 84 : 31-44.
- Mousavi, S.H., Tayarani-Najaran, Z., Asghari, M., Sadeghnia, H. R., (2010). Protective Effect of *Nigella sativa* Extract and Thymoquinone on Serum/Glucose Deprivation-Induced PC12 Cells Death. *Cell Molecular Neurobiology.*, 30:591-598.
- Mueller-Harvey, I., (2001). Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology.*, 91: 3-20.
- Mulas, M., Mulas, G., (2004). Potentialités d'utilisation stratégique des plantes des genres *Atriplex* et *opuntia* dans la lutte contre la désertification. Short And Medium - Term Priority Environmental Action Programme (SMAP). Université Des Etudes De Sassari Groupe De Recherche Sur La Désertification.112p.
- Nedjimi, B., (2014). Effects of salinity on growth, membrane permeability and root hydraulic conductivity in three saltbush species. *Biochemical Systematics and Ecology.*, 52: 4-13.

- Newbold, C.J., El Hassan, S.M., Wang, J., Ortega, M.E., Wallace, R.J., (1997). Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *British Journal of Nutrition.*, 78: 237-249.
- Newbold, C.J., Lassalas, B., Jouany, J.P., (1995). The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Letters in Applied Microbiology.*, 21: 230-234.
- Newbold, C.J., Rode, L.M., (2006). Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. *International Congress Series.*, 1293 :138-147.
- Norton, B.W., (2003). The nutritive value of tree legumes In: *Forage Tree Legumes in Tropical Agriculture*. Gutteridge R G and Shelton H M (Editors).
- Nsahlai, I.V., Siaw, D.E.K.A., Osuji, P., (1994). The relationship between gas production and chemical composition of 23 browses of the genus *Sesbania*. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 65:13-20.
- Nugent, J.H.A., Mangan, J.L., (1981). Characteristics of the rumen proteolysis of fraction 1 (18S) protein from lucerne (*Medicago sativa* L). *British Journal of Nutrition.*, 46: 39-58.
- Odongo, N.E., Bagg, R., Vessie, G., Dick, P., Or-Rashid, M.M., Hook, S.E., Gray, J.T., Kebreab, E., France, J., McBride, B.W., (2007). Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science.*, 90:1781-1788.
- Oeztuerk, H., Emre, B., Sagmanligil, V., Piskin, I., (2010). Effects of Nisin and Propolis on ruminal fermentation *in vitro*. *Journal of Animal and Veterinary Advances.*, 9 (21): 2752-2758.
- Okeola, V.O., Adaramoye, O.A., Nneji, C.M., Falade, C.O., Farombi, E.O., Ademowo, O.G., (2011). Antimalarial and antioxidant activities of methanolic extract of *Nigella sativa* seeds (black cumin) in mice infected with *Plasmodium yoelli nigeriensis*. *Parasitology Research.*, 108:1507-1512
- Oliveira, J.S., de Queiroz, A.C., Lana, R.P., Montovani, H.C., Gneroso, R.A.R., (2006). Effect of monensin and propolis on *in vitro* fermentation of amino acids by mixed ruminal bacteria. *Revista Brasileira de Zootecnia.*, 35: 275-281.
- Onwuka, C.F.I., Akinsoyinu, A.O.O., Tewe, O.O., (1989). Feed value of some Nigerian browse plants: chemical composition and *in vitro* digestibility of leaves. *East African Agricultural and Forestry Journal.*, 54:157-163.
- Orpin, C.G., Munn, E.A., (1974). The occurrence of bacteriophages in the rumen and their influence on rumen bacterial populations. *Experientia.*, 30 (9): 1018-1020
- Ozutsumi, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Itabashi, H., (2005). The effect of protozoa on the composition of rumen bacteria in cattle using 16S rRNA gene clone libraries. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.*, 69: 499-506.
- Ozutsumi, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Itabashi, H., (2006). Real-Time PCR detection of the effects of protozoa on rumen bacteria in cattle. *Current Microbiology.*, 52: 158-162.
- Palmer, B., McSweeney, C., (2000). Tannins in *Calliandra calothyrsus*: effect of polyethylene glycol (PEG) and an evaluation of 19 accessions. In: Brooker, J.D. (Ed.), *Tannins in Livestock and Human Nutrition*. Proceedings of the International Workshop, Adelaide, Australia, May 31–June 2, 1999. *ACIAR Proceedings.* 92 : 36-39.
- Palmisano, A.C., Barlaz, M.A., (1996). *Microbiology of solid waste* CRC Press. p 224
- Pascual, J.J., Fernandez, C., Diaz, J.R., Garces, C., Rubert-Aleman, J., (2000). Voluntary intake and *in vitro* digestibility of different date-palm fractions by Murciano-Granadina (*Capra hircus*). *Journal of Arid Environment.*, 45: 183-189.
- Paterson, J., Cohran, R., Klopfenstein, T., (1996). Degradable and undegradable protein response of cattle consuming forage-based diets. Proceedings of the third grazing livestock nutrition conference. Iudkins M.B., Mc Collum III F.T (Eds.), Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science., 47 (1): 94-103.

- Patra, A., Saxena, J., (2009). Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 96:363-375.
- Patra, A.K., Kamra, D.N., Agarwal, N., (2006). Effect of spices on rumen fermentation, methanogenesis and protozoa counts in *in vitro* gas production test. *International Congress Series.*, 1293: 176-179.
- Patra, R.C., Lal, S.B., Swarup, D., (1996). Biochemical profile of rumen liquor, blood, urine in experimental acidosis in sheep. *Small Ruminant Research.*, 19: 177-180.
- Perry, K.D., Briggs, C.A.E., (1955). A common type antigen in streptococci of groups D and E. *Journal of Pathology and Bacteriology.*, 70: 546.
- Popova, M., (2011a). Structure et activité de la communauté des *Archaea* méthanogènes du rumen en relation avec la production de méthane par les ruminants. Thèse de Doctorat. Université Blaise Pascal. France.
- Popova, M., Morgavi, D.P., Doreau, M., Martin, C., (2011b). Production de méthane et interactions microbiennes dans le rumen. *INRA Productions Animales.*, 24 (5): 447-460.
- Porter, L.W., Hrstich, L.N., Chan, B.G., (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry.*, 25: 223-230.
- Quezel, P., Santa, S., (1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, vol. 2. C.N.R.S., Paris, 1170 p.
- Rammade, F., (2003). *Eléments d'écologie (écologie fondamentale)*. 3^{ème} Edition. Paris. 99p.
- Remond, B., Brugere, H, Poncet, C., Baumont, R., (1995). Le contenu du réticulo-rumen. In: *Nutrition des Ruminants Domestiques*. Editeurs : Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.H., Journet, M., INRA, Paris. p 253-298.
- Rira, M., Morgavi, D.P., Archimède, H., Marie-Magdeleine, C., Popova, M., Bousseboua, H., Doreau, M., (2014). Potential of tannin-rich plants for modulating ruminal microbes and ruminal fermentation in sheep. *Journal of Animal Science.*, 93:334–347.
- Rodehutschord, M., (2013). Effects of monensin and tannin extract supplementation on methane production and other criteria of rumen fermentation *in vitro* and in long-term studies with sheep. Dissertation. Universität Hohenheim. Hohenheim.
- Roger, P., (2012). La constitution chimique du bois. *Biologie et Multimédia* - Université Pierre et Marie Curie - UFR des Sciences de la Vie.
- Rubanza, C.D.K., Shem, M.N., Otsyina, R., Bakengesa, S.S., Ichinohe, T., Fujihara, T., (2005). Polyphenolics and tannins effects on *in vitro* digestibility of selected *Acacia* species leaves. *Animal Feed Science and Technology.*, 119: 129-142.
- Rumpler, W.V., Johnson, D.E., Bates, D.B., (1986). The effect of high dietary cation concentrations of methanogenesis by steers fed with or without ionophores. *Journal of Animal Science.*, 62:1737-1741.
- Russell, J. B., Strobel, H. J., (1988). Effects of additives on *in vitro* ruminal fermentation: A comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. *Journal of Animal Science.*, 66: 552-558.
- Russell, J.B., Strobel, H.J., (1989). Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Applied Environmental Microbiology.*, 55:1-6.
- Salem, A.Z.M., Gonzalez, J.S., Lopez, S., Ranilla, M.J., (2000). Short- and long-term effects of feeding quebracho treated hay on the fermentation activity of the rumen liquid of sheep. In: *Gas Production: Fermentation Kinetics for Feed Evaluation and to Assess Microbial Activity*. An EAAP Satellite Symposium, British Society of Animal Science and Wageningen 395 University, Wageningen, The Netherlands, p. 86.
- Salem, A.Z.M., Salem, M.Z.M., El-Adawy, M.M, 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 Technol.*, 127: 251-267.

- Sanderson S.C., McArthur, E.D, (2004). Fourwing Saltbush (*Atriplex Canescens*) Seed Transfer Zones. Fort Collins (CO): USDA Forest Service, Rocky Mountain Research Station. General Technical Report RMRS-GTR-125. 10 p.
- Sar, C., Santoso, B., Mwenya, B., Gamo, Y., Kobayashi, T., Morikawa, R., Kimura, K., Mizukoshi, H., Takahashi, J., (2004). Manipulation of rumen methanogenesis by the combination of nitrate with β 1-4 galacto-oligosaccharides or nisin in sheep. *Animal Feed Science Technology*, 115: 129-142.
- Satter, L.D., Slyter, L.L., (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *British Journal of Nutrition*, 32: 199-208.
- Sauer, F.D., Fellner, V., Kinsman, R., Kramer, J.K., Jackson, H.A., Lee, A.J., Chen, S., (1998). Methane output and lactation response in Holstein cattle with Monensin or unsaturated fat added to the diet. *Journal of Animal Science*, 76: 906-914.
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Serment, A., Broudiscou, L. P., (2011). Influences des régimes et de leur fermentation dans le rumen sur la production de méthane par les ruminants. *INRA Productions Animales*, 24, 433-446.
- Sauvant, D., Meschy, F., Mertens, D., (1999). Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA Productions Animales*, 12: 49-60.
- Scehovic, J., (1999). Evaluation *in vitro* de l'activité de la population microbienne du rumen en présence d'extraits végétaux. *Revue Suisse d'Agriculture*, 31: 89-93.
- Schelling, G.T., (1984). Monensin mode of action in the rumen. *Journal of Animal Science*, 58:1518-1527.
- Schmidely, P., Glasser, F., Doreau, D., Sauvant, D., (2008). Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors. 1. Total fatty acids. *Animal*, 2: 677-690.
- Serment, A., (2012). Dynamique et intensité de biotransformation dans le rumen. Thèse de Doctorat. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech). pp : 316.
- Shin, E.C, Choi, B.R., Lim, W.J., Hong, S.Y., An, C.L., Cho, K.M., Kim, Y.K., An, J.M., Kang, J.M., Lee, S.S., Kim, H., Yun, H.D., (2004b). Phylogenetic analysis of archaea in three fractions of cow rumen based on the 16S rDNA sequence. *Anaerobe*, 10: 313-319.
- Shin, E.C., Cho, K.M., Lim, W.J., Hong, S.Y., An, C.L., Kim, E.J., Kim, Y.K., Choi, B.R., An, J.M., Kang, J.M., Kim, H., Yun, H.D., (2004a). Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen. *Journal of Microbiology*, 42: 100-105.
- Shingfield, K. J., Griinari, J. M., (2007). Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109: 799-816.
- Skarpe, C., Bergstrom, R., (1986). Nutrient content and digestibility of forage plants in relation to plant phenology and rainfall in the Kalari, Botswana. *Journal of Arid Environment*, 11;147-164.
- Sliwinski, B.J., Soliva, C.R., Machmuller, A., Kreuzer, M., (2002). Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 101: 101-114.
- Smith, A.H., Zoetendal, E., Mackie, R.I., (2005). Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbiology and Ecology*, 50: 197-205.
- Sokatch, J.R., (1969). Fermentation of sugars. In: *Bacterial physiology and metabolism*. p. 72-108, [Academic Press Inc]. London, UK.
- Soliva, C.R., Hindrichsen, I.K., Meile, L., Kreuzer, M., Machmuller, A., (2003). Effects of mixtures of lauric and myristic acid on rumen methanogens and methanogenesis *in vitro*. *Letters in Applied Microbiology*, 37: 35-39.
- Soliva, C.R., Zeleke, A.B., Clement, C., Hess, H.D., Fievez, V., Kreuzer, M., (2008). *In vitro* screening of various tropical foliage, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 147: 53-71.

- Soltan Y.A., (2012). Effect of tanniferous plants and essential oils on methane emission in ruminants. Ph.D Thesis. Graduate School of Sao Paulo University.107p.
- Song, J.H., Kim, S.K., Chang, K.W., Han, S.K., Yi, H.K., Jeon, J.G., (2006). In vitro inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Archives of Oral Biology.*, 51:1131-1140.
- Spear, J.W., (1994). Mineral in forages. In: Forage quality, Evaluation and utilization. Faher J.R. (Eds.), National Conference on Forage Quality, Lincoln. pp, 281-317.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., (1980). Principles and Procedures of Statistics. McGraw-Hill, New York.
- Stewart, C.S., Bryant, M.P., (1988). The rumen bacteria. In : Hobson, P.N., editors. The rumen microbial ecosystem. Elsevier Science Publisher, New York, 21-75. 527 p.
- Stumm, C.K., Gijzen, H.J., Vogels, G.D., (1982). Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *British Journal of Nutrition.*, 47: 95-99.
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M. Benno, Y., (2001). Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied Environmental Microbiology.*, 67 : 2766-2774.
- Tajima, K., Arai, S., Ogata, K., Nagamine, T., Matsui, H., Nabamura, M., Aminov, R.I., Benno, Y., (2000). Rumen Bacterial Community Transition During Adaptation to High grain Diet. *Anaerobe.*, 6: 273-284.
- Takruri, H.M.H., Dameh, M.A.F., (1998). Study of the nutritional value of black cumin seeds (*Nigella sativa* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 76:404-410.
- Tarakanov, B.V., (1971). [Bacteriophages in the contents of cattle rumen]. *Mikrobiologiya* ., 40: 544-550.
- Tavendale, M.H., Meagher, L.P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G.T., Sivakumarab, 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.*, 123-124: 403-419.
- Terrill, T.H., Rowan, A.M., Douglas, G.B., Barry, T.N., (1992). Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *Journal of Science of Food and Agriculture.*, 58: 321-329.
- Theodorou, M.K., France, J., (1993). Rumen microorganisms and their interactions. In: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. pp 145-163. Forbes, J. M., France, J. (eds). CAB international.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J., (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology.*, 48: 185-197.
- Thomson, J.A., (1983). Molecular biology of xylan degradation. *Microbiol. Rev.* 10 : 65-82.
- Tilley, J.M.A., Terry, R.A., (1963). A two stage technique for in vitro digestion of forage crops. *Journal of British Grassland Society.*, 18 : 104-111.
- Tokura, M., Ushida, K., Miyazaki, K., Kojima, Y., (1997). Methanogens associated with rumen ciliates. *FEMS Microbiology and Ecology.*, 22: 137-143.
- Tolera, A., Khazaal, K., Ørskov, E.R., (1997). Nutritive evaluation of some browses species. *Animal Feed Science and Technology.*, 67: 181-195.
- Topps, J.H., (1992). Potential, composition and use of legume shrubs and trees as fodder for livestock in the tropics (a review). *Journal of Agricultural Science.*, 118: 1-8.
- Tormal, D., Mammed, Z., Kribii, A., Ounine, K., (2014). Etude de l'effet antibacterienne et antifongique des huiles essentielles de *Chenopodium ambrosiodes* L. et *Rosmarinus officinalis* L. Science Lib Editions Mersenne : Volume 6, N ° 141104

- Traoré, E., (1998). Facteurs de variations de la composition chimique et de la digestibilité des ligneux consommés par les ruminants domestiques au sahel. Thèse de Doctorat 3^{ème} cycle de Biologie animale. Université Cheikh A Diop Dakar-036.
- Ungerfeld, E.M., Kohn, R.A., Wallace, R.J., Newbold, C.J., (2007). A meta-analysis of fumarate effects on methane production in ruminal batch cultures. *Journal of Animal Science.*, 85: 2556-2563.
- Ungerfeld, E.M., Rust, S., Boone, D., Liu Y., (2004). Effects of several inhibitors on pure cultures of ruminal methanogens. *Journal of Applied Microbiology.*, 97: 520-526.
- Ushida, K., Jouany, J.P., (1994). Fibre digesting capacities of 5 genera of rumen ciliates. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology.*, 3: 168.
- Vaithyanathan, S. and Singh, M., (1989). Seasonal changes in tannin contents in some top feeds in arid region. *Indian Journal of Animal Science.*, 59: 1565-1567.
- Vakili, A. R., Khorrami, B., Danesh Mesgaran, M., Parand, E., (2013). The effects of thyme and cinnamon essential oils on performance, rumen fermentation and blood metabolites in holstein calves consuming high concentrate diet. *Asian Australasian Journal of Animal Science.*, 26(7) : 935-944.
- Van Nevel C.J., Demeyer D.I., Henderickx H.K., Martin J.A. (1970). A simple method for the simultaneous determination of gas production and volatile fatty acid concentration in the rumen. *Zeitschr Tierphysiol Tierernahr Futtermittelkd.*, 26 : 91-100.
- Van Niekerk, W.A., Abubeker, H., Vermaak, P.J., Rethman, N.F.G., Coertze, R.J., (2009). Ruminal degradation and *in vitro* gas production characteristics of foliage from *Atriplex* species and *cassia sturtii*. *South African Journal of Animal Science.*, 5(36): 54-58.
- Van Soest, P.J., (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.
- Van Soest, P.J., Roberston, J.B., 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: 3583-3597.
- Van Soest, P.J., Wine, R.H., Moore, L.A., (1966). Estimation of the true digestibility of forages by the *in vitro* digestion of cell walls. In: *Proceedings of the 10th International Grassland Congress, Helsinki, Finland, vol. 10, pp. 438-441.*
- Ventura, M.R., Castanon, J.I.R., Pieltain, M.C., Flores, M.P., (2004). Nutritive value of forage shrubs: *Bituminaria bituminosa*, *Rumex lunaria*, *Acacia salicina*, *Cassia sturtii* and *Adenocarpus foliosus*. *Small Ruminant Research.*, 52:13–18.
- 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*, p 649-670. INRA Editions, Paris, France.
- Waghorn, G.C., Shelton, I., McNabb, W., McCutchen, S., (1994). Effects of condensed tannins in lotus *Pedunculatus* on its nutritive value for sheep. *Journal of Agricultural Research.*, 123 : 109-119.
- Waghorn, G.C., Tavendale, M.H., Woodfield, D.R., (2002). Methanogenesis from forages fed to sheep. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association.*, 64:167-171.
- Wallace, R.J., Cotta, M.A., (1988). Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: Hobson, P.N. (Ed.). *The rumen microbial ecosystem*. London and New-York, pp. 212-217.
- Wallace, R.J., Czerkawski, J.W., Breckenridge, G., (1981). Effect of monensin on the fermentation of basal rations in the Rumen Simulation Technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition.*, 46:131-148.
- Wallace, R.J., Joblin, K.N., (1985). Proteolytic activity of a rumen anaerobic fungus. *FEMS Microbial Letters.*, 29: 19-25.
- Weatherburn, M.W., (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammoniac. *Annals of Chemistry.*, 39: 971-974.

- Weimer, P.J., Waghorn, G.C., Odt, C.L., Mertens, D.R., (1999). Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science.*, 82: 122-134.
- Welkie, D.G., Stevenson, D. M., Weimer, P. J., (2010). ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe.*, 16:94-100.
- Whitford, M.F., Teather, R.M., Forster, R.J., (2001). Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiology.*, 1: 5.
- Williams, A.G., Coleman, G.S., (1997). The rumen protozoa. In : Hobson, P.N., Stewart, C.S. *The rumen microbial ecosystem*. Second edition, Chapman et Hall, London, 73-139.
- Williams, Y.J., Popovski, S., Rea, S.M., Skillman, L.C., Toovey, A.F., Northwood, K.S., Wright, A.D.G., (2009). A vaccine against rumen methanogens can alter the composition of archaeal populations. *Applied Environmental Microbiology.*, 75: 1860-1866.
- Wilson, J.R., (1994). Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. *Journal of Agricultural Science.*, 122: 173-182.
- Wilson, J.R., Hatfield, R.D., (1997). Structural and chemical changes of cell wall types during stem development: Consequences for fiber degradation by rumen microflora. *Australian Journal of Agricultural Research.*, 48: 165-180.
- Wina, E., Muetzel, S., Hoffmann, E., Makkar, H.P.S., Becker, K., (2005). Saponins containing methanol extract of *Sapindus rarak* affect microbial fermentation, microbial activity and microbial community structure *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology.*, 121: 159-174.
- Wolin, M.J., Stewart, C.S., Miller, T.L., (1997). Microbe-microbe interactions, In: Hobson, P.N., Stewart, C.S. *The rumen Microbial Ecosystem*. Chapman and Hall, London, 467-488.
- Woodward, A., Coppock, D.L., (1995). Role of plant defense in the utilization of native browse in southern Ethiopia. *Agroforestry Systems.*, 32 (2): 147-161.
- Wright, A.D.G., Kennedy, P., O'Neill, C.J., Toovey, A.F., Popovski, S., Rea, S.M., Pimm, C.L., Klein, L., (2004b). Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens. *Vaccine.*, 22: 3976-3985.
- Wright, A.D.G., Ma, X., Obispo, N.E., (2008). Methanobrevibacter phylotypes are the dominant methanogens in sheep from Venezuela. *Microbiology and Ecology.*, 56: 390-394.
- Wright, A.D.G., Williams, A.J., Winder, B., Christophersen, C.T., Rodgers, S.L., Smith, K.D., (2004a). Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia. *Applied Environmental Microbiology.*, 70:1263-1270.
- Wright, D.E., (1967). Metabolism of peptides by rumen microorganisms. *Applied Microbiology.*, 15: 547-550.
- Yamaguchi, K., Honda, M., Ikigai, H., Hara, Y., Shimamura, T., (2002). Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1(HIV-1). *Antiviral Research.*, 53: 19-34.
- Yang, C.M.J., Russel, J.R., (1993). The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation *in vivo* and the numbers of amino acid-fermenting bacteria. *Journal of Animal science.*, 71: 3470-3476.
- Zeenat, A.L., Nazimuddin, M., Shuhei, K., Mitsunori, K., Hisao I., (2005). Sarsaponin Effects on Ruminal Fermentation and Microbes, Methane Production, Digestibility and Blood Metabolites in Steers. *Asian-Australasian Journal of Animal Science.*, (18)12 : 1746-1751.
- Zelege, A.B., Clement, C., Hess, H.D., Kreuzer, M., Soliva, C.R., (2006). Effect of foliage from multi-purpose trees and a leguminous crop residue on *in vitro* methanogenesis and ruminal N use. *International Congress Series.*, 1293: 168-171.

