

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Frères Mentouri-Constantine1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire

N° d'Ordre : 02/D3C/2021

N° de Série : 01/BIO/2021



Thèse
En vue de l'obtention du diplôme
de Doctorat 3^{ème} Cycle
Option : Biochimie Appliquée

**Valorisation des rations protéiques pour ruminants via
un enrobage moléculaire**

Présenté par :

KHELALFA Khaoula

Soutenue le: 18/01/2021

Devant le jury :

Président:

Mr. HADDI Mohamed Laid

Pr. Université des Frères Mentouri Constantine

Directeur de thèse:

Mr. ARHAB Rabah

Pr. Université Oum El Bouaghi

Examineurs :

Mr. NECIB Youcef

Pr. Université des Frères Mentouri Constantine

Mme. BENSLAMA Ouided

M.C.A Université Oum El Bouaghi

Mme. AGGOUN Moufida

M.C.A. Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies

Agro-Alimentaires

Année universitaire : 2020-2021

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier mon directeur de thèse Monsieur ARHAB Rabah, professeur à l'Université d'Oum El Bouaghi, pour avoir dirigé mes travaux de recherche, pour ses précieux conseils et ses encouragements.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance et mes vifs remerciements à Mr. Ignacio Martin GARCIA, Docteur au Département de Physiologie et Biochimie de la Nutrition Animale, Station Expérimentale de Zaidín Grenade, Espagne, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour sa disponibilité, son aide précieuse, son esprit scientifique et ses précieux conseils.

Mes vifs remerciements vont également à Mme ZAABAT Nabila, Docteur au Département de Chimie, Faculté des Sciences Exactes, Université Mentouri Constantine, qui m'a aidé dans la réalisation d'une partie importante de mon travail au sein du Laboratoire de Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Phytochimiques et Biologiques. Qu'elle trouve l'expression de ma profonde gratitude et ma grande considération.

Mes remerciements s'adressent à Monsieur, HADDI Mohamed Laid professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse. Qu'il trouve l'expression de mon profond respect et ma haute considération.

Mes remerciements s'adressent également à Madame AGGOUN Moufida, maitre de conférences A, à l'Institut de Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires, Université des Frères Mentouri Constantine. Et à Madame BENSLAMA Ouided, maitre de conférences A à l'Université d'Oum El Bouaghi, qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail.

Un grand merci à Monsieur NECIB Youcef pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire de Génie Microbiologique et applications et pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Je désire aussi remercier toute l'équipe de la conservation des forêts de Constantine pour la collecte des échantillons.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers les amis et collègues qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de ma démarche.

Enfin, un grand merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie cette thèse à :

Mes chers parents

Pour leur soutien tout au long de ces années d'études

Mes sœurs

Mes adorables neveux et jolies nièces

Mon mari

Table des matières

Introduction générale	01
<u>Première partie : Synthèse Bibliographique</u>	
1. GENERALITES	04
1.1. Anatomie des estomacs des ruminants	04
1.1.1. Le rumen	04
1.1.2. Le Réticulum	05
1.1.3. Le feuillet	05
1.1.4. La caillette	05
1.1.5. L'intestin	05
1.2. Propriétés physicochimiques du rumen	05
1.2.1. La température	06
1.2.2. pH et pouvoir tampon	06
1.2.3. La pression osmotique	06
1.2.4. Le potentiel d'oxydoréduction	06
1.3. Le microbiote ruminale	06
1.3.1. Les bactéries	07
1.3.2. Les protozoaires	08
1.3.3. Les champignons	10
1.4. Dégradation des aliments par le microbiote ruminale	11
1.4.1. Le métabolisme glucidique	11
1.4.2. Métabolisme protéique	14
1.4.3. Métabolisme lipidique	16
1.5. Production et émission de méthane	18
1.5.1. Méthane et effet de serre	18
1.5.2. La méthanogénèse	18
1.5.3. Les archaeobactéries	19
1.5.4. Processus de la méthanogénèse	20
1.5.5. Stratégies alimentaires visant à réduire la méthanogénèse dans le rumen	21
1.5.5.1. Stratégies agissant sur la composition de la ration	21
1.5.5.2. Manipulation du microbiote ruminale	23
1.5.5.3. Additifs chimiques	23

1.5.5.4. L'utilisation des composés naturels	23
2. TANINS ET LEURS EFFETS CHEZ LES RUMINANTS	24
2.1. Tanins	24
2.1.1. Définition	24
2.1.2. Classes	24
2.1.2.1. Les tanins hydrolysables (TH)	24
2.1.2.2. Les tanins condensés (TC)	25
2.1.3. Sources des tanins	27
2.1.3.1. Plantes à tanins condensés	27
2.1.3.2. Plantes à tanins hydrolysables	27
2.1.4. Localisation des tanins dans la plante et facteurs de variation de leur teneur	27
2.1.5. Rôle des tanins chez les végétaux	28
2.1.6. Biosynthèse des tanins condensés	28
2.1.7. Méthodes de dosage des tanins condensés	31
2.1.8. Interaction protéines-tanins condensés	33
2.1.9. Activités biologiques des tanins	34
2.1.9.1. Activités antioxydante et anti-radicalaire	34
2.1.9.2. Activité antimicrobienne et antivirale	34
2.1.9.3. Activité cardioprotectrice	34
2.1.9.4. Activité antidiabétique	35
2.1.9.5. Activité cytotoxique	35
2.1.9.6. Effets antinutritionnels	35
2.2. Effets des tanins condensés chez les ruminants	35
2.2.1. Effets des tanins condensés sur le métabolisme azoté	35
2.2.2. Effets des tanins condensés sur les émissions de méthane	37
2.2.3. Effets des tanins condensés sur la fermentation ruminale	39
2.2.4. Effets des tanins condensés sur les performances des ruminants	40
2.2.5. Effets des tanins condensés sur le microbiote ruminale	42
2.2.6. Effets antinutritionnels des tanins condensés	44
2.2.7. Effets du polyéthylène glycol (PEG)	45
<u>Deuxième partie : Matériel et Méthodes</u>	
1. COLLECTE DES ECHANTILLONS	47
1.1. Matériel végétal	47
1.2. Préparation des échantillons	47

2. COMPOSITION CHIMIQUE DES SUBSTRATS	50
2.1. Détermination de la teneur en matière sèche (MS)	50
2.2. Détermination de la teneur en matières minérale et organique	50
2.3. Détermination de la teneur en matières azotées totales (MAT)	51
2.4. Composés de la paroi végétale	51
2.4.1. Dosage de la fraction NDF (NeutralDetergent Fibre)	52
2.4.2. Dosage de la fraction ADF (AcidDetergent Fibre)	52
2.4.3. Dosage de la fraction ADL (Acide Detergent Lignine)	52
2.4.4. Estimation de la teneur en hémicellulose et cellulose	52
3. ANALYSE PHYTOCHIMIQUE DES COMPOSES SECONDAIRES	52
3.1. Procédé d'extraction	52
3.2. Dosage des phénols totaux	52
3.3. Dosage des tanins totaux	53
3.4. Dosage des tanins condensés	53
3.5. Purification des tanins condensés	54
4. FERMENTATION <i>IN VITRO</i>	55
4.1. Technique de production de gaz <i>in vitro</i>	55
4.1.1. Principe	55
4.1.2. Système de fermentation utilisé	56
4.2. Les animaux donneurs	56
4.3. Inoculum	56
4.4. Tests de production de gaz <i>in vitro</i>	56
4.4.1. Screening biologique du contenu tannoïde	57
4.4.2. Etude de l'impact des tanins purifiés sur la fermentation <i>in vitro</i>	57
5. PARAMETRES FERMENTAIRES MESURES	57
5.1. Production de gaz	57
5.2. Production de Méthane (CH ₄)	58
5.3. Analyse qualitative et quantitative des acides gras volatils (AGV)	58
5.4. Détermination de la concentration en azote ammoniacal (N-NH ₃)	58
6. ANALYSES STATISTIQUES	59
<u>Troisième partie : Résultats et Discussion</u>	
1. COMPOSITION CHIMIQUE DES SUBSTRATS	60
1.1. Teneur en matière sèche	60
1.2. Teneur en matière minérale	60

1.3. Teneur en Matières azotées totales	61
1.4. Constituants de la paroi cellulaire	63
2. SCREENING PHYTOCHIMIQUE DES SUBSTRATS ETUDIES	65
3. PRODUCTION DE GAZ <i>IN VITRO</i>	66
3.1. Screening biologique des substrats étudiés	66
3.1.1. Analyse en composantes principales (ACP)	67
3.1.1.1. En absence du PEG	67
3.1.1.2. En présence du PEG	67
3.1.2. Effet des tanins sur la production de gaz	67
3.1.3. Effet des tanins sur la production de méthane	74
3.1.4. Effet des tanins sur les paramètres fermentaires	77
3.1.4.1. Production de l'azote ammoniacal	77
3.1.4.2. Production des acides gras volatils	78
3.2. Effets des tanins purifiés d'<i>Acacia horrida</i> sur la fermentation <i>in vitro</i>	80
3.2.1. Production de l'azote ammoniacal	81
3.2.2. Production de méthane et des acides gras volatils	83
3.2.3. Production de gaz	84
Conclusion générale et perspectives	85
Références bibliographiques	88
Résumés	
Annexes	
Productions Scientifiques	

Liste des figures

Figure 1. Appareil digestif des ruminants	04
Figure 2. Métabolisme des glucides dans le rumen	13
Figure 3. Métabolisme protéique dans le rumen	15
Figure 4. Métabolisme des lipides dans le rumen	16
Figure 5. Biohydrogénation des acides gras insaturés	17
Figure 6. Voies métaboliques de production et d'utilisation de l'hydrogène au cours des fermentations anaérobies dans le rumen	21
Figure 7. Structure chimique de l'acide gallique, ellagique et hexahydroxydiphénique	24
Figure 8. Structure chimique des tanins hydrolysables	25
Figure 9. Structure de base des tanins condensés	25
Figure 10. Structure de monomères des proanthocyanidines	26
Figure 11. Structure chimique du dimère de proanthocyanidines et type de linkage	26
Figure 12. Biosynthèse des tanins condensés	30
Figure 13. Courbe étalon des phénols totaux et des tanins totaux	53
Figure 14. Courbe étalon des tanins condensés	54
Figure 15. Extraction des tanins condensés <i>d'Acacia horrida</i>	55
Figure 16. Etapes de préparation d'inoculum	56
Figure 17. Corrélation entre les constituants nutritifs, les composés phénoliques et les différents paramètres de fermentation <i>in vitro</i> en absence du polyéthylène glycol	70
Figure 18. Profil de production de gaz (ml/g OM) des arbustes en présence et en absence du polyéthylène glycol	72
Figure 19. Profil de production de gaz (ml/g OM) des sous-produits en présence et en absence du polyéthylène glycol	73
Figure 20. Corrélation entre les constituants nutritifs, les composés phénoliques et les différents paramètres de fermentation <i>in vitro</i> en présence du polyéthylène glycol	74
Figure 21. Effet du polyéthylène glycol sur la production de méthane (ml/g OM)	75

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques des principales bactéries du rumen	08
Tableau 2. Principaux protozoaires ruminants	09
Tableau 3. Champignons anaérobies du rumen chez différents ruminants	11
Tableau 4. Stratégies de réduction de méthane, mécanisme de réduction et considérations d'utilisation	22
Tableau 5. Principales méthodes de dosage de la teneur ou de l'activité biologique des TC	32
Tableau 6. Effets des tanins condensés de différentes sources sur la production des acides gras volatils totaux, l'acide acétique, l'acide propionique et le rapport acétate: propionate	40
Tableau 7. Effets du polyéthylène glycol sur la production de gaz et de méthane chez des espèces tannifères	46
Tableau 8. Caractéristiques botaniques et phénotypiques des arbustes étudiés	48
Tableau 9. Caractéristiques botaniques et phénotypiques des sous-produits étudiés	49
Tableau 10. Composition chimique (g/kg MS) et phytochimique (g/kg MS) des arbustes et des sous-produits	62
Tableau 11. Effets du polyéthylène glycol sur les paramètres fermentaires	69
Tableau 12. Effets des tanins purifiés d' <i>Acacia horrida</i> sur les paramètres fermentaires	82

Liste des abréviations

ADF: Acid Detergent Fiber

ADL: Acid Detergent Lignin

ADS: Acid Detergent Solution

AGV: Acides Gras Volatils

C₂: Acide acétique/acétate

C₃: Acide propionique/propionate

DP: Degré de polymérisation

MAT: Matières azotées totales

MM: Matière minérale

MO: Matière organique

MS: Matière sèche

NDF: Neutral Detergent Fiber

NDS: Neutral Detergent Solution

PEG: Polyéthylène glycol

PM: Poids Moléculaire

PVPP: Polyvinylpyrrolidone

PT: Phénols totaux

TT: Tanins totaux

TC: Tanins condensés

TH: Tanins hydrolysables

Introduction

Les ruminants sont des animaux polygastriques, à la différence des autres animaux, dont la dégradation de leur alimentation s'opère principalement grâce à l'activité métabolique de leur microbiote ruminal. Ce dernier est composé de bactéries, champignons et protozoaires, nichés dans différents endroits du rumen : à la surface de la paroi ruminale (microorganismes aéroanaérobies facultatifs), dans le liquide ruminale et fixés aux fibres alimentaires (flore anaérobie). De ce fait, les voies métaboliques de dégradation des composés de la ration se font en anaérobiose et engendrent la production de biogaz (dioxyde de carbone et du méthane) en plus d'acides gras volatils qui représentent la source énergétique majeure pour les ruminants.

Parmi les composants alimentaires de la ration des ruminants les protéines alimentaires. Ces composants sont nécessaires pour le maintien des fonctions vitales, la croissance, la reproduction et la production de lait et de viande. Cependant, elles sont en grande partie perdues comme source d'acides aminés pour l'animal en raison de leur hydrolyse en niveau du rumen. Les protéines alimentaires sont dégradées par les microorganismes du rumen d'abord en acides aminés et ensuite en ammoniac et acides gras volatils. L'azote non-protéique des aliments et l'urée recyclée dans le rumen par l'intermédiaire de la salive ou la paroi du rumen contribuent aussi à la formation de l'ammoniac dans le rumen (Tamminga, 1979). Cet ammoniac est réutilisé par les microorganismes pour la synthèse de leurs protéines microbiennes. Lorsque la quantité d'ammoniac est insuffisante pour les besoins du microbiote ruminal, la digestibilité des aliments tend à diminuer. Par contre, lorsque sa production dépasse les capacités d'assimilation des microorganismes, l'excédent passe dans le sang et est métabolisé au niveau du foie en urée et excrété dans l'urine. Ainsi, la valeur azotée des protéines se trouve abaissée (Crosier, 2012).

En Algérie, La production fourragère et pastorale est très limitée et représente souvent un frein à l'essor de l'élevage (Abdelguerfi et Laouar, 1999). Ce problème d'alimentation du cheptel se résume à la pauvreté de l'offre fourragère due à la faiblesse des superficies emblavées, au manque d'eau et à la non maîtrise des techniques culturales (Kadi et Djellal 2009). Les ressources fourragères sont assurées en grande partie par les terres de parcours (jachères, prairies naturelles, parcours steppiques, parcours forestiers...) et les sous-produits de la céréaliculture (chaumes des céréales, pailles). Cependant, l'utilisation d'arbres et d'arbustes fourragers représente un moyen potentiel pour augmenter la qualité et la disponibilité des ressources alimentaires pour le bétail (Abdelguerfi *et al.*, 2008).

En effet, les feuillages des arbres et arbustes fourragers sont largement utilisés en alimentation du bétail dans les pays en voie de développement (Van Swinderen, 1991). Ils constituent une partie importante et souvent indispensable dans leurs rations. La valeur fourragère de ces feuilles est souvent supérieure à celle des plantes herbacées, en particulier dans le cas des légumineuses. Ils fournissent dans les zones arides et semi-arides la plus grande partie de l'apport en protéines pendant la saison sèche, période durant laquelle l'azote est le principal facteur limitant pour les productions animales (Baumer, 1992; Archimède *et al.*, 2011).

Dans les zones steppiques en Algérie, les arbustes fourragers représentent une part non négligeable dans la couverture des besoins alimentaires du cheptel ovin. Alors que dans les régions désertiques, les arbres et arbustes fourragers combinés aux fourrages naturels représentent souvent la quasi-totalité de l'alimentation des camelins. Dans les régions du Nord, ces ressources fourragères sont distribuées aux bovins et ovins en période de soudure alors qu'elles constituent une grande partie de la ration quotidienne des chèvres au pâturage (Kadi et Zirmi-Zembri, 2016).

Les espèces du genre *Acacia* sont des arbustes légumineux couramment trouvés dans les zones arides et semi-arides d'Algérie. Ils sont adaptés aux faibles précipitations, à la sécheresse et à la salinité des sols de ces régions. Ils sont généralement riches en protéines, énergie et minéraux. Ils produisent du bois, des graines comestibles, des gommages précieuses et peuvent fournir des suppléments protéiques importants dans la nutrition des ruminants, en particulier pendant la saison sèche lorsque la disponibilité de fourrage frais est limitée. En revanche, ils sont riches en facteurs antinutritionnels notamment les tanins (Fikri Benbrahim *et al.*, 2014).

Les tanins sont des métabolites secondaires de haut poids moléculaire qui sont largement distribués dans les plantes. Leur rôle principal consiste à se protéger contre les prédateurs herbivores, les bactéries et les champignons. Ils ont divers effets sur les systèmes biologiques ; ce sont des antioxydants biologiques, des chélateurs d'ions et des agents précipitants des protéines (Sliwinski *et al.*, 2002; Hao *et al.*, 2011).

Dans la nutrition des ruminants, les tanins peuvent avoir des effets néfastes et des effets bénéfiques. Les effets néfastes sont dus à leur capacité de se lier aux macromolécules principalement aux protéines (Ningrat *et al.*, 2016; Naumann *et al.*, 2018); ils sont considérés comme des facteurs antinutritionnels qui réduisent l'apport alimentaire et la digestibilité des nutriments (Bravo, 1998; Goel *et al.*, 2005; Mezzomo *et al.*, 2011). Cependant, ils peuvent réduire la dégradation des protéines ruminales et, par conséquent, augmentent leur flux vers l'intestin (Liu *et al.*, 2011; Patra et Saxena, 2011) indirectement par inhibition de l'activité des

enzymes protéolytiques (Makkar, 2003) et/ou directement par leur enrobage moléculaire. Cette dernière activité constitue une voie biotechnologique d'amélioration de la production animale. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse dont l'objectif est de mettre en évidence cette voie biotechnologique, en testant les effets des tanins extraits de quatre espèces du genre *Acacia* : *Acacia pycnantha*, *Acacia dealbata*, *Acacia horrida* et *Acacia cyanophylla*, et de trois sous-produits végétaux riches en tanins: les feuilles du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*), les tiges d'artichaut (*Cynara scolymus*) et l'écorce de grenade (*Punica granatum*) sur la fermentation ruminale *in vitro*.

La première partie de cette thèse est une étude bibliographique divisée en deux parties, La première présente des généralités sur le rumen et ses microorganismes, la production et l'émission de méthane entérique. La seconde est consacré à l'étude des caractéristiques des tanins particulièrement les tanins condensés et leurs effets sur les différents paramètres de fermentation ruminale.

La seconde partie est consacrée dans un premier temps à la description des matériels et des méthodes utilisés au cours de l'étude et dans un second temps à l'exposition et la discussion des résultats obtenus.

Enfin, la dernière partie rassemble la conclusion générale et les futures perspectives.

Synthèse Bibliographique

1. GENERALITES

1.1. Anatomie des estomacs des ruminants

L'appareil digestif des ruminants est composé de trois compartiments placés avant la caillette (obomasum) qui est le véritable estomac. Ce sont successivement le rumen ou (la panse) le réseau ou (réticulum) le feuillet ou (omasum) (Castillo-González *et al.*, 2014) (fig. 1).

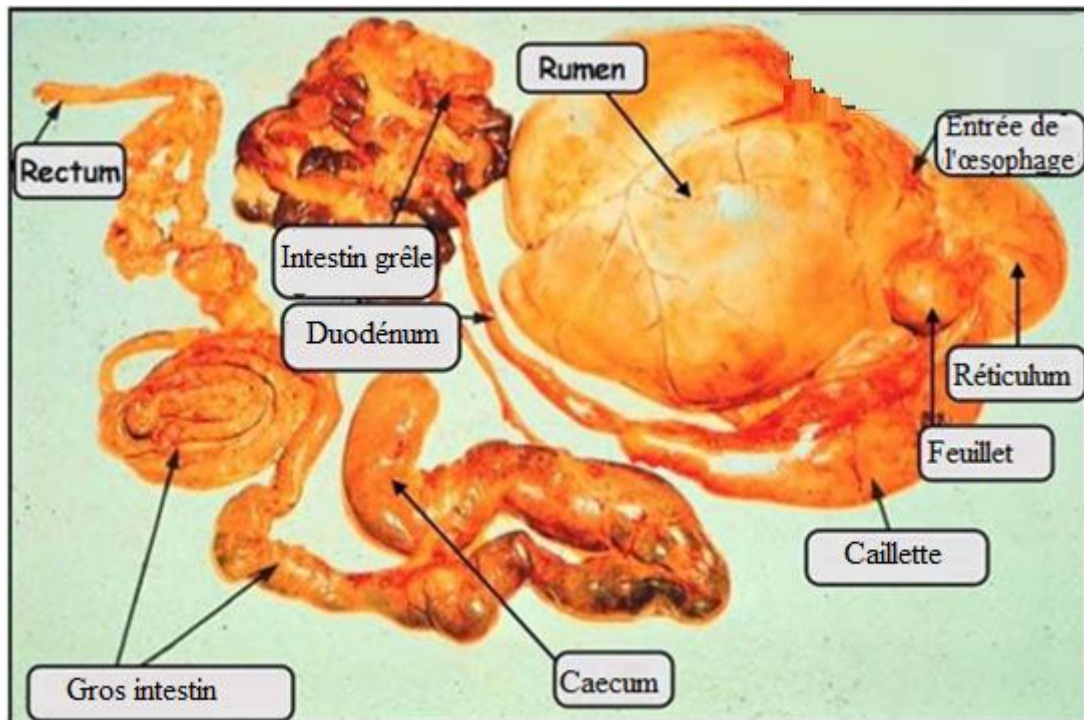


Figure 1. Appareil digestif des ruminants

1.1.1. Le rumen

Le rumen est le plus grand compartiment de l'estomac complexe occupant la moitié gauche de la cavité abdominale (Agarwal *et al.*, 2015). Selon l'espèce des ruminants, le rumen renferme de 70 à 75 % du contenu total du tube digestif et représente de 50 à 60 % de son volume (Qi *et al.*, 2010). Il s'ouvre très largement vers l'avant sur le réseau; le réseau et le rumen sont souvent considérés comme un seul organe appelé réticulo-rumen. C'est le compartiment où s'effectue la plus grande partie de la dégradation des aliments ingérés par l'animal, grâce à la population microbienne qu'il abrite. Il réunit des conditions physico-chimiques particulières permettant l'existence et le fonctionnement d'un microbiote spécifique (Tharwat *et al.*, 2012).

1.1.2. Le Réticulum

Son nom dérive de sa muqueuse réticulée et parsemée également de papilles absorbantes. Il joue un rôle central dans la circulation des particules. Les particules qui franchissent l'orifice réticulo-omasal doivent avoir une taille moyenne inférieure ou égale à 1 mm. Les aliments solides qui n'ont pas acquis la taille minimale vont être séquestrés dans le rumen où elles subissent une rumination et une dégradation microbienne (Ruckebusch et Kay, 1971).

1.1.3. Le feuillet

C'est un organe sphérique chez les bovins et ovoïde chez les moutons. Il se situe à la droite du rumen, sa paroi intérieure est tapissée de très nombreuses lamelles muqueuses semblables aux feuilles d'un livre, d'où son nom. La cavité du feuillet est limitée à un canal qui communique en amont avec le réseau par un sphincter (sphincter réticulo-omasal), en aval avec la caillette par un orifice beaucoup plus large et dilatable.

1.1.4. La caillette

Appelé le vrai estomac, c'est le seul compartiment sécrétoire de l'estomac des ruminants. L'épithélium luminal est constitué de cellules sécrétrices qui produisent du mucus et de l'acide chlorhydrique nécessaires à la dégradation des aliments. Les fonctions digestives de la caillette du ruminant sont donc analogues à celles de l'estomac des mammifères monogastriques (Thivend *et al.*, 1985).

1.1.5. L'intestin

L'intestin est une partie tubulaire musculo-membraneux du tube digestif très longue avec plusieurs modifications pour des fonctions spécifiques. Elle est divisée en intestin grêle, comprenant le duodénum, le jéjunum et l'iléum et en gros intestin comprenant le caecum, le colon et le rectum (William-Walker, 1981).