- Zened, A., (2011). Particularités du microbiote et son activité lors de la déviation de la biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique de la voie trans-11 à la voie trans-10. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse. 336p.
- Zhang, C.M., Guo, Y.Q., Yuan, Z.P., Wu, Y.M., Wang, J.K., Liu, J.X., Zhu, W.Y., (2008). Effect of octadeca carbon fatty acids on microbial fermentation, methanogenesis and microbial flora in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 146: 259-269.
- Zhang, Yu., (2012). Mise en place de la réticulation des parois de maïs au cours du développement et impact sur la variabilité de la dégradabilité des polysaccharides pariétaux. Thèse de Doctorat. Doctorat ParisTech .
- Zimmer, N., Cordesse, R., (1996). Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA Productions Animales*, 9: 167-179.

Sites internet

N° 1 : **Figure 1** : Tube digestif des ruminants :

<https://biologyforlife.wordpress.com/category/chapter-6-nutrition/> (15/05/2015).

N° 2 : **Figure13**: Description phénotypique de plantes médicinales étudiées. *Nigella sativa*

http://images.google.fr/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fs-media-cache-ak0.pinimg.com%2F564x%2Fde%2Fe8%2F6f%2Fdee86fa5da17022059a2db0f68e1d13f.jpg&imgrefurl=https%3A%2F%2Fwww.pinterest.com%2Fpin%2F553098397960444037%2F&h=288&w=200&tbnid=nU_bxjGBruM%3A&docid=XbRs9F7lvTTkM&ei=kKmMV76qM8KuUdSYlcAC&tbnid=isch&iact=rc&uact=3&dur=300&page=3&start=36&ndsp=25&ved=0ahUKEwi-svmy4fzNAhVCVxOKHVRMBSgQMwiCASglMCU&bih=609&biw=1366 (16/05/2015).

N° 3 : **Figure13**: Description phénotypique de plantes médicinales étudiées. *Rosmarinus officinalis*

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Romarin> (16/05/2015).

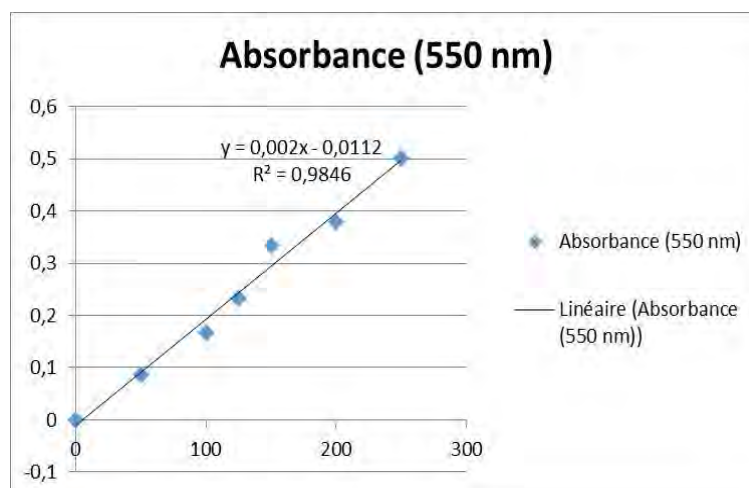
N° 4 : **Figure13**: Description phénotypique de plantes médicinales étudiées. *Zingiber Officinale*

<https://en.wikipedia.org/wiki/Ginger> (16/05/2015).

Annexe 01: Préparation de la courbe d'étalonnage pour les tanins condensés :

25 mg de tanins de quebracho sont dissous dans 25ml d'acétone.

Tube à essais	UI de solution quebracho	UI de solution acétone	Quantité de tanins	Réactif butanol HCl	Réactif Fer	Absorbance (550nm)
Blanc	0	500	0	3 ml	100 ul	0,000
T1	50	450	50	3 ml	100 ul	0,086
T2	100	400	100	3 ml	100 ul	0,166
T3	125	375	125	3 ml	100 ul	0,232
T4	150	350	150	3 ml	100 ul	0,334
T5	200	300	200	3 ml	100 ul	0,380
T6	250	250	250	3 ml	100 ul	0,501



Courbe étalon correspondant au dosage des tanins condensés par méthode chimique

Annexe 02: Préparation des solutions de la salive artificielle selon Theodreau *et al*, (1994)

Solutions	Eléments	Concentration
Oligo-élément (Solution macro minérale)	CaCl ₂ .2H ₂ O MnCl ₂ .4H ₂ O CoCl ₂ .6H ₂ O	13,2 g 10,0 g 8,0 g Q.s.p. 1000ml
Solution tampon	NaHCO ₃ NH ₄ HCO ₃	35,0 g 4,0 g Q.s.p. 1000ml
Solution Eléments minéraux	Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ .7H ₂ O	5,7 g 6,2 g 0,6 Q.s.p. 1000ml
Solution réductrice	NaOH (1N) Na ₂ S.9H ₂ O L-Cystéine	4 ml 0,625 g 0,625 g Q.s.p 100ml
Solution d'oxydo réduction	Résazurine	0,1 g Q.s.p. 100ml

Annexe : Compositon de la salive artificielle selon Theodoro *et al*. (1994)

Solution	Volume (ml)
Solution micro minérale	4,80
Solution tampon	950
Solution macro minérale	950
Résazurine	4,80
Solution réductrice	190
Eau distillée Q.s.p.	4000

Annexe 03 : Préparation de la solution pour les AGV

Solution HCl 0.5 N	
Normalité	0.5 N
HCl	41.58 ml
Eau distillée	1000 ml

Les caractéristiques de HCl	
Poids Moléculaire	36.46 g/mol
% du poids	37 %
La densité	1.185 g/l
La Normalité	12.03 N

Acide Métaphosphorique	20 g
Acide crotonique	4 g
HCl 0.5 N	1000 ml

Pour un nombre donné de substrats : Exemple (40)

Acide Métaphosphorique	0.500 g
Acide crotonique	0.100 g
HCl	1.04 ml
Eau distillée	25.00 ml

Pour le dosage :

Pour la conservation, dans un tube eppendorf numéroté, doser **0.5 ml** de cette dernière + **0.8 ml** de jus de rumen et garder le tout dans une température de 4 °C.

ANALYSE DES AGV**SOLUTIONS STANDARDS**

Std 1A } 0.5 ml de solution crotonique et métaphosphorique.
Std 1B } + 0.8 ml d'une solution standard d'AGVs (Fiole 1 L).
Std 1C }

Std 2A } 0.5 ml de solution crotonique et métaphosphorique
Std 2B } + 0.8 de solution ←
Std 2C }

2 ml de solution standard des AGV (fiole 1 L) } bien mélanger et rajouter 0.8 ml
2 ml Eau distillée }

Garder les tubes eppendorfs dans le réfrigérateur à 4 °C et le deuxième jour centrifuger 13.500 rpm pendant 10-15 min (à 4 °C).

Transférer le surnageant, à l'aide d'une pipette pasteur, dans des Vials spéciale de la chromatographie pour l'analyse.

ISSN: 1992-6197



Aims and Scope

Global Veterinaria (GV) is an international scientific journal edited by the International Digital Organization for Scientific Information (IDOSI). The journal interests in all aspects of veterinary sciences, especially in recent trends and advances. The journal calls for original papers, review articles, technical reports and short communications that are not published or not being considered for publication elsewhere. The journal welcomes papers in Theriogenology, Animal Physiology, Anatomy, Biochemistry, Biophysics, Surgery, Histology, Behavior, Feed Stuff and Feeding, Artificial Insemination, Hygiene, Pathology, Clinical Pathology Genetics, Pharmacology, Embryo Production and Transfer, Dairy and Beef Sciences, Parasitology, Infectious Diseases, Animal medicine, Bacteriology, Virology, Mycology, Immunology, Hydrobiology, Zoonotic Diseases, Food Born Diseases, Food Hygiene, Environmental Pollution, Poultry and Rabbits Production and Diseases, Molecular Biology, and all aspects of Veterinary Sciences for either farm or pet animals.

Abstracting/Indexing

- ISC - ISI indexed
- Global IF (2012)=0.677
- Ulrich's Periodicals Directory
- Eur-Asia Database (EAD)
- Intl Agric Database (IAD)
- DOAJ - Index Copernicus
- Intl Sci Abst (ISA)

Editor-in-chief

- Prof. Dr. Wahid Mohamed Ahmed | Egypt

Co-Editors-in-Chief

- Prof. Dr. Mitsuhiro Furuse | Japan
- Prof. Dr. De-Hua Wang | China
- Assoc. Prof. Dr. Eleonora Nistor | Romania

Assistant Editors-in-Chief

- Prof. Dr. V. Balakrishnan | India
- Prof. Dr. Olav Østerås | Norway
- Assoc. Prof. Dr. A. M. Orheruata | Nigeria
- Assoc. Prof. Dr. John D. Brooks | New Zealand

Managing Editor

- [Muhammad Zeeshan](#)

Effect of Season on Potential Nutritive Value, Methane Production and Condensed Tannin Content of Fourwing Saltbush (*Atriplex canescens*)

^{1,2}Samir Medjekal, ²Mourad Guetouach and ^{1,3}Hacène Bousseboua

¹University Mentouri of Constantine, Department of Applied Microbiology, BP 360, route de Ain El-Bey, 25.017 Constantine, Algeria

²University of Mohamed Bouadiaf M'sila, Faculty of Science, Department of Microbiology and Biochemistry, 28 000 M'sila. Algeria

³Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie Ville Universitaire Ali Mendjeli B.P. E66.

Abstract: The current trail was conducted to study the effect of season on the potential nutritive value, methane production and condensed tannin of *Atriplex canescens* sampled at three different seasons (winter, spring and summer). Gas and methane productions of *Atriplex canescens* were determined at 24 h incubation time. Season of sampling had a significant effect ($p < 0.05$) on the chemical composition, gas production, methane production, metabolizable energy and *in vitro* dry matter digestibility of Telly and Terry. The CP content was lower in spring (167.68 g/kg DM) and summer (171.08 g/kg DM) versus winter (200.89 g/kg DM). In winter and spring, *Atriplex canescens* had higher ($p < 0.05$) NDF, ADF, ADL and HCL contents than in summer. In all the seasons, condensed tannins and EE content were generally low, whereas the ash content was extremely high ($p < 0.05$) with (243.8 g/kg DM) in spring and (197.3 g/kg DM) in winter. Sampling season had a significant effect on the nutritive value of *Atriplex canescens*. Its nutritive value decreased in spring and increase in summer and winter. *Atriplex canescens* should be grazed or harvested during winter and summer since these seasons provide this shrub with high ME and CP content for ruminant.

Key words: *Atriplex canescens* • Nutritive Value • Condensed Tannin • *in vitro* Gas Production • Methane Production

INTRODUCTION

The Mediterranean region encompasses large areas of arid and semi-arid zones. These zones may be defined as areas where rainfall, relative to the level of evapotranspiration, is inadequate to sustain reliable crop production. Most of the arid and semi-arid zones of the Mediterranean region are rangelands and characterized by wide variability in rainfall and temperature [1]. In Algeria, the steppes cover more than 20 million hectares, harbor a human population estimated at 7.2 million among which numerous shepherds. Steppes are grazed by 15 million sheep (data from the Algerian Ministry for Agriculture and Rural development, [2]). The increase in the number of livestock and establishment of settled farms have

contributed to overgrazing and deterioration of these areas, currently, steppe rangelands are in a continued process of degradation [3,4]. Land degradation and desertification are among the most serious challenges facing the sustainable development of society and human well-being. Drought tolerant plants are widely used in desertification control and degraded land recovery. Fourwing saltbush (*Atriplex canescens*), a C4 shrub native to North America, was chosen and massively planted since 1994 due to its drought and cold winter temperature resistance in Algerian steppe and its ability to bridge the food deficit of livestock during long dry season [5-7]. However, there is limited information on about the potential nutritive value of this shrub in such environmental conditions.

Corresponding Author: Medjekal Samir, Department of Applied Microbiology, BP 360, route de Ain El-Bey, 25.017 Constantine, Algeria.
Tel: +213 0661 400 670, Fax: +21303555351.

Chemical composition alone is of limited use to evaluate the nutritive value of plants, especially those containing secondary compounds [8]. Recently, the *in vitro* gas production technique, which provides empirical equations to estimate digestibility and the metabolizable energy (ME) content of animal feed [9], has gained wide acceptance in research on the nutritional evaluation of animal feeds [10]. In addition, *in vitro* gas production was used to screen the feedstuffs in terms of their methane reduction potential [11,12]. Methane production during rumen fermentation is one of important contributors to global warming [13]. Plant development is the major factor affecting forage quality and as plant change from vegetative to reproductive stages, forage quality generally decreases. Our study was undertaken to follow the evolution in the chemical composition, *in vitro* digestibility and *in vitro* gas production of saltbush four-wing (*Atriplex canescens*) through its vegetative cycle.

MATERIALS AND METHODS

Area of Sample Collection: This study was carried out during 2009 in a medium-sized shrub-grassland between El Maader and Bousaada district located in the north central Algeria (N35° 26' 07,9"; E004°20'52,8"), at an altitude of about 398 m above sea. The area is an arid high plateau with steppe like plains and extensive barren soils. It has a continental climate with hot dry summers and very cold winters, with irregular rainfall of between 100 and 250 mm/ year. Under these environmental conditions, the plant species studied show a slow vegetative growth and phenological development throughout most of the year, often lagged in response to the infrequent major rainfalls.

Plant Sampling and Preparation: Representative samples from the aerial parts of plants were randomly hand along a transect of about 2 Km, at the distinct times during the year 2009, in winter (mid-January), spring (mid-May) and summer (end of July). Leaves, thin twigs (young stem) and some flower and seeds (when existing) were clipped with scissors from the aerial part of the plants and taken immediately to the laboratory where the samples from different specimens were pooled, oven dried at 50 °C [14] and subsequently ground to a 1 mm screen.

Chemical Analysis: Ash (Ash method ID 942.05), ether extract (EE, method ID 7.045) and crude protein by

Kjeldhal (CP, method ID 984.13) in samples were determined by the procedures of the Association of Official Analytical Chemists [15]. Neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF) and acid detergent lignin (ADL) contents were analysed following the methodology described by Van Soest *et al.* [16] using an ANKOM Model 220 Fibre Analyser (Macedon, NY, USA).

Levels of condensed tannins (free condensed tannins, protein and fibre-bound condensed tannins) of each sample were determined using the method described by Terrill *et al.* [17]. Free tannins are estimated by HCL-butanol, after the extraction of this fraction with diethyl ether to remove lipids and interfering pigments. The residue from the acetone extraction is treated with sodium dodecyl sulfate (SDS) and the extract obtained reacts again with HCL-butanol assay protein bound tannins. After SDS extraction the remaining residue is also treated with HCL-butanol to assay fibre-bound condensed tannins [18]. Solution of purified quebracho tannin (1 mg/ml aqueous acetone, 700 ml/l) was the standard. Absorbance was measured against a blank at 550 nm. The CH₄ concentration was determined by gas chromatography (GC) using a HP Hewlett 5890, Packard Series II gas chromatograph (Waldbronn, Germany). A sample of 0.5 ml of gas was injected using a 1 ml Sample-Lock® syringe (Hamilton, Nevada, USA).

Animals and Rumen Fluid Extraction: Four adult and mature Merino sheep (body weight 48.3±3.45 kg) fitted with a permanent ruminal cannula were used for the extraction of rumen fluid to carry out the *in vitro* incubations (digestibility and gas production) of the browse material. Animals were fed twice a day (0900h and 1600h) a diet that consisted of alfalfa hay and grain oats in a proportion 60:40 at approximately and had free access to water and mineral/vitamin licks. A sample of rumen contents was withdrawn prior to morning feeding. Extraction of rumen contents was performed through the rumen cannula and with the aid of a PVC tube 1.5 cm in diameter, whose distal end is placed in the bag ventral rumen and which applies a slight suction. Of each of the animals takes a similar amount of rumen contents, which is transferred into thermos flasks and taken immediately to the laboratory. Rumen fluid from the four sheep was mixed, strained through various layers of cheesecloth and kept at 39° C under a CO₂ atmosphere. Time required from rumen content collection to the inoculation of bottles was less than 30 minutes.

In vitro Dry Matter Digestibility of Tilley and Terry (IVD-TT) and Metabolizable Energy (ME) MJ/kg:

Analysis of *in vitro* dry matter (DM) digestibility (IVD-TT) followed the method of Tilley and Terry [19]. A culture medium containing macro- and micro-mineral solutions, resazurin and a bicarbonate buffer solution was prepared as described by Van Soest *et al.* [20]. The medium was kept at 39 °C and saturated with CO₂. Oxygen in the medium was reduced by the addition of a solution containing cysteine-HCl and Na₂S, as described by Van Soest *et al.* [20]. Rumen fluid was then diluted into the medium in the proportion 1:5 (v/v). Samples (400 mg) were weighed out into artificial fibre bags (size 5 cm × 5 cm, pore size 20µm) which were sealed with heat and placed in incubation jars. Each jar is a 5 L glass recipient with a plastic lid provided with a single-way valve which avoids the accumulation of fermentation gases. Each incubation jar was filled with 2 L of the buffered rumen fluid transferred anaerobically and closed with the lid, mixing the contents thoroughly. The jars were then placed in a revolving incubator (Ankom Daisy II digestion system, ANKOM Technology Corp., Fairport, NY, USA) at 39°C, with continuous rotation to facilitate the effective immersion of the bags in the rumen fluid. After 48 h of incubation in buffered rumen fluid, samples were subject to a 48 h pepsin-HCl digestion as described by Tilley and Terry [19].

ME (MJ/kg DM) content of *Atriplex canescens* samples was calculated using equation of Menke *et al.* [21] as follows:

$$\text{ME (MJ/kg DM)} = 2.20 + 0.136 \text{ GP} + 0.057 \text{ CP},$$

where

GP = 24 h net gas production (ml/200 mg);

CP = Crude protein.

In vitro Gas Production: Batch cultures of mixed rumen micro-organisms were used to study the ruminal fermentation, gas and methane production. The experimental procedure was based on Theodorou *et al.* [22] protocol with some modifications. Three identical 48 h incubation runs were carried out in three consecutive weeks. Rumen content from each sheep was obtained before the morning feeding, immediately transported to the laboratory into thermal bottles, mixed and strained through four layers of cheesecloth into a warmed Erlenmeyer flask with an O₂-free headspace. The buffer

solution of Goering and Van Soest [23] was previously prepared into an Erlenmeyer flask under a CO₂ stream and kept one hour with an O₂-free headspace after the resazurine colour turnover showed an O₂-free solution. Particle-free ruminal fluid was mixed with the buffer solution in a proportion 1:4 (vol/vol) at 39°C under continuous flushing with CO₂. Buffered ruminal fluid (50 mL) was added into each bottle under CO₂ flushing. Bottles were sealed with butyl rubber stoppers and aluminium caps and placed in a water bath at 39 °C. Serum bottles of 120 mL (Laboratorios Ovejero S.A., León, Spain) were used. In each incubation run triplicate samples (0.5 g dry matter, DM) were placed into the bottle and incubated. Pressure in the bottle headspace and volume of gas produced were measured at 2, 4, 6, 8, 12, 24 and 48 h after inoculation using a Wide Range Pressure Meter (Spec Scientific LTD, Scottsdale, AZ, USA) and a calibrated glass syringe as described by Theodorou *et al.* [22], respectively. After 24 and 48 h of incubation an aliquot of the gas produced was taken in a 10 mL vacuum tube (Venoject®, Terumo Europe N.V., Leuven, Belgium) for CH₄ concentration analysis. Fermentation flasks without samples (i.e., blanks) were included to allow correction for gas produced directly from rumen fluid. Volume of gas (ml/g DM) produced after 24 h of incubation (GP24) was used as an index of energy feed value.

Statistical Analysis: All data obtained were subjected to analysis of variance (ANOVA) using the randomized completed block design. Significance between individual means was identified using the Tukey's multiple range tests. Mean differences were considered significant at P<0.05. Analysis of variance (PROC ANOVA) was performed using the SAS software package [24].

RESULTS

The chemical composition and tannins content of *Atriplex canescens* (ATCA) are in table 1. As expected, there were differences (p <0.05) between growth seasons in all chemical component of ATCA except in free condensed tannins. The CP content was lower (p <0.05) in spring (167.68 g/kg DM) and summer (171.08 g/kg DM) versus winter (200.89 g/kg DM). In winter and spring, ATCA had higher (p <0.05) NDF, ADF, ADL and HCL contents than in summer. In all the seasons, condensed tannins and EE content were generally low,

Table 1: Chemical composition and condensed tannins (g/kg DM) contents of *Atriplex canescens* harvested at three different seasons

Nutrients	Seasons			SEM	Significance
	Winter	Spring	Summer		
CP	200.89 ^a	167.68 ^b	171.08 ^b	5.553	***
NDF	400.75 ^a	352.49 ^b	282.19 ^c	18.01	***
ADF	172.70 ^a	152.17 ^a	101.19 ^b	11.28	***
ADL	64.06 ^a	63.75 ^a	47.05 ^b	2.834	***
HCL	228.05 ^a	229.28 ^a	181.00 ^b	11.01	***
Ash	197.3 ^c	243.8 ^a	212.0 ^b	6.859	***
EE	12.65 ^c	16.64 ^a	14.30 ^b	0,589	***
Free CT	12.56	12.18	12.42	0,119	NS
PCT	2.14 ^{ab}	4.69 ^a	1.71 ^b	0,625	***
FCT	20.46 ^a	12.23 ^b	12.91 ^b	1,669	***
TCT	35.16 ^a	29.10 ^b	27.04 ^b	1,511	***

a, b, c Row means with common superscripts do not differ ($P < 0.05$); S.E.M.: standard error mean; CP: Crude protein, NDF: Neutral detergent fiber, ADF: Acid detergent fiber, ADL: Acid detergent lignin, HCL: Hemicellulose, Ash: Ash, EE: Ether extract, Free CT: Free condensed tannins, PCT: Protein-bound condensed tannins, FCT: Fiber-bound condensed tannins, TCT: Total condensed tannins, NS: Non-significant, *** $P < 0.05$

Table 2: Gas production (GP24 (ml/g DM) methane 24h (ml/g) *in vitro* digestibility (%) and metabolic energy (MJ/KG DM)

Estimate parameters	Seasons			SEM	Significance
	Winter	Spring	Summer		
GP24h (ml/g)	60.50 ^a	47.00 ^b	67.66 ^a	3,336	***
CH ₄ 24h (ml/g)	8.70 ^a	4.67 ^b	7.94 ^a	0,6631	***
IVD-TT (%)	73.05 ^b	74.05 ^b	79.34 ^a	0,9246	***
ME (MJ/KG DM)	11.58 ^a	9.65 ^b	12.38 ^a	0,4643	***

a, b, c Row means with common superscripts do not differ ($P < 0.05$); S.E.M.: standard error mean; GP24: gas production 24hour (ml/g), CH₄: methane production 24 hour (ml/g), IVD-TT: *in vitro* digestibility of Tilley and Terry (%), ME: Metabolisable energy (MJ/KG DM)

whereas the ash content was extremely high ($p < 0.05$) with (243.8 g/kg DM) in spring and (197.3 g/kg DM) in winter. As shown in table 2. The season had a significant effect on gas production, methane production, IVD.TT and ME. The gas and methane production at 24 h incubation ranged from 47 to 67.66 ml and 4.67 to 8.70 ml respectively and decreased ($p < 0.05$) significantly during spring. The IVD.TT and ME of ATCA ranged from 73.05 and 79.34 % and 9.65 and 12.38 MJ/kg DM respectively.

DISCUSSION

Reduction ($p < 0.05$) in CP content of ATCA in summer versus in winter, is consistent with other studies. For example, the level of CP, EE and NFE decreased whereas CF, ash and DM contents increased on passing from the wet season to the dry season [25]. However, the CP content of ATCA remained relatively high (171.08 g/kg DM) in summer, suggesting the possibility that ATCA may be used as a dry season fodder and /or as feed

supplement to low quality diets. In addition, the values of CP content obtained are above the 7% CP requirement for ruminants that should provide ammonia required by rumen microorganisms to support optimum microbial growth. CP contents obtained in the current study are comparable with finding of Van Niekerk *et al.* [26] who reported that CP ranged from 187 g/kg DM in ATCA (Santa Rita) located in Mier to 206 g/kg DM Field reserve 1) in Mier. However, Mellado *et al.* [27] reported values of 141, 172 and 146g/kg/ DM respectively for spring, summer and fall. The increase in CP levels measured during winter is most likely due to the increase soil moisture levels following the small rain [28].

The marked decrease in ADF, NDF, ADL and HCL from winter to summer may be explained by changing in maturity stage of ATCA; in which flowering generally occurs between May and September. This period can vary, however, with genotype and location [29]. The high level of fiber content in ATCA could be explained partly by the environmental conditions prevailing in the area of

Bousaada, as high temperatures and low precipitations tend to increase the cell wall fraction and to decrease the soluble content of the plants [30]. Our values are similar to those reported for other browse forages [31-33], with some differences among all studies, probably because of the different proportions of foliage and twigs in the samples and the different phenological stage of the plants at sampling. Cell wall in concentration in shrubs fodder is negatively correlated with palatability, voluntary dry matter intake and potential dry matter degradability [34,35].

Condensed tannin had an important role in forages depending on the amount. Low level tannin (2-3% of DM) may have beneficial effect since the level of tannin in diets prevents the CP from extensive degradation through formation of protein-tannin complexes [36]. On the other hand, high tannin level (5% of DM) in diets may result in the increased indigestible CP due to excessive formation of tannin-protein complexes [37]. As can be seen from table 1, the observed total condensed tannin levels of ATCA harvested at three different seasons were low magnitude. Hence, low condensed tannin of Fourwing saltbush seems to have a potential for beneficial effect when included into ruminant diets as it can increase rumen indegradable CP without decreasing digestibility. Furthermore, the lack of accurate laboratory techniques and reliable compounds to be used as standards are major difficulties into condensed tannin analysis. Colorimetric methods should be used with caution as a quantitative assay. The differences between our tannin values and other reported in the literature [32,33], could be due to the nature of the assays used, nature of tannin in different fodder species, standards used for the quantification, plant growth stage and the influence of soil and climatic conditions [38].

The marked decrease in gas production, methane production, ME and IVD-TT occurred in spring were closely associated with increase in less digestible cell contents (NDF and ADF) and decrease in CP of ATCA. Gas production after 24h was higher ($p < 0.05$) in summer versus spring and this was in agreement with cell wall concentration. The gas production is closely associated with the amount of fermentable substrate in diets. In accordance with our result, Haddi *et al.* [39] reported significant differences in gas 24h among five halophytes shrubs including *Atriplex halimus*, *Salsola vermiculata* and *Sueada molis*.

Methane is one of the potent greenhouse gasses, contributing significantly to the environment pollution. The livestock contribute about 20% (gut microbial and animal waste fermentation). Lopez *et al.* [40] suggested

that the methane reduction potential of any feedstuff can be estimated from the percentage of methane *in vitro* gas production and the feedstuff can be arbitrary divided in three groups, low potential (% methane in gas between >11% and =14%), moderate potential (% methane in gas between >6% and <11%), high potential (% methane in gas between >0% and <6%). Therefore ATCA had low potential since the percentage of methane for all three seasons is between 11 and 14 %. The differences in ATCA among season reflect the observed differences in ADF, NDF, HCL and ADL concentrations. It could also relate to differences in concentrations of secondary compounds such as tannins in the fodder [41-43] as well as differences in the configuration of cell wall polysaccharides [44]. As conclusion, ATCA is a valuable plant that provides livestock and wildlife habitat and food. Season had a significant effect on the nutritive value of ATCA. Its nutritive value decreased in spring and increase in summer and winter. ATCA should be grazed or harvested during winter and summer since these seasons provide this shrub with high ME and CP content for ruminant. Furthermore, ATCA can be an effective fodder component in mixed diets for livestock mainly during winter and summer due to its droughts resistance and salt and freezing tolerance.

ACKNOWLEDGMENT

Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research is gratefully acknowledged for supporting this research (CNEPRU Project F2500/29/06). Grateful thanks are due to anonymous reviewer for the constructive comments and to Dr. M.Ghadbane for reading the manuscript.

Conflict of Interest: All of the authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Abu-Zanata, M.W., G.B. Ruyleb and N.F. Abdel-Hamid, 2004. Increasing range production from fodder shrubs in low rainfall areas. *Journal of Arid Environment*, 59: 205-216.
2. Amghar, F., E. Forey, P. Margerie, E. Langlois, L. Brouri and H. Kadi-Hanifi, 2012. Grazing enclosure and plantation: a synchronic study of two restoration techniques improving plant community and soil properties in arid degraded steppes (Algeria). *Revue d'Ecologie (La Terre et la Vie)*, 67: 257-269.

3. Aidoud, A., 1994. Pâturage et désertification des steppes arides en Algérie. Cas de la steppe d'alfa (*Stipa tenacissima* L.). Paralelo, 37° 16: 33- 42.
4. Slimani, H., A. Aidoud and F. Rozé, 2010. 30 Years of protection and monitoring of a steppic rangeland undergoing desertification. Journal of Arid Environment, 74: 685-69.
5. Aouissat, M., D.J. Walker, M. Belkhodja, S. Fares and E. Correal, 2009. Freezing tolerance in Algerian populations of *Atriplex halimus* and *Atriplex canescens*. Spanish Journal of Agricultural Research, 7: 672-679.
6. Guangyou, H., 2011. "Effect of Polyploidy on Ecophysiology of Four-Wing Saltbush: Implications for its Sustainable Use in Agriculture and Degraded Land Reclamation." CID Research Fellow and Graduate Student Working Paper No. 52. Center for International Development at Harvard University, August.
7. Nedjimi, B., 2014. Effects of salinity on growth, membrane permeability and root hydraulic conductivity in three saltbush species. Biochemical Systematics and Ecology, 52: 4-13.
8. El Hassan, S.M., A. Lahlou Kassi, C.J. Newbold and R.J. Wallace, 2000. Chemical composition and degradation characteristics foliage of some African multipurpose trees. Animal Feed Science and Technology, 86: 27-37.
9. Menke, K.H. and H. Steingass, 1988. Estimation of energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Animal Research Development, 28: 7-21.
10. Getachew, G., E.J. DePeters, P.H. Robinson and J.G. Fadel, 2005. Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. Animal Feed Science and Technology, (123-124): 547-559.
11. Jayanegara, A., E. Wina, C.R. Soliva, M. Marquardt Kreuzer and F. Leiber, 2011. Dependence of forage quality and methanogenic potential of tropical plants on their phenolic fractions as determined by principal component analysis. Animal Feed Science and Technology, 163(2-4): 231-243.
12. Lin, B., J.H. Wang, Y. Lu, Q. Liang and J.X. Liu, 2013. *in vitro* rumen fermentation and methane production are influenced by active components of essential oils combined with fumarate. Animal Physiology and Animal Nutrition, 97: 1-9.
13. Lassey, K.R., 2007. Livestock methane emissions from the individual grazing animal through national inventories to the global methane cycle. Agricultural and Forest Meteorology, 142: 120-132.
14. Makkar, H.P.S., 2003. Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht (The Netherlands).
15. AOAC., 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed. Washington, D.C.
16. Van Soest, P.J., J.B. Robertson and B.A. Lewis, 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science, 74: 3583-3597.
17. Terrill, T.H., A.M. Rowan, G.B. Douglas and T.N. Barry, 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. Journal of the Science of Food and Agriculture, 58: 321-329.
18. Barahona, R.R., 1999. Condensed tannins in tropical forage legumes: their characterisation and study of their nutritional impact from the standpoint of structure-activity relationships. PHD Thesis. Department of Agriculture. The University of Reading.
19. Tilley, J.M.A and R.A. Terry, 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops Current Contents. Journal of British Grassland Society, 18: 104-111.
20. Van Soest, P.J., R.H. Wine and L.A. Moore, 1966. Estimation of the true digestibility of forage by the *in vitro* digestion of cell walls. Proc. 10th Int. Grassland Congress, 10: 438-441.
21. Menke, K.H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz and W. Schneider, 1979. The Estimation of Digestibility and Metabolizable Energy Content of Ruminant Feedstuffs from the Gas Production When They Incubated with Rumen Liquor *in vitro*. The Journal of Agricultural Science Camb, 92: 217-222.
22. Theodorou, M.K., B.A. Williams, M.S. Dhanoa, A.B. McAllan and J.A. France, 1994. Simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology, 48: 185-197.
23. Goering, H.K. and P.J. Van Soest, 1970. Forage fiber analysis (Apparatus, reagent, procedures and some applications). Agric. Handbook, No. 379, ARS-USDA, Washington, DC.

24. SAS, 2002. SAS User's Guide: Statistics. Ver 9.0. Cary, NC, USA: SAS Institute.
25. El shaer, H.M., 2010. Halophytes and salt-tolerant plants as potential forage for ruminants in the Near East region: Review. *Small Ruminants Research*, 91: 3-12.
26. Van Niekerk, W.A., H. Abubeker, P.J. Vermaak, N.F.G. Rethman and R.J. Coertze, 2009. Ruminal degradation and *in vitro* gas production characteristics of foliage from *Atriplex* species and *Cassia sturtii*. *South African journal of animal Science*, check the volume 36: 54-58.
27. Mellado, M., A. Rodriguez, E.A. Lozano, J. Duenez, C.N. Aguilar and J.R. Arévalo, 2012. The food habits of goats on rangelands with different amounts of fourwing saltbush (*Atriplex canescens*) cover. *Journal of Arid Environment*, 84: 91-96.
28. Johnson, J.A., J.S. Caton, W. Poland and D.V. Dhuyvetter, 1998. Influence of season on dietary composition, intake and digestion by beef steers grazing mixed-grass prairie in the northern Great Plains. *Journal of Animal Science*, 76: 1682-1690.
29. Hamilton, C. and R. Hamilton, 2003. Fourwing saltbush. *ScienceViews.com*. [Online] Available at <http://scienceviews.com/plants/fourwingsaltbush.html> (verified 25 October 2014).
30. Pascual, J.J., C. Fernandez, J.R. Diaz, C. Garces and J. Rubert-Aleman, 2000. Voluntary intake and *in vitro* digestibility of different date-palm fractions by Murciano-Granadina (*Capra hircus*). *Journal Arid Environment*, 45: 183-189.
31. Salem, A.Z.M., J.S. Gonzalez, S. Lopez and M.J. Ranilla, 2000. Short- and long-term effects of feeding quebracho treated hay on the fermentation activity of the rumen liquid of sheep. In: *Gas Production: Fermentation Kinetics for Feed Evaluation and to Assess Microbial Activity*. An EAAP Satellite Symposium, British Society of Animal Science and Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, pp: 86.
32. Boufennara, S., S. Lopez, H. Bousseboua, R. Bodas and L. Bouazza, 2012. Chemical composition and digestibility of some browse plant species collected from Algerian arid rangelands. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 10: 88-98.
33. Bouazza, L., R. Bodas, S. Boufennara, H. Bousseboua and S. Lopez, Nutritive evaluation of foliage from fodder trees and shrubs characteristic of Algerian arid and semi-arid areas. *Journal of Animal Feed Science*, 21: 521-536.
34. Kaitho, R.J., I.V. Nsahlai, B.A. Williams, N.N. Umunna, S. Tamminga and J. Van Bruchem, 1998. Relationships between preference, rumen degradability, gas production and chemical composition of browses. *Agroforestry Systems*, 39: 129-144.
35. Larbi, A., J.W. Smith, I.O. Kurdi, I.O. Adekunle, A.M. Raji and D.O. Ladipo, 1998. Chemical composition, rumen degradation and gas production characteristics of some multipurpose fodder trees and shrubs during the wet and dry seasons in the humid tropics. *Animal Feed Science and Technology*, 72: 81-96.
36. Barry, T.N., 1987. Secondary compounds of forages. In: Hacker, J.B and J.H. Ternouth (Eds): *Nutrition of Herbivores*. Academic Press, Sydney, pp: 91-120.
37. Kumar, Rand M. Singh, 1984. Tannins: Their adverse role in ruminant nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32: 447-453.
38. Rubanza, C.D.K., M.N. Shem, R. Otsyina, S.S. Bakengesa, T. Ichinohe and T. Fujihara, 2005. Polyphenolics and tannins effects on *in vitro* digestibility of selected Acacia species leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 119: 129-142.
39. Haddi, M.L., S. Filacorda, K. Meniai, F. Rollin and P. Susmel, 2003. *in vitro* fermentation kinetics of some halophyte shrubs sampled at three stages of maturity. *Animal Feed Science and Technology*, 104: 215-225.
40. Lopez, S., H.P.S. Makkar and C.R. Soliva, 2010. Screening plants and plant products for methane inhibitors. In: Vercoe, P.E., H.P.S. Makkar and A. Schlink (Eds): *in vitro* Screening of Plant Resources for Extra-nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies, London, New York, pp: 191-231.
41. Warren, B.E., C.J. Bunny and ER. Bryant, 1990. A preliminary examination of the nutritive value of four saltbush (*Atriplex*) species. *Proceeding of Australian Society of Animal Production*, 18: 424-427.
42. Nsahlai, I.V., D.E.K.A. Siaw and P.O. Osuji, 1994. The relationship between gas production and chemical composition of 23 browses of the genus *Sesbania*. *Journal of Science and Food Agriculture*, 65: 13-20.
43. Ventura, M.R., J.I.R. Castanon, M.C. Pieltain and MP. Flores, 2004. Nutritive value of forage shrubs: *Bituminaria bituminosa*, *Rumex lunaria*, *Acacia salicina*, *Cassi sturtii* and *Adenocarpus foliosus*. *Small Ruminants Research*, 52: 13-18.

Electronic Journal of Polish Agricultural Universities (EJPAU) founded by all Polish agriculture universities presents original papers and review articles relevant to all aspects of natural and engineering sciences. Covered by AGRICOLA, AGRO, AGRIS, Copernicus Index, IFIS Publishing (FSTA – Food Science and Technology Abstracts), DOJE-Directory of Open Access Journal, National Marine Biological Library UK, CAS USA (Chemical Abstracts), Ulrich's Periodicals Directory, Free E-journals, Worldcat, Thomson Zoological Record and ALPSP (Association of Learned and Professional Society Publisher – full membership). Presented in the Master List of Thomson ISI.



**ELECTRONIC
JOURNAL OF
POLISH
AGRICULTURAL
UNIVERSITIES**

Founded in 1998 **ISSN 1505-0297**

- University of Technology and Life Sciences of Bydgoszcz
- Agricultural University of Cracow
- University of Life Sciences in Lublin
- University of Warmia and Mazury in Olsztyn
- University of Life Sciences in Poznań
- Siedlce University of Natural Sciences and Humanities
- West Pomeranian University of Technology in Szczecin
- Warsaw University of Life Sciences - SGGW
- Wrocław University of Environmental and Life Sciences

Disciplines

- [Agricultural Engineering](#)
- [Agronomy](#)
- [Animal Husbandry](#)
- [Biology](#)
- [Biotechnology](#)
- [Civil Engineering](#)
- [Economics](#)
- [Environmental Development](#)
- [Fisheries](#)
- [Food Science and Technology](#)
- [Forestry](#)
- [Geodesy and Cartography](#)
- [Horticulture](#)
- [Veterinary Medicine](#)
- [Wood Technology](#)

Issues

- [2015 Volume 18 Issue 4](#)
- [2015 Volume 18 Issue 3](#)
- [2015 Volume 18 Issue 2](#)
- [2014 Volume 17 Issue 4](#)
- [2014 Volume 17 Issue 3](#)
- [2014 Volume 17 Issue 2](#)
- [2013 Volume 16 Issue 4](#)
- [2013 Volume 16 Issue 3](#)
- [2013 Volume 16 Issue 2](#)
- [2012 Volume 15 Issue 4](#)
- [2012 Volume 15 Issue 3](#)
- [Previous Issues](#)



Copyright © Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, ISSN 1505-0297

Medjekal S., Ghabbane M., Bousseboua H. 2015. IMPACT OF SEASON OF HARVEST ON POTENTIAL NUTRITIVE VALUE, METHANE PRODUCTION AND CONDENSED TANNINS CONTENT OF *CALOBOTA SAHARAE* IN M'SILA, NORTH-CENTRAL ALGERIA, EJPAU 18(2), #03.
Available Online: <http://www.ejpau.media.pl/volume18/issue2/art-03.html>

IMPACT OF SEASON OF HARVEST ON POTENTIAL NUTRITIVE VALUE, METHANE PRODUCTION AND CONDENSED TANNINS CONTENT OF *CALOBOTA SAHARAE* IN M'SILA, NORTH-CENTRAL ALGERIA

Samir Medjekal¹, Mouloud Ghabbane², Hacène Bousseboua³

¹ University Mentouri of Constantine, Department of Applied Microbiology, BP 360, route de Ain El-Bey, 25.017 Constantine, Algeria. E-mail: sammedj2008@gmail.com

² University of Mohamed Bouadiaf M'sila. Faculty of Science. Department of Microbiology and Biochemistry. 28 000 M'sila. Algeria.

³ Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie Ville Universitaire Ali Mendjeli B.P. E66. Algeria.

ABSTRACT

The current trial was conducted to study the effect of season on the potential nutritive value, methane production and condensed tannin of *Calobota saharae* shrub harvested at three different seasons, in winter (mid-January), spring (mid-May) and summer (end of July). Leaves, thin twigs, some flower and seeds (when existing) were clipped with scissors from the aerial part of the plants then dried and analysed for chemical composition. Gas and methane production were determined at 24 h incubation time. Season of harvest had a significant effect ($p < 0.05$) on the chemical composition, gas production and *in vitro* digestibility of Tilley and Terry but no effect on metabolisable energy. Neutral detergent fibre (NDF), Acid detergent fibre (ADF) and acid detergent lignin (ADL) of *Calobota saharae* were high during summer (dry season) and low in spring and winter (wet season). The NDF, ADF and ADL contents ranged from 463.05 to 616.82 and 352.27 to 488.21 and 121.19 to 151.73 (g/kg DM) respectively. The CP content was lower ($p < 0.05$) in summer (96.84g/kg DM) versus spring (138.85 g/kg DM) and winter (139.42g/kg DM). The gas and methane production at 24 h incubation varied between 65.75 to 77.75 and 6.50 to 10.17 (ml/g DM) respectively and decreased significantly ($p < 0.05$) from spring to summer. In conclusion, season had a significant effect on the nutritive value of *Calobota saharae* shrub. *Calobota saharae* should be grazed or harvested during winter and spring since these seasons provide this shrub with high ME and CP content for ruminant.