1.2. Propriétés physicochimiques du rumen

Les principaux facteurs influençant la croissance et l'activité des populations microbiennes du rumen sont la température, le pH, le pouvoir tampon, la pression osmotique et le potentiel d'oxydoréduction. Ces facteurs sont déterminés par les conditions environnementales.

1.2.1. La température

La température dans le rumen est maintenue entre 39 à 39,5 °C et peut augmenter jusqu'à 41 °C immédiatement après la nourriture de l'animal, car le processus de fermentation génère de la chaleur (Brod *et al.*, 1982; Wahrmond *et al.*, 2012).

1.2.2. pH et pouvoir tampon

Dépendent de la production de la salive, de la production et de l'absorption d'acides gras à chaîne courte (AGCC), du type et du niveau de consommation de la nourriture et des échanges de bicarbonates et de phosphates à travers l'épithélium du rumen. Ainsi, ces facteurs déterminent à la fois le pH et la capacité tampon dans l'environnement du réticule (Aschenbach *et al.*, 2011). Le pH change constamment, mais il reste généralement compris entre 5,5 et 7,0 en fonction du régime alimentaire et du pouvoir tampon de la salive et des sécrétions réticulo ruminales (Krause et Oetzel, 2006).

1.2.3. La pression osmotique

Dépend de la présence d'ions et de molécules, l'osmolalité dans le liquide ruminal est d'environ 250 mOsm/kg et peut atteindre 350 à 400 mOsm/kg, immédiatement après la prise alimentaire puis diminue progressivement sur une période de 8 à 10 heures (Lodemann et Martens, 2006). La pression osmotique augmente avec la présence d'acides gras volatils (AGV) produits par le processus de fermentation et a une relation directe avec le pH dans les régimes riches en glucides (Lodemann et Martens, 2006).

1.2.4. Le potentiel d'oxydoréduction

Le rumen est caractérisé par des conditions d'anaérobiose. Cependant, de très faibles quantités d'oxygène peuvent entrer dans le milieu via l'alimentation. La présence des souches de bactéries aérobies facultatives contribuent à son élimination ce qui permet de maintenir l'écosystème en anaérobiose. Le milieu ruminal est réducteur, son potentiel d'oxydo-réduction moyen est de -250 mv (Castillo-González *et al.*, 2014).

1.3. Le microbiote ruminale

Le rumen contient les microbes les plus variés et les plus denses connus dans la nature. Les microorganismes du rumen peuvent être divisés en trois groupes principaux: les bactéries, les protozoaires et les champignons à des concentrations respectives de 10^{10} , 10^6 et 10^4 cellules / ml (Czerkawski, 1986).

1.3.1. Les bactéries

Le rumen comprend généralement environ 10^{10} - 10^{11} bactéries /ml (Hungate *et al.*, 1966). Ces bactéries sont responsables de la majorité des fermentations ruminales. La population bactérienne constitue environ 50 % de la biomasse microbienne et représente la catégorie de microorganismes la plus complexe et la plus importante (Stewart *et al.*, 1997). Elle est composée essentiellement de bactéries anaérobies strictes (Thivend *et al.*, 1985). Des comparaisons de séquences d'ADN ribosomal 16S ont mis en évidence un degré élevé de diversité parmi les bactéries du rumen et de nouvelles espèces continuent d'être identifiées et décrites (Agarwal *et al.*, 2015).

Les bactéries du rumen varient en taille et en forme. Parmi les petites bactéries (1-2 μ de diamètre), il existe des bâtonnets, de petits ovales, des cocci ronds et des bâtonnets très courts. La population bactérienne du rumen contient également une faible proportion de grosses bactéries (3-6 μ de diamètre). Elles forment très souvent des chaînes, des rosettes et des autres groupes associés (Czerkowski, 1986).

Les bactéries du rumen sont généralement classées selon les substrats qu'elles sont capables de fermenter ou de dégrader en bactéries cellulolytiques, amylolytiques, hémicellulolytiques, saccharolytiques, protéolytiques, méthanogènes, lipolytiques et en bactéries utilisant les produits formés par d'autres microbes (Jouany, 1994) (tab. 1).

La population bactérienne occupe trois biotopes distincts. Elles peuvent être libres dans le liquide du rumen, ou attachées soit à la paroi interne du rumen, soit aux particules alimentaires. Enfin, certaines espèces bactériennes vivent également liées à la surface des protozoaires (Hungate, 1966).

Tableau 1. Caractéristiques des principales bactéries du rumen (Castillo-González *et al.*, 2014)

Microorganismes	Coloration de Gram	Morphologie	Produits de Fermentation
Bactéries dégradant la cellulose			
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Négative	Bacille	Succinate, Acétate, Formiate
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Négative	Bacille courbé	Acétate, Formiate, Lactate, Butyrate, H ₂ , CO ₂
<i>Ruminococci albus</i>	Positive	Cocci	Acétate, Formiate, H ₂ , CO ₂
<i>Clostridium lochheadii</i>	Positive	Bacille sporulé	Acétate, Formiate, Butyrate, H ₂ , CO ₂
Bactéries amylolytiques			
<i>Bacteriodes ruminicola</i>	Négative	Bacille	Formiate, Acétate, Succinate
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	Négative	Bacille	Formiate, Acétate, Succinate
<i>Selenomonas ruminantium</i>	Négative	Bacille courbé	Acétate, Propionate, Lactate
<i>Succinomonas amylolytica</i>	Négative	Ovale	Acétate, Propionate, Succinate
<i>Streptococci bovis</i>	Positive	Cocci	Lactate
Bactéries lipolytiques			
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	Négative	Bacille	Acétate, Propionate
Bactéries dégradant le lactate			
<i>Selenomonas lactilytica</i>	Négative	Bacille courbé	Acétate, Succinate
<i>Megasphaera elsdenii</i>	Positive	Cocci	Acétate, Propionate, Butyrate, H ₂ , CO ₂ Valérate
Bactéries dégradant la pectine			
<i>Lachnospira multiparus</i>	Positive	Bacille courbé	Acétate, Formiate, Lactate, H ₂ , CO ₂
Archées ruminales (méthanogènes)			
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	Positive	Bacille	CH ₄ (de H ₂ +CO ₂ ou Formiate)
<i>Methanomicrobium mobile</i>	Négative	Bacille	CH ₄ (de H ₂ +CO ₂ ou Formiate)
Bactéries utilisant de l'acide lactique			
<i>Megasphaera elsdenii</i>	Négative	Cocci	Lactate

1.3.2. Les protozoaires

Les protozoaires sont présents dans le rumen en nombre beaucoup plus faible que les bactéries mais, en raison de leur taille, ils représentent parfois jusqu'à la moitié de la masse microbienne (Williams et Coleman, 1992). Plus de 30 genres différents (environ 300 espèces)

de protozoaires ont été décrits depuis leur découverte initiale depuis 150 ans (Wang *et al.*, 2012). Les principales espèces sont représentées dans le tableau 2.

Ils produisent des enzymes qui participent directement à la digestion des particules ingérées. Cependant, malgré le fait qu'ils constituent une grande partie de la biomasse du rumen, leur rôle dans la fermentation ruminale et leur contribution au métabolisme et à la nutrition de l'animal restent un sujet de grande controverse (Morgavi *et al.*, 2010).

Les protozoaires sont divisés en deux groupes les protozoaires flagellés et les protozoaires ciliés. Les flagellés sont présents en faible concentration (10^3 à 10^4 /ml) et leur rôle est mal connu. Les protozoaires ciliés étant de loin les plus importants, ils représentent entre 10^5 et 10^6 cellules/ml (Chaucheyras-Durand et Ossa, 2014).

Les protozoaires ciliés sont composés de holotriches et des entodiniomorphes. Les holotriches jouent un rôle important dans l'utilisation des sucres solubles, ils aident à contrôler le taux de fermentation des glucides lorsque de grandes quantités de glucides solubles sont présentes dans le régime alimentaire. Les entodiniomorphes sont responsables du contrôle de la digestion de l'amidon en englobant des granules entiers. Ils ingèrent aussi continuellement les bactéries (Morgavi *et al.*, 2010).

Les ciliés sont également protéolytiques, une population abondante de protozoaires est souvent associée à une concentration élevée en ammoniac dans le rumen. Ils utilisent les acides aminés mais leurs besoins azotés sont en grande partie couverts par l'ingestion des bactéries (Jouany, 1994).

Tableau 2. Principaux protozoaires ruminales (Castillo-González *et al.*, 2014)

Protozoaire	Produits de fermentation
Protozoaires cellulolytiques <i>Enoploplastron triloricastrum</i> <i>Eudiplodinium maggii</i> <i>Diploplastron affine</i> <i>Epidinium ecaudatum</i> <i>Diplodinium monacanthum</i> <i>Diplodinium pentacanthum</i>	Sucres réduits
Protozoaires protéolytiques <i>Entodinium caudatum</i> <i>Eudiplodinium medium</i>	Ammoniac, Acides gras volatils

1.3.3. Les champignons

Les champignons du rumen constituent 5 à 8% de la biomasse microbienne totale (Orpin et Joblin, 1997). Ils sont présents dans l'ensemble du tractus gastro-intestinal dont 90% sont présents dans le réticulo-rumen et 10% sont distribués dans le reste du tractus gastro-intestinal (Davies *et al.*, 1993).

Les champignons constituent le groupe le moins bien caractérisé en raison de leur faible densité cellulaire, leur vitesse de croissance lente et de la difficulté de les conserver pendant une longue période et de les identifier, il a été initialement estimé que 10^{11} des champignons du rumen n'avaient qu'une implication minime dans la digestion des ruminants. Cependant, de plus en plus de preuves confirment leur fonction de colonisateur primaire et de digesteur de matière végétale dans le rumen (Benoit, 2018).

La présence de matières fibreuses à base de plantes dans le rumen attire rapidement les zoospores, vraisemblablement par chimiotactisme, qui colonisent ensuite ce substrat. Une fois fixées, les zoospores se développent en mycéliums qui envahissent et décomposent le matériau en fibres végétales. En raison de leur activité et de leur croissance, les champignons du rumen sont capables de pénétrer dans le tissu végétal et de le perturber, ce qui augmente également la surface de substrat exposée, facilitant ainsi l'accès à d'autres utilisateurs de fibres végétales, telles que les bactéries et les protozoaires (Williams et Orpin, 1987).

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. Ils peuvent aussi solubiliser les formes les plus résistantes de cellulose cristalline, telles que les fibres de coton, mais ils ne peuvent pas utiliser les pectines (Jouany, 1994). Les champignons du rumen sont dépourvus de mitochondries et ne possèdent ni cytochromes ni autres composants biochimiques nécessaires à la phosphorylation oxydative (Fonty et Joblin, 1991). Ils utilisent des organites spécifiques, des hydrogénosomes, pour fermenter des monosaccharides issus de la décomposition de polysaccharides structuraux de plantes en H_2 , CO_2 , formiate et acétate en tant que produits finals (Benoit, 2018).

À ce jour, seuls six genres de champignons anaérobies du rumen ont été identifiés, à savoir *Neocallimastix*, *Orpinomyces*, *Cyllamyces*, *Anaeromyces* anciennement (*Ruminomyces*), *Piromyces* anciennement (*Piromonas*), *Caecomyces* anciennement (*Sphaeromonas*) (Agarwal *et al.*, 2015) (tab. 3).

Tableau 3. Champignons anaérobies du rumen chez différents ruminants (Agarwal *et al.*, 2015)

Genre	Espèces	Source
<i>Caecomyces</i>	<i>communis</i>	Mouton
		Bovin
	<i>sympodialis</i>	Vache
	<i>Equi</i>	Mouton
<i>Piromyces</i>	<i>Communis</i>	Mouton
		Vache
	<i>Spiralis</i>	Chèvre
	<i>Polycephalus</i>	Buffle
<i>Neocallimastix</i>	<i>Mae</i>	Mouton
		Vache
	<i>Frontalis</i>	Mouton
		Vache
	<i>Patriciarum</i>	Mouton
	<i>Hurleyensis</i>	Vache
<i>Anaeromyces</i>	<i>Variabilis</i>	Mouton
		Vache
	<i>Elegans</i>	Vache
<i>Orpinomyces</i>	<i>Mucronatus</i>	Mouton
		Vache
		Vache
	<i>Joyonii</i>	Mouton
		Vache
<i>Intercalaris</i>	Buffle	
<i>Cyllamyces</i>	<i>Bovis</i>	Vache
		Buffle
	<i>Aberensis</i>	Vache
	<i>Icaris</i>	Buffle

1.4. Dégradation des aliments par le microbiote ruminale

Les macromolécules alimentaires ingérées sont dégradé dans le rumen en petits molécules qui sont ensuite transférées dans le flux sanguin à travers la muqueuse digestive. Cette hydrolyse est réalisée par des enzymes d'origine microbienne.

1.4.1. Le métabolisme glucidique

La fermentation dans le rumen est de loin le moyen le plus important par lequel les ruminants digèrent les glucides (Sutto, 1979). Les ruminants sont capables de digérer et d'utiliser une large gamme de glucides que la plupart des autres mammifères (Sutto, 1971). Les glucides composant le régime alimentaire des ruminants peuvent être divisés en deux groupes: les glucides intracellulaires comprenant les glucides solubles et les polysaccharides de réserve, et les glucides structurels de la paroi cellulaire (fibre) composés de cellulose, d'hémicelluloses (Noziere *et al.*, 2010).

Les sucres simples présents dans le contenu cellulaire de la plupart des plantes sont le glucose et le fructose. Ces sucres n'ont pas besoin d'être dégradés dans le rumen avant d'être métabolisés par les micro-organismes du rumen (Nafikov et Beitz, 2007).

Les glucides complexes, la cellulose, l'hémicellulose, et l'amidon; polysaccharide de stockage le plus répandu dans le règne végétal qui représente 70% de la matière sèche de certaines céréales et jusqu'à 30% de la matière sèche de fruits et de racines (Morrison, 1979), sont hydrolysés en unités monomères par les microorganismes du rumen par différentes enzymes microbiennes tel que les cellulases, les hemicellulases, les amylases. Ils sont ensuite fermentés en pyruvate principalement par les voies de la glycolyse d'Embden-Meyerhof et des pentoses phosphates. Le pyruvate est ensuite converti en acides gras volatils et en méthane (CH₄) (fig. 2). Les AGV sont formés dans des proportions très différentes: l'acétate (56-70%), le propionate (17-29%) et le butyrate (9-19%). Ils sont transportés du rumen dans le sang en tant que source d'énergie pour être utilisée par les tissus (Sutto, 1979; Lin *et al.*, 1985).

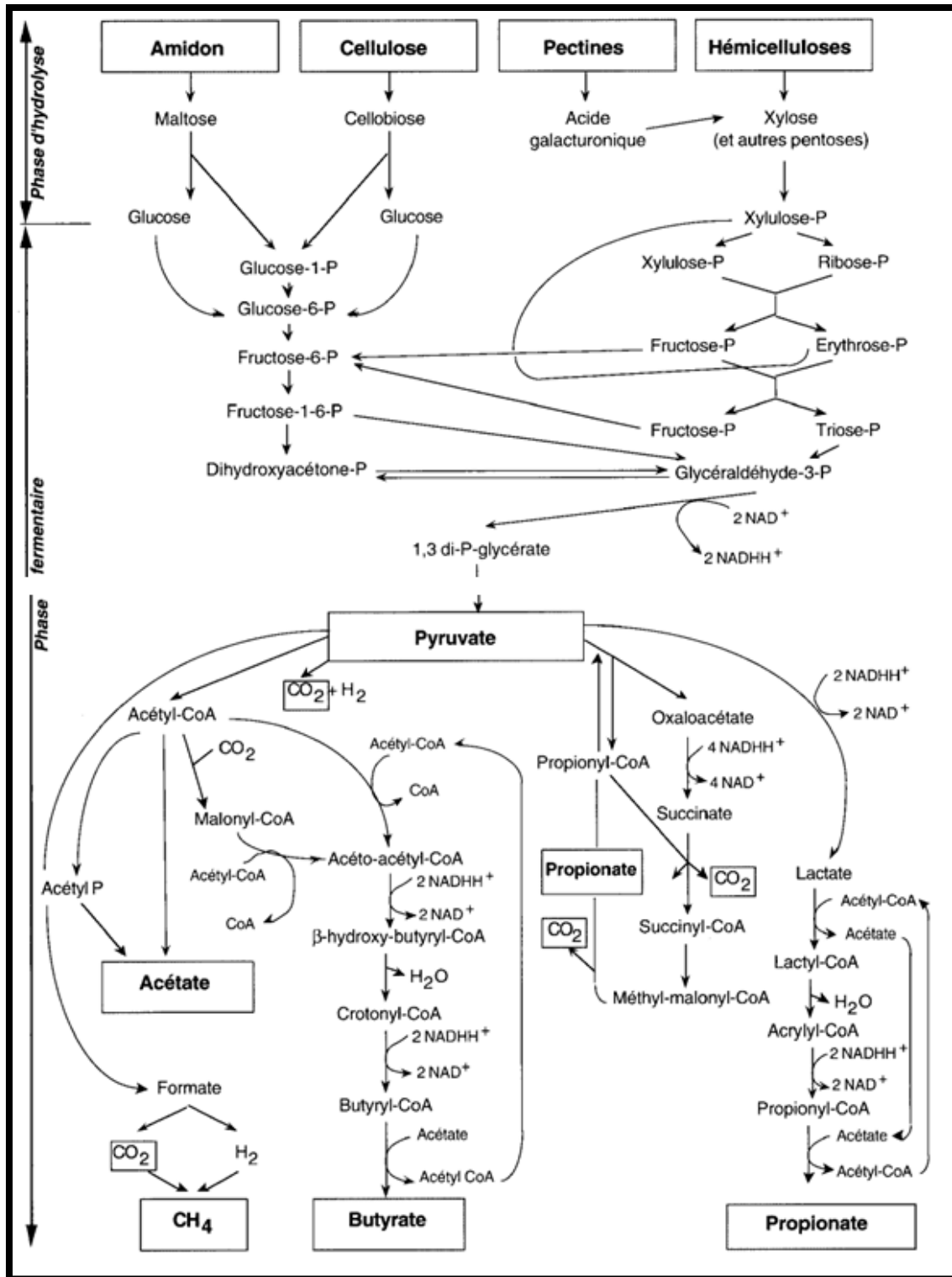


Figure 2. Métabolisme des glucides dans le rumen (Jouany, 1994)

1.4.2. Métabolisme protéique

Le métabolisme des protéines dans le rumen commence par leur dégradation en peptides, ces peptides sont ensuite hydrolysés en acides aminés (Debroas *et al.*, 1998). Le taux de la protéolyse est étroitement lié à la solubilité des protéines dans le liquide ruminale. Certaines protéines alimentaires non solubles dans le rumen échappent de cette dégradation (Smith, 1969).

Le processus de la protéolyse est principalement dû aux bactéries et aux protozoaires (Durand, 1982). Les bactéries protéolytiques, représentant de 30-50% de la population bactérienne du rumen, dégradent principalement les protéines solubles par des protéases composées d'exo et d'endopeptidases qui sont localisées à la surface de leurs membranes bactériennes. La protéolyse a lieu donc en dehors de la cellule (Leng, 1993). Chez les protozoaires, la protéolyse s'effectue à l'intérieur de la cellule à partir des particules alimentaires et des bactéries qu'ils ingèrent.

Les acides aminés issus de la dégradation microbienne sont ensuite désaminés en ammoniac (Tamminga, 1979). La partie majeure de cet ammoniac est réutilisé par les microorganismes pour la synthèse de protéines microbiennes. Cette synthèse dépend de la quantité d'énergie (sous forme d'ATP) produite par la fermentation des glucides. Les acides aminés qui entrent dans l'intestin du ruminant et y sont absorbés ont donc deux origines: une fraction alimentaire non dégradée et une fraction microbienne (Delteil, 2004).

Lorsque la production d'ammoniac dépasse les capacités d'assimilation des microorganismes du rumen, l'excédent passe dans le sang et est métabolisé au niveau du foie en urée et excrété dans l'urine entraînant ainsi une baisse de l'efficacité d'utilisation de l'azote par le ruminant (Croisier et Croisier, 2012). Cependant l'urée peut être recyclée par diffusion à travers la paroi du rumen ou par le biais des sécrétions salivaires (fig. 3). L'urée joue un rôle particulièrement important chez les animaux consommant de faibles quantités d'azote, le recyclage permet d'éviter les pertes urinaires et d'approvisionner les microorganismes du rumen en azote (Huntington et Archibeque, 2000).

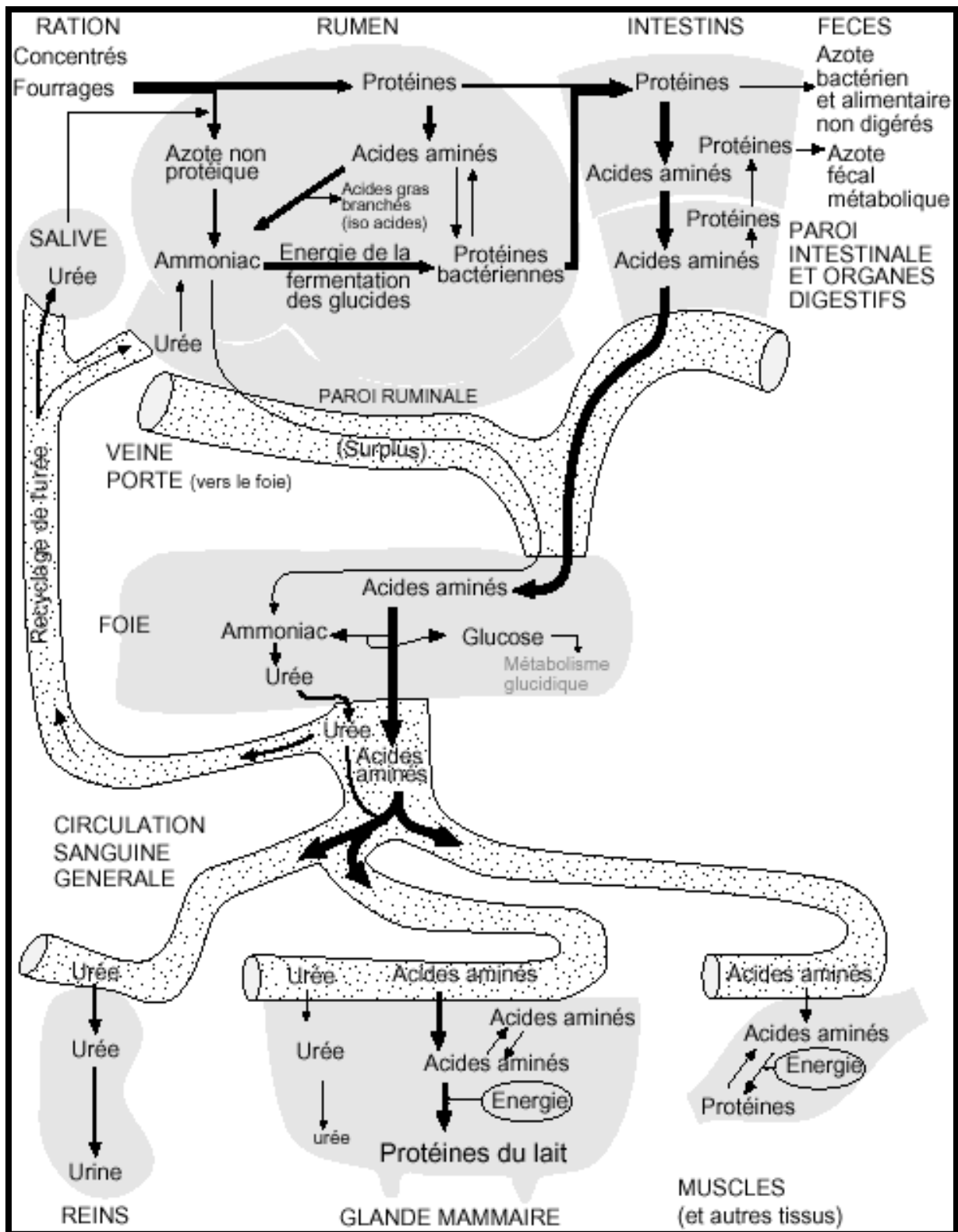


Figure 3. Métabolisme protéique dans le rumen

1.4.3. Métabolisme lipidique

Les lipides représentent une source énergétique importante dans le régime alimentaire des ruminants (Baumann *et al.*, 2003). La ration des ruminants contient généralement entre 2 et 5% de lipides, dont environ la moitié est des acides gras (Doreau et Ferlay, 1994). Le métabolisme des lipides dans le rumen s'effectue en deux étapes (Nafikov et Beitz, 2007) (fig. 4).