Keywords: *Calobota saharae*, Condensed tannin, *In vitro* gas production, Nutritive value, Methane production, Rumen fermentation

Abbreviations: ADF (acid detergent fibre); ADL (acid detergent lignin); AOAC (Association of official analytical chemists); CP (crude protein); DM (dry matter); EE (ether extract); FCT (fibre-bound condensed tannins); Free CT (free condensed tannins); GC (gas chromatography); GP24 (gas production 24hour); HCL (hemicellulose); IVD-TT (*in vitro* digestibility of Tilley and Terry); ME (metabolisable energy); NDF (neutral detergent fibre); PCT (protein-bound condensed tannins); SDS (sodium dodecyl sulfate); TCT (total condensed tannins).

INTRODUCTION

Large tracts of desert and semi-desert lands of African and Middle Eastern countries cannot be cultivated but can be used to raise livestock, mainly sheep, goats and camels. Even in favourable rainfall years, animal performance can be poor due to a lack of adequate dietary protein and energy intake in the dry season. Furthermore, the herbaceous forage is fibrous and of low quality, and in the event of drought, livestock mortality can be high [20]. Feed supplementation during drought is infeasible for livestock producers in resource-poor countries due to high feeding costs [6]. Thus, an alternative approach for overcoming such feed constraints is the propagation of nutritious local fodder shrubs on degraded land. One ligneous species suitable for browse in areas of severe aridity is *Calobota saharae* (Coss. & Durieu) Boatwr. & B-E. van Wyk (formerly *Genista saharae* or *Spartidium saharae*). *Calobota* has a great ecological significance in Mediterranean countries.

They colonize degraded forests and deforested areas that characterize the landscape [21]. The genus *Calobota* consisting of 87 species [26] among these species 23 grow in Algeria [24, 31]. The nutritive value of a ruminant feed is determined by the concentrations of its chemical components, as well as their rate and extent of digestion. Determining the digestibility of feeds *in vivo* is laborious, expensive, requires large quantities of feed, and is largely unsuitable for single feedstuffs thereby making it unsuitable for routine feed evaluation [12]. *In vitro* methods provide less expensive and more rapid alternatives. Both *in vitro* gas production and the ANKOM Technology (Automated instrumentation for the food analysis) devices can be used as rapid evaluation tools to assess nutritional quality of feeds [16]. In Algeria, there is limited information on the nutritive value of local shrubs and both *in vitro* and *in vivo* studies are not available. Moreover there is limited information on the impacts of seasonal variations on nutritional values of local most grazed leguminous shrub. A study was therefore carried out to evaluate the effects of season on chemical composition, *in vitro* gas production and organic matter degradability of indigenous shrub *Calobota Saharae*.

MATERIALS AND METHODS

Collection of *Calobota saharae*

The study was carried out during 2009 in a medium-sized shrub-grassland between El Maader and Bousaada district located in the north central Algeria (N35° 26' 07,9"; E004°20'52,8") (**Fig.1**), at an altitude of about 398 m above sea. The area is an arid high plateau with steppe like plains and extensive barren soils. Its climate is continental, semi-arid, subjected partly to Saharan influences with an annual average temperature of 21C° (average temperature of 34 C° in summer and 10 C° in winter), and a low and irregular rainfall not exceeding 250 mm per year. M'Sila experiences high temperature between June and September, and rainfalls between September and December (**Fig.2**).

Representative samples from the aerial parts of plants were randomly hand clipped with scissors along a transect of about 2 Km, in winter (mid-January), spring (mid-May) and summer (end of July) during the year 2009. Between six and ten specimens of each plant species were sampled to obtain a representative aliquot of the edible biomass. Leaves, thin twigs (young stem) and some flower and seeds (when existing) were clipped with scissors from the aerial part of the plants, and taken immediately to the laboratory where the samples from different specimens were pooled, oven dried at 50 °C [25], and subsequently ground to a 1 mm screen.

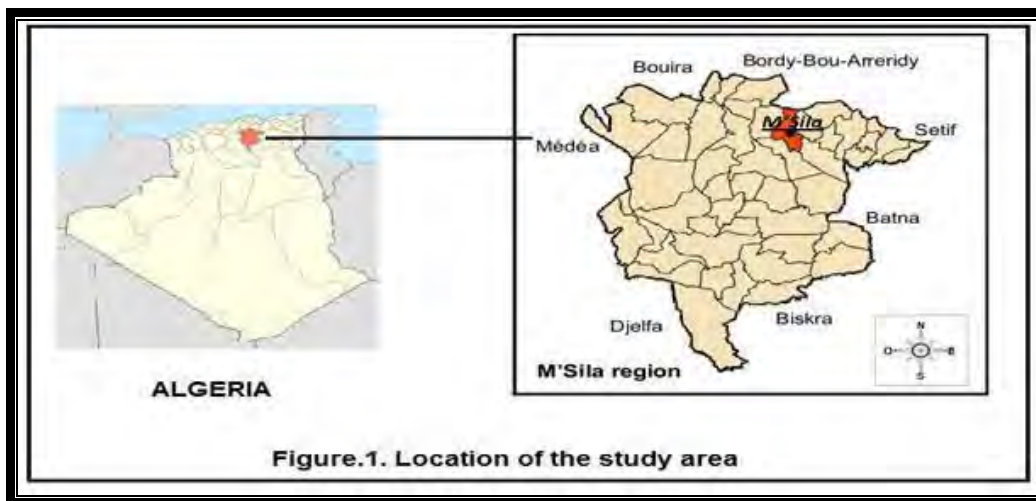


Figure.1. Location of the study area

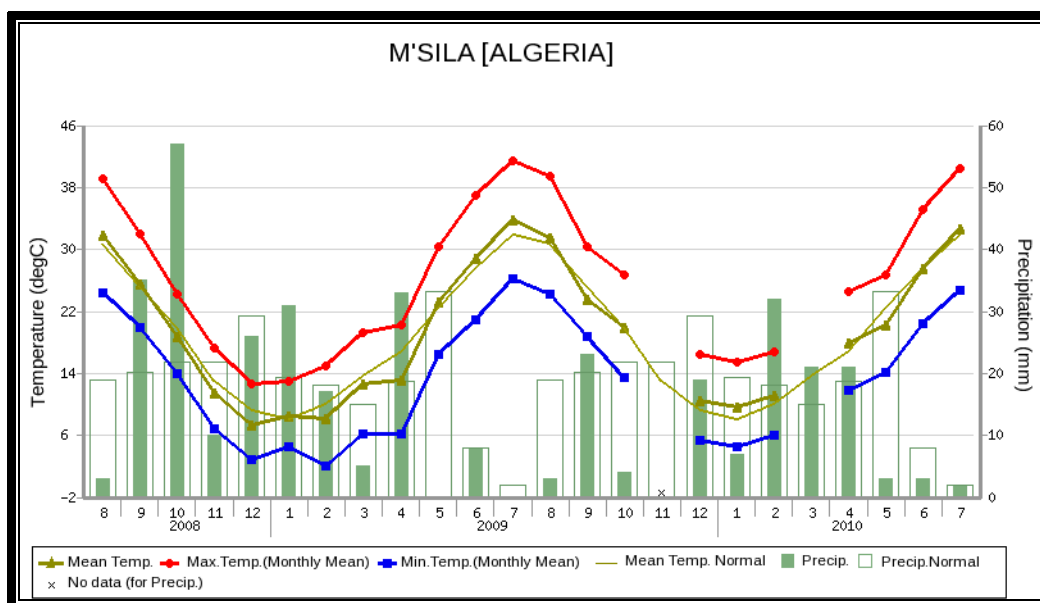


Figure.2.: Precipitation and Temperature 2008-2010 (Tocyo Climate Center (<http://ds.data.jma.go.jp/tcc/tcc/>)

Chemical composition and condensed tannins

Ash (Ash method ID 942.05), ether extract (EE, method ID 7.045) and crude protein by Kjeldhal (CP, method ID 984.13) in samples were determined by the procedures of the Association of Official Analytical Chemists [2]. Neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF) and acid detergent lignin (ADL) contents were analysed following the methodology described by Van Soest et al. [38] using an ANKOM Model 220 Fibre Analyser (Macedon, NY, USA).

Levels of condensed tannins of each sample were determined using the method described by Terrill *et al.* [34]. Free tannins are estimated by HCL-butanol, after the extraction of this fraction with diethyl ether to remove lipids and interfering pigments. The residue from the acetone extraction is treated with sodium dodecyl sulfate (SDS) and the extract obtained reacts again with HCL-butanol assay protein bound tannins. After SDS extraction the remaining residue is also treated with HCL-butanol to assay fibre-bound condensed tannins [4]. Solution of purified quebracho tannin (1 mg/ml aqueous acetone, 700 ml/l) was the standard. Absorbance was measured against a blank at 550 nm. The CH₄ concentration was determined by gas chromatography (GC) using a HP Hewlett 5890, Packard Series II gas chromatograph (Waldbronn, Germany). A sample of 0.5 ml of gas was injected using a 1 ml Sample-Lock® syringe (Hamilton, Nevada, USA).

***In vitro* gas production (GP24h), *In vitro* dry matter digestibility of Tilley and Terry (IVD-TT) and metabolizable energy (ME) MJ/kg**

Four adult and mature Merino sheep (body weight 48.3±3.45 kg) fitted with a permanent ruminal cannula were used for the extraction of rumen fluid to carry out the *in vitro* incubations (gas production and digestibility) of the browse material. Animals were fed twice a day (0900h and 1600h) a diet that consisted of alfalfa hay and grain oats in a proportion 60:40 at approximately and had free access to water and mineral/vitamin licks. A sample of rumen contents was withdrawn prior to morning feeding. Of each of the animals takes a similar amount of rumen contents, which is transferred into thermos flasks and taken immediately to the laboratory. Animals were cared for by trained personnel in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrates used for Experimental and other Scientific Purposes [10]. Rumen fluid from the four sheep was mixed, strained through various layers of cheesecloth and kept at 39° C under a CO₂ atmosphere. Batch cultures of mixed rumen micro-organisms were used to study the ruminal fermentation, gas and methane production. The experimental procedure was based on Theodorou et al. [34] protocol with some modifications. Three identical 48 h incubation runs were carried out in three consecutive weeks. The buffer solution of Goering and Van Soest [13], (1970) was previously prepared into an Erlenmeyer flask under a CO₂ stream and kept one hour with an O₂-free headspace after the resazurine color turnover showed an O₂-free solution. Particle-free ruminal fluid was mixed with the buffer solution in a proportion 1:4 (vol/vol) at 39 °C under continuous flushing with CO₂. Buffered ruminal fluid (50 mL) was added into each bottle under CO₂ flushing. Bottles were sealed with butyl rubber stoppers and aluminum caps and placed in a water bath at 39 °C. Serum bottles of 120 mL were used. In each incubation run triplicate samples (0.5 g dry matter, DM) were placed into the bottle and incubated. Pressure in the bottle headspace and volume of gas produced were measured at 24 inoculation using a Wide Range Pressure Meter (Spec Scientific LTD, Scottsdale, AZ, USA) and a calibrated glass syringe as described by Theodorou et al. [35] respectively. An aliquot of the gas produced was taken in a 10 mL vacuum tube (Venoject®, Terumo Europe N.V., Leuven, Belgium) for CH₄ concentration analysis. Fermentation flasks without samples (i.e., blanks) were included to allow correction for gas produced directly from rumen fluid.

Analysis of *in vitro* dry matter (DM) digestibility (IVD-TT) followed the method of Tilley and Terry [36]. A culture medium containing macro- and micro-mineral solutions, resazurin and a bicarbonate buffer solution was prepared as described by Van Soest et al. [39]. Rumen fluid was then diluted into the medium in the proportion 1:5 (v/v). Samples (400 mg) were weighed out into artificial fibre bags (size 5 cm × 5 cm, pore size 20m) which were sealed with heat and placed in incubation jars. The jars were then placed in a revolving incubator (Ankom Daisy II digestion system, ANKOM Technology Corp., Fairport, NY, USA) at 39°C, with continuous rotation to facilitate the effective immersion of the bags in the rumen fluid. After 48 h of incubation in buffered rumen fluid, samples were subject to a 48 h pepsin-HCl digestion as described by Tilley and Terry [36].

ME (MJ/kg DM) content of *Calobota saharae* samples was calculated using equation of Menke et al [27] as follows:

ME (MJ/kg DM) = 2.20 + 0.136 GP + 0.057 CP, where GP = 24 h net gas production (ml/200 mg); CP = Crude protein.

Statistics

All data obtained were subjected to analysis of variance (ANOVA) using the randomized completed block design. Significance between individual means was identified using the Tukey's multiple range tests. Mean differences were considered significant at P<0.05. Analysis of variance (PROC ANOVA) was performed using the SAS software package [32].

RESULTS

The changes in chemical composition of *Calobota saharae* at different seasons of harvest are presented in table 1. There were differences between growth seasons in ash, cell wall components, CP, EE and condensed tannins contents ($p < 0.05$). The CP content was lower in summer (96.84 g/kg DM) versus spring (138.85 g/kg DM) and winter (139.42 g/kg DM). In winter, *Calobota saharae* had lower ($p < 0.05$) NDF, ADF, ADL and HCL content than in summer, and intermediate values were observed in spring. In the other hand, high values of ash, EE and CTC were observed during spring versus summer and winter with values ranging between 3.92 and 5.44, 20.64 and 23.79 and 25.33 and 34.72 (g/kg DM) respectively.

The 24h volume of gas produced (GP24), methane (CH₄ 24h) *in vitro* digestibility of Telly and Terry in each season are in table 2. There are marked decreases in gas production, methane and IVD-TT from spring to summer.

Table 1: Chemical composition and condensed tannins (g/kg DM) contents of *Calobota saharae* harvested at three different seasons (n=6) for all chemical parameters.

Nutrients	Seasons			SEM	Significance
	Winter	Spring	Summer		
Ash	3.967 ^b	5.447 ^a	3.923 ^b	0.254	***
NDF	526.24 ^b	463.05 ^c	616.82 ^a	22.52	***
ADF	402.17 ^b	352.27 ^c	488.21 ^a	19.98	***
ADL	128.84 ^b	121.19 ^c	151.73 ^a	4.656	***
HCL	124.10 ^a	110.78 ^b	128.59 ^a	2.922	***
CP	139.42 ^a	138.85 ^a	96.84 ^b	7.212	***
EE	22.18 ^{ab}	23.79 ^a	20.64 ^b	0.567	***
Free CT	15.30 ^a	13.92 ^{ab}	12.83 ^b	0.403	***
PCT	1.06 ^{ab}	1.41 ^a	0.98 ^b	0.080	***
FCT	11.98 ^b	19.39 ^a	11.46 ^b	1.283	***
TCT	28.34 ^b	34.72 ^a	25.33 ^c	1.407	***

a, b, c Row means with common superscripts do not differ ($P < 0.05$); **S.E.M.:** standard error mean; **Ash:** Ash %, **NDF:** Neutral detergent fiber, **ADF:** Acid detergent fiber, **ADL:** Acid detergent lignin, **HCL:** Hemicellulose, **CP:** Crude protein, **EE:** Ether extract, **Free CT:** Free condensed tannins, **PCT:** Protein-bound condensed tannins, **FCT:** Fibre-bound condensed tannins, **TCT:** Total condensed tannins, *** $P < 0.05$

Table 2: Gas production (GP24 (ml/g DM) methane 24h (ml/g) *in vitro* digestibility (%) and metabolic energy (MJ/KG DM) ((n=3) for all parameters)

Estimate parameters	Seasons			SEM	Significance
	Winter	Spring	Summer		
GP24h (ml/g)	71.25 ^b	77.75 ^a	65.75 ^c	2.798	***
CH ₄ 24h (ml/g)	6.50 ^b	10.17 ^a	7.78 ^b	0.713	***
IVD-TT (%)	53.41 ^b	57.41 ^a	53.17 ^b	0.742	***
ME (MJ/KG DM)	6.40	6.61	5.97	0.269	NS

a, b, c Row means with common superscripts do not differ ($P < 0.05$); **S.E.M.:** standard error mean; **GP24:** gas production 24hour (ml/g), **CH₄:** methane production 24 hour (ml/g), **IVD-TT:** *in vitro* digestibility of Tilley and Terry (%), **ME:** Metabolisable energy (MJ/KG DM), NS: Non-significant

DISCUSSION

In the current study, large differences in the nutritive value of *Calobota saharae* (as assessed by gas production and DM degradability) were observed, which were primarily the results of changes in maturity of the collected leaves. Reduction ($p < 0.05$) in CP content of *Calobota saharae* in summer versus other seasons, is consistent with other studies, as was the observation that the minimum CP content of fodder tree leaves in the dry season was more than twice that of grasses in the wet season [33, 9]. However, the CP content of *Calobota saharae* remained relatively high (96.84 g/kg DM) during summer which is higher than the minimum level of 7-8 % DM required for optimum rumen function and feed intake in ruminants livestock [40]. In addition, the higher CP content (193.42 g/kg DM) during winter compared with the other two seasons as a result of higher moisture content and nitrogen uptake being more rapid than dry matter accumulation agrees with [3, 19] who reported that seasonal variation occur between plant species and between seasons with higher values reported for seasons with higher moisture levels. The lower CP content during summer may be largely due to moisture stress experienced by *Calobota saharae* during this period and build-up of lignocellulosic fibre structures of the plants, diluting the nitrogen [1]. The wide variations in NDF, ADF, ADL and HCL contents of *Calobota saharae* in winter and summer are consistent with the report of Onwuka et al. [30], on browse species in the humid lowlands of West Africa and in other parts of the tropics [37, 8]. The seasonal differences in cell wall constituents may relate to the differences in elements of the weather between seasons, and their effects on cell wall lignifications as well as translocation of nutrient to the different part of the plant [18]. Moreover, cell wall concentration in shrub fodder is negatively correlated with palatability [14, 18]. Therefore, the observed differences in NDF, ADF, ADL and HCL among the seasons of harvest could have implications for the use of *Calobota saharae* as a fodder. Condense tannin had an important role in forages depending on the amount. Low level tannin (2-3% of DM) may have beneficial effect since the level of tannin in diets prevents the CP from extensive degradation through formation of protein-tannin complexes [5]. In addition, condensed tannins in fodder trees and shrubs could also, help in the control of gastro intestinal parasites because they have biological properties that decrease fecal egg count in sheep and goats, and hatch rate and Laval development in feces [29]. On the other hand, high tannin level (5 % of DM) in diets may result in the increased indigested CP due to excessive formation of tannin-protein complexes [17]. As can be seen from table 1, the observed condensed tannin levels of *Calobota saharae* harvested at three different seasons were low magnitude. Therefore, low condense tannin of *Calobota saharae* seems to have a potential for beneficial effect when included into ruminant diet as it can increase rumen undegradable CP without decreasing digestibility [23]. The gas production is closely associated with the amount of fermented substrate in diets [7]. The low gas production for *Calobota saharae* in the dry season (summer) may be attributed to the relatively higher NDF, ADF, ADL and the low CP content. Our observation are similar to Evitayani et al. [9], who found that *in vitro* gas production and *in vitro* dry matter digestibility of some legume species increased in wet season (winter) compared with the dry season (summer). Similar observations with maturity were also observed by kamalak et al. [15] in *Gundelia tournifortii* hay and Mahmut et al. [23] in *Sanguisorba minor* hay. There were no differences in ME of *Calobota saharae* obtained in the current study this could be due to the little variations of gas production between the three seasons, since, ME energy values were estimated using the gas production and CP content. According to Fagg and Stewart [11], indigenous legumes of arid regions such as *Calobota saharae*, because of their nitrogen fixing symbiosis with legume nodulating bacteria, collectively called rhizobia, contribute to soil fertility by enhancing soil nitrogen content and organic matter. They provide high-quality animal fodder, prevent erosion and contribute to soil stabilization and ecosystem restoration.

Methane is a product of microbial fermentation, particularly in the rumen. At the end of a complex interplay of microbiological and chemical processes, methanogens use hydrogen to reduce carbon CO_2 to CH_4 [28]. Lopez et al. [22] suggested that the methane reduction potential of any feedstuffs can be estimated from the percentage of methane of *in vitro* gas production and the feedstuffs can be arbitrarily divided in three groups, low potential (% methane in gas between $>11\%$ and $\leq 14\%$), moderate potential (% methane in gas between $>6\%$ and $<11\%$), high potential (% methane in gas between $>0\%$ and $<6\%$).

Therefore, *Calobota saharae*, shrub had no methane reduction potential since the percentage of methane for all the seasons is between 10 to 13 %. The recent interest in methanogenesis reflects effects to identify mitigation strategies to reduce output of this greenhouse gas from livestock and manure. It also reflects an interest in reducing a source of energy loss that arises when feed is digested by ruminants.

CONCLUSIONS

The results presented in this study indicate that the major differences in nutritive value of *Calobota saharae* shrub, in terms of chemical composition and rumen microbial fermentation, are caused by the effect of the growing season. *Calobota saharae* should be grazed or harvested during winter and spring since these season provides this shrub with high ME and CP content for ruminant. This study has practical implications for the development of agro-forestry technologies. *Calobota saharae* shows potential as a fodder shrub for revegetation projects in degraded ecosystems in arid and semiarid lands.