La première étape du métabolisme des lipides dans le rumen est l'hydrolyse. Les lipides diététiques sont largement hydrolysés dans le rumen en acides gras libres (AG) par des lipases microbiennes des bactéries (Doreau et Ferlay, 1994). Les protozoaires ne participent pas beaucoup à l'hydrolyse. L'hydrolyse des lipides produit également du glycérol et du galactose, qui sont convertis en acides gras volatils principalement le propionate et le butyrate (Doreau et Chilliard, 1997).

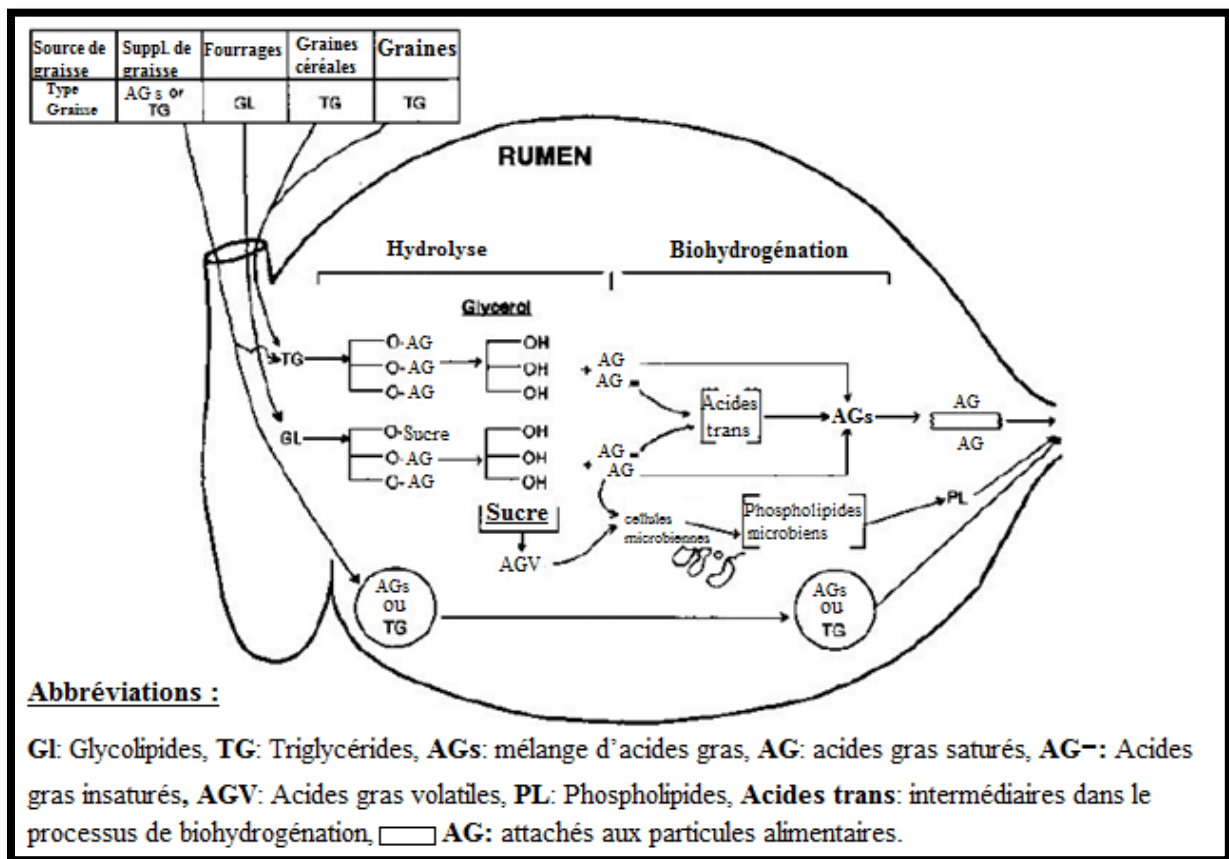


Figure 4. Métabolisme des lipides dans le rumen (Baumann *et al.*, 2003)

La biohydrogénation des acides gras insaturés est la deuxième transformation majeure que les lipides alimentaires peuvent subir dans le rumen avant leur absorption dans l'intestin grêle (Baumann *et al.*, 2003) (fig. 5). Elle se produit sur des acides gras libres dont les principaux sont les acides linoléique (C18:2) et linoléique (C18:3) par des enzymes extracellulaires de bactéries associées aux aliments ou libres en suspension (Harfoot et Hazlewood, 1997). Le produit final de l'hydrogénation des acides gras est l'acide stéarique (C18:0). Cependant, lorsque de grandes quantités d'acide linoléique (C18:2) sont disponibles, l'hydrogénation s'arrête généralement avant cette étape finale, ce qui conduit à divers isomères cis et trans de l'acide mononoïque dont le plus important est l'acide trans-vaccénique (C18:1) (Doreau et Chilliard, 1997).

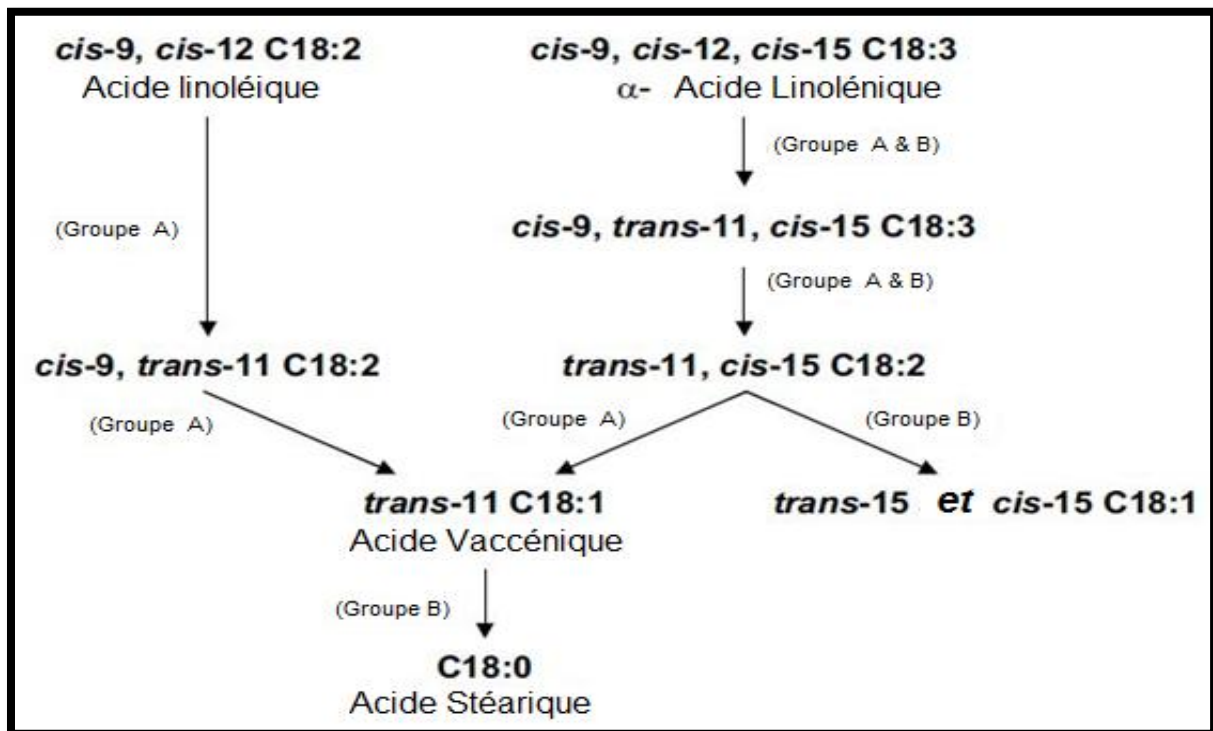


Figure 5. Biohydrogénation des acides gras insaturés (Harfoot et Hazlewood, 1997)

1.5. Production et émission de méthane

1.5.1. Méthane et effet de serre

Au cours du processus de fermentation anaérobie des glucides solubles et structuraux dans le rumen, des acides gras volatils et d'autres sous-produits se forment, parmi lesquels H₂, CO₂ et CH₄, ces deux derniers sont appelés gaz à effet de serre (Moss *et al.*, 2000).

Les systèmes de production animale contribuent considérablement aux émissions de gaz à effet de serre (GES) dans l'atmosphère et constituent donc l'une des causes des changements climatiques et du réchauffement de la planète (Pal *et al.*, 2015). Les émissions totales de gaz à effet de serre provenant de l'agriculture, y compris du bétail, sont estimées entre 25 et 32%, le CH₄ étant le plus important (Wanapat *et al.*, 2013). A l'échelle mondiale, 80 millions de tonnes de CH₄ sont produites chaque année, l'agriculture contribuant par 47% de ces émissions, les ruminants étant responsables de 39% de ce volume: les bovins représentant 77% de ce volume, les buffles 13% et les petits ruminants 10% (Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2015). En outre, le méthane a un potentiel de réchauffement planétaire vingt-cinq fois plus élevé que le CO₂ et représente une perte d'énergie alimentaire importante pouvant aller jusqu'à 12%. La quantité totale de méthane produite quotidiennement est synthétisée à 95% dans le rumen et les 5% restants dans l'intestin postérieur (caecum) (Jafari *et al.*, 2019).

La production de méthane dépend principalement du type et de la qualité de la ration. Les rations riches en amidon (concentrés) génèrent des émissions de CH₄ inférieures en raison de la synthèse de l'acide propionique et de l'amélioration du rapport méthane: matière organique fermentée dans le rumen, par rapport aux rations à base de cellulose et de lignine (fourrages) qui favorisent la synthèse de l'acide acétique et la production de H₂ qui est utilisé pour réduire le CO₂ en CH₄ (Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2015).

1.5.2. La méthanogénèse

La méthanogénèse est l'un des moyens importants d'élimination du H₂ produit lors de la décomposition des glucides dans le rumen. Les micro-organismes qui produisent du méthane en tant que produit final de leur fermentation sont appelés méthanogènes et le processus par lequel les méthanogènes produisent du CH₄ est appelée méthanogénèse (Jafari *et al.*, 2019).

1.5.3. Les archaebactéries

Les populations archéennes du rumen sont des méthanogènes anaérobies strictes (Janssen et Kirs, 2008) relativement limitées en nombre et en diversité par rapport aux bactéries du rumen. Elles représentent un taux <3% du microbiote procaryote du rumen et n'appartiennent qu'à trois genres principaux : *Methanobrevibacter* (environ 62%), *Méthanomicrobium* (environ 15%) et le groupe du rumen C ou RCC récemment renommé *Methanoplasmatales* (environ 16%), tandis que le reste appartient à des genres minoritaires tels que *Methanimicrococcus*, *Methanosarcina* et *Methanobacterium* (Belanche *et al.*, 2014). Contrairement aux bactéries, les méthanogènes sont dépourvus de peptidoglycane dans la paroi cellulaire. Il est remplacé par la pseudomureine dans *Methanobrevibacter* et *Methanobacterium*, par l'hétéropolysaccharide dans *Methanosarcina* et par la protéine dans *Methanomicrobium* (Hook *et al.*, 2010).

Les espèces de méthanogènes peuvent croître en utilisant du H₂ et souvent du formiate. Ils utilisent les électrons dérivés de H₂ (ou formiate) pour réduire le CO₂ en CH₄. Certaines espèces peuvent pousser avec des groupes méthyle, en oxydant du CO₂ pour produire des électrons qui sont utilisés pour réduire davantage les groupes méthyle en méthane. Quelques espèces peuvent se développer avec de l'acétate, dissimulant efficacement l'acétate en CH₄ et CO₂. Cependant, l'acétate n'est pas métabolisé en CH₄ dans une mesure significative dans le rumen (Janssen et Kirs, 2008).

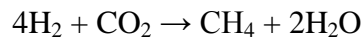
Les méthanogènes sont connus pour avoir des relations symbiotiques impliquant un transfert d'hydrogène interspécifique avec des micro-organismes du rumen, en particulier avec les protozoaires du rumen qui produisent de grandes quantités de H₂ via leurs hydrogénosomes, les protozoaires bénéficient de l'élimination de H₂, car H₂ inhibe leur métabolisme s'il n'est pas éliminé. Il a été estimé qu'entre 9% et 25% des méthanogènes du rumen sont associés aux protozoaires et que 37% du méthane provenant de ruminants est produit par des méthanogènes associés aux protozoaires (Morgavi *et al.*, 2010; Belanche *et al.*, 2014). Des protozoaires communs dans le rumen de bovin sont révélés avoir une relation provient des genres *Entodinium*, *Polyplastron*, *Epidinium* et *Ophryoscolex*, tandis que les méthanogènes les plus souvent associés aux protozoaires appartiennent aux ordres Methanobacterales et Methanomicrobiales (Sharp *et al.*, 1998). Les champignons anaérobies, tels que *Neocallimastix frontalis*, ont également une relation avec les méthanogènes impliquant un

transfert d'hydrogène interspécifique, l'activité enzymatique des champignons étant alors accrue et le métabolisme passant à la production d'acétate (Joblin *et al.*, 2002).

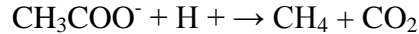
1.5.4. Processus de la méthanogénèse

Le CH₄ entérique est produit lors de l'élimination de H₂ métabolique. Le H₂ métabolique présent dans le rumen est utilisé par les bactéries méthanogènes, en particulier par les *Archaea*, qu'ils l'utilisent pour réduire le CO₂ en CH₄ dans des conditions d'anaérobiose. Il existe deux voies principales pour la synthèse de CH₄ (Cieslak *et al.*, 2013) (fig. 6).

L'élimination nécessaire de l'hydrogène est assurée principalement par les *Archée* méthanogènes qui produisent du méthane en tant que sous-produit métabolique selon la réaction suivante :



D'autres microorganismes comme les bactéries acétogènes (produisant de l'acétate) peuvent également fixer l'hydrogène digestif selon la réaction suivante, mais elles sont peu actives au niveau du rumen.



Ces processus sont contrôlés au moyen de la réduction de cofacteurs tels que le nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH), NAD phosphate réduit (NADPH) et la flavine adénine dinucléotide réduit (FADH), qui sont oxydés en NAD⁺, NADP⁺ et FAD⁺ qui à leur tour donnent des ions H⁺ pour synthétiser H₂ (Martin *et al.*, 2010). Des voies secondaires d'utilisation de l'hydrogène existent dans le rumen (synthèse de propionate, réduction des nitrates ou des sulfates, saturation d'acides gras insaturés...) mais elles sont moins efficaces (Jouany *et al.*, 1995).

Les protozoaires du rumen représentent également un facteur important dans la synthèse de méthane, car ils vivent en symbiose avec les *Archaea* avec lesquels il peut y avoir un transfert interspécifique de H₂.

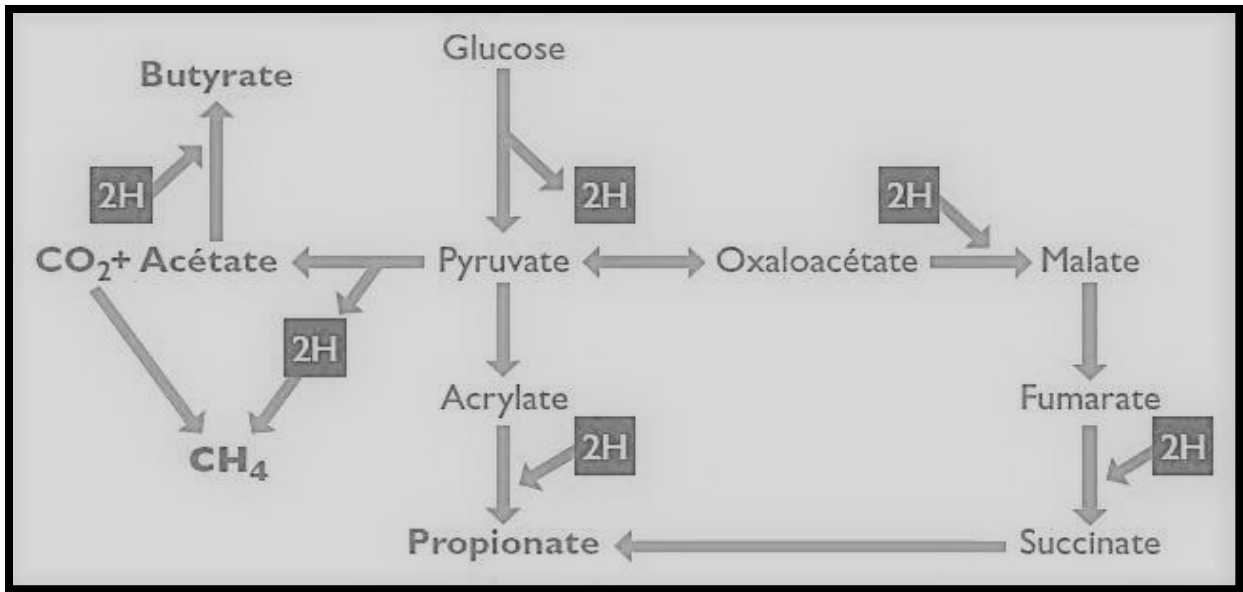


Figure 6. Voies métaboliques de production et d'utilisation de l'hydrogène au cours des fermentations anaérobies dans le rumen

1.5.5. Stratégies alimentaires visant à réduire la méthanogénèse dans le rumen

Depuis plus de deux décennies, les chercheurs travaillent pour identifier, quantifier et inhiber les méthanogènes et la méthanogénèse grâce à diverses stratégies d'atténuation de méthane. Globalement ces stratégies peuvent être divisées en quatre groupes, celles agissant sur la composition de la ration, celles de manipulation du microbiote ruminale, l'inclusion des additifs chimiques et l'utilisation des composés naturels (tab. 4).

1.5.5.1. Stratégies agissant sur la composition de la ration

-L'enrichissement de la ration en sucres fermentescibles et en amidon: Les composants du régime alimentaire, en particulier le type de glucides sont capables d'influencer la production de méthane. Il a été prouvé à travers les études que l'ajout des aliments riches en glucides rapidement fermentescibles et de l'amidon à la ration des ruminants a diminué les émissions de méthane entérique tout en favorisant la formation de propionate (Hindrichsen *et al.*, 2006).

-L'inclusion des lipides dans la ration: L'ajout des lipides, tels que les acides gras, les huiles et le suif peut réduire la production de méthane en diminuant le nombre de protozoaires et en inhibant les méthanogènes (Johnson et Johnson, 1995; Jordan *et al.*, 2006). Il a été également démontré que l'inclusion des lipides dans l'alimentation (en particulier à des

niveaux supérieurs à 5 g/kg MS) peut considérablement inhiber la dégradation des fibres dans le rumen (Machmuller et Kreuzer, 1997).

Tableau 4. Stratégies de réduction de méthane, mécanisme de réduction et considérations d'utilisation (Hook *et al.*, 2010)

Stratégie de réduction du méthane	Mécanisme de réduction	Considérations lors de la sélection de la stratégie de réduction
Composition diététique -Augmenter la cellulose -Augmenter l'amidon -Diminuer les composants de la paroi cellulaire	-Augmentation du taux de passage - Proportion de propionate plus élevée par rapport à l'acétate - pH ruminal réduit	-Déplacer la méthanogénèse vers l'intestin postérieur ou le fumier - risque d'acidose ruminale subaiguë
Lipides -Acides gras - Huiles -Suif	-Inhibition des méthanogènes et des protozoaires -Proportion de propionate plus élevée par rapport à l'acétate	-Effet sur l'appétence, l'apport, les performances et les composants du lait -Varie selon le régime alimentaire et les espèces des ruminants - Etudes à long terme nécessaires
-Défaunation - Additifs chimiques	-Supprime les méthanogènes associés -Moins d'hydrogène pour la méthanogénèse	-Une adaptation du microbiote possible - Varie avec le régime alimentaire - Entretien des animaux défaunés difficile
-Vaccin méthanogènes	-Réponse immunitaire de l'hôte aux méthanogènes	-Cibles vaccinales difficiles à définir - Varie avec l'alimentation et la localisation géographique de l'hôte
-Monensin	- Inhibe les protozoaires et les bactéries gram positives - Manque du substrat pour la méthanogénèse	-Une adaptation du microbiote possible - Varie selon le régime alimentaire et l'animal
Acides organiques - Fumarate - Malate	- Un puits d'hydrogène -Proportion de propionate plus grande par rapport à l'acétate	-Varie selon le régime alimentaire - Des recherches <i>in vivo</i> nécessaires -Etudes à long terme nécessaires - Peut affecter la digestibilité
Composés végétaux -Tannins condensés - Saponines -Huiles essentiels	-Activité antimicrobienne - Réduit la disponibilité d'hydrogène	- Dosage optimal inconnu - Des recherches <i>in vivo</i> nécessaires - Etudes à long terme nécessaires -Peut affecter la digestibilité

1.5.5.2. Manipulation du microbiote ruminale

-Vaccination: L'utilisation des vaccins qui stimulent le système immunitaire des ruminants afin qu'ils produisent des anticorps contre les méthanogènes producteurs du méthane (Wright *et al.*, 2004).

-Défaunation: Comme indiqué précédemment les protozoaires partagent une relation symbiotique avec les méthanogènes, impliquant le transfert interspécifique de l' H_2 nécessaire à la réduction du CO_2 en CH_4 . La défaunation consiste à éliminer les protozoaires du rumen, pour cette raison, les traitements qui diminuent la population de protozoaires du rumen peuvent également diminuer la population de méthanogènes et par conséquent, diminuer la production de méthane dans le rumen (Machmuller *et al.*, 2003).

1.5.5.3. Additifs chimiques

- **Le Monensin:** Est un antibiotique polyéther ionophore produit par *Streptomyces cinnamomensis* qui inhibe les bactéries à Gram positif responsables de l'apport des substrats pour la méthanogénèse (Russell et Strobel, 1989).

- **Les acides organiques:** L'ajout des acides organiques tel que l'acide fumarique et l'acide malique peut diminuer la méthanogénèse en orientant la fermentation ruminale vers la production de propionate (Asanuma *et al.*, 1999).

De nombreux autres additifs alimentaires chimiques sont connus par avoir un effet direct ou indirect sur la production de méthane tels que, les composés halogénés (chloroforme, l'acide 2-bromoethanesulfonique (BES)), les réducteurs de nitrite, les inhibiteurs d'hydroxyméthylglutaryl-SCoA réductase. Cependant aucun de ces composés n'est utilisé en routine dans les industries commerciales d'élevage pour réduire les émissions de CH_4 (Cottle *et al.*, 2011).

1.5.5.4. L'utilisation des composés naturels

Les trois principaux composés végétaux efficaces pour réduire les émissions de CH_4 sont les saponines, les huiles essentielles et les tanins condensés. Les saponines inhibent les protozoaires et limitent la disponibilité de l'hydrogène pour les méthanogènes (Guo *et al.*, 2008) tandis que les huiles essentielles ont des activités antimicrobiennes qui agissent de manière similaire à la monensin en inhibant les bactéries à Gram positif (Burt, 2004). L'effet des tanins condensés sur la méthanogénèse sera étudié dans la partie suivante.

2. TANINS ET LEURS EFFETS CHEZ LES RUMINANTS

2.1. Tanins

2.1.1. Définition

Les tanins sont des composés phénoliques de poids moléculaire élevé allant de 500 Da à 3000 Da qui sont largement distribués dans les plantes (Gross, 1999; Kraus *et al.*, 2003). Ils sont principalement caractérisés par leur capacité de précipiter les protéines (Hassanpour *et al.*, 2011).

2.1.2. Classes

Les tanins sont généralement divisés en deux groupes principaux: les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Seresinhe et Pathirana, 2003).

2.1.2.1. Les tanins hydrolysables (TH)

Les tanins hydrolysables sont des esters d'acides phénoliques et d'un sucre, généralement le D-glucose (Frutos *et al.*, 2004; Ghosh, 2015). Les acides phénoliques sont soit l'acide gallique (TH type 1: les gallotannins) soit l'acide ellagique ou l'acide hexahydroxydiphénique (TH type 2: ellagitannins) (Santos-Buelga et Scalbert, 2000; Naumann *et al.*, 2013). La structure chimique des acides phénoliques et des deux types de tanins est présentée dans la fig. 7 et fig. 8 respectivement.