REFERENCES

1. Anele U.Y., Arigbede O.M., Südekum K.H., Oni, A.O., Jolaosho A.O., Olanite J.A., Adeosun A.I., Dele P.A., Ike K.A., Akinola O.B., 2009. Seasonal chemical composition, *in vitro* fermentation and *in sacco* dry matter degradation of four indigenous multipurpose tree species in Nigeria. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 154, 47-57.
2. AOAC., 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed. Gaithersburg, Maryland 20877-2417, USA.
3. Bamualim A., Jones R.J., Murray R.M., 1980. Nutritive value of tropical browse legumes in the dry season. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 13, 229-232.
4. Barahona R.R., 1999. Condensed tannins in tropical forage legumes: their characterization and study of their nutritional impact from the standpoint of structure-activity relationships. Ph.D. Thesis. Department of Agriculture, the University of Reading.
5. Barry T.N., 1987. Secondary compounds of forages. In: *Nutrition of Herbivores*, Hacker J-B, Ternouth J-H. (Eds). Academic Press, Sydney; pp: 91-120.
6. Benavides J.E., 1994. La Investigacion en Arboles Forrajeros. *Arboles y Arbustos Forrajeros en America Central*, CATIE, Turrialba, Costa Rica., 1, 3-28.
7. Blummel M., Orskov E.R., 1993. Comparison of an *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 40, 109-119.
8. Dzewela B.H., Hove L., Topps J.H., Mafongoya P.L., 1995. Nutritional and anti-nutritional characters and rumen degradability of dry matter and nitrogen for some multi-purpose tree species with potential for agroforestry in Zimbabwe. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 55, 207-214.
9. Evitayani Warly L., Fariani A., Ichinohe T., Abdulrazak S.A., Fujihara T., 2004. Comparative rumen degradability of some legumes forages between wet and dry seasons in west Sumatra, Indonesia. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 17, 1107-1111.
10. European Directive 86/609. Commission recommendations of 18 June 2007 on guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. Annex II to European Council Directive 86/609. The Commission of the European Communities Publishing, Brussels, Belgium.
11. Fagg C.W., Stewart J.L., 1994. The value of Acacia and Prosopis in arid and semi-arid environments. *J Arid Environ.*, 27, 3-25.
12. Getachew G., De Peters E.J., Robinson P.H., 2004. *In vitro* gas production provides effective method for assessing ruminant feeds. *California Agriculture.*, 58, 1-12.
13. Goering H.K., Van Soest P.J., 1970. Forage fiber analysis (Apparatus, reagent, procedures and some applications). *Agric. Handbook*, No. 379, ARS-USDA. Washington, DC.
14. Kaitho R.J., Nsahlai I.V., Williams B.A., Umunna N.N., Tamminga S., Van Bruchen J., 1997. Relationship between preference, rumen degradation, gas production and chemical composition of browses. *Agrofor Syst.*, 39, 129-144.

15. Kamalak A., Canbolat O., Gurbuz Y., Erol A., Ozay O., 2005. Effect of maturity stage on chemical composition, *in vitro* and *in situ* dry matter degradation of tumbleweed hay (*Gundelia tournefortii* L). Small Rumin Res., 58, 149-156.
16. Khanal R.C., Subba D.B., 2001. Nutritional evaluation of leaves from some major fodder trees cultivated in the hills of Nepal. Anim. Feed. Sci. Technol., 92, 17-32.
17. Kumar R., Singh M., 1984. Tannins: Their adverse role in ruminant nutrition. J Agric Food Chem., 32, 447-453.
18. Larbi A., Smith J.W., Kurdi I.O., Adekunle I.O., Raji A.M., Ladipo D.O., 1998. Chemical composition, rumen degradation and gas production characteristics of some fodder tree and shrubs during wet and dry season in the humid tropics. Anim Feed Sci Technol., 72, 81-96.
19. Larbi A., Smith J.W., Raji A.M., Kurdi I.O., Adekunle I.O., Ladipo D.O., 1997. Seasonal dynamics in dry matter degradation of browse in cattle, sheep and goats. Small Rumin. Res., 25, 129-140.
20. Le Houérou H.N., 1980. Planting and management methods for browse trees and shrubs. In: Browse in Africa, the current state of knowledge, Le Houérou, H.N. (Eds). UNESCO, Paris France; pp: 351- 359.
21. Lopez Gonzalez G.A., 2001. The trees and Shrubs in the Iberian Peninsula and Balearic Islands: (Wild and the Main Cultivated Species). 2nd Edn., Mundi-Prensa, Madrid, Spain, ISBN: 84-7114-953-2; pp: 1511-1518.
22. Lopez S., Makkar H.P.S., Soliva C.R., 2010. Screening plants and plant products for methane inhibitors. In: *In vitro* Screening of Plant Resources for Extra-nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies, Vercoe P.E., Makkar H.P.S., Schlink A., (Eds). London, New York, pp: 191-231.
23. Mahmout K., Kamalak A., Kzsra A.A., Guven İ., 2014. Effect of Maturity Stages on Potential Nutritive Value, Methane Production and Condensed Tannin Content of *Sanguisorba minor* Hay. Kafkas Univ Vet Fak Derg., 20, 445-449.
24. Maire R., 1987. Flore de l'Afrique du Nord. Vol. 16, Le chevalier, Dicotyledonae, Paris, ISBN : 2-7205-0519-6 ; pp: 302.
25. Makkar H.P.S., 2003. Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht (The Netherlands).
26. Martin A., Wink M., Tei A., Brum-bousquet M., Tillequin F., Rauter A.P., 2005. A phytochemical study of the quinolizidine alkaloids from *Genista tenera* by gas chromatography-mass spectrometry. Phytochem Anal., 16, 264-266.
27. Menke K.H., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritz D., Schneide, W., 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. J. Agric. Sci. (Camb), 93, 217-222.
28. Mills J.A.N., Dijkstra J., Bannink A., Cammell S.B., Kebreab E., France J.P., 2001. A mechanistic model of whole-tract digestion and methanogenesis in the lactating dairy cow: model development, evaluation, and application. J. Anim.Sci., 79, 1584-1597.
29. Min B.R., Hart S.P., 2003. Tannins for suppression of internal parasites. J. Anim. Sci 81, E102–E109.
30. Onwuka C.F.I., Akinsoyinu A.O.O., Tewe O.O., 1989. Feed value of some Nigerian browse plants: chemical composition and *in vitro* digestibility of leaves. E. Afr. Agric. For J., 54, 157-163.
31. Quezel P, Santa S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales. CNRS, Paris.
32. SAS., 2002. SAS User's Guide: Statistics. Ver 9.0. SAS Institute. Cary, NC.
33. Skarpe C., Bergstrom R., 1986. Nutrient content and digestibility of forage plants in relation to plant phenology and rainfall in the Kalari, Botswana. J. Arid Environ., 11,147-164.

34. Terrill T.H., Rowan A.M., Douglas G.B., Barry T.N., 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *J. Sci. Food Agric.*, 58, 321-329.
35. Theodorou M.K., Williams B.A., Dhanoa M.S., McAllan A.B., France J.P., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 48, 185-197.
36. Tilley J.M.A., Terry R.A., 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Current Contents. J. Bt. Grass. Soci.*, 18, 104-111.
37. Topps J.H., 1992. Potential, composition and use of legume shrubs and trees as fodder for livestock in the tropics (a review). *J. Agric. Sci. (Camb.)*, 118, 1-8
38. Van Soest P.J., Robertson J.B., Lewis B.A., 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy. Sci.*, 74, 3583-3597.
39. Van Soest P.J., Wine R.H., Moore L.A., 1966. Estimation of the true digestibility of forage by the *in vitro* digestion of cell walls. *Proc. 10th Int. Grassl. Cong.*, 10, 438-441.
40. Van Soest P.J., 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.

Accepted for print: **11.04.2015**

Samir Medjekal

Department of Applied Microbiology, University Mentouri of Constantine, Algeria

BP 360, route de Ain El-Bey 25.017 Constantine Algeria

email: sammedj2008@gmail.com

Mouloud Ghadbane

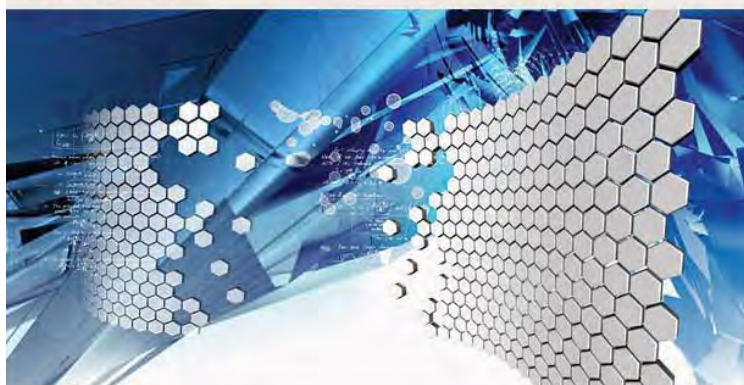
Department of Microbiology and Biochemistry, Faculty of Science, University of Mohamed Bouadiaf

M'sila, Algeria 28 000 M'sila Algeria

Hacène Bousseboua

Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie Ville Universitaire Ali Mendjeli, Algeria

B.P. E66 Algeria



AJBAS

Abstracting / Indexing



THOMSON REUTERS
(Formerly known as ISI)



Ulrich Periodicals



EBSCO HOST



CABI (CAB International)

Editorial Board

Editor in Chief

Dr. Abdel Rahman Mohammad Said Al-Tawaha

Senior Editors

Prof. Dr. Maybelle Saad Gaballah, Egypt

Prof. Dr. Abubakr Gomaa, Egypt

Prof. Dr. Shaban D. Abou Hussein, Egypt

Prof. Dr. Mazen A. Ateyyat, Jordan

Prof. Dr. Ismail Sahid, Malaysia

Prof. Dr. Kyung-Dong Lee, Korea

Prof. Dr. Mohammed Rahmatullah,
Bangladesh

Prof. Dr. Abdul Haseeb Ansari, Malaysia

Dr. Anuchit Uchaipichat, Thailand

Dr. Bob Redden, Australia

Dr. Abu Umar Faruq Ahmad, Australia

Dr. Mohd Mustafa Al Bakri Abdullah,
Malaysia

Editorial Board

Dr. Sarwoko Mangkoedihardjo, Indonesia

Dr. Bob Redden, Australia

Dr. Shyam Yadav, Afghanistan

Dr. Nawfal Yousif Jamil, Iraq

Dr. Theiaa Najam Abdulla, Iraq

Dr. Ammar Seddiq Mahmood, Iraq

Dr. Hiyam Abdel Ibraheem AlTaii, Iraq

Dr. Faten Noori Mula Abed, Iraq

Dr. R.K. Maiti, India

Dr. Mohammad Ali Ashrafi Pour, Armenia

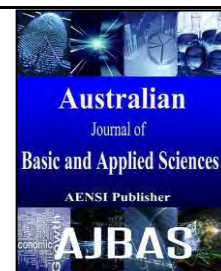
Dr. C. Annamalai, Malaysia



ISSN:1991-8178

Australian Journal of Basic and Applied Sciences

Journal home page: www.ajbasweb.com



Strategies to Mitigate Methane Emissions during the Digestive Process in Ruminants: A review

^{1,2}Samir Medjekal, ²Mouloud Ghadbane, ³Hacène Bousseboua

¹University Mentouri of Constantine, Department of Applied Microbiology, BP 360, route de Ain El-Bey, 25.017 Constantine, Algeria

²University Mohamed Boudiaf of M'sila. Faculty of Science. Department of Microbiology and Biochemistry. 28 000 M'sila. Algeria.

³Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie, Ville universitaire Ali Mendjeli BP 66E RP 25100, Ali Mendjeli/Constantine (Algérie).

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 June 2015

Accepted 25 August 2015

Available online 2 September 2015

Keywords:

Methane, Methanogens, Mitigation, Rumen

ABSTRACT

Methane emitted from ruminant livestock is regarded as a loss of feed energy and also a contributor to global warming. Methane is synthesized in the rumen as one of the hydrogen sink products that are unavoidable for efficient succession of anaerobic microbial fermentation. Strategies for reduction of methane emissions from the rumen have been proposed. Mainly through rumen microbial manipulation, by the use of agents including chemicals, antibiotics and natural products such as oils, fatty acids and plant extracts. A more recent approach is the development of vaccines against methanogenic bacteria. While ionophore antibiotics have been widely used due to their efficacy and affordable prices, the use of alternative natural materials is becoming more attractive due to health concerns regarding antibiotics. It was concluded that the most promising areas for future research for reducing methanogenesis are the development of new product/ delivery systems for antimethanogenic compounds in the rumen and reduction in protozoal numbers in rumen. Whatever the approach proposed, however, before practical solutions are applied in the field, the sustainability of CH₄ suppressing strategies is an important issue that has to be considered. The evaluation of different strategies, in terms of total greenhouse gas emissions for a given production system, is discussed.

© 2015 AENSI Publisher All rights reserved.

To Cite This Article: Samir Medjekal and 3Hacène Bousseboua, Strategies to Mitigate Methane Emissions during the Digestive Process in Ruminants: A review. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.*, 9(27): 9-18, 2015

INTRODUCTION

Background:

Methane (CH₄) is one of the three main greenhouse gases (GHG), together with carbon dioxide (CO₂) and nitrous oxide (N₂O). Methane has a thermogenic affect some four to six times that of carbon dioxide and the one most associated with animal agriculture (Leng, 1993; Moss, 2000; Gworgwor, 2006). The agricultural sector contributes a total of 10-12% of global anthropogenic GHG emissions (McAllister, 2011). The livestock sector is one of the largest CH₄ producers, with total emissions from enteric fermentation estimated to be 70-100 Tg/year (Hegarty, 1999; Thorpe, 2009; Ramin, 2013).

Ruminants establish a symbiotic relationship with rumen microorganisms by which the animal provides nutrients and optimal environmental conditions for the fermentation of feeds, and microorganisms degrade fibre and synthesize microbial protein as an energy and protein supply for

the animal, respectively. However, this symbiotic relationship has energy (losses of methane) and protein (losses of ammonia N) inefficiencies (Van Nevel, 1988; Calsamiglia, 2007). The ruminal methane production is a by-product of the microbial digestive process and represents a loss of 2–12% of the feed energy (Calsamiglia, 2007). Furthermore, emission of methane is considered as one of the most important global environmental issues (IPCC, 2001). Therefore, decreasing methane production is desirable for reducing the greenhouse gas emission with improved efficiency of the digested energy utilization (Johnson, 1995; Goel, 2011).

Ruminant nutritionists have long been interested in modulating the competition among different microbial populations with the objective of improving the efficiency of energy and protein utilization in the rumen. Among the factors that influence ruminant methane production, changes in the rumen fermentation pattern resulting from altered diets is probably the most important. Furthermore, various feed supplements have been found to directly

Corresponding Author: Samir Medjekal, University Mentouri of Constantine, Department of Applied Microbiology, BP 360, route de Ain El-Bey, 25.017 Constantine, Algeria
Tel: (213) 0661 400 670 E-mail: medjekal.samir@univ-msila.dz

or indirectly reduce methane emissions, including halogenated methane analogues (Ungerfeld, 2004), bacteriocins (Lee, 2002), propionate enhancers, acetogens, immunization, genetic engineering, phage, fats and probiotics such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* etc. (Moss, 2000; Gworgwor, 2006; McAllister, 2011; Hegarty, 1999; Thorpe, 2009; Ramin, 2013; Van Nevel, 1988; Calsamiglia, 2007; . IPCC, 2001; Johnson, 1995; Goel, 2011; Ungerfeld, 2004; Lee, 2002; Boadi, 2004; Kumar, 2009).

Methane mitigation in ruminants is possible through various strategies. Today, the feeding management approach is the most developed. An integrated approach that considers the rumen microbiota, the animal and the diet seems the best approach to find a long-term solution for reducing enteric CH₄ production by ruminants.

Factors influencing methane production:

Factors that can be identified as influencing CH₄ production in ruminants include dietary characteristics as well as the fermentation conditions in the rumen. Diet has an important impact not only on methanogen numbers but also on methane production, as both the quantity and quality of feed can alter the rumen fermentation pattern. It is widely recognized that alterations in the diet strongly affect rumen functioning and performance of ruminants (e.g. roughage: concentrate ratio, or the fibre, starch, sugars and protein content of the feed). Increase the level of starch or rapidly fermentable carbohydrates, to enhance propionate production, reduces excess hydrogen and subsequent CH₄ production. Moreover, addition of readily fermentable carbohydrates (e.g., cereal grain) to diets fed at maintenance levels causes a proliferation in the ciliate population (Bonhomme, 1990). Ciliates are symbiotic with methanogens (Stumm, 1986; Finlay, 1994) and the increase in methane production when grain is fed at maintenance may be due to an increase in hydrogen transfer between these microorganisms (Krumholz, 1983).

Among important fermentation conditions are acidity (pH) of rumen fluid. The optimum pH for methane production is 7.0-7.2, but the gas production can occur in the pH range of 6.6-7.6. However, beyond this range, the activity of fibre degraders reduces (Arglyle, 1988; Dijkstra, 1992). Additionally, there is a different profile of volatile fatty acids and methane production with different carbohydrates fermented (Murphy, 1982; Friggens, 1988). Simple carbohydrates produce more methane (0.45 moles/mole of hexose) as compared to complex carbohydrates (0.3 moles/mole of hexose). Forage: concentrate ratio also influence the acetate: propionate ratio, and methane emission decreases drastically from 6-12% (forage-based diet) to 2-3% when a diet with concentrate (90%) predominates (Johnson, 1995).

Methane yield can thus be related to many and different categories of factors. However, these factors are often interrelated and so are their effects on CH₄ yield in the rumen. This complicates the use of such factors to predict the course of fermentation in the rumen, the extent of organic matter digestion and the productive response of the ruminant. Due to these interrelationships, the contribution of a single feed component or type of carbohydrate to CH₄ yield is not necessarily constant (Smink, 2003), but may vary with a change of the dietary characteristics and the fermentation conditions in the rumen (Mills, 2001; Bannink, 2005).

Diet composition:

The type of feed offered to a ruminant can have a major effect on methane production. It is well known that methane production is influenced by quality and quantity of feed stuffs. The forages to concentrate ratio of the ration has an impact on the rumen fermentation and hence to acetate: propionate (A/P) ratio (Moss, 2000; Mitsumori, 2008). Van Soest (1982) indicated that a high grain diet and/ or the addition of soluble carbohydrates shifted the fermentation pattern in the rumen which give rise to a more hostile environment for the methanogenic bacteria in which passage rates are increased, ruminal pH is lowered and certain population of protozoa, ruminal ciliates and methanogenic bacteria maybe eliminated or inhibited, which results in lower CH₄ production. Russel (1998) suggested that rumen bacteria that produce propionate are more sensitive to pH than some bacteria that produce acetate and H₂, because the A/P ratio was dramatically increased and a large amount of H₂ was detected when the final pH in his experiments was less than 5.3. Moreover, the final pH range of 5.3 to 6.5, CH₄ production was highly correlated with A/P ratio, which depended on the pH and substrate (CH₄ = 0.02 + 0.05 pH; r² = 0.80) (Russell, 1998).

Forage type and quality can also increase voluntary feed intake, which consequently reduces retention time in the rumen and partly shifts digestion from the rumen to lower gut (Eckard, 2010). The digestion of starch and protein in the small intestine is characterized to be more efficient compared to rumen fermentation, resulting in a reduced conversion of feed energy to methane (Blaxter, 1965). Several authors have shown that including tannin rich legumes (sainfoin, lotus, sulla) and shrubs in the diet contribute to a decrease in methanogenesis due to the presence of condensed tannins (Eckard, 2010; Blaxter, 1965; Waghorn, 2007). Robertson and Waghorn (2002) observed that CH₄ production from grazing dairy cows increased with forage maturity. A putative decrease in CH₄ with young fresh forages may be explained by a higher content of soluble sugars and linolenic acid. More generally, the correlation between forage quality and CH₄ emissions is low (Pinares-Patino,

2003). Methanogenesis tends to be lower when forages are ensiled than when they are dried, and when they are finely ground or pelleted than when coarsely chopped (Boadi, 2004; Beauchemin, 2008). Improving forage quality tends to increase voluntary intake and reduces retention time in the rumen, promoting energetically more efficient post-ruminal digestion and reducing the proportion of dietary energy converted to CH₄ (Blaxter, 1965).

Dietary fat supplements:

Dietary fat seems a promising nutritional alternative to depress ruminal methanogenesis without affecting other ruminal parameters. Fatty acids, especially those of medium chain length (C8–C16) (e.g., coconut oil, canola oil, kernel oil etc.) have been found to decrease methane production (Machmuller, 1999; Dohme, 2000) and in study a 22% reduction was achieved by addition of sunflower oil to the diet (McGinn, 2004). Most of the oils and fatty acids that reduce methanogenesis reduce the ruminal level of protozoa that are known to be cosymbionts of methanogens. Therefore, a reduction in protozoan numbers is partly responsible for the decreased methane production induced by oils and fatty acids (Kobayashi, 2010). However, the effects of fat on methane production are not limited to those mediated via the rumen protozoa. Lipids have also been shown to inhibit methanogenesis even in the absence of rumen protozoa (Dohme, 1999), possibly due to the toxicity of long chain fatty acids to methanogenic bacteria (Henderson, 1973). Linolenic acid is toxic to cellulolytic bacteria (*F. succinogenes*, *R. albus* and *R. flavefaciens*) by disrupting their cell integrity, and to the cellulolytic fungus *Neocallimastix frontalis* grown *in vitro* [43]. In addition, biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids results in an uptake of hydrogen. However, its influence on methanogenesis is low since the complete hydrogenation of 1 mol of linolenic acid spares 0.75 mol of CH₄ (Martin, 2010). A common effect for all lipid sources is that unlike other feed constituents such as forages and cereals they are not fermented in the rumen, and thus the decrease in fermented organic matter leads to a decrease in CH₄ production. Among common sources of lipids, coconut oil suffers from a possible negative effect of medium-chain fatty acids (FA) on human health, due to an increase in meristic acid in milk (Martin, 2010). In contrast, polyunsaturated FA are considered beneficial to human health. The inclusion of polyunsaturated FA in ruminant diets results in a limited increase of these FA's in milk and meat could thus be proposed as a way for CH₄ abatement provided that supplementation levels do not decrease feed efficiency or performance of animals (Martin, 2010).