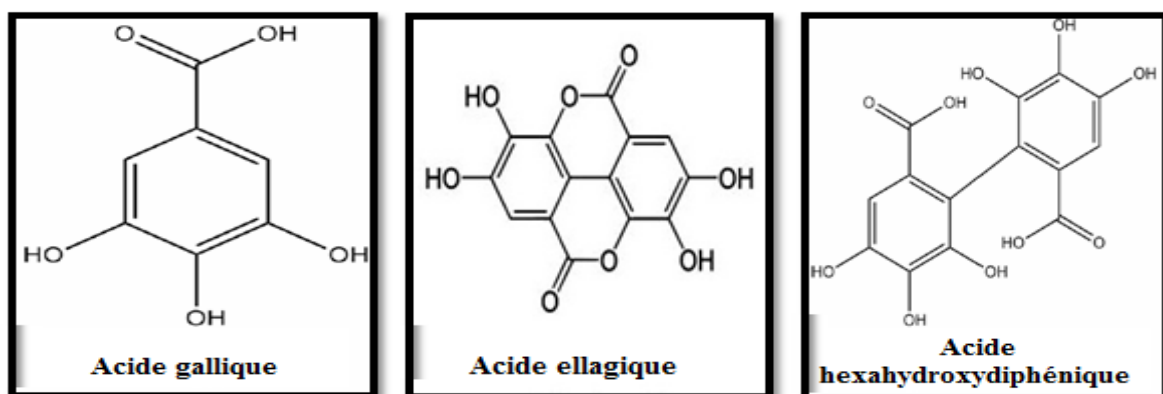
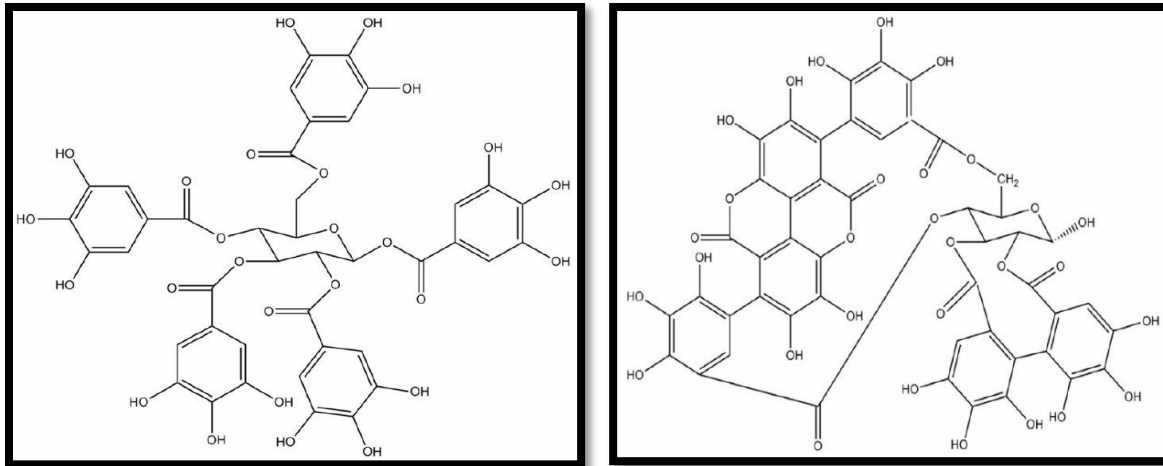


Figure 7. Structure chimique de l'acide gallique, ellagique et hexahydroxydiphénique

La désignation « tanin hydrolysable » est due au fait que ces composés s'hydrolysent facilement en sucres et en acides phénoliques (l'acide gallique ou l'acide ellagique) lors du traitement acide ou alcalin ou sous l'action d'enzymes hydrolytiques telle que la tannase (Gupta et Haslam, 1979).



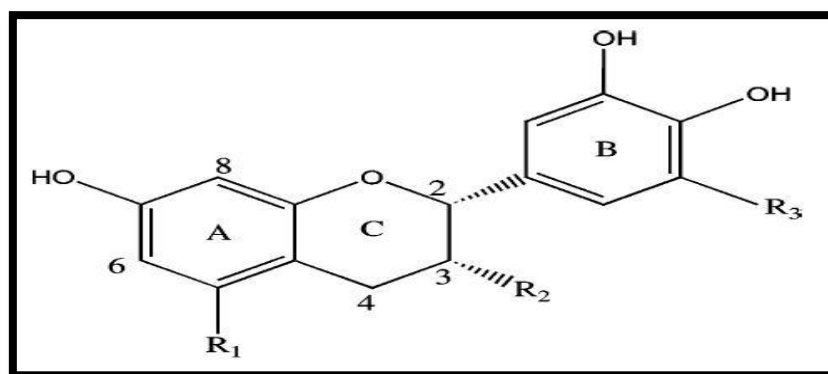
Gallotanin

Ellagitanin

Figure 8. Structure chimique des tanins hydrolysables

2.1.2.2. Les tanins condensés (TC)

Les tanins condensés appelés également proanthocyanidines, sont des oligomères ou des polymères d'unités Flavan-3-ol à trois cycles (A, B et C) (fig. 9), liés par des liaisons carbone-carbone C-C (He *et al.*, 2008). Ces liaisons sont de type (C₄-C₆) (conduisant à des proanthocyanidines ramifiés) et/ou (C₄-C₈) (conduisant à des proanthocyanidines linéaires) (fig. 11). Elles peuvent également être liées de manière double par une liaison éther supplémentaire (C₂ -O-C₇/C₂-O-C₅) (Bruyne *et al.*, 1999; Schofield *et al.*, 2001; Serrano *et al.*, 2009).

**Figure 9.** Structure de base des tanins condensés

Les unités monomères peuvent présenter une stéréochimie cis ou trans C₂-C₃; Les unités monomères de tanins condensés possédant une stéréochimie cis sont appelées épicatechines, épigallocatechines ou épiafzéléchines, tandis que celles de stéréochimie trans sont appelées

catéchines, gallocatéchines ou afzéléchines (fig. 10). Les oligo et les polymères sont respectivement appelés procyanidines, prodelphinidines et propélargonidines (Naumann *et al.*, 2013).

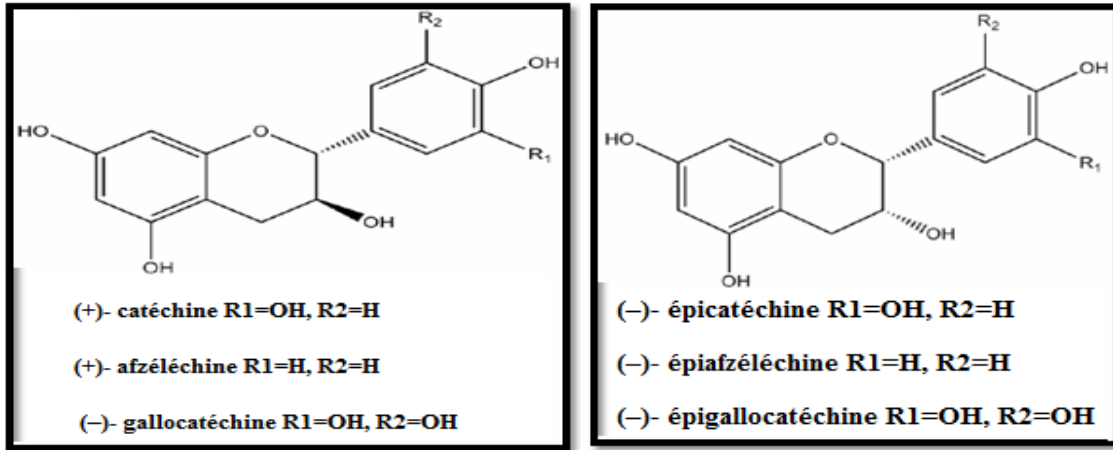


Figure 10. Structure de monomères des proanthocyanidines

Il existe des structures complexes qui contiennent des éléments structurels de différents groupes. Les soi-disant procyanidino-ellagitanins contiennent une unité (+) - catéchine ou (-) - épicatechine liée glycosidiquement à une unité ellagitanin. Lors de l'hydrolyse, les tanins complexes donnent (+) - catéchine ou (-) - épicatechine et acide gallique ou acide ellagique (Bhat *et al.*, 1998).

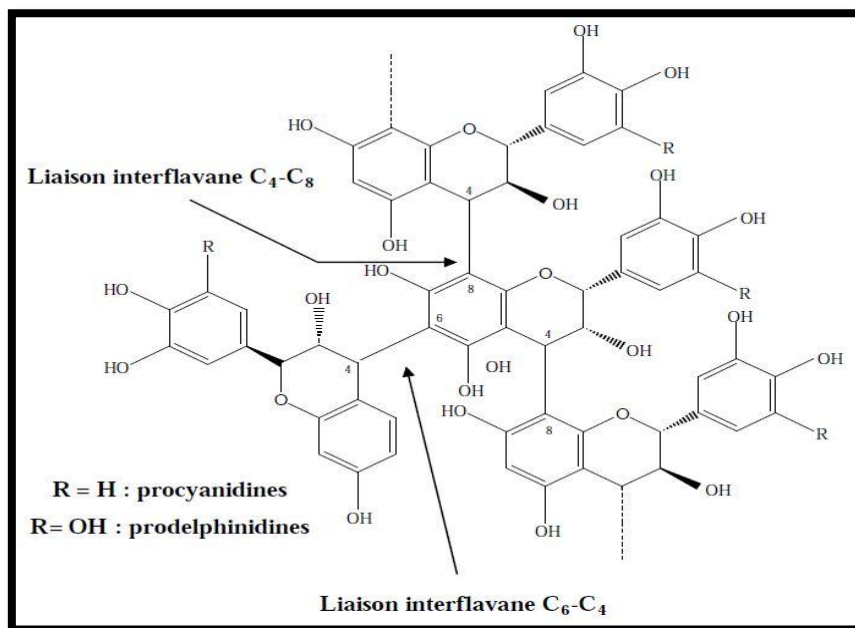


Figure 11. Structure chimique du dimère de proanthocyanidines et type de linkage

2.1.3. Sources des tanins

2.1.3.1. Plantes à tanins condensés

Les tanins condensés sont largement répandus dans le règne végétal, ils se rencontrent chez les Angiospermes et les Gymnospermes. Les plantes riches en tanins condensés se répartissent au sein de nombreuses familles botaniques de Dicotylédones tel que: les Anacardiaceae, les Polinaceae, les Poaceae et les Fagaceae (Bruneton, 1999). Ils sont largement distribués dans la famille des légumineuses, dans de nombreuses espèces fourragères telle que le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), le sulla (*Hedysarium coronarium*), les lotiers pédonculé et corniculé (*Lotus pedunculatus* et *Lotus corniculatus*) et plusieurs espèces d'*Acacia* (Piluzza *et al.*, 2013).

2.1.3.2. Plantes à tanins hydrolysables

Contrairement aux proanthocyanidines qui sont largement distribuées dans les plantes. Les tanins hydrolysables sont de distribution limitée dans la nature. Les tanins galliques se trouvent dans les dicotylédones ligneuses et herbacées et les ellagitannins se trouvent dans les Hamamelidae inférieurs, les Dilleniidae et les Rosidae (Bruyne *et al.*, 1999).

2.1.4. Localisation des tanins dans la plante et facteurs de variation de leur teneur

Les tanins se trouvent dans les feuilles, les racines, les tiges, le bois, l'écorce, les fruits et les fleurs des plantes. Leur distribution dans les tissus végétaux semble varier selon l'espèce (Ossipov *et al.*, 2003). Au niveau cellulaire, les tanins se trouvent dans les parois cellulaires, l'espace intercellulaire et les vacuoles. Il est largement admis que les tanins stockés dans les vacuoles peuvent former des complexes avec les protéines cytoplasmiques pendant la dégradation cellulaire (McMahon *et al.*, 2000).

La teneur en tanins d'une plante varie en fonction de plusieurs facteurs tels que l'espèce, la partie végétale, le stade végétale et les conditions environnementales.

-Espèce et partie végétale: En sein de la même famille et du même genre. Les espèces végétales présentent des teneurs variables en tanins. La teneur en tanins diffère également entre les organes des plantes, généralement les concentrations élevées sont enregistrées dans les feuilles que dans les tiges (Barrau *et al.*, 2005).

-Le stade végétal: La teneur en tanins est influencée par le stade végétal. De façon générale, la teneur en tanins diminue avec la maturité des plantes (Koricheva, 2002).

-Conditions environnementales: La concentration de tanins dans les plantes varie en réponse aux changements des conditions environnementales telles que les nutriments, la lumière, la température, le CO₂ et la disponibilité de l'eau (Chaves et Escuder, 1999). Il a été démontré que les concentrations des tanins augmentent en réponse à une fertilité plus faible et à des niveaux de CO₂ atmosphériques et une lumière plus élevés (Gebauer *et al.*, 1998; Booker et Maier, 2001). Le stress induit par des agressions des végétaux et des herbivores conduit également à une synthèse accrue de tanins, en particulier les TC.

2.1.5. Rôle des tanins chez les végétaux

Les tanins sont des métabolites secondaires qui servent d'agents de défense face aux agressions par divers phyto-pathogènes. Ils protègent la plante contre les insectes et les herbivores par un mécanisme d'astringence (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992). La présence des tanins conduit à la formation des complexes tanins-protéines salivaires dans la bouche donnant ainsi un goût astringent désagréable qui rend les plantes moins appétentes pour les prédateurs. Les tanins peuvent également affecter les enzymes digestives des prédateurs (Swain, 1979).

Les tanins sont aussi un moyen de défense contre l'invasion par les bactéries et les champignons en s'appuyant sur leur capacité de former des complexes avec les protéines et les polysaccharides (Collingborn *et al.*, 2000). La capacité des tanins de se lier aux métaux peut également limiter la croissance des micro-organismes invasifs en provoquant une grave déplétion en minéraux essentiels (Scalbert, 1991).

Il a été également démontré que les proanthocyanidines ont la capacité d'empêcher la prolifération des espèces végétales voisines via la production d'oxygène actif et via le déclenchement des cascades de signalisation calcique qui favorisant la mort cellulaire des cellules racinaires des plantes voisines (Bais *et al.*, 2003).

2.1.6. Biosynthèse des tanins condensés

Les tanins condensés sont synthétisés par condensation de deux voies métaboliques la voie de l'acétate-malonate et celle de l'acide shikimique, également appelée voie phénylpropanoïde qui est à l'origine de formation d'autres composés phénoliques tels que: les

isoflavones, les coumarines, la lignine et les acides aminés aromatiques (tryptophane, phénylalanine et tyrosine).

La condensation de trois molécules de malonyl CoA (issus de la carboxylation des molécules d'acétyl CoA) provenant de la voie d'acétate-malonate avec l'acide 4- hydroxy cinnamoyl - CoA par la chalcone synthase permet d'obtenir les flavonoïdes, précurseurs des tanins condensés. L'acide 4- hydroxy cinnamoyl- CoA est obtenu par désamination de la phénylalanine, ce dernier est le résultat de la transamination de l'acide préhénique issu de la voie shikimate.

La synthèse des proanthocyanidines découle directement de la naringénine et de ce fait de celle des flavonoïdes. En effet, les flavonoïdes sont formés à partir de la naringénine par différentes réactions enzymatiques faisant intervenir des hydrolases, des réductases et des glucosyl transférases. La flavanone 3 -hydroxylase catalyse l'hydroxylation de la flavanone en dihydroflavonol. Les dihydroflavonols comme la dihydroquercétine sont ensuite réduits par La dihydroflavonol 4-réductase (DFR) en leucoanthocyanidines. Les leucoanthocyanidines sont les précurseurs immédiats de la synthèse des catéchines et des proanthocyanidines. La réduction des leucoanthocyanidines en catéchines est catalysée par la réductase II. Cette synthèse est réalisée au niveau des chloroplastes dans le cytoplasme tandis que la polymérisation des monomères a lieu dans les vacuoles (Merghem, 2009) (fig. 12).

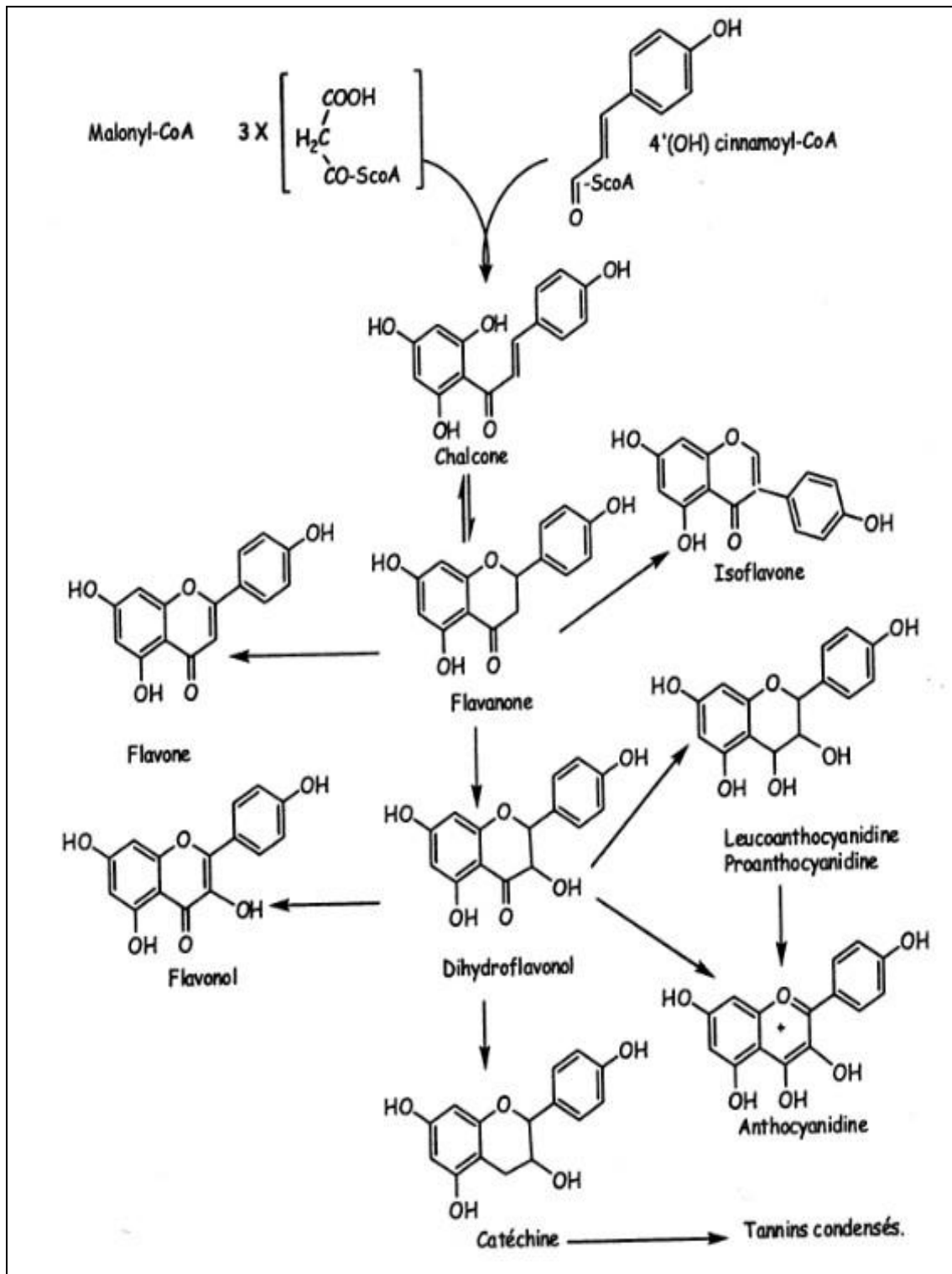


Figure 12. Biosynthèse des tanins condensés (Merghem, 2009)

2.1.7. Méthodes de dosage des tanins condensés

De nombreuses techniques telles que les analyses colorimétriques, chromatographiques, gravimétriques, les tests spectrométriques, spectroscopiques et de dégradations acides sont appliquées dans le dosage des tanins condensés (tab. 5).

Les méthodes colorimétriques tel que la méthode du butanol-HCl (Porter *et al.*, 1986), la méthode à la vanilline, (Broadhurst et Jones 1978) ou celles basées sur la précipitation des protéines (méthode de diffusion radiale, Hagerman, 1987) sont les plus utilisées. Ces méthodes permettent de doser des entités différentes et restent imparfaites en raison notamment d'un manque de standards appropriés et de leur non spécificité. La méthode de diffusion radiale permet de déterminer l'activité biologique, mais est mal adaptée pour mesurer la teneur en TC (Aufrere *et al.*, 2012).

Des progrès récents des méthodes analytiques ont aidé les chercheurs à déterminer des détails structuraux supplémentaires sur les polymères des tanins. Ces techniques comprennent la thiolysse, la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (Zeller, 2019).

- **La thiolysse:** C'est une méthode qualitative et quantitative, permet de mesurer la teneur en TC et d'avoir des indications sur leur structure. Cette méthode est un élément de base dans l'analyse des échantillons de TC purifiés et s'est avérée également utile dans l'analyse de TC des matières végétales séchées. Elle a été récemment adaptée pour l'analyse des fourrages ensilés (Ramsay *et al.*, 2015).

- **Résonance Magnétique Nucléaire:** Deux spectroscopies RMN ^1H et ^{13}C sont utilisés dans la détermination de la structure des TC. RMN ^{13}C à l'état de solution a longtemps été et demeure un outil précieux pour la détermination structurale d'échantillons de TC purifiés. C'est la seule méthode analytique actuellement utilisée pour l'identification des liaisons interflavane $\text{C}_4 - \text{C}_6$ et $\text{C}_4 - \text{C}_8$. Une étude récente a décrit l'utilisation de la spectroscopie bidimensionnelle RMN HSQC ^{31}P et $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ pour la détermination de la structure des TC purifiés (Crestini *et al.*, 2016).

- **Spectrométrie de masse:** La spectrométrie de masse a été largement utilisée comme méthode instrumentale pour la détermination de la composition des TC. Beaucoup de méthodes sont utilisées: la désorption / ionisation laser assistée par matrice - spectrométrie de

masse à temps de vol (MALDI-TOF-MS et la spectrométrie de masse à ionisation par électrospray (ESI-MS).

Tableau 5. Principales méthodes de dosage de la teneur ou de l'activité biologique des TC.

Méthode	Type et Principe	Avantages	Inconvénients	Remarques
HCl-butanol Porter <i>et al.</i> , (1986)	-Méthode chimique. -Dosage colorimétrique. -Dépolymérisation. oxydative en milieu acide des TC conduisant à la production d'anthocyanes de couleur rouge.	-Spécifique des TC. -Simple, rapide.	-Nécessite des standards externes. - L'intensité de la coloration varie avec la structure des TC. -Les polymères des TC sont clivés en dimères et trimères plus qu'en monomères ce qui conduit à une sous-estimation.	-Méthode mesurant le nombre total de résidus de flavonoïdes.
Vanilline Broadhurst et Jones (1978)	-Méthode chimique. -Dosage colorimétrique La vanilline (aldéhyde aromatique) réagit avec les TC pour former un complexe coloré.		-La structure des TC affecte l'intensité de la coloration. -Manque de spécificité.	-Méthode mesurant les flavonoïdes et les tanins totaux. -Inappropriée pour la détermination des TC liés aux parois végétales.
Gravimétrique Reed <i>et al.</i> , (1985)	-Mesure les TC liés au polyvinylpyrrolidone ou précipitation des polyphénols solubles avec l'ytterbium.	-Utilisation de standard non nécessaire.	-Moins sensible que les méthodes colorimétriques -Rendement de la réaction variable avec le rapport Ytterbium/ Tanin. -Mesures faites sur les matières minérales.	-Utilisable pour préparer des standards pour méthodes colorimétriques.
Activité enzymatique Goldstein et Swain (1965)	-Inhibition de l'activité de certaines enzymes par les tanins.	-Haute sensibilité parce que les enzymes ont un rôle amplificateur.	-Certaines enzymes sont plus adaptées que d'autres.	-Ne peut pas être mise en relation avec l'activité biologique.
Diffusion Radiale Hagerman (1987)	-Mesure de l'activité biologique. -Formation de complexes entre les tanins de la plante et l'albumine sérique bovine inclus dans une solution d'agar.	-Méthode rapide. -Ne requiert ni réactifs complexes, ni instrumentation.	-Moins précise que les méthodes colorimétriques pour la quantification. -Les tanins condensés et hydrolysables peuvent être détectés. -Le résultat dépend du choix de la protéine.	-Mesure de l'activité biologique. -Utilisation de plaques d'agar. -Acide tannique couramment utilisé comme témoin.

2.1.8. Interaction protéines-tanins condensés

Les tanins sont caractérisés par leur capacité de se fixer sur les protéines mais aussi sur d'autres types de molécules tels que les glucides (cellulose, amidon) et les métaux ou encore sur les polymères synthétiques (Polyéthylène glycol et polyvinyl polypyrrolidone) (Zimmer et Cordesse, 1996).

La formation de complexes tanins-protéines conduisant à la précipitation des protéines implique des liaisons covalentes et non covalentes. Les liaisons covalentes sont formées lors du couplage oxydant, par la conversion des phénols en quinones ou semi-quinones, ces liaisons sont irréversibles (Le Bourvelle et Renard, 2012; Lamy *et al.*, 2016). Cependant, la liaison des TC avec les protéines diététiques implique typiquement des liaisons non covalentes qui sont réversibles: les liaisons hydrogène formées entre les groupements phénoliques des tanins et les groupements carboxyle des protéines, les interactions hydrophobes formés entre la structure cyclique aromatique des tanins et des régions hydrophobes des protéines (Smith *et al.*, 2005).