Methane inhibitors:

A large number of halogenated methane analogues and related compounds have been studied for their efficacy in inhibiting CH₄ production. Some of them, including chloroform, amichloral and 2-bromoethanesulfonic acid, can be used directly to suppress methanogenesis, but they have an adverse effect on the animal (Dong, 1999). Chloroform reduced methanogenesis *in vitro* and *in vivo* (Bauchop, 1967; Clapperton, 1974), but is obviously not suitable for use in practice. Chloral hydrate, which is converted to chloroform in the rumen (Prins, 1965; Quaghebaour, 1971), inhibited methane production *in vivo* (Mathers, 1982) but lead to liver damage and death in sheep after prolonged feeding (Lanigan, 1978). In contrast, amichloral appeared to be safer and was found to increase live weight gain in sheep. Denman *et al* (2007) reported that bromochloromethane could decrease the number of methanogenic *Archaea* by 34% as assayed by qPCR and thus reduce methane production. But the anti-methanogenic activity of bromochloromethane has been reported to be transient (Sawyer, 1974). However, a combination of bromochloromethane with α -cyclodextrin was found to be more stable, and was shown to suppress methane emissions in sheep and cattle over a prolonged period (McCrabb, 1997). 2-bromoethanesulfonic acid (BES), a bromine analogue of coenzyme F involved in methyl group transfer during methanogenesis, is a potent methane inhibitor (Martin, 1985; Wolfe, 1982). BES is a specific inhibitor of methanogens and does not appear to inhibit the growth of other bacteria (Sauer, 1987; Sparling, 1987). However, when tested *in vivo* the inhibition in methanogenesis was transient suggesting that adaptation of the methanogenic population occurred (Van Nevel, 1995). Quaternary ammonium compounds inhibit methanogenesis at concentration of 25 mg/l or above but at prolonged periods of incubation the effect become transient (Tezel, 2006). Anthraquinone has also been shown to inhibit methanogenesis *in vitro* and in lambs by inhibiting the methyl-coenzyme M reductase (Garcia-Lopez, 1996; Kung, 1998).

Mevastatin and lavastatin, inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, can inhibit growth and methane production of *Methanobrevibacter* strains isolated from the rumen (Miller, 2001). Since *Archaea* are the only bacteria known to possess biosynthetic HMG-CoA reductase, HMG-CoA reductase inhibitors would have the potential to specifically inhibit rumen methanogens without inhibiting other rumen bacteria [63]. Inhibitors directly toxic to methanogens are a powerful tool to stop methanogens from producing methane. However, as a result of these inhibitors, Hydrogen, which could suppress the activity of rumen fermentation, can be expected to accumulate in the rumen (Baker, 1995).

Ionophores:

Ionophores are lipid-soluble molecules. Some ionophores are used as antibiotics or as growth-enhancing feed additives for growing cattle. Adding ionophores to the diet of ruminants has been shown to reduce CH₄ production (Moss, 2000). It promotes the production of propionate at the expense of acetate and reduces feed intake (Ramin, 2013; Johnson, 1995; Baker, 1995; Hegarty, 1999). Ionophores are generally effective against Gram-positive bacteria but exhibit little or no activity against Gram-negative bacteria and methanogens in the rumen (Nagaraja, 1997). Furthermore, entodiniomorphs (*Entodinium*, *Diplodinium* and *Ophryoscolex*) in rumen ciliates are sensitive to ionophores (Dennis, 1986). It is assumed that ionophores are able to modify rumen fermentation based on their antimicrobial spectrum, which has been examined using culturable strains (Mitsumori, 2008).

Monensin is the most commonly used ionophore in ruminant nutrition and was originally developed as a coccidiostat in poultry (Chapman, 2010; Rodehutscord, 2013). Monensin is considered as a growth promoter due to its favorable effects on rumen fermentation including methane reduction, propionate enhancement and ammonia reduction, together with its preventive effects on coccidiosis, bloat and lactic acidosis. These effects are attributed to a selective antimicrobial action of monensin on rumen microbes. Review papers indicate that methane reduction by monensin ranges from 4 to 31% (Schelling, 1984; Rumpler, 1986). A recent report indicated that long term administration of monensin to dairy cattle stably reduced methane by 7% and that this reduction persisted for 6 months with no adverse effect on milk yield (Kobayashi, 2010; Odongo, 2007). Further investigations are needed to verify whether monensin is able to reduce methane production without adverse effects on rumen fermentation, and to clarify its effect on microbial protein synthesis on the basis of commonly used feedstuffs in ruminant production.

This family of additives is not permitted in many countries including the European Union. Research has focused on the use of other compounds that can be substituted for ionophores but have the same inhibitory effect. Plant extracts have shown inhibitory effects on CH₄ production. Using a rumen simulation technique, McAllister and Newbold (McAllister, 2008) reported that a commercial allicin product originating from garlic was effective in inhibiting CH₄ production at a dose of 20 µg/mL without any adverse effect on daily VFA production. Tannins have also been reported to reduce emissions of CH₄ from ruminants, either by reducing the methanogen population in the rumen directly or by reducing the protozoa population, which tends to increase the molar proportion of propionate in the rumen (Bhatta, 2009). Tavendale *et al* (Tavendale, 2005) reported a decrease in CH₄ production when legume forages containing condensed tannins were

incubated *in vitro*. Reductions in H₂ production or direct inhibitory effects on methanogens were the suggested mechanisms by which tannins reduced CH₄ production (Ramin, 2013).

Defaunation:

Protozoa provide a habitat for 10 to 20% of rumen methanogens and produce acetate and butyrate as substrates for methanogenesis (Rodehutscord, 2013; Stumm, 1982)]. The elimination of protozoa (defaunation) is reported to considerably decrease the methane production compared with the normal faunated animals (Williams, 1988; Santra, 2002). Defaunation can be done by lowering the pH in the rumen (e.g. feeding grain), if the pH fall below 5.0, the ciliate protozoa are to be completely eliminated. In addition, the inclusion of fat in ruminant diet depress protozoal numbers (Ikwuegbu, 1982; Czerkawski, 1975) and the use of lipids as a defaunating agent has been suggested (Moss, 2000; Newbold, 1988).

It is possible to get defaunated animals with a consequently lower methane production, when they are isolated as new-borns from other ruminants (Faichney, 1999). Hegarty (Hegarty, 1999) reviewed further possibilities to eliminate protozoa by the use of synthetic chemicals (e.g. copper sulphate or calcium peroxide). Plant secondary metabolites i.e., saponin-containing plants are reported to suppress or inhibit protozoa and certain bacteria in the rumen (Cheeke, 2000). Saponins are glycosides which interact with the cholesterol present in the membrane of protozoa and causes cell lysis (Hess, 2003).

Consequently, the elimination of the rumen protozoal population to mitigate methanogenesis appears interesting, but this option should be carefully evaluated in terms of livestock performances. The absence of protozoa from the rumen can have diverse effects on animals that can be either negative or positive depending on the diet and the type of production targeted. Up to now, however, practical defaunation techniques are not available (Martin, 2010).

Acetogenesis:

An alternative strategy to reduce ruminal methanogenesis would be to rechannel substrates for methane production into alternative products, in fact, potential microbes for CO₂-acetate fermentation exist in the rumen, but CO₂-CH₄ fermentation is always predominant in the rumen (Crutzen, 1995; Fievez, 1999). Acetogenic bacteria in the hindgut of mammals and termites produce acetic acid by the reduction of carbon dioxide with hydrogen and reductive acetogenesis acts as important hydrogen sink in hindgut fermentation (Lajoie, 1988; Demeyer, 1991). Adding acetogenic bacteria daily as a feed additive to the diet of ruminants can inhibit CH₄ production, as they compete with methanogens by using H₂ and producing acetic acid. Joblin (Joblin, 1999) reported that artificially increasing the

concentration of acetogens through exogenous inoculation could be useful for competing against methanogens as they have many-fold greater hydrogen threshold concentration than methanogens. Similarly, Lopez *et al* (1999) found that acetogens suppressed methane production when added to the rumen fluid *in vitro* but that they did not persist in the rumen. However, they concluded that it might be possible to achieve the same metabolic activity using acetogens provided as a daily-fed feed additive. Unfortunately, it has been reported that in the rumen conditions, acetogens are unable to compete with methanogenic *Archaea*. Acetogens are more active in the gut of termites and the human colon than in the rumen (Immig, 1996; Klieve, 1999), furthermore acetogens are more numerous in the hind-gut than in the rumen of the dairy cow (Fievez, 1999).

Vaccines and other factors:

Several biotechnological strategies are currently being explored. Vaccination is a novel strategy to reduce CH₄ production in ruminants. This approach has the benefit of using the animal's immune system to produce antibodies against specific methanogens, instead of chemicals, drugs, or antibiotics that may be potentially harmful to the animal or the environment. Baker (Baker, 1995) has proposed that it may be possible to immunize ruminants against their own methanogens with associated decreases in CH₄ output. Shu *et al* (1999) have shown that such an approach can successfully reduce the numbers of *Streptococci* and *Lactobacilli* in the rumen. In a further study by Wright *et al* (Wright, 2004), two vaccines were developed, named VF3 (based on three methanogen strains) and VF7 (based on seven methanogen strains), which produced a 7.7% methane reduction per dry matter intake, despite only approximately 20% of the methanogen population being targeted. The same research group also created a vaccine based on five methanogen strains that was administered in three vaccinations to sheep (Williams, 2009). An additional vaccine has recently been developed using subcellular fractions of *Methanobrevibacter ruminantium* M1. Twenty sheep were vaccinated and then revaccinated three weeks later and the antisera was found to cause agglutination of methanogens and decrease growth and methane production *in vitro* (Wedlock, 2010).

Biological strategies to control methanogens are one approach influencing CH₄ production. Bacteriophages against rumen bacteria, not rumen *Archaea*, have been detected in the rumen (Swain, 1996; Klieve, 2004). The presence of phages against archaea in the rumen has also been suggested (Newbold, 1996). Some bacteriocins are known to reduce CH₄ production *in vitro* (Lee, 2002; Callaway, 1997). Nisin is thought to act indirectly, affecting hydrogen-producing microbes in a similar way to that of the ionophore anti-biotic, monensin (Callaway, 1997). There is a single *in vivo* result

reporting a significant 10% decrease of CH₄ emissions in sheep with this bacteriocin (Santoso, 2004). In contrast, the expected effect of nisin on the improvement of nitrogen metabolism was not observed in other *in vivo* reports (Santoso, 2004; Russell, 2002) implying that the same may happen if CH₄ was measured. A bacteriocin obtained from a rumen bacterium, bovicin HC5, decreased CH₄ production *in vitro* up to 50% without inducing methanogens' adaptation (Lee, 2002). The reported inhibitory effect on methanogenesis of spent culture from *Lactobacillus plantarum* 80 is also probably induced by a bacteriocin or a similar compound. The compound(s) in question reduced numbers of methanogens, but, like many other inhibitors that are efficient *in vitro*, the effect was lost in sheep after continuous administration for a few days (Nollet, 1998).

Plants and their extracts:

Many compounds extracted from plants have been screened and utilized for their ability to reduce rumen methanogens, because of the increased awareness of the hazards associated the use of antibiotics and chemical feed additives (Wallace, 1996). One such compound is saponin. These are glycosides found in many plants that have a direct effect on rumen microbes. Saponins decrease protein degradation and favor at the same time microbial protein and biomass synthesis (Makkar, 1996), two processes that result in reduced availability of hydrogen for CH₄ production (Dijkstra, 2007). However, the mode of action of saponins seems to be mostly related to their anti-protozoal effect (Newbold, 2006). For tannin-rich plants, the antimethanogenic activity has been attributed mainly to the group of condensed tannins. Hydrolysable tannins, although they also affect methanogens (Field, 1989), are usually considered more toxic to the animal (McSweeney, 2001) and have not been extensively tested. The condensed tannins appear to decrease methane more through reduction in fibre digestion (indirect effect), while hydrolysable tannins act more through inhibition of the growth and/or activity of methanogens- and/or hydrogen-producing microbes (direct effect). Most essential oils and active components tested at high doses have inhibited rumen microbial fermentation, confirming their antimicrobial activity. Garlic oil, cinnamaldehyde, eugenol, anethol, and capsaicin are potential options for application as additives for ruminants. However, even though *in vitro* research is still needed for screening new products and determining mechanisms of action, there is an urgent need to conduct *in vivo* studies to determine the optimal dose in units of the active component, the potential adaptation of rumen microflora to the action of these additives, the fate of these products in the animal and the presence of residues in meat or milk, and the effects on animal performance (Calsamiglia, 2007).

Conclusions:

There is growing worldwide interest in reducing methane emissions from domestic ruminants. Methane is a potent greenhouse gas and its release into the atmosphere is directly linked with animal agriculture, particularly ruminant production. Methane mitigation options from ruminants focus on increasing production per animal, modifying diet, decreasing numbers of methanogens and methanogen activity and by reducing livestock numbers. Moreover, stimulation of propionate production could be the best alternative hydrogen sink to methanogenesis in the rumen. Therefore, a strategy for abatement of methane production should be considered concurrently with a strategy to enhance propionate production. A universal feed additive that works under different conditions may not exist because effects have been diet and ruminal pH dependent. Although various feed additive candidates are now available to achieve this aim, the choice of additive must depend on the potency, safety, and expense of the candidate additive. Models predicting the amounts of CH₄ produced by ruminants are more of an interest for inventories such as IPCC and for developing mitigation strategies. Emphasis should be placed on developing models predicting CH₄ production with minimum requirements needed as input variables, with the goal of achieving higher accuracy. For evaluating mitigation strategies, models that are able to predict feed intake with reasonable accuracy and that rely on input data available at the time of predictions should be developed. It would also be useful to develop ration formulation models, in which CH₄ production per unit product can be used as a constraint.

REFERENCES

- Argyle, JL., RL. Baldwin, 1988. Modeling of rumen water kinetics and effects of rumen pH changes. *J Dairy Sci*, 71: 1178-1188.
- Baker, SK., 1995. Method for improving utilization of nutrients by ruminant or ruminant like animals. International Patent No WO9511041.
- Bannink, A., J. Dijkstra, JAN. Mills, E. Kebreab, J. France, 2005. Nutritional strategies to reduce enteric methane formation in dairy cows. In: *Emissions from European Agriculture* Edited by Kuczynski T, Dämmgen U, Webb J, Myczko A. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, pp: 367-376.
- Bauchop, T., 1967. Inhibition of rumen methanogenesis by methane analogues. *J. Bacteriol*, 94: 171-175.
- Beauchemin, KA., M. Kreuzer, F. O'Mara, TA. McAllister, 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust. J. Exp. Agric*, 48: 21-27.
- Bhatta, R., Y. Uyeno, K. Tajima, A. Takenaka, Y. Yabumoto, I. Nonaka, O. Enishi, M. Kurihara, 2009. Difference in the nature of tannins on *in vitro* ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic Archaea and protozoal populations. *J. Dairy.Sci*, 92: 5512-5522.
- Blaxter, KL., JL. Clapperton, 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *Brit.J. Nutr*, 19: 511-522.
- Boadi, D., C. Benchaar, J. Chiquette, D. Masse, 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: update review. *Can. J. Anim. Sci*, 84: 319-335.
- Bonhomme, A., 1990. Rumen ciliates: their metabolism and relationships with bacteria and their hosts. *Anim. Feed Sci. Technol*, 30: 203-266.
- Callaway, TR., DE. Carneiro, AM. Melo, JB. Russell, 1997. The effect of nisin and monensin on ruminal fermentations *in vitro*. *Cur. Microbiol*, 35: 90-96.
- Calsamiglia, S., M. Busquet, PW. Cardozo, L. Castillejos, A. Ferret, 2007. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *J. Dairy. Sci*, 90: 2580-2595.
- Chapman, HD., TK. Jeffers, RB. Williams, 2010. Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. *Poult. Sci*, 89: 1788-1801.
- Cheeke, PR., 2000. Actual and potential application of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. *J. Anim. Sci*, 77: 1-10.
- Clapperton, JL., 1974. The effect of trichloroacetamide chloroform & linseed oil given into the rumen of sheep on some of the end products of rumen digestion. *Br. J. Nutr*, 32: 155-161.
- Crutzen, PJ., 1995. Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. In *The Role of Methane in Atmospheric Chemistry and Climate*. Edited by Engelhardt WV, Leonhardt-Marek S, Breves G, Giesecke D. Ventura, Germany, pp: 291-313.
- Czerkawski, JW., WW. Christie, G. Breckenridge, ML. Hunter, 1975. Changes in rumen metabolism of sheep given increasing amounts of linseed oil in their diet. *Br. J. Nutr*, 34: 25-44.
- Demeyer, DI., K. De Graeve, 1991. Differences in stoichiometry between rumen and hindgut fermentation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr*, 22: 50-61.
- Denman, SE., NW. Tomkins, CS. McSweeney, 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol*, 62: 313-322.
- Dennis, SM., TG. Nagaraja, AD. Dayton, 1986. Effect of lasalocid, monensin and thiopeptin on rumen protozoa. *Res. Vet. Sci*, 41: 251-256.
- Dijkstra, J., A. Bannink, J. France, E. Kebreab, 2007. Nutritional control to reduce environmental impacts of intensive dairy cattle systems. In: *Proceedings of the VII International Symposium on the Nutrition of Herbivores*. Edited by Meng QX,

- Ren LP, Cao ZJ. China Agricultural University Press, Beijing, China, pp: 411-435.
- Dijkstra, J., HD. Neal, C. St, DE. Beever, J. France, 1992. Stimulation of nutrient digestion, absorption and outflow in the rumen: model description. *J. Nutr.*, 122: 2239-2256.
- Dohme, F., A. Machmuller, A. Wasserfallen, M. Kreuzer, 2000. Comparative efficiency in various fats rich medium chain fatty acid to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. *Can. J. Agric. Sci.*, 80: 473-482.
- Dohme, F., A. Machmuller, BL. Estermann, P. Pfister, A. Wasserfallen, M. Reuzer, 1999. The role of the rumen ciliate protozoa for methane suppression caused by coconut oil. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29: 187-193.
- Dong, Y., HD. Bae, TA. McAllister, GW. Mathison, KJ. Cheng, 1999. Effects of exogenous fibrolytic enzymes, 2-bromoethanesulfonate and monensin on fermentation in a rumen simulation (RUSITEC) system. *Can. J. Anim. Sci.*, 79: 491-498.
- Eckard, RJ., C. Grainger, CAM. de Klein, 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livest. Sci.*, 130: 47-56.
- Faichney, GJ., NM. Graham, DM. Walker, 1999. Rumen characteristics, methane emissions, and digestion in weaned lambs reared in isolation. *Aust. J. Agric. Res.*, 50: 1083-1089.
- Field, JA., S. Kortekaas, G. Lettinga, 1989. The tannin theory of methanogenic toxicity. *Biol. Waste*, 29: 241-262.
- Fievez, V., F. Piattoni, L. Mbanzamihigo, D. Demeyer, 1999. Reductive acetogenesis in the hindgut and attempts to its induction in the rumen - A review. *J. Appl. Anim. Res.*, 16: 1-22.
- Finlay, BJ., G. Esteban, KJ. Clarke, AG. Williams, TM. Embley, RP. Hirt, 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *Fems. Microbiol. Lett.*, 117: 157-162.
- Friggens, NC., JD. Oldham, RJ. Dewhurst, G. Horgan, 1998. Proportions of volatile fatty acids in relation to the chemical composition of feeds based on grass silage. *J. Dairy*, 8: 1331-1334.
- Garcia-Lopez, PM., LJR. Kung, JMI. Odom, 1996. *In vitro* inhibition of microbial methane production by 9, 10- anthraquinone. *J. Anim. Sci.*, 74: 2276-2284.
- Goel, G., HPS. Makkar, 2011. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Trop. Anim. Health. Prod.*, 44: 729-39.
- Gworgwor, ZA., TF. Mbahi, B. Yakubu, 2006. Environmental Implications of Methane Production by Ruminants: A Review. *J. Sustain. Agr. Dev. Agric. Environ.*, 2: 0794-8867.
- Hegarty, RS., 1999. Mechanisms for competitively reducing ruminal methanogenesis. *Aust. J. Agric. Res.*, 50: 1299-1305.
- Hegarty, RS., 1999. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Aust. J. Agric. Res.*, 50: 1321-1327.
- Henderson, C., 1973. The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. *J. Agric. Sci (Camb)*, 81: 107-112.
- Hess, HD., M. Kreuzer, TE. Diaz, CE. Lascano, JE. Carulla, R. Soliva Carla, A. Machmüller, 2003. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Anim. Feed. Sci. Technol.*, 109: 79-94.
- Ikwuegbu, OA., JD. Sutton, 1982. The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. *Br. J. Nutr.*, 48: 365-375.
- Immig, I., 1996. The rumen and hindgut as source of ruminant methanogenesis. *Environ. Monit. Assess.*, 42: 57-72.
- IPCC, 2001. In: *Climate Change*. Edited by Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ. The Scientific Background, vol. 94; Cambridge, UK. Cambridge University Press.
- Joblin, KN., 1999. Ruminant acetogens and their potential to lower ruminant methane emission. *Aust. J. Agric. Res.*, 50: 1307-1313.
- Johnson, KA., DE. Johnson, 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.*, 73: 2483-2492.
- Klieve, AV., PA. Bain, MT. Yokoyama, D. Ouwkerk, RJ. Forster, AF. Turner, 2004. Bacteriophages that infect the cellulolytic ruminal bacterium *Ruminococcus albus* AR67. *Lett. Appl. Microbiol.*, 38: 333-338.
- Klieve, AV., RS. Hegarty, 1999. Opportunities for biological control of ruminal methanogenesis. *Aust. J. Agric. Res.*, 50: 1315-1319.
- Kobayashi, Y., 2010. Abatement of Methane Production from Ruminants: Trends in the Manipulation of Rumen Fermentation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 23(Suppl 3): 410-416.
- Krumholz, LR., CW. Forsberg, DM. Veira, 1983. Association of methanogenic bacteria with rumen protozoa. *Can. J. Microbiol.*, 29: 676-680.
- Kumar, S., AK. Puniya, M. Puniya, SS. Dagar, SK. Sirohi, K. Singh, GW. Griffith, 2009. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *World. J. Microbiol Biotechnol.*, 25: 1557-1566.
- Kung, LJR., AO. Hession, JP. Bracht, 1998. Inhibition of sulfate reduction to sulfide by 9, 10-anthraquinone in *in vitro* ruminal fermentations. *J. Dairy. Sci.*, 81: 2251-2256.
- Lajoie, SF., S. Bank, TL. Miller, MJ. Wolin, 1988. Acetate production from hydrogen and 13 carbondioxide by the microflora of human faces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(Suppl 11): 2723-2727.
- Lanigan, GW., AL. Payne, JE. Peterson, 1978. Antimethanogenic drugs and *heliotropium europaeum* poisoning in penned sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, 29: 1281-1291.
- Lee, SS., JT. Hsu, HC. Mantovani, JB. Russell, 2002. The effect of bovicin HC5, a bacteriocin from