La formation de complexes tanins -protéines dépend des caractéristiques des protéines et celles des tanins. L'interaction tanins-protéines est liée au poids moléculaire des protéines et celui des tanins, de manière générale plus le poids moléculaire de la protéine est élevé plus la liaison avec les tanins est plus stable (Zimmer et Cordesse, 1996). Les tanins ont une grande affinité pour les protéines riches en proline, les proline sont responsables de la structure tertiaire flexible et ouverte de la protéine favorisant la fixation des tanins (Hagerman *et al.*, 1998). L'interaction tanins-protéines dépend aussi du pH du milieu, les protéines ont une affinité plus élevée pour les tanins à des valeurs de pH proches de leurs points isoélectriques (McNabb *et al.*, 1998).

Les interactions tanins-protéines provoquant la précipitation des protéines, sont en grande partie responsables des effets bénéfiques et des effets néfastes des tanins chez les ruminants, la formation des complexes tanins-protéines peut diminuer la dégradation des protéines alimentaires au niveau du rumen mais peut aussi causer une perturbation des activités microbiennes, une diminution de l'ingestion et parfois même une toxicité (Zimmer et Cordesse, 1996).

2.1.9. Activités biologiques des tanins

Les effets biologiques des tanins ont été largement étudiés *in vitro* et *in vivo*. Les tanins peuvent exercer leurs effets biologiques de deux manières différentes: en tant que structures complexes non absorbable via la formation des complexes avec les macromolécules, produisant ainsi des effets locaux dans le tractus gastro-intestinal (antioxydant, anti-radicalaire, antimicrobien, antiviral, antidiabétique et antinutritionnel) ou en tant que tanins absorbables (métabolites de faible poids moléculaire) et métabolites absorbables provenant de la fermentation colique produisant des effets systémiques dans divers organes (Sieniawska, 2015).

2.1.9.1. Activité antioxydante et anti-radicalaire

Les tanins sont connus par leur capacité d'inhiber la peroxydation lipidique *in vitro* et de piéger les radicaux libres tels que l'hydroxyle, le superoxyde et le peroxyde impliqués dans la prooxydation cellulaire. La capacité des proanthocyanidines à éliminer les radicaux libres dépend en grande partie de leur structure et leur degré de polymérisation (Okuda, 2005; Jerez *et al.*, 2007).

2.1.9.2. Activité antimicrobienne et antivirale

Les tanins sont des agents antimicrobiens qui peuvent affecter la croissance bactérienne par différents mécanismes, indirectement par l'inhibition des enzymes microbiennes extracellulaires ou la réduction de la disponibilité des substrats nécessaires à la croissance microbienne ou directement en inhibant la phosphorylation oxydative dans le métabolisme microbien (Chung *et al.*, 1993). La liaison des tanins avec les ions métalliques dans l'environnement de croissance des bactéries pourrait également être un mécanisme de leur action antimicrobienne (Bruyne *et al.*, 1999).

De nombreux extraits de tanin ont montrés une activité antivirale. Les activités anti herpétiques des tanins hydrolysables dépendent du nombre de groupes galloyl ou hexahydroxydiphenoyl tandis que celles des tanins condensés dépendent de leur degré de polymérisation (Takechi *et al.*, 1985).

2.1.9.3. Activité cardioprotectrice

De nombreuses études conduites *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les tanins condensés ont une activité cardioprotectrice. L'apport des TC a été associé avec des

réductions des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires et une diminution des taux de cholestérol plasmatique et de l'athérosclérose (Serrano *et al.*, 2009).

2.1.9.4. Activité antidiabétique

Les tanins possèdent un potentiel antidiabétique en raison de leur capacité à baisser le taux du glucose en retardant son absorption intestinale et par un effet semblable à l'insuline sur les tissus insulino-sensibles. Ils peuvent également retarder l'apparition du diabète insulino-dépendant en régulant l'environnement antioxydant des cellules β pancréatiques (Serrano *et al.*, 2009).

2.1.9.5. Activité cytotoxique

De nombreuses études ont démontré que les procyanidines sont plus cytotoxiques que les flavanols monomères pour une variété de lignes de cellules cancéreuses humaines. Cependant, la présence d'un résidu galloyle sur la position 3 du cycle C des monomères améliore leur cytotoxicité (Actis-Goretta *et al.*, 2008).

2.1.9.6. Effets antinutritionnels

La capacité des tanins de se lier aux protéines peut provoquer une inhibition enzymatique et peut donc interférer avec la digestion gastro-intestinale et l'absorption des nutriments. Des études conduites *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les tanins ont réduit l'absorption du sucre et des ions métalliques (Motilva *et al.*, 1983; Martinez *et al.*, 1986).

2.2. Effets des tanins condensés chez les ruminants

2.2.1. Effets des tanins condensés sur le métabolisme azoté

Du à leur capacité de former des complexes avec les protéines, les tanins condensés constituent une stratégie efficace pour protéger les protéines alimentaires de la dégradation microbienne dans le rumen (Frutos *et al.*, 2004). En effet, de nombreuses études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les tanins condensés ont réduit la digestibilité des protéines et ont diminué la concentration d'ammoniac issu de leur dégradation. Les essais d'Ishlak *et al.*, (2015) et de Castro-Montoya *et al.*, (2017) conduits *in vitro*, sur l'extrait de quebracho ont montré que l'utilisation de ce dernier comme un additif alimentaire a conduit à une réduction de la dégradation des protéines brutes et à une diminution de la concentration d'ammoniac. En utilisant le système de simulation du rumen, Hess *et al.*, (2006) ont rapporté que l'ajout de la légumineuse *Calliandra calothyrsus*, riche en tanins condensés, à une alimentation à base

d'herbes tropicales a entraîné une diminution de la concentration d'ammoniac. Similairement, Cieslak *et al.*, (2014) en utilisant la même technique ont noté que l'extrait de *Quercus cortex* et *Vaccinium vitis idaea*, ont réduit la concentration d'ammoniac sans effet négatif sur la digestibilité de la matière sèche.

La liaison tanins-protéines entraîne l'enrobage des protéines par les tanins via un mécanisme d'adsorption en surface, ce qui conduit à la précipitation des complexes tanins-protéines (Naumann *et al.*, 2017). Dans le rumen, où des conditions de pH neutre sont dominantes, ces complexes ne peuvent pas être dissociés, les protéines ne sont pas donc dégradées par les microorganismes. Les TC permettent ainsi une limitation de la production d'ammoniac. Dans l'obomasum, où le pH est acide (2-3), certaines de liaisons tanins-protéines sont dissociées, les protéines peuvent être donc dégradées en acides aminés puis absorbées dans l'intestin (Min *et al.*, 2006).

Les interactions tanins-protéines conduisant à une diminution de la dégradation des protéines dans le rumen sont fortement liées à la source et la concentration des TC d'une part et de la source des protéines d'autre part. L'extrait *Vaccinium vitis idaea* était plus efficace dans la réduction de la concentration d'ammoniac que l'extrait de *Quercus cortex* (Cieslak *et al.*, 2014). L'ajout des TC de l'extrait de *Calliandra calothyrsus* à différentes concentrations à différentes source de protéines (feuilles de gliricidia, tourteau de soja et caséine) a conduit à une diminution, concentration dépendante de la digestibilité des protéines; plus la concentration des tanins augmente plus la digestibilité diminue. En outre, le taux des protéines non dégradées arrivant au rumen dépend de la source de protéine; les complexes tanins-caséine ont été facilement dégradé dans le rumen par rapport aux autres sources de protéines (Wina et Abdurohman, 2005). Les extraits purifiés de tanins condensés des légumineuses *Calliandra calothyrsus*, *Flemingia macrophylla* et *Leucaena leucocephala* ajoutés au tourteau de soja à des proportions de 300, 600 ou 900 mg/g de la protéine brute, ont réduits la digestibilité des protéines à mesure que la concentration de TC augmentait, selon la source de protéine (Cortés *et al.*, 2009).

De nombreux travaux menés *in vivo* ont démontré également l'efficacité des tanins condensés dans la réduction de la digestibilité des protéines alimentaires. L'utilisation d'un extrait commercial de quebracho en tant qu'additif à 40g/kg MS dans l'alimentation des moutons, dans les régimes de bovins de boucherie et dans les régimes de génisses à 1 et 2% de MS a conduit à une diminution de la digestibilité des protéines brutes et à une augmentation du taux

d'azote absorbé (Kamel *et al.*, 2019; Mezzomo *et al.*, 2011; Beauchemin *et al.*, 2007). L'inclusion de l'extrait d'*Acacia mearnsii* dans les régimes alimentaires des génisses et des vaches, a réduit l'excrétion d'azote urinaire et a amélioré l'apport en acides aminés (Orlandi *et al.*, 2015; Grainger *et al.*, 2009).

Les tanins peuvent également réduire la dégradation des protéines alimentaires et la production d'ammoniac dans le rumen en inhibant directement l'activité et la croissance des bactéries protéolytiques (Patra et Saxena, 2009; Hao *et al.*, 2011; Durmic et Blache, 2012). Molan *et al.*, (2001) ont rapporté que les TC de *Lotus corniculatus* et *Lotus pedunculatus* ont inhibé la croissance de cinq souches de bactéries protéolytiques du rumen *in vitro*. De plus, la réduction de la production d'ammoniac peut être provoquée par l'inactivation des enzymes protéolytiques (Makkar, 2003). En effet, Nsahlalai *et al.*, (2011) ont rapporté que les tanins d'*Acacia sieberiana* et d'*Acacia nilotica* ont réduit la digestibilité des protéines dans le rumen en affectant l'activité des enzymes protéolytiques.

2.2.2. Effets des tanins condensés sur les émissions de méthane

Les tanins condensés ont été rapportés pour réduire les émissions de méthane aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. En effet plusieurs études l'ont confirmé, l'étude de Poornachandra *et al.*, (2019) conduite *in vitro* a démontré que la supplémentation de graine de tamarin riche en tanins condensés à un niveau de 7g/kg MS a conduit à une réduction de 29% de la production de méthane entérique. Hess *et al.*, (2006) ont noté que la production de méthane a été diminuée linéairement lorsque la légumineuse *Calliandra calothyrsus* a été ajoutée à une alimentation à base d'herbe tropicale. Dans une expérience conduite *in vivo* Hess *et al.*, (2006) ont noté que la supplémentation d'un extrait de tanins condensés d'*Acacia mearnsii* à l'alimentation des agneaux en croissance a diminué le dégagement du méthane par 13%. La supplémentation des fourrages légumineux dans des fermenteurs continus a conduit également à une réduction de la production de CH₄ (Williams *et al.*, 2011).

Des sous-produits riches en tanins condensés ont également démontré leur pouvoir à réduire la production de CH₄, la supplémentation de la graine de Mao, sous-produit de l'industrie du vin et des jus, à l'alimentation des chèvres a conduit à une diminution linéaire de la production de méthane (Gunun *et al.*, 2016). L'incubation des échantillons de marc de raisin dans le jus du rumen des moutons a réduit la production de méthane entérique (Hixson *et al.*, 2018).

L'effet des TC dépend généralement de leur concentration (Patra et Saxena, 2011; Jafari *et al.*, 2019). Ceci a été confirmé par plusieurs études, l'ajout de l'extrait de quebracho chez les bovins nourris avec du *Pennisetum purpureum grass* de basse qualité à 1,2, 3 et 4% a diminué linéairement la production totale de CH₄, ou les réductions les plus élevées ont été enregistrées pour les taux de 3 et de 4% (Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2017). La supplémentation de niveaux croissants des fourrages contenant des tanins condensés de *Kobe lespedeza* et *Sericea lespedeza* chez les chèvres, de *Leucaena leucocephala* chez les bovins a conduit à une réponse dose dépendante dont la plus grande réduction de méthane entérique a été enregistrée pour la concentration la plus élevée (Animut *et al.*, 2008; Puchala *et al.*, 2012; Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2018). Cependant Beauchemin *et al.*, (2007) ont rapporté que la supplémentation d'un extrait de quebracho à 2% à l'alimentation des bovins en croissance n'a pas permis de réduire les émissions de méthane entérique. De même l'extrait commercial de mimosa supplémente à un régime riche en grain à 14.9g/kg MS n'a eu aucun effet sur la production de méthane *in vitro* (Krueger *et al.*, 2010).

Le poids moléculaire, la structure chimique et la source des tanins jouent également un rôle clé dans leur activité biologique par rapport à la diminution de la production de méthane entérique (Cieslak *et al.*, 2013), en effet Huang *et al.*, (2011) ont rapporté que l'inhibition de la production de CH₄ la plus élevée a été enregistrée avec la fraction de tanins ayant le poids moléculaire le plus élevé. Hatew *et al.*, 2015, ont noté que les différences significatives dans l'activité antiméthanogène des extraits de TC de quatre accessions de sainfoin, présentant des teneurs relativement similaires en TC, sont attribuées aux différences de taille du polymère des tanins.

Les tanins condensés peuvent diminuer la méthanogenèse soit directement par la réduction de la digestion des fibres, ce qui réduit la production de H₂ ou par réduction de la population des méthanogènes (Wanapat *et al.*, 2013), soit indirectement, en réduisant la population de protozoaires, réduisant ainsi les méthanogènes associés symbiotiquement à ces derniers (Bhatta *et al.*, 2009). Tan *et al.*, (2011); Cortés *et al.*, (2009) et Cieslak *et al.*, (2013) ont rapporté que l'inclusion de l'extrait de TC de *Leucaena leucocephala in vitro* a réduit la production de CH₄ et le nombre total des méthanogènes. L'inclusion des tanins condensés de *Vaccinium vitis idaea* dans l'alimentation des vaches laitières a réduit la production de méthane par 8% et la population des protozoaires par 35% (Cieslak *et al.*, 2012).

2.2.3. Effets des tanins condensés sur la fermentation ruminale

Les tanins condensés ont la capacité d'affecter la fermentation ruminale. Leurs effets sont généralement associés à une réduction de la digestibilité de la matière organique et de la production d'AGV, en particulier le rapport acétate: propionate (Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2015). L'étude de Dschaak *et al.*, (2011) portée sur la supplémentation d'un extrait de tanins de quebracho à l'alimentation des vaches laitières a enregistré une diminution de la concentration totale en acides gras volatils, Castro-Montoya *et al.*, (2011) ont rapporté que les tanins purifiés de mimosa ont réduit la production totale d'acides gras à chaîne courte et ont diminué le rapport acétate: propionate. L'addition des tanins condensés extraits du zeste de mangoustan (*Garcinia mangostana L*) a diminué la concentration des AGV totaux, d'acide acétique, propionique, butyrique et isovalérique de façon linéaire avec l'augmentation de la quantité des TC (Paengkoum *et al.*, 2015). Getachew *et al.*, (2008) ont enregistré que l'inclusion des tanins de quebracho a diminué la production d'AGCC et le rapport acétate: propionate. Cependant, de nombreuses études conduites *in vivo* ont rapporté que les tanins condensés n'ont pas eu d'effet sur la production des acides gras volatils (Junior *et al.*, 2017; Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2018; Attia *et al.*, 2011; Dentinho *et al.*, 2014; Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2017; Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2018) ou peuvent conduire à une augmentation de leur production, Pinski *et al.*, (2015) ont rapporté que l'inclusion de l'extrait de quebracho à 25, 50, 75 g/kg de MS a augmenté la concentration totale en acides gras volatils à 50 g/kg de MS (tab. 6).

La supplémentation en tanins condensés diminue la digestibilité *in vitro* et *in vivo* (Wanapat *et al.*, 2012). L'addition d'un niveau croissant de TC de différentes accessions de sainfoin a réduit la digestibilité de la matière organique *in vitro* (Henke *et al.*, 2016). En revanche l'étude de Dentinho *et al.*, (2014) portée sur la supplémentation de l'extrait de tanins condensés de *Cistus ladanifer* et l'étude de Ishlak *et al.*, (2015) portée sur l'addition de l'extrait de quebracho *in vitro* ont démontré que les TC n'ont eu aucun effet sur la digestibilité de la matière organique, la digestibilité apparente de la MS et la digestibilité de la fraction de fibre détergent neutre (NDF). Rufino-Moya *et al.*, (2019) ont enregistré une augmentation de la digestibilité de la matière organique *in vitro*.

Tableau 6. Effets des tanins condensés de différentes sources sur la production des acides gras volatils totaux, l'acide acétique, l'acide propionique et le rapport acétate: propionate

Substrat	Concentration	AGVt	C ₂	C ₃	C ₂ : C ₃	Animal	Référence
Etudes <i>in vitro</i> Extrait de quebracho	25 g/kg MS	0	-	-	nd	Vaches	Pinski <i>et al.</i> , 2015
Extrait de quebracho	50 g/kg MS	+	nd	-	nd	Vaches	Gatechew, 2008
	75g/kg MS	0	-	nd	nd		
	50 g/kg MS	-	nd	-	nd		
<i>Garcinia mangostana L.</i>	100 g/kg MS	-	-	-	nd	Bétail	Paengkoum <i>et al.</i> , 2015
	10mg/500gMS	-	-	-	nd		
Mimosa/Quebracho	20mg/500gMS	-	-	-	nd	Vaches	Castro-Montoya <i>et al.</i> , 2011
	30mg/500gMS	-	-	-	-		
	0.25mg/ml	-	nd	nd	nd		
	1.25mg/ml	-	nd	-	nd		
Extrait de quebracho	100g/kg MS	nd	nd	+	nd	Vaches en lactation	Ishlak <i>et al.</i> , 2015
Etudes <i>in vivo</i> Extrait de quebracho	3%	-	nd	nd	nd	Vaches laitières	Dschaak <i>et al.</i> , 2011
<i>Acacia meransi</i>	18 mg/kg MS	0	0	nd	nd	Bovins	Junior <i>et al.</i> , 2017
<i>Leucaena leucocephala</i>	20 %, 40%, 60%,80%	0	0	0	nd	Bovins	Piñeiro-Vázquez <i>et al.</i> , 2018
Quebracho	26 g	0	nd	nd	nd	Moutons	Attia <i>et al.</i> , 2013
	52 g	0	nd	nd	nd		
<i>Cistus ladanifer L.</i>	15 g /kg	0	nd	nd	nd	Béliers	Dentinho <i>et al.</i> , 2014
	30 g /kg						
Mimosa	10%	-	nd	nd	nd	Moutons	Costa <i>et al.</i> , 2018
Quebracho	1% ,2%,3%,4%	0	0	+	nd	Bétail	Piñeiro-Vázquez <i>et al.</i> , 2017

+ : augmentation de la production, - : diminution de la production, 0: aucun effet, nd: non disponible, C₂:C₃ : Acétate: Propionate.

2.2.4. Effets des tanins condensés sur les performances des ruminants

Les tanins peuvent exercer des effets nutritionnels bénéfiques chez les ruminants (Mueller-Harvey, 2006). Rivera-Méndez *et al.*, (2016) ont rapporté que la supplémentation de l'extrait de quebracho à l'alimentation des bouvillons a augmenté le gain du poids, l'efficacité du gain et l'énergie alimentaire nette. Salem *et al.*, (2011) ont noté que l'administration d'un extrait de *Leucaena leucocephala* a amélioré les performances de l'agneau par 21%. Pathak *et*

al., (2017) ont enregistré une augmentation de la production du lait chez les vaches laitières à mi-lactation recevant un supplément contenant 1,5% de TC des feuilles de *Ficus bengalensis*. Une augmentation des protéines totales du lait a été enregistrée chez des chèvres en lactation nourries au fourrage frais du sulla riche en tanins condensés (Di Trana *et al.*, 2015). La supplémentation en TC de *Ficus infectoria* et de *Psidium guajava* à raison de 1% et à 2% au régime alimentaire des moutons a considérablement amélioré les performances de croissance et le rendement en laine (Dawson *et al.*, 2011).

L'un des effets positifs des tanins condensés le plus important est la diminution de la dégradation des protéines alimentaires qui entraîne une baisse de la production d'ammoniac dans le rumen. En conséquence, l'azote urinaire est réduit et l'azote fécal est légèrement augmenté. Le flux des acides aminés vers le duodénum est alors augmenté conduisant à une meilleure absorption des acides aminés par le sang (Kumar *et al.*, 2014). Zhang *et al.*, (2019) ont noté que la supplémentation en tanins condensés de baies Bayberry à l'alimentation des vaches a amélioré l'utilisation d'azote en augmentant le taux de son rétention et en réduisant son excrétion urinaire. Dschaak *et al.*, (2011) ont rapporté une diminution de la concentration de l'azote ammoniacal dans le rumen chez des vaches ayant reçu des régimes alimentaires enrichis en extrait de quebracho .

Les tanins condensés peuvent potentiellement contrôler les parasites et les nématodes gastro-intestinaux, la supplémentation alimentaire d'un mélange de feuilles contenant des tanins condensés a inhibé les différents stades de développement d'*Haemonchus contortus* chez les moutons (Pathak *et al.*, 2013). Molan et Faraj, (2010) ont rapporté que les extraits de TC de plantes ont perturbé le cycle de vie des nématodes en ralentissant le développement des larves et en tuant les larves non développées. Le traitement des moutons par une dose de 37,5 mg/kg de TC a diminué l'infection parasitaire et a amélioré leurs performances (García-Hernández *et al.*, 2016). Novobilsky *et al.*, (2011) a étudié l'effet de trois extraits de plantes tannifères et a confirmé que les tanins condensés ont un effet anthelminthique contre les nématodes des bovins.

Les effets des tanins sur les performances des ruminants sont difficiles à généraliser, ils dépendent strictement de leurs caractéristiques spécifiques et des conditions inhérentes au régime alimentaire de base et au statut métabolique des animaux. Plusieurs études portées sur différentes sources de tanins condensés ont démontré qu'ils n'ont eu aucun effet sur les

performances des ruminants (Bengaly *et al.*, 2007; Krueger *et al.*, 2010; Dawson *et al.*, 2011; Aprianita *et al.*, 2014; Francisco *et al.*, 2015; Valenti *et al.*, 2018).

2.2.5. Effets des tanins condensés sur le microbiote ruminale

Les tanins condensés peuvent avoir un effet positif ou négatif sur la microflore du rumen. Leurs effets varient en fonction de leur source, de leur structure et leur dose utilisée. Phesatcha et Wanapat, (2016) ont rapporté que la population de microorganismes chez des buffles mâles a augmenté avec l'augmentation des niveaux d'alimentation en *Leucaena leucocephala* et que l'analyse des bactéries cellulolytiques déterminée par PCR quantitative a montré que la population de *Fibrobacter succinogenes* a été augmentée, tandis que la population de *Ruminococcus flavefaciens* a été réduite. Min *et al.*, (2012) ont enregistré une augmentation des populations microbiennes de *Prevotella ruminicola* et des souches de *Fibrobacter succinogenes* et *Ruminococcus flavefaciens* avec supplémentation des TC de mimosa. Kok *et al.*, (2013) ont démontré que *Leucaena leucocephalahybrid-Bahru* contenant 6% des TC nourrit à des chèvres, a affecté la population de moisissures cellulolytiques du rumen à différentes périodes d'alimentation, avec inhibition de la croissance au début, suivie d'adaptation et de prolifération de la croissance, puis une réduction à nouveau avec une exposition prolongée aux TC. Supreena et Peangkoum, (2011) ont enregistré une augmentation des populations de bactéries chez les chèvres nourries avec 40 g de feuillages de *Leucaena leucocephala*. Nguyen *et al.*, (2017) ont révélé que la supplémentation de *Leucaena leucocephala* ensilée à 60% a amélioré la population microbienne du rumen, en particulier les bactéries cellulolytiques, protéolytiques et les zoospores fongiques, alors que la population de bactéries amylolytiques n'est pas affectée par les traitements. Chanthakhoun *et al.*, (2011) ont rapporté que la supplémentation en foin de *Phaseolus calcaratus* (PCH) à 600 g chez les buffles nourris avec la paille de riz a amélioré les microorganismes du rumen, en particulier les bactéries cellulolytiques, à savoir *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* et *Fibrobacter succinogènes* et les zoospores fongiques. Min *et al.*, (2015) ont noté que la supplémentation de *Sericea lespedeza* dans les régimes alimentaires des chèvres a modifié positivement la communauté bactérienne du rumen. Chentli *et al.*, (2014) ont enregistré des augmentations de l'abondance de *F. succinogenes* avec incorporation des TC d'*A. nilotica* et *A. cyanophylla* et une réduction des populations de champignons. Min *et al.*, (2014) ont noté que les populations bactériennes les plus importantes étaient le *phylum Bacteroides* et *Firmicutes* avec la supplémentation en poudre d'écorce de pin contenant 11% de tanins condensés.