- Streptococcus bovis* HC5, on ruminal methane production *in vitro*. *Fems. Microbiol. Lett*, 217: 51-55.
- Leng, RA, 1993. Quantative Ruminant Nutrition- A Green house science. *Aust. J. Agric. Res*, 44: 363-80.
- Lopez, S., FM. McIntosh, RJ. Wallace, CJ. Newbold, 1999. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. *Anim. Feed. Sci. Technol*, 78:1-9.
- Machmuller, A., M. Kreuzer, 1999. Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. *Can. J. Anim. Sci*, 79: 65-72.
- Maia, MRG., LC. Chaudhary, L. Figueres, RJ. Wallace, 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *A. Van. Leeuw*, 91: 303-314.
- Makkar, HPS., K. Becker, 1996. Effect of pH, temperature, and time on inactivation of tannins and possible implications in detannification studies. *J. Agric. Food. Chem*, 44: 1291-1295.
- Martin, C., DP. Morgavi, M. Doreau, 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Anim*, 4(Suppl 3): 351-365.
- Martin, SA., JM. Macey, 1985. Effects of monensin, pyromellitic diimide and 2-bromoethanesulfonic acid on rumen fermentation *in vitro*. *J. Anim. Sci*, 60: 544-550.
- Mathers, JC., EL. Miller, 1982. Some effects of chloral hydrate on rumen fermentation and digestion in sheep. *J. Agric. Sci (Camb)*, 99: 215-224.
- McAllister, TA, CJ. Newbold, 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Aust. J. Exp. Agric*, 48: 7-13.
- McAllister, TA., KA. Beauchemin, SM. McGinn, X. Hao, PH. Robinson, 2011. Greenhouse gases in animal agriculture-Finding a balance between food production and emissions. *Anim. Feed. Sci. Technol* 2011, 1(Suppl 166-167).
- McCrabb, GJ., KT. Berger, T. Magner, C. May, RA. Hunter, 1997. Inhibiting methane production in Brahman cattle by dietary supplementation with a novel compound and the effects on growth. *Aust. J. Agric Res*, 48: 323-329.
- McGinn, SM., KA. Beauchemin, T. Coates, D. Colombatto, 2004. Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast and fumaric acid. *J. Anim. Sci*, 82: 3346-3356.
- McSweeney, CS., B. Palmer, DM. McNeill, DO. Krause, 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim. Feed. Sci. Technol*, 91: 83-93.
- Miller, TL., MJ. Wolin, 2001. Inhibition of growth of methane-producing bacteria of the ruminant forestomach by hydroxymethylglutaryl-S-CoA reductase inhibitors. *J. Dairy Sci*, 84(Suppl 6):1445-8.
- Mills, JAN., J. Dijkstra, A. Bannink, SB. Cammell, E. Kebreab, J. France, 2001. A mechanistic model of whole-tract digestion and methanogenesis in the lactating dairy cow: Model development, evaluation, and application. *J. Anim. Sci*, 79: 1584-1597.
- Mitsumori, M., W. Sun, 2008. Control of Rumen Microbial Fermentation for Mitigating Methane Emissions from the Rumen. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*, 21(Suppl 1):144-154.
- Moss, AR., JP. Jouany, CJ. Newbold, 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech*, 49: 231-253.
- Murphy, MR., RL. Baldwin, LJ. Koong, 1982. Estimation of stoichiometric parameters of rumen fermentation of roughage and concentrate diets. *J. Anim*, 55: 411-421.
- Nagaraja, TG., CJ. Newbold, CJ. Van Nevel, DI. Demeyer, 1997. Manipulation of ruminal fermentation. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. 2nd edition. Edited by Hobson PJ, Stewart CS. London. Blackie Acad. Profess, 523-632.
- Newbold, CJ., LM. Rode, 2006. Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. In *Greenhouse gases and animal agriculture: an update*. Edited by Soliva CR, Takahashi J, Kreuzer M. Elsevier International Congress Series 1293. Elsevier, Amsterdam. The Netherlands, pp: 138-147.
- Newbold, CJ., RJ. Wallace, FM. McIntosh, 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *Br. J. Nutr*, 76: 249-261.
- Newbold, CJ., RJ. Wallace, ND. Watt, AJ. Richardson, 1988. The effect of the novel ionophore tetronasin (ICI 139603) on ruminal microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol*, 54: 544-547.
- Nollet, L., L. Mbanzamihi, D. Demeyer, W. Verstraete, 1998. Effect of the addition of *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 on reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem after inhibition of methanogenesis by cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* 80. *Anim. Feed. Sci. Technol*, 71: 49-66.
- Odongo, NE., R. Bagg , G. Vessie , P. Dick, MM. Or-Rashid, SE. Hook, JT. Gray, E. Kebreab, J. France, BW. McBride, 2007. Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci* 2007, 90: 1781-1788.
- Pinares-Patino, CS., MJ. Ulyatt, KR. Lassey, TN. Barry, CW. Holmes, 2003. Rumen function and digestion parameters associated with differences between sheep in methane emissions when fed chaffed lucerne hay. *J. Agric. Sci*, 140: 205-214.
- Prins, RA., 1965. Action of chloral hydrate on rumen microorganisms *in vitro*. *J. Dairy Sci*, 48: 991-993.
- Quaghebaer, D., W. Oyaert, 1971. Effect of chloral hydrate and related compounds on the activity of several enzymes in extracts of rumen microorganisms. *Zentrabl. Veterinaer. Med*, 18: 417-427.

- Ramin, M., 2013. Predicting Methane Production in Dairy Cows. *PhD thesis*. Swedish University of Agricultural Sciences Umeå. Sweden.
- Robertson, LJ., GC. Waghorn, 2002. Dairy industry perspectives on methane emissions and production from cattle fed pasture or total mixed rations in New Zealand. In: Proceedings of the New Zealand Society Animal Production, 62: 213-218.
- Rodehutsord, M., 2013. Effects of monensin and tannin extract supplementation on methane production and other criteria of rumen fermentation *in vitro* and in long-term studies with sheep. *Dissertation*. Universität Hohenheim. Hohenheim.
- Rumpler, WV., DE. Johnson, DB. Bates, 1986. The effect of high dietary cation concentrations of methanogenesis by steers fed with or without ionophores. *J. Anim. Sci*, 62: 1737-1741.
- Russell, JB., 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. *J. Dairy Sci*, 81: 3222-3230.
- Russell, JB., HC. Mantovani, 2002. The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. *J. Mol. Microb. Biotech*, 4: 347-355.
- Santoso, B., B. Mwenya, C. Sar, Y. Gamo, T. Kobayashi, R. Morikawa, K. Kimura, H. Mizukoshi, J. Takahashi, 2004. Effects of supplementing galacto-oligosaccharides, *Yucca schidigera* or nisin on rumen methanogenesis, nitrogen and energy metabolism in sheep. *Livest. Prod. Sci*, 91: 209-217.
- Santra, A., SA. Karim, 2002. Nutrient utilization and growth performance of defaunated and faunated lambs maintained on complete diets containing varying proportion of roughage and concentrate. *Anim. Feed. Sci. Technol*, 101: 87-99.
- Sauer, FD., RM. Teather, 1987. Changes in oxidation-reduction potentials and volatile fatty acid production by rumen bacteria when methane synthesis is inhibited. *J. Dairy Sci*, 70: 1835-1840.
- Sawyer, MS., WH. Hoover, CJ. Sniffen, 1974. Effects of ruminal methane inhibitor on growth and energy metabolism in the ovine. *J. Anim. Sci*, 38: 908-914.
- Schelling, GT., 1984. Monensin mode of action in the rumen. *J. Anim. Sci*, 58: 1518-1527.
- Shu, Q., HS. Gill, DW. Hennessy, RA. Leng, SH. Bird, JB. Rowe, 1999. Immunisation against lactic acidosis in cattle. *Res. Vet. Sci*, 67: 65-71.
- Smink, W., KD. Bos, AF. Fitie, LJ. Van der Kolk, WKJ. Rijm, G. Roelofs, GAM. Van den Broek, 2003. Methaanreductie melkvee. Een onderzoeksrapport naar inschatting van de methaanproductie vanuit de voeding en naar de reductiemogelijkheden via de voeding van melkkoeien. FIS report, Wageningen.
- Sparling, R., L. Daniels, 1987. The specificity of growth inhibition of methanogenic bacteria by bromoethanesulfonate. *Can. J. Microbiol*, 33: 1132-1136.
- Stumm, CK., HJ. Gijzen, GD. Vogels, 1982. Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *Br. J. Nutr*, 47: 95-99.
- Stumm, CK., KB. Zwart, 1986. Symbiosis of protozoa with hydrogen-utilizing methanogens. *Microbiol. Sci*, 3: 100-105.
- Swain, RA., JV. Nolan, AV. Klieve, 1996. Natural variability and diurnal fluctuations within the bacteriophage population of the rumen. *Appl. Environ. Microbiol*, 62: 994-997.
- Tavendale, MH., LP. Meagher, D. Pacheco, N. Walker, TA. Graeme, S. Sivakumaran, 2005. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Anim. Feed. Sci. Technol*, 123-124: 403-419.
- Tezel, U., JA. Pierson, SG. Pavlostathis, 2006. Fate and effect of quaternary ammonium compounds on a mixed methanogenic culture. *Water. Res*, 40: 3660-3668.
- Thorpe, A., 2009. Enteric fermentation and ruminant eructation: the role (and control?) of methane in the climate change debate. *Clim. Chan*, 93: 407-431.
- Ungerfeld, EM., SR. Rust, DR. Boone, Y. Liu, 2004. Effects of several inhibitors on pure cultures of ruminal methanogens. *J. Appl. Microbiol*, 97: 520-526.
- Van Nevel, CJ., DI. Demeyer, 1995. Feed additives and other interventions for decreasing methane emissions. In: *Biotechnology in Animal Feeds & Animal Feeding*. Edited by Wallace RJ, Chesson A. VCH, Weinheim, pp: 329-349.
- Van Nevel, CJ., DI. Demeyer, 1988. Manipulation of rumen fermentation. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Edited by Hobson PN. New York, NY: Elsevier Applied Science, pp: 387-443.
- Van Soest, PJ., 1982. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. O & B Books, Oregon.
- Waghorn, GC., 2007. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production: progress and challenges. *Anim. Feed. Sci. Technol*, 147: 116-139.
- Wallace, RJ., 1996. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proc. Nutr. Soc*, 63: 621-629.
- Wedlock, DN., G. Pedersen, M. Denis, D. Dey, PH. Janssen, BM. Buddle, 2010. Development of a vaccine to mitigate greenhouse gas emissions in agriculture: vaccination of sheep with methanogen fractions induces antibodies that block methane production *in vitro*. *N. Z. Vet. J*, 58: 29-36.
- Williams, AG., GS. Coleman, 1988. The rumen protozoa. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Edited by Hobson PN. Elsevier Applied Science. London and New York, pp: 77-128.
- Williams, YJ., S. Popovski, SM. Rea, LC. Skillman, AF. Toovey, KS. Northwood, ADG. Wright, 2009. A vaccine against rumen methanogens

can alter the composition of archaeal populations. *Appl. Environ. Microbiol*, 75: 1860-1866.

Wolfe, RS., 1982. Biochemistry of methanogenesis. *Experientia*, 38: 198-200.

Wright, ADG., P. Kennedy, CJO. Neill, AF. Toovey, S. Popovski, SM. Rea, CL. Pimm, L. Klein, 2004. Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens. *Vac*, 22: 3976-3985.



Livestock Research for Rural Development

An International Computerized Journal (ISSN 0121-3784)

Published by CIPAV (Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria), Cali, Colombia, Edited by Dr. Thomas R Preston (Finca Ecológica, University of Agriculture and Forestry, Ho Chi Minh City, Vietnam) and Héctor Osorio (CIPAV), Electronic Publishing by Dr. Andrew W Speedy and Nicholas Waltham

[Read Livestock Research for Rural Development Papers](#)



Nutritive value assessment of some desert by-products by gas production and rumen fermentation *in vitro*

S Medjekal¹, R Arhab² and H Bousseboua²

¹ *Université Mohamed BOUDIAF M'sila, B.P 166, route Ichbillia 28 000 M'sila ALGERIE.*

sammedj2002@yahoo.fr

² *Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri, BP 325 route de Aïn-El-Bey 25.017 Constantine.*

Abstract

The main objective of this study is assessing the nutritive value of agricultural by-products dry palm leave, *Aristida pungens* in comparison to barley straw by chemical analysis, rumen fermentation characteristics and gas production technique *in vitro*. A quantitative analysis of gases produced from dry palm leaves was compared to that of Drin and barley straw which are common feeds in the semi-arid and arid regions of Algeria. The results obtained show that the activity of goats' rumen microflora is very important on the studied substrate of the arid regions, which indicates very significant digestibility coefficient. This situation is certainly due to the high content of barley straw of total soluble sugars and thus more easily fermentable. For dry palm leaves, the value of *in vitro* gas digestibility is 49.8 %. It is close to that of Drinn, probably owing to the fact that these substrates present almost the same level of lignin and of cellular wall contents. These results suggest a high potential of integrating dry palm leaves in ruminants' feed in these areas leading to overcoming the problems of maintaining feed supply.

Key words: Drinn, goats, dry palm leaves, *in vitro* gas production, rumen microflora.

Received 24 November 2009; Accepted 5 January 2011; Published 6 March 2011.

Introduction

Ruminant animals have evolved a unique system which involves a slow pre-gastric fermentation of plant fibre by bacteria, protozoa, and fungi that provide the host animal with nutrients (volatile fatty acids, microbial protein and B vitamin). High quality forages are crucial for proper feeding of ruminant animals since they provide energy, proteins and minerals (McSweeney et al 1999). In the semi-arid and arid regions of Algeria, the lowest production of forage is during dry season, which usually lasts for 6-7 months (from Mai to October) and leads to a rapid decline in the quantitative value of natural vegetation. Ruminants reared in those regions may have problems overcoming maintenance requirements on natural vegetation without any additional feed supply resulting in low performance. Agricultural and agro-industrial by-products represent an important fodder reserve for livestock in harsh conditions that can be used by grazing ruminant in periods of feed scarcity. Dry palm leaves, the yearly maintenance of date palm trees let considerable quantities of green leaves, roughly 20 kg per tree (Bahman et al 1997; Pascual et al 2000; Arhab et al 2006). This date palm by-

product is traditionally used as complementary feeding source for livestock by people who live in oases. *Aristida Pungens* (local name drinn), a spontaneous desert plant of the family of Gramineous is currently harvested and fed to animals. Knowledge about the potential feeding value of these plants is insufficient. The nutrient composition of feeds is commonly determined primarily by chemical analysis. However this does not provide sufficient information to determine the feed's true nutritive value. The *in vitro* gas production system helps to better quantify nutrient utilization and its accuracy in describing digestibility in animals has been validated in numerous experiments. The *in vitro* gas production technique developed by (Menke et Steingass 1988), has been used by (Blummel and Orskov 1993), to determine gas production at several incubation times and these values could describe the pattern of fermentation of feed, by using the equation of (Mc Donald 1981). The main objective of this study is assessing the nutritive value of agricultural by-products dry palm leave, *Aristida pungens* in comparison to barley straw by chemical analysis, rumen fermentation characteristics and gas production technique *in vitro*.

Material and methods

Plant material

Three fibrous substrates were sampled from an arid region located in the south east of ALGERIA: Dry palm leaves (whole leaves: rachis plus leaflets) which represent a by-product of date palm trees (*Phoenix dactylifera* L.), *Aristida pungens* (local name Drinn) and barley straw.

***In vitro* incubation**

The nutritive value of the three substrates was studied by measuring the volume of gas produced during the *in vitro* incubation of samples (200mg DM per syringe) according to the technique of Menke and Steingass (1988). Blanks and 200 mg of ground samples were incubated in triplicate into 60 ml calibrated propylene syringes with 30 ml of mixture of strained rumen fluid and buffer containing sodium hydrogen carbonate. The syringes were pre-warmed at 39 °C before the injection of 30 ml rumen fluid-buffer mixture into each syringe followed by incubation in an electrically heated vessel equipped with a rotor runs continuously at 9 rpm. The syringes were gently shaken 30 minutes after the start of the incubation and every hour of the first 10 hour of incubation. Rumen fluid was collected from the rumen of three male goats which were all fed a restricted amount of a commercial concentrate and wheat straw *ad libitum*. Immediately after slaughter, in the morning, samples of fresh digesta were collected from the rumen of the three goats. At the laboratory, rumen digesta was squeezed through four layers of cheesecloth to ensure liquors contained microbial population from both the liquid and solid phases. Rumen liquor was homogenized and kept at approximately 39 °C in a water bath, and flushed with CO₂ before use. At the end of incubation (i.e. 96 h), the contents of each syringe were transferred to centrifuge tubes and centrifuged at 20.000 x g for 20 minutes at 4 °C. The residual pellet was lyophilized in the tubes overnight. The residual moisture, if any was removed by drying the tubes overnight at 60°C, and then the tubes were weighed. IVDMD was calculated from differences between initial and residue weights, minus blank tubes.

Chemical analysis

Chemical analysis of the three substrates was carried out following AOAC (1990) procedures for determination of the dry matter (DM) and organic matter (OM). Nitrogen concentration was determined by a macro Kjeldahl procedure. Acid detergent fibre (ADF) and neutral detergent fibre (NDF) were determined by the procedure of Van Soest et al (1991).

Calculations and statistical analysis

Gas was expressed as ml of gas produced per 200mg of dry matter and corrected for blanks. Cumulative gas production at time t was fitted to the exponential model developed by Ørskov and McDonald (1979) ($Y = a + b(1 - \exp^{-ct})$), where Y (ml) is gas production at time t , a is the amount of gas or proportion corresponding to the rapidly degradable fraction, b is the amount of gas corresponding to the slowly degradable fraction, $a+b$ is the potential gas production corresponding to potential degradable DM, and c is gas production rate. The estimation of these parameters was made by the Neway Excel software (Arhab et al 2006; Chen 1997). Data were subject to analysis of variance (ANOVA) using STATITCF Version 5.

Results and discussion

Chemical composition and gas production

Crude protein content was low in all substrates (Table 1). The results agree with those reported in the literature (Ehag and Elkhangari 1992; Nicolic et al 1987). However, Pedraza (1998) announced a value of the higher NDF for the barley straw with 86.9% in DM. Generally, the three substrates were high in cell wall content, related to the phenological role of each one. Because of their high content of cell walls and their crude protein deficit, these three feeds can be regarded as coarse substrates (Chermiti 1997).

Table 1: Chemical analyses of different substrates (%).

	DM	Ash	CP	NDF	ADF	HC
Drinn	92.4±0.24 ^a	8.7 ±0.51 ^a	5.20±0.35 ^a	85.2±1.22 ^b	60.9±1.71 ^b	24.3±.3 ^a
Barley Straw	90.2±0.17 ^b	6.25±0.10 ^b	3.13±0.75 ^c	73.2±1.32 ^c	55.9±1.39 ^c	17.3±1.75 ^c
Dry palm leaves	91.8±0.13 ^b	8.25±0.64 ^a	4.8±0.43 ^b	87.5±0.75 ^a	65.5±1.45 ^a	21.9±0.75 ^b

DM: Dry Matter, HC: Hemicellulose.

Kinetics of gas production:

The dry palm leaves and the Drinn have almost the same curve of gas production (Figure 1), because of their closer structure and chemical composition compared to the barley straw which is characterized by a different curve indicating high degradability at all times and a short latency time. This is due to their less fibrous chemical composition and their low lignin content. The latency time (time from incubation to start of gas production) is a very important digestibility parameter.