Les tanins condensés sont considérés comme des composés antimicrobiens naturels qui exercent un effet inhibiteur sur les différents microorganismes du rumen notamment les bactéries, indirectement en réduisant la disponibilité en azote et en soufre des protéines pour leur utilisation ou directement, par la formation des complexes avec l'enveloppe de la cellule bactérienne (Kumar *et al.*, 2014). Les complexes de tanins avec la membrane de la paroi cellulaire des bactéries provoquent des modifications morphologiques capables de limiter le transport des nutriments dans la cellule et de retarder ou de prévenir la croissance de l'organisme (Uyeno, 2015). Wang *et al.*, (2013) ont démontré que les tanins condensés provenant de la dallée pourpre (*Dalea purpurea*) ont réduits les taux de croissance d'*Escherichia coli* ATCC 25922 et huit souches d'*Escherichia coli* O157: H7 en provoquant une modification de la composition en acides gras et une perturbation de la membrane externe de la cellule. Liu *et al.*, (2013) ont démontré que les tanins condensés de trèfle pourpre (*Dalea purpurea* Vent.) ont été plus efficaces que les TC de sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) dans l'inhibition des souches bactériennes d'*E. Coli* et d'*E. Coli* O157: H7 et que l'activité antibactérienne est due à la capacité accrue des tanins condensés de trèfle pourpre à précipiter les protéines, augmentant ainsi la perméabilité de la membrane extérieur et favorisant l'agrégation cellulaire.

De nombreuses études ont démontré que les tanins sont capables d'inhiber la croissance de différents microorganismes responsables du développement des maladies intestinales (Patra *et al.*, 2012). Elizondo *et al.*, (2010) ont enregistré que la croissance de *Clostridium perfringens* (types A, B, C, D et E) obtenus à partir de l'intestin d'animaux malades a été réduite de manière dose-dépendante en présence de tanins de quebracho. Anderson *et al.*, (2012) ont rapporté que les extraits de TC de mimosa et de quebracho ont inhibé la croissance de *Campylobacter jejuni*. Costabile *et al.*, (2011) ont rapporté que Différentes sources de tanins condensés commerciales, ou isolées de préparations ou de plantes ont réduit l'infection à *Salmonella in vitro*. Les tanins condensés peuvent aussi modifier la biohydrogénation en modifiant les communautés microbiennes du rumen (Vasta *et al.*, 2010; Buccioni *et al.*, 2017).

Des recherches portant sur les effets des TC sur les populations méthanogènes ont été réalisées à la fois *in vitro* et *in vivo*. Min *et al.*, (2014) ont enregistré une diminution des méthanogènes *Methanobrevibacter* avec augmentation de la supplémentation de l'écorce de pin (PB) dans le tractus gastro-intestinal des chèvres. Malik *et al.*, (2017) ont rapporté que la supplémentation en TC de l'enveloppe de graine de tamarin a conduit à une diminution de 5%

des méthanogènes dans le rumen des bovins. Longo *et al.*, (2013) dans une étude conduite *in vitro*, portée sur des plantes tannifères riches en tanins condensés, ont enregistré une diminution des bactéries méthanogènes pour toutes les légumineuses étudiées.

Les protozoaires du rumen sont également impliqués dans la méthanogénèse en raison de leurs relations symbiotiques avec les archées méthanogènes. La défaunation (élimination des protozoaires) est une méthode permettant de réduire l'apport en hydrogène métabolique aux méthanogènes (Uyeno, 2015). Dans une étude portée sur des feuilles d'arbres tropicaux contenant des TC, Bhatta *et al.*, (2015) ont rapporté que les protozoaires ont été réduits avec *Filopaludina bengalensis*, plante contenant le taux le plus élevé en TC. Chentli *et al.*, (2014) ont noté que les TC d'*A. cyanophylla* et *A. nilotica* ont réduit la population des protozoaires. Saminathan *et al.*, (2017) ont enregistré que les fractions de tanins condensés de différents poids moléculaire de *Leucaena leucocephala-Rendang* (LLR) ont réduit et modifié la population de protozoaires du rumen *in vitro*. Nguyen *et al.*, (2017) ont rapporté une réduction de la population des protozoaires chez les bouvillons avec l'augmentation du niveau de *Leucaena leucocephala*.

2.2.6. Effets antinutritionnels des tanins condensés

Les tanins sont des facteurs antinutritionnels les plus répandus dans les plantes (Tadele, 2015). Leurs effets consistent en une diminution de la sapidité du régime, de la digestibilité des éléments nutritifs (protéines, glucides et lipides), de l'efficacité alimentaire et de la production animale. La diminution de la sapidité du régime est souvent basée sur l'astringence associée à la formation des complexes TC-protéines qui se produisent au niveau de la cavité buccale à partir des protéines salivaires; ainsi, plus la liaison TC-protéine est grande, plus l'astringence est grande et plus l'appétence est faible (Naumann *et al.*, 2017).

La diminution de la digestibilité est due à la grande affinité des tanins aux protéines et à autres polymères tel que la cellulose, l'hémicellulose et la pectine. Gerlach *et al.*, (2018) ont enregistré une diminution de la digestibilité de la matière organique avec incorporation d'un extrait de TC d'*Acacia mearnsi* à 3% et à 5% et une diminution de la digestibilité des fractions de fibres à un taux d'incorporation de 1%, 3% et 5%. Beauchemin *et al.*, (2007) ont rapporté que l'inclusion de l'extrait de tanins de quebracho à un taux de 2% dans l'alimentation des vaches laitières a conduit à une réduction de la digestibilité de la matière sèche et de la matière organique. Theodoridou *et al.*, (2010) ont noté que l'inclusion des TC de *Onobrychis viciifolia* à des concentrations de 2,5 et 3,4% MS ont réduit la digestibilité

des protéines ruminales et ont conduit à un passage de l'excrétion urinaire d'azote à une excrétion fécale.

De nombreuses études ont rapportées des effets néfastes des TC sur les performances des ruminants et une diminution des produits animales. La supplémentation d'un extrait de tanins condensés d'*Acacia mearnsii* à 3 % a réduit le rendement en protéines du lait et l'efficacité apparente de l'azote. Attia *et al.*, (2016) ont enregistré que la supplémentation de quebracho commercial aux vaches laitières en période de transition a eu des effets négatifs sur les performances de production et de reproduction. Grainger *et al.*, (2009) ont rapporté que l'inclusion d'un extrait de tanins condensés d'*Acacia mearnsii* à deux concentrations 163 g et 326 g a conduit à une diminution de la production laitière surtout avec la dose la plus forte. Les effets antinutritionnels des TC dépendent de leur concentration mais aussi de leur structure chimique, ainsi que de l'état physiologique de l'animal et la composition de son alimentation (Makkar, 2003).

2.2.7. Effets du polyéthylène glycol (PEG)

Le polyéthylène glycol est un détergent non ionique qui a la capacité de former des complexes stables avec les tanins (tanins hydrolysables et tanins condensés) (Abd El Tawab et Abdellatif Khattab, 2018). Il est largement utilisé pour atténuer les effets antinutritionnels des tanins en empêchant la formation de complexes tanins- protéines ou même de libérer les protéines de ces complexes (Addisu, 2016). Les effets néfastes de la légumineuse *Flemingia macrophylla* incluse à 25% dans l'alimentation des chèvres, consistaient en une diminution de la consommation d'hémicellulose, de la matière sèche, de la matière organique, des protéines brutes, de la fraction NDF et de la digestibilité des glucides totaux ont été neutralisés avec l'ajout du PEG (Fagundes *et al.*, 2014). L'incubation du PEG *in vitro* avec des sous-produits du raisin a conduit à une augmentation de la production des AGV et de la digestibilité de la matière organique permettant ainsi de surmonter les effets néfastes des tanins (Besharati et Taghizadeh, 2011).

Plusieurs auteurs ont rapportés que l'inclusion du PEG a eu des effets positifs sur la fermentation ruminale de fourrages tannifères *in vivo*. Kebede *et al.*, (2014) ont enregistré un taux de croissance, un poids de carcasse et une digestibilité apparente de toutes les sources de nutriments plus élevés ainsi qu'une amélioration de l'efficacité de la conversion alimentaire chez les agneaux nourries du foin supplémenté de feuilles d'*Albizia gummifera* riche en tanins condensés et en PEG 6000 par rapport à ceux nourris au foin seul ou au foin supplémenté en

Albizia gummifera. Yisehak *et al.*, (2013) ont noté que la supplémentation en polyéthylène glycol 6000 avec des feuilles de quatre espèces végétales riches en tanins a augmenté l'apport en nutriments, la digestibilité, la rétention d'azote et le gain quotidien moyen.

Le polyéthylène glycol est également largement utilisé pour étudier la valeur nutritive des espèces tannifères et l'activité biologique de leurs tanins *in vitro* en comparant les caractéristiques de fermentation des substrats en présence et en absence du PEG (tab. 7). (Longo *et al.*, 2012; Kondo *et al.*, 2014; Mebirouk-Boudechiche *et al.*, 2018; Boufennara *et al.*, 2013; Abdallah Hassan Sallam *et al.*, 2010).

Tableau 7. Effets du polyéthylène glycol sur la production de gaz et de méthane chez des espèces tannifères

Espèce	Gaz	CH ₄	Référence
<i>Leucaena leucocephala</i>	+	nd	Longo <i>et al.</i> , 2012
<i>Stylobium aterrimum L.</i>	+	nd	
<i>Stylobium deeringianum</i>	+	nd	
<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>	+	nd	
<i>Fraxinus angustifolia</i>	+	+	Mebirouk-Boudechiche <i>et al.</i> , 2018
<i>Acacia dealbata</i>	+	+	
<i>Phillyrea angustifolia</i>	+	+	
<i>Phillyrea latifolia</i>	+	+	
<i>Smilax aspersa</i>	-	-	
<i>Lavandula stoechas</i>	-	-	
<i>Atriplex halimus</i>	+	+	Boufennara <i>et al.</i> , 2013
<i>Artemisia campestris</i>	+	+	
<i>Artemisia herba-alba</i>	+	+	
<i>Calobota saharae</i>	+	+	
<i>Stipagrostis pungens</i>	+	+	
<i>Lygeum spartum</i>	+	+	
<i>Stipa tenacissima</i>	+	+	
<i>Acacia saligna</i>	+	+	Abdallah Hassan Sallam <i>et al.</i> , 2010
<i>Leucaena leucocephala</i>	+	+	
<i>Atriplex caseneace</i>	+	+	
<i>Eucalytus globules</i>	+	+	
<i>Medicago sativa</i>	-	-	
thé vert	-	-	Kondo <i>et al.</i> , 2014
thé noir	+	+	

+: augmentation de la production, - : aucun effet, nd : non disponible

Matériel et Méthodes

1. COLLECTE DES ECHANTILLONS

1.1. Matériel végétal

Les substrats retenus pour cette étude sont quatre arbustes du genre *Acacia* (*Acacia horrida*, *Acacia cyanophylla*, *Acacia dealbata*, *Acacia pycnantha*) et trois sous-produits: l'écorce de grenade (*Punica granatum*), les palmes sèches du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) et les tiges d'artichaut (*Cynara scolymus*). Leurs propriétés phénotypiques et botaniques sont illustrées dans le tab. 8 et tab. 9 respectivement.

Les arbustes (*Acacia horrida*, *Acacia cyanophylla*, *Acacia dealbata*) sont collectés de la wilaya de Constantine, située dans le nord-est algérien à 36,17° de latitude nord, 6,37° de longitude est et à une altitude moyenne de 693 m. Le climat de la région est semi-aride, avec des précipitations irrégulières qui atteignent en moyenne 350-700 mm par an. Les températures moyennes oscillent entre -0,3°C en hiver et 37,3°C en été. Tandis qu'*Acacia pycnantha* est collecté de la wilaya de Taref, située à l'extrême nord-est de l'Algérie à 36.77° de latitude nord, de 8.31° longitude est. Le climat de la région est du type subhumide à humide chaud au nord, et humide doux à humide frais au sud. La pluviométrie varie entre 900 et 1200 mm/an. La collecte est effectuée en plein hiver ou *Acacia dealbata* (mimosa d'hiver) était en stade de floraison. Les feuilles des *Acacia* sont récoltées à la main puis elles sont coupées aux ciseaux. Le choix de ces espèces légumineuses est basé sur leur grande disponibilité, leur grande résistance à la sécheresse, leur richesse en protéines et en facteurs antinutritionnels et leur capacité de fournir de feuillage pendant les périodes sèches en absence d'espèces herbacées.

Les deux sous-produits l'écorce de (*Punica granatum*) et les tiges de (*Cynara scolymus*) sont également collectés en hiver de deux régions semi-arides, wilaya de Tébessa et Mila. Les palmes sèches du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) sont collectées de la région de Foughala, wilaya de Biskra au mois de juin au stade de début de grossissement des fruits. Ces sous-produits sont riches en tanins.

1.2. Préparation des échantillons

Les feuilles d'*Acacia*, l'écorce de grenade et les tiges d'artichaut ont été séchés en ombre à l'abri de la lumière. Ils sont ensuite broyés et calibrés à travers un tamis de 1 mm. Les fourrages sont conservés à température ambiante dans des récipients en verre clos jusqu'à leur utilisation.

Tableau 8. Caractéristiques botaniques et phénotypiques des arbustes étudiés.








arbuste	Description botanique
<p data-bbox="271 336 479 363"><i>Acacia horrida</i></p> 	<p data-bbox="725 336 2157 480">Arbuste ou arbre de 8 à 15 mètres de hauteur, doté d'épines de 15 cm de longueur sur les tiges et les rameaux. Les feuilles sont bipennées, de couleurs vert pâle regroupés en touffe. Les fleurs sont de couleur jaune, parfumés et regroupées en glomérules sphériques.</p>
<p data-bbox="271 560 479 587"><i>Acacia dealbata</i></p> 	<p data-bbox="725 560 2157 759">ou mimosa d'hiver est un arbre qui peut atteindre une vingtaine de mètres avec un tronc lisse. Ses rameaux sont duveteux et portent des feuilles composées. Ces feuilles sont divisées en folioles elles même divisée en foliolules (plusieurs milliers par feuilles). La floraison survient de Janvier à mars. Les fleurs se présentent sous forme de pompons jaunes disposés en grappe.</p>
<p data-bbox="271 815 479 842"><i>Acacia cyanophylla</i></p> 	<p data-bbox="725 815 2157 1015">appelée également <i>Acacia saligna</i> est un arbuste à croissance rapide, atteignant 2-5 mètres de hauteur. Les rameaux anguleux sont flexueux et pendants à leur extrémité touchent presque le sol. Le feuillage est constitué de feuilles (plus exactement de phyllodes) de 8-25cm de longueur et de couleur bleue glauque. Les fleurs sont jaunes et la floraison est abondante. Elle survient en Avril-Mai.</p>
<p data-bbox="271 1054 479 1082"><i>Acacia pycnantha</i></p> 	<p data-bbox="725 1054 2157 1254">connu sous le nom d'<i>Acacia</i> doré, est un petit arbre qui a une hauteur de 8 mètres et possède des phyllodes de 9 à 15 cm de longueur. Les fleurs sont de couleur jaune d'or parfumées et abondantes. Elles apparaissent à la fin de l'hiver et au printemps. Le fruit est constitué des gousses. Les gousses, ont une couleur verte à l'état jeune, virent au brun ou au brun foncé à la maturité, ou elles s'ouvrent d'un côté pour libérer des graines noires.</p>

Tableau 9. Caractéristiques botaniques et phénotypiques des sous-produits étudiés.

Sous-produit	Description botanique
<p data-bbox="91 336 353 368">Ecorce de grenade</p> 	<p data-bbox="421 336 2163 746">Le grenadier ou le <i>Punica granatum</i> fait partie des espèces médicinales. C'est une espèce qui appartient à la famille de Punicaceae. C'est un arbuste de 2 à 5 m de hauteur, légèrement épineux. Il croît majoritairement dans toute la région méditerranéenne, de façon spontanée ou cultivée. Les feuilles sont caduques et brillantes, mesurant environ 7,6 cm de longueur. Les fleurs font environ 5 cm de longueur, sont produites en été. Le fruit est globuleux, de 5–7,6 cm de diamètre et brillant de couleur vert rougeâtre ou jaunâtre. Il est rempli de graines croquantes, dont chacune est enveloppé dans une pulpe juteuse qui est elle-même enfermée dans une peau membraneuse entourée d'une écorce. L'écorce de grenade est l'un des sous-produits les plus précieux de l'industrie alimentaire, elle représente 40% du fruit entier et elle est riche en composés phénoliques notamment les tanins.</p>
<p data-bbox="91 751 353 783">Les palmes sèches</p> 	<p data-bbox="421 751 2163 1034"><i>Phoenix dactylifera L.</i> appartient à la classe des monocotylédones, famille des palmacées, est un arbre de 20-30mètres de hauteur, a un tronc cylindrique appelé aussi stipe ou tige, non ramifié, lignifié et de couleur marron brun. Les feuilles sont appelées palmes, ont une forme pennée et sont insérées en hélice, très rapprochées sur le stipe. De nombreuses palmes constituent la couronne. Le fruit du palmier dattier est la datte, est une baie, généralement de forme allongée, ou arrondie. Elle est composée d'un noyau consistant entouré de chair qui la partie comestible de la datte.</p>
<p data-bbox="91 1038 353 1070">Les tiges d'artichaut</p> 	<p data-bbox="421 1038 2163 1359">L'artichaut, ou <i>Cynara scolymus</i>, est une plante herbacée appartenant à la famille des astéracées, largement cultivée et consommée comme légume dans les régions méditerranéennes et utilisée en médecine traditionnelle pour ses propriétés biologiques attribuées essentiellement aux polyphénols. L'artichaut est une plante à tige rigide et cannelée pouvant atteindre de 1,50 à 2 mètres de hauteur. Il dispose de longues feuilles très découpées semblables à celles du chardon, à la différence qu'elles sont non épineuses. Les fleurs apparaissent comme autant de petits fils violets, très attractives pour les insectes. Les feuilles et les tiges à l'amertume marquée sont riches en tanins.</p>

2. COMPOSITION CHIMIQUE DES SUBSTRATS

Les analyses chimiques des substrats étudiés ont porté sur la détermination de leur teneur en matière sèche, minérale, azotées et à la détermination de leur composition en parois végétale. Elles sont réalisées selon les normes décrites par l'AOAC (1990).

2.1. Détermination de la teneur en matière sèche (MS)

La teneur en MS est déterminée par séchage d'échantillon de 1 g dans une étuve ventilée à 105°C jusqu'à poids constant.

L'expression des résultats est faite comme suit :

$$\%MS = 100 \frac{(M_0 - t)}{m}$$

Où:

M₀: Poids du creuset+ échantillon sec, **t**: Poids du creuset vide, **m**: échantillon frais.

2.2. Détermination de la teneur en matières minérale et organique

La matière minérale (MM) est déterminée par calcination de 1g d'échantillon préalablement séché dans un four à moufle pendant 6 heures. Le résidu obtenu représente les cendres (matière minérale).

L'expression des résultats est faite comme suit:

$$\%MM = 100 \frac{(MM - t)}{(M_0 - t)}$$

Où:

MM: échantillon calciné +Poids du creuset, **t**: Poids du creuset vide, **M₀**: Poids du creuset+ échantillon sec.

La matière organique (MO) correspond à la différence entre la matière sèche et la matière minérale.

$$\% MO = 100 - \%MM$$

2.3. Détermination de la teneur en matières azotées totales (MAT)

L'azote total contenu dans les échantillons est dosé par la méthode de kjeldahl. Cette méthode peut être divisée en trois principales étapes:

-La minéralisation: l'azote organique est transformé en azote minérale (sulfate d'ammonium) par traitement de 0.7 g d'échantillon par l'acide sulfurique pendant 4h à 350°C et en présence d'un catalyseur (sélénium).

-La distillation: Le sulfate d'ammonium est transformé en ammoniac en présence d'une base forte (NaOH, 10N). L'ammoniac formé est entraîné par de la vapeur d'eau et récupéré dans une solution d'acide borique (4%) contenant un indicateur coloré (rouge de méthyle et bleu de méthylène).

-La titration: La solution d'ammoniac est titrée par une solution d'acide chlorhydrique (HCl, 0.1N). La teneur en azote total (N) est obtenue à l'aide de l'équation suivante:

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

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

2.4. Composés de la paroi végétale

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

2.4.1. Dosage de la fraction NDF (Neutral Detergent Fibre)

L'NDF représente la fraction fibreuse de la paroi cellulaire non soluble dans un détergent neutre, elle contient la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Elle inclut aussi des protéines insolubles à pH neutre et des cendres. La méthode de détergent neutre repose sur la solubilisation dans une solution neutre des composants non fibreux. Elle est réalisée dans des sacs ANKOM préalablement séchés à 103°C ou sont introduits 0.5 g d'échantillon séché. Les sacs sont scellés et introduits dans l'appareil ANKOM remplie avec 2L de la solution de détergent neutre (NDS) (annexe 1). Ils sont portés à l'ébullition pendant 1h et 15 min. Après vidange de l'appareil ils sont lavés trois fois avec de l'eau bouillante puis deux fois avec de

l'acétone. Les sacs sont par la suite séchés dans une étuve réglée à 103°C jusqu'à poids constant.

2.4.2 Dosage de la fraction ADF (AcidDetergent Fibre)

La fraction ADF de la paroi cellulaire est constituée de la cellulose et de la lignine, ainsi que des protéines insolubles dans une solution acide et des cendres. Elle est réalisée selon la même procédure décrite précédemment en traitant les échantillons par la solution (ADS) (annexe1).

2.4.3. Dosage de la fraction ADL (Acide Detergent Lignine)

La fraction ADL correspond au résidu insoluble obtenu après traitement de la fraction ADF par l'acide sulfurique. Elle est constituée de lignine et de cendres. Les sacs récupérés, après analyse ADF, sont traités par l'acide sulfurique concentré à 72% pendant trois heures. Ils sont lavés trois fois avec de l'eau bouillante puis deux fois avec de l'acétone. Les sacs sont par la suite séchés dans une étuve à 103°C jusqu'à poids constant.

2.4.4. Estimation de la teneur en hémicellulose et cellulose

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

3. ANALYSE PHYTOCHIMIQUE DES COMPOSES SECONDAIRES

3.1. Procédé d'extraction

L'extraction de la fraction phénolique est réalisée selon le procédé décrit par Makkar *et al.*, (1993), 200 mg de substrat séché sont dilués dans 10 ml d'acétone aqueuse (70%) et soumis à un traitement par ultrasons dans un sonificateur (Bioblock Scientific vibracell 75043) pendant 20 min à température ambiante. Le mélange est ensuite centrifugé à 3000 g et à 4°C pendant 10 min. Le surnageant est recueilli et conservé dans la glace tandis que le culot est récupéré dans 10 ml d'acétone aqueuse, et traité comme précédemment. L'extraction est répétée jusqu'à ce que le surnageant devient transparent.

3.2. Dosage des phénols totaux

Les phénols totaux (PT) contenus dans les extraits sont déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu dans laquelle 0.25 ml d'extrait est ajouté à 0.95 ml d'eau distillée, 0.25 ml du

réactif du folin de ciocalteu (1N) et 1.25 ml d'une solution de carbonate de sodium (20%) (Makkaret *et al.*, 1993).

3.3. Dosage des tanins totaux

La teneur en tanins totaux (TT) est déterminée par différence entre les phénols totaux mesurés par la méthode de Folin-Ciocalteu avant et après traitement avec le polyvinylpolypyrrolidone (PVPP); 100 mg de PVPP sont ajoutés à 1 ml d'eau distillée et 1 ml d'extrait, le mélange est maintenu à 4°C pendant 15 min, puis centrifuger à 3000g et à 4°C pendant 10 min. Le contenu phénolique du surnageant, contenant que les composés phénoliques simples autres que les tanins précipités avec le PVPP, est déterminé par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'absorbance est mesurée à 725 nm et les teneurs en PT et TT sont exprimées en équivalent d'acide tannique/gde MS (Fig. 13).

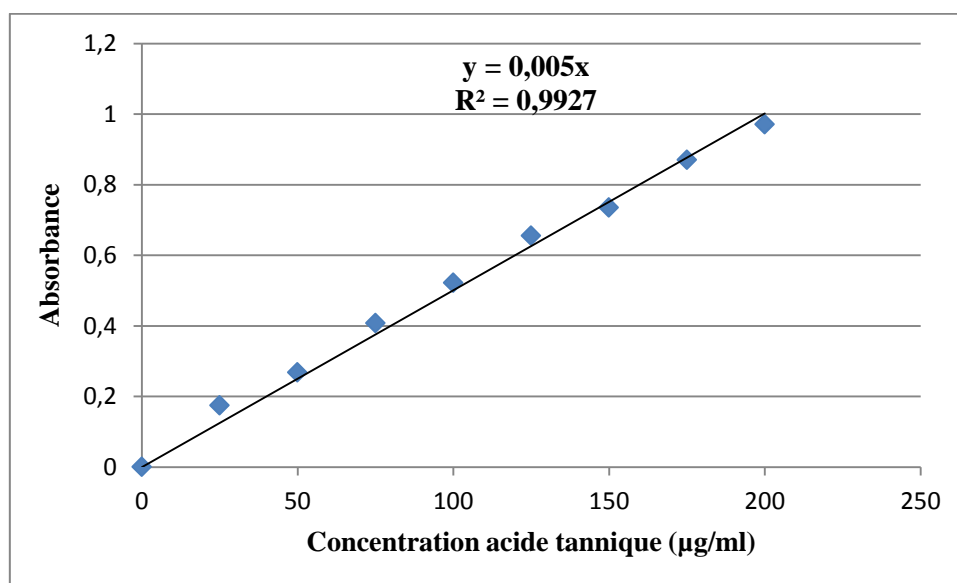


Figure 13. Courbe étalon des phénols totaux et des tanins totaux

3.4. Dosage des tanins condensés

Les tanins condensés (TC) sont déterminés par la méthode au n-butanol-HCl décrite par Porter *et al.* (1986). 0,5 ml d'extrait sont mélangé avec 3 ml du réactif n-butanol-HCl (95:5, v/v) et 0,1 ml d'une solution ferrique (sulfate d'ammonium ferrique, 2%, dilué dans l'HCl 2N). Les tube sont ensuite incubés dans un bain marie à 100°C pendant 60 min. Après refroidissement, l'absorbance est enregistrée à 550 nm et les résultats sont exprimés en équivalent de catéchine (Fig. 14).

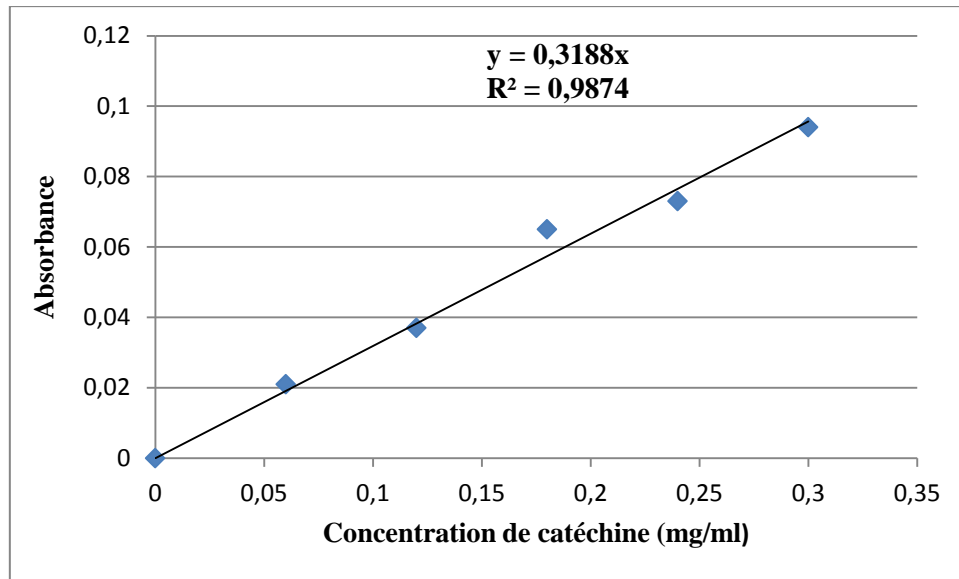


Figure 14. Courbe étalon des tanins condensés

3.5. Purification des tanins condensés

Après l'analyse phytochimique et le criblage biologique des substrats étudiés, la purification des tanins condensés a porté sur *Acacia horrida* (activité biologique la plus élevée). La purification des tanins est réalisée selon la méthodologie décrite par Terrill *et al.*, (1992). 50 g de feuilles d'*Acacia horrida* sont macérées dans 500 ml d'acétone aqueuse (70% + 1 g d'acide ascorbique) sous agitation pendant 40 min. Le macérât est filtré sous vide à travers du papier whatman (N°1) (fig. 15). Le filtrat (250 ml) est ensuite introduit dans une ampoule à décantation et mélangé avec 250 ml de dichlorométhane. Après décantation, la phase inférieure contenant les pigments et les lipides est éliminée, et la phase supérieure est lavée deux fois avec du dichlorométhane. Cette phase est évaporée à 39°C dans un évaporateur rotatif (Butchi) et le résidu aqueux est récupéré et conservé après lyophilisation.



Figure 15. Extraction des tanins condensés d'*Acacia horrida*

L'extrait brut de tanins est, dissous dans une solution de méthanol (50%), soumis à une séparation chromatographique sur colonne de Sephadex LH-20 (longueur X diamètre = 13 X 2,3 cm) équilibrée avec le même solvant. La colonne est lavée avec le méthanol 50% (650 ml) et les tanins sont ensuite élués avec l'acétone 70% (450 ml). L'achèvement de la séparation chromatographique est vérifié par chromatographie sur couche mince (CCM). Les fractions contenant des tanins sont combinées, évaporées à l'évaporateur rotatif et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

4. FERMENTATION *IN VITRO*

4.1. Technique de production de gaz *in vitro*

4.1.1. Principe

La technique de production de gaz *in vitro* est une technique de simulation du processus de fermentation dans le rumen. Elle consiste à déterminer les caractéristiques de la digestion des aliments et la cinétique de fermentation en mesurant les gaz produits à partir de la digestion de l'aliment avec du liquide ruminale tamponné. La fermentation des substrats dans le rumen par des microbes anaérobies engendre la production des acides gras volatils et des gaz: le dioxyde de carbone (CO_2) et le méthane (CH_4). Elle a été développée par Menke *et al.* (1979) dans des seringues en verre de 100 ml où le volume des gaz produits est mesuré par une lecture visuelle des graduations présentes sur les seringues. La technique a été ensuite modifiée par Theodorou *et al.*, (1994) où la fermentation est réalisée dans des flacons en verre de 120 ml. La pression des gaz accumulés dans l'espace libre des flacons au cours de la fermentation est mesurée à l'aide d'un baromètre.

4.1.2. Système de fermentation utilisé

Dans notre étude, la fermentation est réalisée dans des flacons en verre de 120 ml de capacité selon la technique de production du gaz *in vitro* décrite par Theodureau *et al.*, (1994). Ce système permet l'accumulation des gaz fermentaires dans l'atmosphère intérieure du flacon dont la pression est mesurée manuellement, en utilisant un baromètre (Wide Range 840065).

4.2. Les animaux donneurs

Quatre chèvres *Murciano-Granadina* munies d'une canule ruminale permanente sont utilisées comme donneurs de liquide ruminale pour les deux expériences. Les chèvres ont reçu une ration composée de foin de luzerne et de concentré commercial dont les proportions (50:50) distribuée deux fois par jour à 08h00 et 16h00. L'eau est distribué *ad.libitum*.

4.3. Inoculum

Le jus de rumen utilisé comme inoculum est prélevé de quatre chèvres avant le repas du matin. Il est immédiatement transporté dans des Thermos préalablement chauffés à 39°C. Au laboratoire, il est filtré à travers deux couches de gaz chirurgical sous un flux continu de CO₂. Le liquide ruminal est mélangé avec la salive artificielle dans un rapport de 1: 3 (V/V, fig. 16). La salive artificielle est préparée selon les recommandations de Menke et Steingass (1988) (annexe 2).



Figure 16. Etapes de préparation d'inoculum

4.4. Tests de production de gaz *in vitro*

Deux essais *in vitro* sont réalisés, le premier est mené pour sélectionner le substrat dont l'activité des tanins est la plus élevée. Dans ce cas, la procédure décrite par Makkar et

al., (2003) est adoptée. Elle consiste à incuber les substrats en présence et en absence d'un polymère synthétique: le polyéthylène glycol (PEG, PM= 4000 Da). Ce dernier se lie spécifiquement avec les tanins en formant des complexes binaires inactifs. Le second essai est mené pour déterminer l'activité des tanins purifiés sur les paramètres fermentaires.

4.4.1. Screening biologique du contenu tannoïde

400 mg du substrat sont incubés en présence ou en absence de 1g de PEG (PM= 4000 Da) et 40 ml du milieu de culture (10 ml de jus de rumen + 30 ml de salive artificielle) dans des flacons de 120 ml de capacité (Theodorou *et al.*, 1994; Makkar *et al.*, 2003). Pour chaque substrat, quatre répétitions sont réalisées. Dans les mêmes conditions, quatre flacons contenant uniquement le milieu de culture sans substrat (blancs) sont également incubés. Les flacons sont scellés, agitées et placées dans un bain-marie à 39°C.

4.4.2. Etude de l'impact des tanins purifiés sur la fermentation *in vitro*

L'impact des tanins purifiés à part *A. horrida* est étudié en présence de deux types de fourrages: le foin de luzerne (riche en azote) et la paille d'orge (riche en cellulose). Ainsi, deux séries d'incubations sont réalisées, une série avec le foin de luzerne et une série avec la paille d'orge. Pour chaque série, les tanins purifiés à trois concentrations (50, 100, 150 mg/g de fourrage incubé) sont ajoutés à 500 mg de fourrage est mis à fermenter avec 40 ml du milieu de culture. Pour chaque concentration, quatre répétitions sont réalisées. Dans les mêmes conditions, 4 flacons contenant uniquement le milieu de culture sans fourrage (blancs) et 4 flacons contenant le fourrage et le milieu de culture sans additif (tanins purifiés) sont également incubés. Les flacons sont incubés dans un bain marie à 39°C pendant 24h.

5. PARAMETRES FERMENTAIRES MESURES

5.1. Production de gaz

La pression des gaz produits dans chaque flacon est recordée à 2, 4, 6, 12, 24 et 48h à l'aide d'un baromètre (Wide Range 840065). Les gaz produits sont ajustés au modèle exponentiel monophasique de France *et al.* (2000):

$$Y = A (1 - e^{-c * t})$$

Avec: **Y:** production cumulative de gaz (ml), **t:** temps d'incubation (h), **A:** l'asymptote (volume de gaz potentiel à l'état d'équilibre; ml) et **c:** taux de production de gaz (ml.h⁻¹).

5.2. Production de méthane

Le volume du méthane produit est déterminé par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Après 24 h d'incubation, un échantillon de gaz (1.0 ml) est prélevé de chaque flacon et introduit dans des tubes (Terumo Europe NV, Louvain, Belgique). L'échantillon est ensuite injecté dans la chromatographie en phase gazeuse (HP Hewlett 5890 Packard Series II gas chromatograph, Waldbronn, Germany) équipée d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'une colonne de polyéthylène glycol réticulée HP INNOWAX (25 m x 0,2 mm x 0,2 µm; Teknokroma, Madrid, Espagne).

5.3. Analyse qualitative et quantitative des acides gras volatils (AGV)

Après 24 h d'incubation, 0,8 ml du contenu de chaque flacon sont prélevés et transférés dans des tubes Eppendorf contenant 0,8 ml d'une solution déprotéinisante (d'acide crotonique (4 mg/ml) et d'acide métaphosphorique (20 mg/ml dissoute dans HCl 0,5 M). Les échantillons sont conservés à -20°C. Avant l'analyse chromatographique, ils sont décongelés et centrifugés à 4000 g et à 4 °C pendant 20 min.

Les concentrations des acides gras volatils sont déterminées par chromatographie en phase gazeuse couplé à un détecteur à ionisation de flamme (Autosystem Perkin- Elmer Cor., Norwalk, Connecticut, USA) en utilisant une colonne réticulée à 100% de polyéthylène glycol (TRB-FFAP 30 m x 0,53 mm, épaisseur du film x 1 µm, Teknokroma, Barcelone, Espagne). 1 µl d'échantillon est injecté en mode fractionné (20 ml/min). L'azote (1 ml/min) est utilisé comme gaz vecteur, la température de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 260 et de 275°C. La température de la colonne est maintenue à 100°C pendant 1 min, augmentée à 15°C/min jusqu'à 160°C. L'identification des pics est basée sur le temps de rétention des étalons externes. L'acide crotonique est utilisé comme étalon interne. Les courbes standards sont préparées par dilution (1: 1) du mélange de standard dans la même solution dans laquelle les échantillons du jus de rumen fermenté sont ajoutés (Arco-Pérez *et al.*, 2017).

5.4. Détermination de la concentration en azote ammoniacal (N-NH₃)

L'azote ammoniacal (N-NH₃) est dosé par colorimétrie, selon la méthode décrite par Weatherburn (1967), basée sur la réaction de Berthelot. L'ion ammonium (NH₄⁺) se fixe sur une molécule de phénol en présence du chlore. La réaction est catalysée par le nitroprussiate de sodium. Il se forme ainsi un complexe de type indophénol qui donne une coloration bleue. Après 24 h d'incubation, 0,2 ml du contenu de chaque flacon sont transférés dans des tubes eppendorf contenant 0,05 ml de l'acide trichloroacétique (TCA, 25%, p/v) et conservés à -

20°C. Avant dosage, les échantillons sont décongelés et centrifugés à 4000g et à 4 °C pendant 20 min. Les surnageants sont ensuite dilués au 1/10^{ème} avec de l'eau distillée.

60 µl d'une solution A sont ajoutés à 20 µl d'échantillon dilué. 100 µl de chacune des deux solutions B et C sont ensuite ajoutés au premier mélange (annexe 3). Après agitation, les plaques de microtitration sont incubés à l'obscurité à 39°C pendant 15 min. L'absorbance est enregistrée à 650 nm. Les résultats sont rapportés à une courbe de régression et exprimés en équivalent de sulfate d'ammonium (annexe 4).

6. ANALYSES STATISTIQUES

Une analyse de la variance à un seul facteur (ANOVA) est réalisée sur les données des paramètres de fermentation, à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute Inc, 2003). Lorsque des différences significatives sont trouvées, les moyennes sont comparées par le test de Tukey. Les différences sont considérées comme significatives à $p < 0,05$.

Résultats et Discussion

1. COMPOSITION CHIMIQUE DES SUBSTRATS

1.1. Teneur en matière sèche

La composition chimique des arbustes du genre *Acacia* et des sous-produits est représentée dans le tableau 10. Il ressort que tous les arbustes étudiés renferment des teneurs élevées en matière sèche. La teneur la plus élevée est enregistrée pour *A. cyanophylla* (917.9 g/kg MS) et la plus faible est notée pour *A. pycnantha* (872.7 g/kg MS). Les contenus hydriques faibles enregistrés pour ces arbustes sont comparables à ceux rapportés par Bouazza, (2014) et Chentli, (2015) pour des espèces du même genre. De même, des taux élevés (supérieurs à 90%) ont été enregistrés pour les sous-produits. La teneur la plus élevée est notée pour les palmes sèches (932.7 g/kg MS) et la plus faible est enregistrée pour *P. granatum* (901.0 g/kg MS). Les valeurs enregistrées dans notre étude sont inférieures à celles rapportées par Zei et Sharifi Hosseini, (2009) et Boufenera *et al.*, (2016) et supérieures à celles enregistrées par Arhab, (2006) et Mirizei-Aghsaghali *et al.*, (2011).

Les teneurs faibles en humidité des substrats étudiés sont essentiellement dues à leur origine aride et semi-aride. Il est à noter que l'espèce, *A. pycnantha* provient d'une région humide et présente une teneur en eau relativement plus élevée par rapport aux autres arbustes et sous-produits.

1.2. Teneur en matière minérale

Les substrats étudiés renferment des concentrations variables en MM. Chez les arbustes, *A. cyanophylla* représente la teneur la plus forte (126.2 g/kg MS) tandis que *A. dealbata* renferme la concentration la plus faible (51.6 g/kg MS). Des observations similaires ont été également notées par Bouazza, (2014) et Chentli, (2015). Pour les sous-produits, la teneur la plus élevée est notée pour *C. scolymus* (202.1 g/kg MS) et la plus basse est enregistrée pour *P. granatum* (37.1 g/kg MS). L'accumulation des minéraux dans les fourrages est contrôlée par de nombreux facteurs tels que le climat, le type de sol et le stade de la maturité. Ainsi, à mesure que les plantes mûrissent, les teneurs en minéraux diminuent en raison d'un processus de dilution naturel et de la translocation d'éléments nutritifs vers le système racinaire minéral (Spear, 1994). Cependant le type de sol semble être le facteur le plus important qui influence la teneur des fourrages en matière minérale parce qu'il présente la source de tous les éléments minéraux trouvés dans les plantes. La plupart des carences minérales naturelles chez les ruminants sont associées à des régions spécifiques et sont

directement liées aux caractéristiques du sol et à sa concentration en minéraux. À titre d'exemple, les sols des régions tropicales sont fortement lessivés, ce qui les rend déficients en minéraux végétaux.

1.3. Teneur en matières azotées totales

Les résultats exposés dans le tableau 10 montrent que les arbustes ont des teneurs relativement élevées en protéines brutes. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés dans la littérature pour des légumineuses fourragères (Njidda, 2010; Balseca *et al.*, 2015; Melesse *et al.*, 2017). Les teneurs élevées en matières azotées totales enregistrées dans les *Acacia* de notre étude sont probablement dues à la capacité des légumineuses de fixer l'azote atmosphérique grâce aux bactéries du genre rhizobium associés à leur système racinaire (Hadjipanayiotou *et al.*, 1985; Lee, 2018).

La teneur en MAT des *Acacia* varie entre 17,8 et 20,1%, ainsi les arbustes ont des teneurs en protéines brutes supérieures au taux de 8%, suggéré par Van Soest, (1994) comme concentration requise chez les ruminants pour soutenir une activité microbienne optimale (Magalhães *et al.*, 2010; Njidda, 2010). En outre, selon Rubanza *et al.*, (2005), ces espèces peuvent être utilisées comme suppléments protéiques chez les ruminants nourris avec des fourrages de mauvaise qualité en particulier pendant la saison sèche.

La variation du contenu en MAT entre les espèces d'*Acacia*, peut s'expliquer d'une part par le stade végétatif dans lequel la récolte a été réalisée; l'arbuste *A. dealbata* représentant la teneur la plus élevée (201.6 g/kg MS) a été collecté au stade de la floraison et d'autre part par les variations climatiques. Dans notre étude, le taux le plus faible en MAT a été enregistré pour *A. pycnantha* (178 g/kg MS) espèce provenant d'une région humide tempérée. D'autres facteurs tels que le profil d'azote des sols et la différence de l'efficacité de l'accumulation de protéines par les espèces pendant la croissance peuvent influencer le contenu des plantes en MAT (Njidda, 2010).

Les résultats enregistrés dans notre étude pour les espèces d'*Acacia* étudiées sont proches de ceux trouvés par Rubanza *et al.*, (2005) et sont supérieurs à ceux rapportés par Al-Soqeer (2008). Ces différences peuvent être dues aux variations du stade de croissance, de la partie de la plante étudiée (rameaux, feuilles, tige, gousses), du type du sol et de la saison (Melesse *et al.*, 2017).

Tableau 10. Composition chimique (g/kg MS) et phytochimique (mg/kg MS) des arbustes et des sous-produits.

Substrat	Arbustes				Sous-produits		
	<i>A. horrida</i>	<i>A. cyanophylla</i>	<i>A. dealbata</i>	<i>A. pycnantha</i>	<i>C. scolymus</i>	<i>P. granatum</i>	<i>P. dactylifera</i>
Composition chimique							
MS	909.0	917.9	907.2	872.7	909.2	901.0	932.7
MO	891.4	873.8	948.4	917.7	797.9	962.9	804.4
MM	108.6	126.2	51.6	82.3	202.1	37.1	195.6
MAT	182.8	186.6	201.6	178.0	81.7	48.1	95.8
NDF	379.1	553.9	429.4	520.5	351.0	301.6	533.8
ADF	191.4	253.3	238.3	345.3	230.4	109.5	353.7
ADL	140.6	172.5	165.1	264.7	28.9	68.6	127.7
Hémicellulose	187.7	300.6	191.1	175.2	120.6	192.1	180.1
Cellulose	50.8	80.8	73.2	80.6	201.5	40.9	126.0
Comosition phytochimique							
PT	785.1	778.7	798.4	591.2	594.4	799.2	585.9
TT	521.3	442.3	536.4	395.3	376.0	517.9	351.3
TCT	680.4	439.7	464.5	120.5	23.1	50.9	170.4

MS: Matière sèche, MO: Matière organique, MM: Matière minérale, MAT: Matières azotées totales, NDF: Neutral detergent fiber, ADF: Acid detergent fiber, ADL: Acid detergent lignin, PT : Phénols totaux, TT: Tanins totaux, TCT: Tanins condensés totaux.

En ce qui concerne les sous-produits, des teneurs relativement faibles par rapport aux arbustes ont été enregistrées, la teneur la plus élevée est observée pour *P. dactilyfera* (95.8 g/kg MS) et la plus faible est notée pour *P. granatum* (48.1 g/kg MS). Le résultat obtenu pour les feuilles du palmier dattier est supérieur à celui enregistré par Pascual *et al.*, (2000), Ziaei et Sharifi Hosseini(2009), Boufennara *et al.*, (2016) tandis que la concentration enregistrée pour l'écorce de *Punica granatum* est proche de celle obtenue par Shabtay *et al.*,(2008),Sadqet *al.*, 2016 et Yurtsevenet *al.*,(2018) et supérieure à celle enregistrée par Mirzaei-Aghsaghali *et al.*, (2011).

1.4. Constituants de la paroi cellulaire

La paroi cellulaire est le composant principal du fourrage qui influence la digestibilité et la consommation de la matière sèche. Elle est constituée de cellulose, d'hémicellulose et d'une partie non glucidique, la lignine (Van Soest *et al.*, 1991). La teneur en ces composants est inversement proportionnelle à la digestibilité et à l'apport volontaire (Morales *et al.*, 2013). D'après le tableau 10, les substrats étudiés ont une composition de la paroi cellulaire identique. Ils présentent tous des teneurs modérées de la fraction NDF. Ces teneurs sont inférieures au seuil de 600 g/kg de MS rapporté par Meissner *et al.*, (1991), au-delà duquel la consommation de la matière sèche est diminuée. Les valeurs dans notre étude varient entre 379.1 g/kg et 553.9 g/kg MS pour les arbustes et entre 301.6 g/kg MS et 533.8 g/kg MS pour les sous-produits. En général, plus le contenu en NDF d'un fourrage est grand, plus sa digestibilité est faible. Cependant, cette relation ne tient pas toujours, parce que la digestibilité de la paroi cellulaire dépend beaucoup plus du degré de lignification (Balseca *et al.*, 2015).

Pour les arbustes, la teneur en NDF la plus élevée est enregistrée pour *A. cyanophylla* (553.9 g/kg MS) et la plus faible est notée pour *A. horrida* (379.1 g/kg MS). Tandis que pour les sous-produits, la teneur la plus élevée est enregistrée pour *P. dactilyfera* (533.8 g/kg MS) et la plus faible est notée pour *P. granatum* (301.6 g/kg MS). Les résultats enregistrés dans les arbustes sont comparables à ceux trouvés par Bensalem *et al.*,(1997), Bensalem *et al.*,(1999), Moujahed *et al.*,(2000) et Al-Soqeer, (2008).

La teneur élevée de la fraction NDF enregistrée pour les palmes sèches, est proche de celle observée par Pascual *et al.*, (2000) et inférieure à celle enregistrée par Boufennara *et al.*, (2016). La teneur élevée de la fraction NDF pourrait être attribuée à la température élevée qui favorise généralement l'accumulation de matériaux structuraux de la paroi cellulaire (Abebe *et al.*,2012).

En ce qui concerne la fraction ADF, les teneurs pour les arbustes, varient entre 109,5 g/kg MS et 353,7 g/kg MS. La teneur la plus élevée a été enregistrée pour *A. pycnantha*, valeur proche de celle trouvée par Hanafy *et al.*, (2014) et la plus basse est notée pour *A. horrida*, valeur proche de celle rapportée par Tafera *et al.*, (2008). Les sous-produits montrent des teneurs variant de 109.5 à 353.7 g/kg MS, les teneurs enregistrées pour les palmes sèches sont similaires à celles rapportées par Pascual *et al.*, (2000) et Boufennara *et al.*, (2016).

La fraction ADL (la lignine) peut être considérée comme le squelette principal de la cellule végétale. Elle confère à la plante une résistance et une rigidité supplémentaire. C'est un produit non digestible qui inhibe la disponibilité des portions de fourrage contenant de la cellulose et de l'hémicellulose (Njidda *et al.*, 2013). Dans notre étude les arbustes présentent des concentrations modérées en lignine. La concentration la plus élevée est enregistrée pour *A. pycnantha* et la plus faible pour *A. horrida*. Vieira *et al.*, (2008) indiquent que à mesure que la plante avance en maturité, de plus en plus de lignine est ajoutée à la paroi cellulaire ce qui la rend plus difficile à décomposer et à digérer. En outre selon Van Soest, (1994) les températures environnementales élevées entraînent une lignification accrue de la paroi cellulaire des plantes.