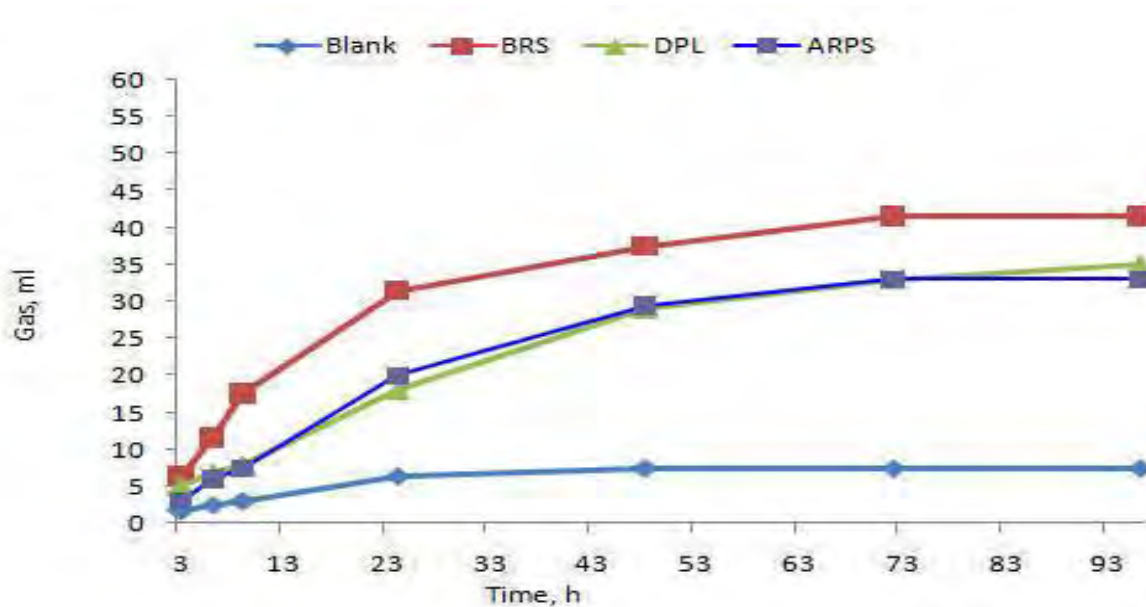


Figure 1. Kinetics of the gas production from the three substrates (BRS Barley straw, DPL Date palm leaves, ARPS *Aristida pungens*) and the blank

The profile of fermentation of the three substrates lengthens before becoming stable at 90 hours. This profile is precisely a characteristic of the fibrous substrates which express a more or less high latency time and spend a long period of stay in the rumen. Therefore, in order to maximize the nutrient supply from the leaves, longer residence time in the rumen may be required which may allow the rumen microbes to attach and degrade the fibre that may otherwise be resistant to intestinal enzymes (Salawu et al 1999).

Conclusion

Gas production from date palm leaves was comparable with that from Drinn but lower than from barley straw.

References

Arhab R, Macheboeuf D, Doreau M and Bousseboua H 2006 Nutritive Value Of Date Palm Leaves And *Aristida Pungens* Estimated By Chemical, In Vitro And In Situ Methods. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 6: 167-175.

AOAC 1990 Official methods of analysis, 15th edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C, USA.

Bahman A M, Topps J H and Rooke J A 1997 Use of date palm leaves in high concentrate diets for lactating Friesian and Holstein cows. *Journal of Arid Environment*. 35: 141-146.

Blummel M and E R Ørskov 1993 Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting of food intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology* 40:109–119.

Chermiti A 1997 Prédiction de l'ingestion volontaire des fourrages chez les ovins à partir des caractéristiques chimiques et de dégradation ruminale. *Options Méditerranéennes. Série Séminaires* 34: 37-41.

Chen X B 1997 Neway Excel: A utility for processing data of feed degradability and in vitro gas production (version 5.0). Rowett Research Institute, Aberdeen, UK. http://www.macaulay.ac.uk/IFRU/resrc_fcuvre.html

Ehag M G and Elkhargari H H 1992 Dates and sardines as potential animal feed resources. In: Branckaert R D S (Editor) *Better feeding for improved production* pp: 52-60.

McDonald I 1981 A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 96: 25 1-252.

McSweeney C S, Dalrymple B P, Gobius K S, Kennedy P M, Krause D O, Mackie R I and Xue G P 1999 The application of rumen biotechnology to improve the nutritive value of fibrous feedstuffs: pre-and post-ingestion. *Livestock Production Science* 59: 265-283.

Menke K H and Steingass H 1988 Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 28: 7-55.

Nicolic JA, Jovanovic M and Zeremski D 1987 application of modified in vitro procedure in the prédiction of organic matter digestibility of feed stuffs for ruminants. *Acta Veterinaria (Beograd)* 37: 3-12.

Ørskov E R and McDonald I 1979 The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science* 92: 499-503.

Pascual J J, Fernandez C, Diaz J R, Garces C and Rubert-Aleman J 2000 Voluntary intake and in vivo digestibility of different date-palm fractions by Murciano-Granadina (*Capra Hircus*). *Journal of Arid Environment* 45: 183-189.

Pedraza O M R 1998 Use of in vitro gas production to assess the contribution of both soluble and insoluble fractions on the nutritive value of forages. Ph.D Dissertation, University of Aberdeen, Scotland.

Salawu M B, Acamovic T, Stewart C S, Hvelplund T and Weisbjerg M R 1999 The disappearance of dry matter, nitrogen and amino acids in the gastrointestinal tract from Calliandra leaves. *Animal Feed Science and Technology* 79:289-300.

Van Soest P J, Robertson J B and Lewis B A 1991 Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.

LIVESTOCK AND CLIMATE CHANGE: MITIGATION STRATEGIES TO REDUCE METHANE PRODUCTION

Medjekal Samir¹, Ghabane Mouloud¹, Benderradji Laid¹, Hacène Bousseboua²

¹ *Université Mohamed Boudiaf-M'sila, faculté des Sciences, Département de Microbiologie et Biochimie, 2800 M'sila, Algérie.*

² *Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie Ville Universitaire Ali Mendjeli B.P. E66. Algeria.
E-mail : sammedj2002@yahoo.fr*

Résumé

Le méthane émis par les ruminants est considéré comme une perte d'énergie d'alimentation et contribue également pour 3% environ au réchauffement climatique de la planète. Le méthane est synthétisé dans le rumen comme l'un des produits de dissipation de l'hydrogène qui sont inévitables pour la succession efficace de fermentation microbienne anaérobie. Plusieurs stratégies de réduction des émissions de méthane provenant du rumen ont été proposées. Principalement par la manipulation microbienne du rumen (sélection des micro-organismes du rumen ou vaccination contre les micro-organismes méthanogènes), par l'utilisation d'agents chimiques, les antibiotiques et les produits naturels tels que des huiles, des acides gras et des extraits de plantes (additifs qui inhibent les micro-organismes méthanogènes et/ou modifient les orientations métaboliques du rumen). Une nouvelle approche est le développement de vaccins contre les bactéries méthanogènes. Bien que les antibiotiques ionophores aient été largement utilisés en raison de leur efficacité et de leur prix abordables, l'utilisation de matériaux naturels de remplacement est de plus en plus attrayante en raison de problèmes de santé concernant les antibiotiques. Il a été conclu que les zones les plus prometteuses pour la recherche future pour réduire la méthanogénèse sont le développement de nouveaux systèmes produit / livraison pour les composés antiméthanogène dans le rumen et la réduction du nombre de protozoaires dans le rumen. Quelle que soit l'approche proposée, toutefois, avant que des solutions pratiques soient appliquées dans le domaine, la durabilité des stratégies de suppression de CH₄ est une question importante qui doit être considérée. L'évaluation des stratégies différentes, en termes d'émissions total des gaz à effet de serre pour un système de production donné, est discutée.

Mots clés: Méthane, Atténuation, Fermentation ruminale, Méthanogènes.

Abstract

Methane emitted from ruminant livestock is regarded as a loss of feed energy and also a contributor to global warming. Methane is synthesized in the rumen as one of the hydrogen sink products that are unavoidable for efficient succession of anaerobic microbial fermentation. Strategies for reduction of methane emissions from the rumen have been proposed. Mainly through rumen microbial manipulation, by the use of agents including chemicals, antibiotics and natural products such as oils, fatty acids and plant extracts. A newer approach is the development of vaccines against methanogenic bacteria. While ionophore antibiotics have been widely used due to their efficacy and affordable prices, the use of alternative natural materials is becoming more attractive due to health concerns regarding antibiotics. It was concluded that the most promising areas for future research for reducing methanogenesis are the development of new product/ delivery systems for antimethanogenic compounds in the rumen and reduction in protozoal numbers in rumen. Whatever the approach proposed, however, before practical solutions are applied in the field, the sustainability of CH₄ suppressing strategies is an important issue that has to be considered. The evaluation of different strategies, in terms of total greenhouse gas emissions for a given production system, is discussed.

Keywords: Methane, Mitigation, Rumen Fermentation, Methanogens.

BAI-P34

Effects of selected medicinal plants on ruminal fermentation, fibre digestion and methane production *in vitro*

Medjekal Samir¹, Ghabbane Mouloud¹, Hacène Bousseboua²

¹ Université Mohamed Boudiaf-M'sila, faculté des Sciences, Département de Microbiologie et Biochimie, 2800 M'sila, Algérie.

² Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie, Ville universitaire Ali Mendjeli BP 66E RP 25100, Ali Mendjeli / Constantine, Algérie.

*Corresponding author: sammedj2008@gmail.com ; sammedj2002@yahoo.fr

Abstract

The objective of this *in vitro* study was to compare fermentation patterns of three selected traditional medicinal plants and to evaluate their potential as antimethanogenic additives in ruminant feeds. Effects of *Nigella sativa*, *Rosmarinus Officinalis* and *Zingiber Officinale*, which were incorporated to the fermentation substrate as a dry powder, on ruminal fermentation, fibre digestion and methane production were studied *in vitro* in batch cultures of mixed rumen microorganisms. Serum bottles containing 500 mg of substrate (500 g alfalfa hay/kg, 400 g grass hay/kg and 100 g barley grain), 50 mg of the plant additive tested and 50 ml of buffered rumen fluid (10 ml sheep rumen fluid + 40 ml culture medium) were incubated at 39 °C for 24 h. After incubation, gas and methane production, pH and volatile fatty acid (VFA) concentration in the incubation medium and dry matter and neutral detergent fibre disappearance were recorded. In general, a high methane reduction was noted with Monensin (control) and *Nigella sativa* and no effect was observed with the other treatments. The amounts of methane produced after 24 hours of fermentation varies between 0,28 and 1,12 mmol/g DM. Monensin drives the highest percentage reduction, with a value of 75% and *Nigella sativa* recorded a 20% reduction in value. This study should be complemented by other *in vitro* investigations to determine the dose effect of *Nigella sativa* and also studies by the Rusitec to ensure stability in time of the observed effects.

Keywords: *in vitro* fermentation, methanogenesis, medicinal plants, ruminants.

SESSION 7:

EFFET DES MECANISMES INCITATIFS SUR LES SYSTEMES DE PRODUCTION ET SUR LES RESSOURCES NATURELLES, EN ZONE SEMI-ARIDE.

Réf 12. INFLUENCE OF SEASONAL VARIATION ON CHEMICAL COMPOSITION AND METHANE PRODUCTION OF *CALOBOTA SAHARAE* IN M'SILA, NORTH-CENTRAL ALGERIA.

Samir MEDJEKAL¹, Mouloud GHADBANE¹, Hacène BOUSSEBOUA²

1) University of Mohamed Bouadiaf, M'sila, Faculty of Science. Department of Microbiology and Biochemistry. 28.000 M'sila. Algérie, sammedj2002@yahoo.fr;

2) ENS de Biotechnologie Ville Universitaire Ali Mendjeli BP, E66. Alegria, ensb_hb@yahoo.fr

Large tracts of desert and semi-desert lands of African and Middle Eastern countries cannot be cultivated but can be used to raise livestock, mainly sheep, goats and camels. Even in favorable rainfall years, animal performance can be poor due to a lack of adequate dietary protein and energy intake in the dry season. Furthermore, the herbaceous forage is fibrous and of low quality, and in the event of drought, livestock mortality can be high. Feed supplementation during drought is infeasible for livestock producers in resource-poor countries due to high feeding costs. Thus, an alternative approach for overcoming such feed constraints is the propagation of nutritious local fodder shrubs on degraded land. One ligneous species suitable for browse in areas of severe aridity is *Calobota saharae* Coss. & Durieu. Plant development is the major factor affecting forage quality and as plant change from vegetative to reproductive stages, forage quality generally decreases. The current trial was conducted to study the effect of season on the potential nutritive value, methane production and condensed tannin of *Calobota saharae* shrub harvested at three different seasons, in winter (mid-January), spring (mid-May) and summer (end of July). Leaves, thin twigs, some flower and seeds (when existing) were clipped with scissors from the aerial part of the plants then dried and analyzed for chemical composition. Gas and methane production were determined at 24 h incubation time. Season of harvest had a significant effect on the chemical composition, gas production and *in vitro* digestibility of Tilley and Terry but no effect on metabolisable energy. Neutral detergent fibre (NDF), Acid detergent fibre (ADF) and acid detergent lignin (ADL) of *Calobota saharae* were high during summer (dry season) and low in spring and winter (wet season). The NDF, ADF and ADL contents ranged from 463.05 to 616.82 and 352.27 to 488.21 and 121.19 to 151.73 (g/ kg DM) respectively. The gas and methane production at 24 h incubation varied between 65.75 to 77.75 and 6.50 to 10.17 (ml/ g DM) respectively and decreased significantly from spring to summer. Season had a significant effect on the nutritive value of *Calobota saharae* shrub. *Calobota saharae* should be grazed or harvested during winter and spring since these seasons provide this shrub with high ME and CP content for ruminant.

Keywords: *Calobota saharae*, nutritive value, condensed tannin, *in vitro* gas production

Réf 16. ÉVALUATION DES POLLUTIONS BIOLOGIQUES ET CHIMIQUES DES EAUX DES Puits D'USAGE DOMESTIQUE ET AGRICOLE DANS LES REGIONS ARIDES AUX NORD EST D'ALGERIE: CAS DES WILAYAS DE SETIF ET BORDJ-BOU-ARRERIDJ.

MERIBAI A., MOUATASSEM D., & BENSOLTANE A.

Laboratoire de Microbiologie Alimentaire, Université Es'Senia- Oran, hc.mer71@gmail.com

This study aimed to valorize the Algerian traditional cheese: *Klila*, by the appreciation of its microbiological, physicochemical and sensorial qualities and to select lactic acid bacteria that have technological applications. The study focused on 22 *Klila*'s samples, prepared from cattle's, goat's and sheep's *L'ben*, among which: 15 fresh samples and 04 dried samples collected from rural regions of Bordj-Bou-Arreridj's wilaya, and 03 samples manufactured at laboratory. The latter devoid any contamination whereas the collected samples presented a bad hygienic quality, with average loads of mesophilic aerobic bacteria and fecal coliforms were respectively $09,93.10^5$ and $08,08.10^3$ UFC/g for the fresh *Klila* and $02,62.10^3$ and 0 UFC/g for dried *Klila*. These cheese is characterized by an acid pH (04,10-04,60), high dry matter's rate (27,22-48,53%) and low fat's rate (02,07-13,7%). Sensorial analysis (ANOVA, ACP) showed that *Klila* made from goat's milk is the most appreciated and that there is a correlation between physicochemical parameters and sensorial profile. Twenty enlactic strains were identified; the dominant genera are: *Betabacterium* (50%) and *Streptococcus* (35%), followed by *Enterococcus* and *Thermo bacterium* with percentages of 15% and 10% respectively. *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Streptobacterium* are the less dominant and occupied the same proportion of 05%. The technological selection has revealed strains with considerable technological and probiotic potentialities.

Key words: *Klila*, Microbiological Quality, Physicochemical, Sensorial, Lactic Acid Bacteria.

Chemical composition and *in vitro* gas production of three local Poaceae in El djelfa's region, North-central Algeria.

S. Medjekal^{1,2}, H.Bousseboua².

1-University of Mohamed Bouadiat M'sila. Faculty of Science. Department of Microbiology and Biochemistry. 28 000 M'sila. Algeria.

2-Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie Ville Universitaire Ali Mendjeli B.P. E66. Algeria.

The Algerian steppe covers more than 30 million ha of land and constitutes a transition area between the green belt in the North and the Sahara desert. The diversity and relative abundance of fodder plants has allowed the steppe to provide animal food for 15% of the Algerian population, and constitutes the main source of red meat for the population as a whole. However, the major constraint on the performance of grazing ruminants in these regions is the scarcity of high quality pastures. The situation is even worse during the dry season when the quality and quantity of the natural pasture declines, resulting in lower intakes and reduced ruminant productivity. In this study the nutritive value of some Algerian browse species was studied on the basis of their chemical composition, *in vitro* gas production and fermentation kinetics (gas production technique). The browse species were *Stipagrostis pungens*, *Lygeum spartum* L. and *Stipa tenacissima* L. Generally, there were significant variations ($p < 0.05$) between chemical components of all browse species studied herein except in CT content. The CP content value of the edible components ranged between 47.06-75.20 g/kg DM, the highest CP value was recorded for *Lygeum spartum* L. The NDF and ADF contents were relatively high ($p < 0.05$) in *Stipa tenacissima* L. and low in *Lygeum spartum* L. with value ranging from 696.96 to 775.20 g/kg DM and 500.16 to 562.06 g/kg DM respectively. The total gas production and OMD ranged from 56.49 to 91.15 (ml/g DM) and 38.15 to 59.03 % respectively. Generally, high values ($p < 0.05$) of gas production and OMD were recorded by *Lygeum spartum* L. followed by *Stipagrostis pungens*. As conclusion, browse species evaluated in the present study show high content of fiber and low crude protein concentration. Nitrogen supplementation and effects of alkaline treatments are then expected to be highly beneficial for *in vitro* organic matter digestibility, as observed in more conventional low quality forages when dealing with sustainability of low-input livestock farming systems.

Key-words: browse species, gas production, *in vitro* digestibility, nutritive value.

Evaluation of genetic variability in Algerian clover (*Trifolium* L.) based on morphological and isozyme markers.

I. Medoukali, I. Bellil, D. Khelifi.

Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Constantine 1, 25000 Constantine, Algérie.

As part of evaluation and enhancement of genetic resources, genetic variation within and among fifteen *Trifolium* species represented by 157 accessions collected in northern Algeria was assessed using morphological and isozyme markers. Most of morphometric characters contributed to the discrimination of the species. No significant relationship between environment of the site of collection and morphological features were appreciated. The two enzymatic systems analyzed; Esterase (EST) and Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) were considered to be polymorphic. Phenotype diversity of isozyme markers ranged from 0.07 to 0.61 with an average of 0.31 based on polymorphic information content. The pair-wise Jaccard similarity coefficient ranged between 0.10 and 0.60 indicating that the collection represent genetically diverse species. A considerable number of species-specific zymograms were detected since can used for species identification. The clustering pattern of enzymatic markers was not in consonance with the groupings based on quantitative traits. This rich variability present among Algerian clover species can provide good gene resources for breeding program.

Key-words: clover, isozymes, morphology, PAGE, polymorphism.

Nom: MEDJEKAL Prénom: SAMIR	Date de soutenance: 17/07/2016 e-mail: sammedj2002@yahoo.fr
Titre : Effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive, la production de méthane et de tannins condensés d'arbustes fourragers locaux. Essai de contrôle <i>in vitro</i> de la méthanogénèse ruminale d'ovins par l'utilisation de plantes médicinales.	
<p style="text-align: center;"><u>Résumé</u></p> <p>Cette thèse avait pour objectifs principaux l'étude, dans une première partie, de l'effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive, la teneur en tannins et la production de méthane de trois arbustes fourragers locaux : <i>Atriplex canescens</i>, <i>Astragalus gombo</i> et <i>Calobota saharae</i>, prélevés d'une zone aride d'Algérie sur trois saisons consécutives. Le travail a consisté à caractériser divers paramètres : la composition chimique des plantes, l'évaluation de leur potentiel nutritif par la mesure de leur fermentescibilité et leur digestibilité <i>in vitro</i>.</p> <p>Dans une deuxième partie, un essai de réduction de la méthanogénèse ruminale <i>in vitro</i> a été testé en présence de trois plantes médicinales locales : <i>Nigella sativa</i>, <i>Rosmarinus officinalis</i>.L et <i>Zingiber officinale</i>. Les paramètres étudiés sont : le profil de la fermentation ruminale, la production de gaz totaux, la production de méthane et la digestibilité, de même que leur impact sur la production quantitative et qualitative d'acides gras volatiles.</p> <p>L'analyse chimique révèle que la saison de collecte a un effet significatif sur tous les composants chimiques des trois arbustes étudiés, sauf en tanins condensés. <i>Atriplex canescens</i> détient une teneur très élevée en protéines brutes durant l'hiver qui atteint 200g/kgMS. Concernant sa teneur en constituants pariétaux, elle est très élevée en hiver et au printemps, par rapport aux valeurs d'été. Les mêmes variations en composition chimique sont enregistrées pour <i>Astragalus gombo</i>, contrairement à <i>Calobota saharae</i> dont les teneurs sont très élevées en été par rapport à l'hiver et au printemps. Cette situation est probablement due aux conditions climatiques qui règnent dans la région de M'sila, caractérisée par des températures élevées et une faible pluviométrie.</p> <p>Du point de vue chimique, les variations temporelles démontrent que l'effet saison sur les différents résultats obtenus est significatif. Cet effet s'exerce par les variations climatiques qui lui sont associées. En effet, est enregistrée une variabilité nette pour la teneur en matière azotée totale et en constituants pariétaux. Malgré les caractéristiques exceptionnelles d'adaptation de la flore spontanée saharienne aux rudes conditions du milieu, il est évident que sa survie, sa prolifération et sa composition chimique dépendent étroitement des variations climatiques. Cette étude a des implications pratiques pour le développement des technologies agro-forestières. Les trois plantes étudiées ont un bon potentiel comme arbustes fourragers pour les projets de réhabilitation des écosystèmes dégradés dans les zones arides et semi-arides.</p> <p>Les plantes médicinales représentent une source naturelle de molécules bioactives qui peuvent modifier positivement la fermentation ruminale. Une réduction significative de la production de méthane est observée avec le Monensin. Pour ce qui est du <i>Nigella sativa</i>, il est établi que cette plante est très riche en lipides et en stérols, cet état pourrait être à l'origine de son action anti-méthanogène. Quant aux autres traitements testés, ils sont sans effet.</p>	
Mots clés Arbustes fourragers, analyse chimique, tannins condensés, fermentescibilité <i>in vitro</i> , digestibilité, méthanogénèse, plantes médicinales.	
Laboratoires de recherche: Laboratoire de Génie Microbiologique et Application. Université des Frères Mentouri Constantine 1.	
Devant le Jury: Présidente : MERAIHI Z. Prof. à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1. Rapporteur : BOUSSEBOUA H. Prof. à l'Ecole Nationale supérieure de Biotechnologie/ Constantine. Examineurs : KHELIFI D. Prof. à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1. NIAR A. Prof. à l'Université IBN Khaldoun Tiaret.	