La cellulose et l'hémicellulose représentent les principales sources d'énergie pour les ruminants (Merkel *et al.*, 1999). Les teneurs en hémicellulose varient entre 175.2 g/kg MS et 300.6 g/kg MS pour les arbustes et entre 120.6 g/kg MS et 180.1 g/kg MS pour les sous-produits. Les teneurs enregistrées pour les arbustes sont comparables à celles notées par Bouazza, (2014) et supérieures à celles observées par Chentli, (2015).

Pour la cellulose, les arbustes présentent des teneurs faibles ≤ 100 g/kg MS, teneurs inférieures à celles enregistrées par Bouazza, (2014). Les teneurs enregistrées pour les sous-produits sont comprises entre 40.9 g/kg et 201.5 g/kg MS. La teneur la plus élevée est enregistrée pour *C. scolymus* et la plus faible est notée pour les palmes sèches (201.5 g/kg MS).

2.SCREENING PHYTOCHIMIQUE DES SUBSTRATS ETUDIÉS

L'analyse quantitative des composés phénoliques (les phénols totaux, les tanins totaux et les tanins condensés) est montrée dans le tableau 10. Il apparaît que tous les substrats contiennent des teneurs élevées en phénols totaux. Chez les arbustes, la teneur la plus élevée est enregistrée pour *A. dealbata* et la plus faible pour *A. pycnantha*, tandis que pour les sous-produits, la teneur la plus forte est enregistrée pour *P. granatum* et la plus faible pour les palmes sèches. Une tendance similaire est constatée pour les TT dont les concentrations les plus élevées sont enregistrées pour *A. dealbata* et *P. granatum* et les plus faibles pour *A. pycnanatha* et les palmes sèches. La concentration élevée des composés phénoliques enregistrée pour les substrats étudiés pourrait être le résultat d'un mécanisme de défense des plantes contre le stress induit par le climat et les nutriments et /ou par les parasites et les herbivores (Makkar, 2003). Les teneurs en PT et en TT enregistrées pour les arbustes de notre étude sont comparables à celles notées par Abdulrazak *et al.*, (2000) et Rubanza *et al.*, (2005) et supérieures à celles observées par Alonso-Díaz *et al.*, (2009), Bouazza, (2014) et Chentli, (2015).

Pour les tanins condensés, les résultats révèlent une variation considérable entre les substrats étudiés, les teneurs se situent entre 120.5 mg/g MS et 680.4 mg/g pour les arbustes, la concentration la plus élevée est enregistré pour *A. horrida* (680.4 mg/g MS) et la plus faible pour *A. pycnantha* (120.5 mg/g MS) et entre 23.1 et 170.4 mg/g MS pour les sous-produits. La concentration enregistrée pour *A. horrida* est supérieure à celle rapportée par Bouazza, (2014) et la concentration enregistrée pour *A. pycnantha* est similaire à celle enregistrée par Grainger *et al.*, (2009) pour *A. tortilis*. Pour les sous-produits, la concentration la plus élevée est enregistrée pour les palmes sèches et la plus faible pour *C. scolymus* (120.5 mg/g MS). La concentration enregistrée pour les palmes sèches est supérieure à celle notée par Arhab, (2006).

La variation des concentrations en phénols totaux et en composés antinutritionnels entre nos substrats étudiés et ceux de la littérature pourrait être attribuée au stade de croissance, à l'origine anatomique du tissu végétal et aux facteurs génotypiques qui contrôlent la biosynthèse et l'accumulation de composés polyphénoliques (Haslam, 1999). Elle peut être aussi due au procédé d'extraction, à la méthode d'analyse et aux standards utilisés.

Les teneurs élevées enregistrées pour les espèces du genre *Acacia* ainsi que pour les palmes sèches en facteurs antinutritionnels (tanins et tanins condensés) peuvent limiter leur utilisation

comme fourrages ou comme suppléments alimentaires au fourrage de base. Les tanins sont reconnus depuis longtemps comme des facteurs antinutritionnels qui ont la capacité de former des complexes avec plusieurs types de macromolécules (les polysaccharides, les minéraux, les protéines). À des concentrations élevées (> 80 g/kg), les tanins réduisent la prise alimentaire et diminuent la digestibilité des protéines et des glucides, ce qui altère les performances de l'animal et peut causer même une toxicité (Barry et McNabb, 2000).

En contrepartie, de nombreuses études ont rapportés des effets bénéfiques des tanins. En effet, en se liant aux protéines alimentaires, les tanins peuvent réduire leur dégradation par les microorganismes du rumen et augmenter le flux des acides aminés vers l'intestin grêle (McAllister *et al.*, 2005). Il faut noter également que plusieurs facteurs autres que la concentration peuvent influencer les effets des tanins tels que leur type, leur degré de polymérisation, et leur poids moléculaire.

3. PRODUCTION DE GAZ *IN VITRO*

3.1. Screening biologique des substrats étudiés

L'activité biologique des tanins a été évaluée par la technique de la production de gaz *in vitro* couplée à un agent chélateur des tanins, le polyéthylène glycol. Le polyéthylène glycol (PEG) et le polyvinylpyrrolidone (PVPP) sont des polymères synthétiques qui ont une grande affinité pour les tanins, ils les rendent inertes par la formation de complexes tanins-PEG, tanins-PVPP (Makkar *et al.*, 1995). Ils sont même caractérisés par leur capacité de libérer les protéines de complexes tanins-protéines préformés (Barry *et al.*, 1986; Besharati et Taghizadeh, 2011). Ces propriétés ont été exploitées avec la méthode de la production de gaz *in vitro* pour quantifier les effets des tanins sur la fermentation ruminale. Le PEG semble être préféré pour l'utilisation comme agent atténuant dans les essais biologiques des tanins du fait de son affinité plus élevée pour les tanins que le PVPP. Les complexes tanins-PEG sont plus stables que les complexes tanins-PVPP (Alain *et al.*, 2015).

Makkar, (2003) a associé l'effet biologique aux changements de la production de gaz lors de la fermentation *in vitro* en absence et en présence de PEG lorsque les tanins sont inactivés. Dans notre étude ce concept a été extrapolé à d'autres paramètres de fermentation à savoir : la production du méthane (CH₄), la concentration des acides gras volatils (AGV), la production d'ammoniac (NH₃). L'effet biologique (l'activité biologique) des tanins est mesuré par l'augmentation de la production de ces paramètres suite à leur neutralisation par le PEG (Ali *et al.*, 2016).

3.1.1. Analyse en composantes principales (ACP)

Les corrélations existantes entre les constituants nutritifs, les composés phénoliques et les différents paramètres de production de gaz et de méthane *in vitro* en absence et en présence du PEG sont étudiées par l'ACP. Les résultats sont présentés dans des cercles de corrélation fig.17 et fig.20 respectivement.

3.1.1.1. En absence du PEG

La majorité des variables sont corrélées avec le facteur1 (composante 1) sauf NH₃, ADF, TP et TT. Des corrélations positives existent entre MAT, NDF, ADL, TCT et entre Gaz, CH₄, C₂ AGV, C₃, C₄. Les variables MAT, NDF, ADL, TCT sont corrélées négativement avec les variables Gaz, CH₄, AGV, C₂, C₃ et C₄.

Les variables NH₃, ADF, TP, TT sont corrélées avec le facteur2 (composante 2). Les composés phénoliques TP et TT sont corrélés positivement entre eux ainsi que les variables NH₃ et ADF.

3.1.1.2. En présence du PEG

La majorité des variables sont corrélés avec le facteur1 (composante 1) sauf Gaz, CH₄, TP, TT et TCT. Les variables NH₃, MAT, NDF, ADF, ADL sont corrélés positivement entre elles ainsi que les variables Gaz, AGV, C₂, C₃, C₄. Ces dernières sont corrélées négativement avec NH₃, MAT, NDF, ADF et ADL.

les variables TP, TT, TCT sont corrélés avec le facteur2 (composante 2) et sont corrélés positivement entre elles. Les composés phénoliques (TP, TT) sont corrélés positivement avec les variables Gaz, AGV, C₂, C₃, C₄ et négativement avec NH₃, MAT, NDF, ADF et ADL.

3.1.2. Effet des tanins sur la production de gaz

L'effet du PEG sur la production de gaz est illustré dans le tableau 11. Les résultats montrent que cet effet est statistiquement significatif (P <0,0001). En absence du PEG, la production de gaz la plus élevée est enregistrée dans les tiges de *C. scolymus* (159,8 ml/g OM) et la plus faible chez *A. dealbata* (29,6 ml/g OM). La faible production de gaz issue de la fermentation des espèces d'*Acacia* a été également notée par d'autres études (Bensalem *et al.*, 2002; Rubanza *et al.*, 2005; Bouazaa, 2014; Chentli, 2015). Cette faible production pourrait être attribuée à la teneur élevée en fibres et/ou à leur faible digestibilité (Longo *et al.*, 2012). En effet, la fraction pariétale (NDF, ADL) est corrélée négativement avec la

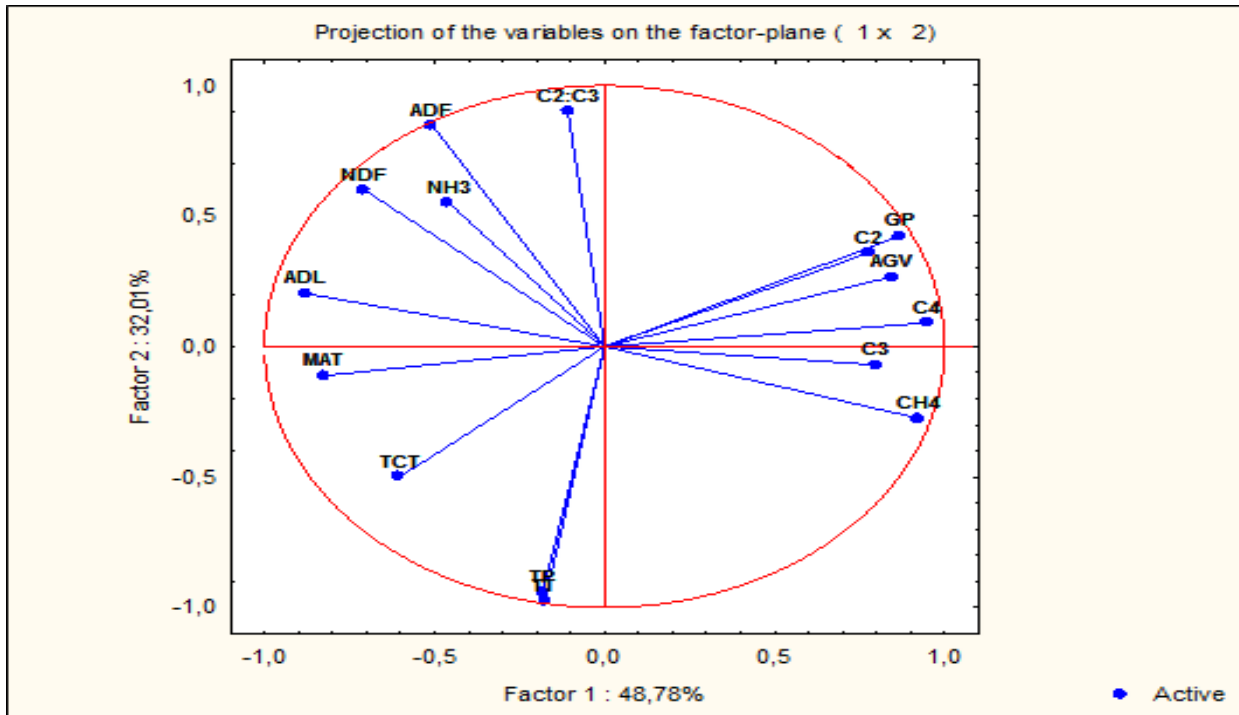
production de gaz (fig.17). L'effet négatif du contenu fibreux des aliments sur la production de gaz a été rapporté par plusieurs recherches (Njida et Nasiru, 2010; Abdallah Hassan Sallam *et al.*, 2010). De même, les matières azotées totales sont liées négativement avec le processus de la production de gaz *in vitro* (fig. 17). Ceci est dû au fait que la production de gaz résultant de la fermentation des protéines est relativement faible par rapport aux glucides (Al-Soqeer, 2008).

Les faibles valeurs de la production de gaz enregistrées chez les espèces d'*Acacia* notamment *A. dealbata*, substrat ayant la teneur la plus élevée en TT déterminée par méthode chimique peuvent s'expliquer par les effets antinutritionnels des tanins. Effectivement, les tanins peuvent se lier aux glucides et inhiber leur dégradation réduisant ainsi la production de gaz (Bhatta *et al.*, 2009; Njida et Nasiru, 2010; Abdallah Hassan Sallam *et al.*, 2010; Rodriguez *et al.*, 2014). Les tanins condensés montrent un effet corrélatif négatif avec la production de gaz (fig.17).

Tableau 11. Effets du polyéthylène glycol sur les paramètres fermentaires.

Items	Sans PEG (-PEG)							Avec PEG (+PEG)							S.E.M.	P. value
	Arbustes			Sous-produits				Arbustes			Sous-produits					
	<i>A.horrida</i>	<i>A.cyanophylla</i>	<i>A.dealbata</i>	<i>A.pycnantha</i>	<i>C.scolymus</i>	<i>P.granatun</i>	<i>P.dactilyfera</i>	<i>A.horrida</i>	<i>A.cyanophylla</i>	<i>A.dealbata</i>	<i>A.pycnantha</i>	<i>C.scolymus</i>	<i>P.granatun</i>	<i>P.dactilyfera</i>		
Gaz (ml/g OM)	54.5 ^b	61.1 ^b	29.6 ^b	60.9 ^b	159.8 ^a	73.6 ^b	70.2 ^b	104.9 ^b	86.0 ^b	91.8 ^b	72.5 ^b	204.0 ^a	83.9 ^b	70.9 ^b	5.02	<.0001
N-NH ₃ (mg/100 ml)	18.97 ^{ab}	17.67 ^{ab}	18.12 ^{ab}	20.47 ^a	18.52 ^{ab}	14.05 ^b	17.97 ^{ab}	22.40 ^{ab}	21.35 ^{ab}	25.95 ^{ab}	27.45 ^a	14.25 ^{ab}	14.90 ^b	20.37 ^{ab}	2.28	0.0382
AVGt(mM/g OM)	49.68 ^b	51.83 ^{bc}	37.33 ^{bc}	48.00 ^{bc}	72.18 ^a	51.85 ^b	44.15 ^c	58.46 ^b	54.38 ^{bc}	54.80 ^{bc}	55.06 ^{bc}	68.08 ^a	57.85 ^b	45.73 ^c	2.42	0.0009
Acetate %	33.05 ^b	36.21 ^b	24.67 ^c	33.54 ^b	48.82 ^a	33.61 ^b	30.25 ^c	37.63 ^b	38.62 ^b	35.48 ^c	37.37 ^b	46.24 ^a	37.36 ^b	31.40 ^c	1.59	<.0001
Propionate %	11.7 ^{ab}	10.80 ^{bc}	8.22 ^{bc}	9.77 ^{bc}	14.72 ^a	11.49 ^{ab}	7.78 ^c	14.06 ^{ab}	9.70 ^{bc}	11.92 ^{bc}	11.26 ^{bc}	14.35 ^a	12.80 ^{ab}	7.98 ^c	1.55	0.1024
Butyrate %	2.66 ^b	2.53 ^b	2.47 ^b	2.67 ^b	4.82 ^a	4.63 ^a	3.57 ^{ab}	3.47 ^b	3.17 ^b	3.85 ^b	3.32 ^b	4.23 ^a	5.13 ^a	3.65 ^{ab}	0.92	0.0373
Isobutyrate %	0.89 ^a	0.87 ^a	0.80 ^a	0.64 ^a	1.26 ^a	0.64 ^a	0.95 ^a	1.26 ^a	0.84 ^a	1.24 ^a	1.07 ^a	1.14 ^a	1.00 ^a	1.03 ^a	0.52	0.0046
Valerate %	0.47 ^b	0.5 ^b	0.38 ^b	0.41 ^b	1.22 ^a	0.57 ^b	0.43 ^b	0.72 ^b	0.77 ^b	0.85 ^b	0.67 ^b	1.08 ^a	0.59 ^b	0.49 ^b	0.36	<.0001
Isovalerate %	0.89 ^a	0.88 ^a	0.77 ^a	0.94 ^a	1.32 ^a	0.89 ^a	1.14 ^a	1.29 ^a	1.27 ^a	1.42 ^a	1.34 ^a	1.02 ^a	0.95 ^a	1.17 ^a	0.52	0.0032
C ₂ :C ₃	2.82	3.35	3.00	3.43	3.32	2.93	3.89	2.68	3.98	2.98	3.32	3.22	2.92	3.93		

N-NH₃: Azote ammoniacal, AVGt: Acides gras volatils totaux, C₂:C₃: Acétate: Propionate.



MAT: Matières azotées totales, **NDF:** Neutral detergent fiber, **ADF:** Acid detergent fiber, **ADL:** Acid detergent lignin, **TP:** Phénols totaux, **TT:** Tanins totaux, **TCT:** Tanins condensés totaux, **GP:** Production de gaz, **CH₄:** Méthane, **AGV:** Acides gras volatils, **C₂:** Acétate, **C₃:** Propionate, **C₄:** Butyrate, **C₂:C₃:** Acétate : Propionate.

Figure 17.Corrélation entre les constituants nutritifs, les composés phénoliques et les différents paramètres de fermentation *in vitro* en absence du polyéthylène glycol

En présence du PEG, la production de gaz la plus élevée est enregistrée chez *A. dealbata* et la plus basse est notée dans les feuilles du palmier dattier (70,96 ml/g OM). De nombreuses études ont rapporté que l'inclusion du PEG a augmenté la production de gaz *in vitro* de la plupart des aliments riches en tanins (Rubanza *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2005; Osuga *et al.*, 2007; Calabro *et al.*, 2011). L'augmentation de la production de gaz après inclusion du PEG signifie que les tanins ont réduit la digestibilité des aliments dans le rumen (Makkar *et al.*, 1995; McSweeney *et al.*, 2001).

L'effet biologique des tanins mesuré comme étant l'augmentation de la production de gaz après leur neutralisation par l'inclusion du PEG est plus prononcé pour *A. dealbata* (210,16%) suivie par *A. horrida* (92,5%), *A. cyanophylla* (40,7%) et *A. pycnantha* (19,0%) (fig. 18). L'augmentation en pourcentage de la production de gaz en raison de l'addition de l'agent complexant des tanins représente l'effet quantitatif des tanins; plus le pourcentage d'augmentation de la production de gaz est élevé, plus l'effet est plus important (Ali *et al.*, 2016). L'augmentation de la production de gaz après inclusion du PEG est due à une

augmentation de la disponibilité des nutriments nécessaires à la croissance des microorganismes du rumen notamment l'azote conduisant ainsi à une fermentation accrue et par conséquent une production de gaz plus élevée. De plus, l'inactivation des tanins supprime l'inhibition éventuelle de l'activité microbienne, car les tanins sont connus par avoir une activité antimicrobienne directe (McSweeney *et al.*, 2001).

Le faible volume de gaz produit lors de la fermentation d'*A. dealbata* considérablement augmenté lorsque l'effet des tanins a été neutralisé peut être principalement dû à la concentration élevée des tanins (Rodriguez *et al.*, 2014). En effet, les facteurs antinutritionnels (TT) sont corrélés positivement avec l'augmentation de la production de gaz (fig. 20). Ces résultats concordent avec les travaux de Getachew, (2002), Makkar, (2003), Alonso-Díaz *et al.*,(2009) et Rodríguez *et al.*, (2010). En revanche de nombreuses études ont rapportés des corrélations positives entre l'activité biologique (mesurée comme étant l'effet du PEG sur la production de gaz) et les concentrations en tanins condensés (Ali *et al.*, 2016; Alvarez del Pino *et al.*, 2005). D'autres auteurs n'ont enregistré aucune corrélation entre l'activité biologique et les facteurs antinutritionnels (Khazaal et Ørskov, 1994; Mlambo *et al.*, 2009). Ces différences semblent avoir une relation avec les substrats étudiés ainsi qu'aux techniques analytiques et des standards utilisés (Makkar, 2003).

Cependant l'effet biologique des tanins ne dépend pas uniquement de leur concentration mais aussi de leur nature et leur structure chimique (Jones et Palmer 2000; Bueno *et al.*, 2008). De nombreuses études ont signalé qu'à la même concentration, les tanins de différentes sources montrent des effets biologiques différents (Appel *et al.*, 2001; Andrabi *et al.*, 2005).

Dans les sous-produits, l'activité biologique des tanins la plus élevée est notée pour les tiges de *C. scolymus* (27,6%) suivi d'écorce de *P. granatum* (13,8%). Cependant, l'inclusion du PEG n'a pas entraîné une augmentation de la production de gaz chez les feuilles du palmier dattier (1%) (fig. 19), suggérant que les tanins présents dans ces dernières ont une activité biologique faible (Guerrero *et al.*, 2012).

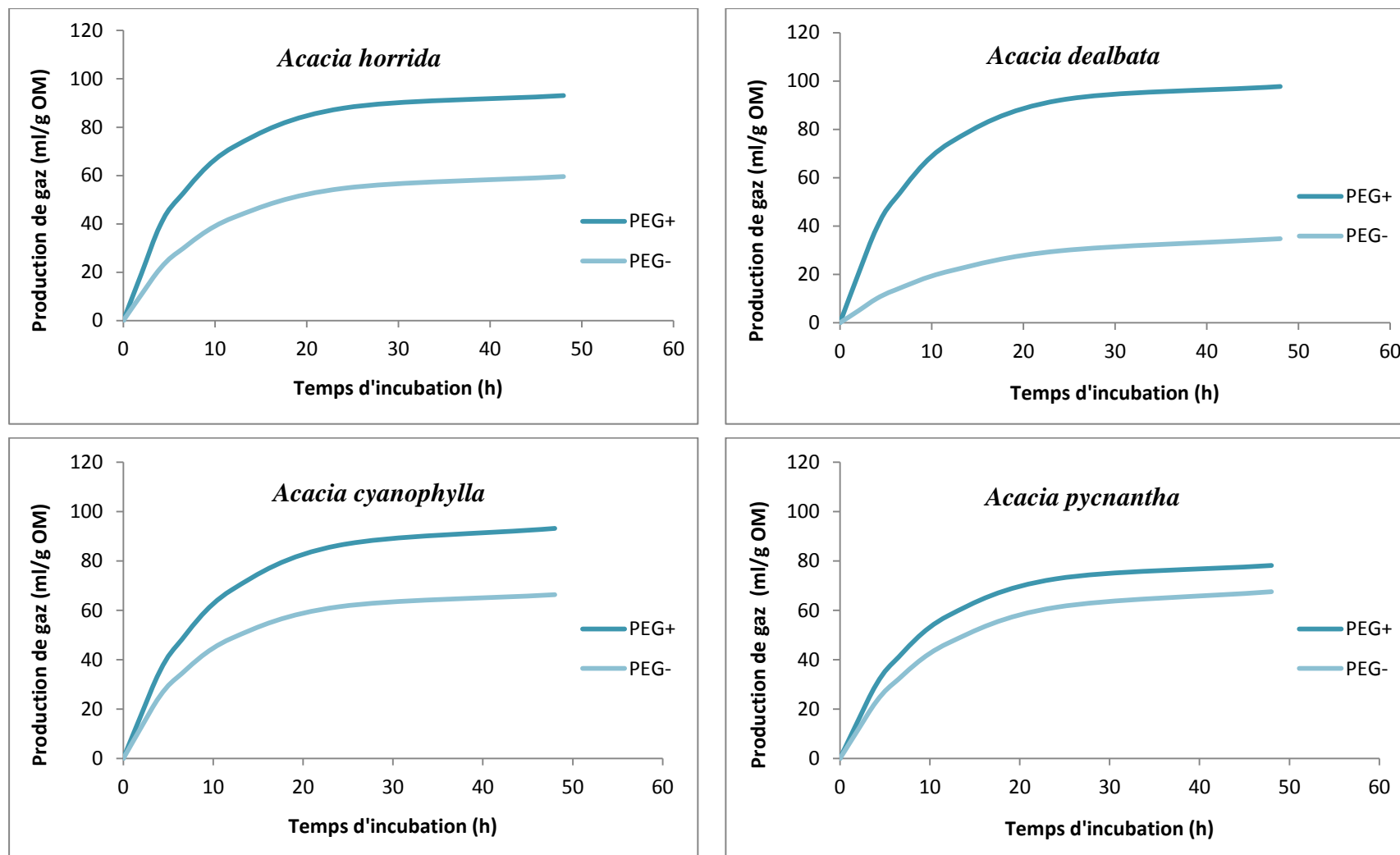


Figure 18. Profil de production de gaz (ml/g OM) des arbustes en absence et en présence du polyéthylène glycol

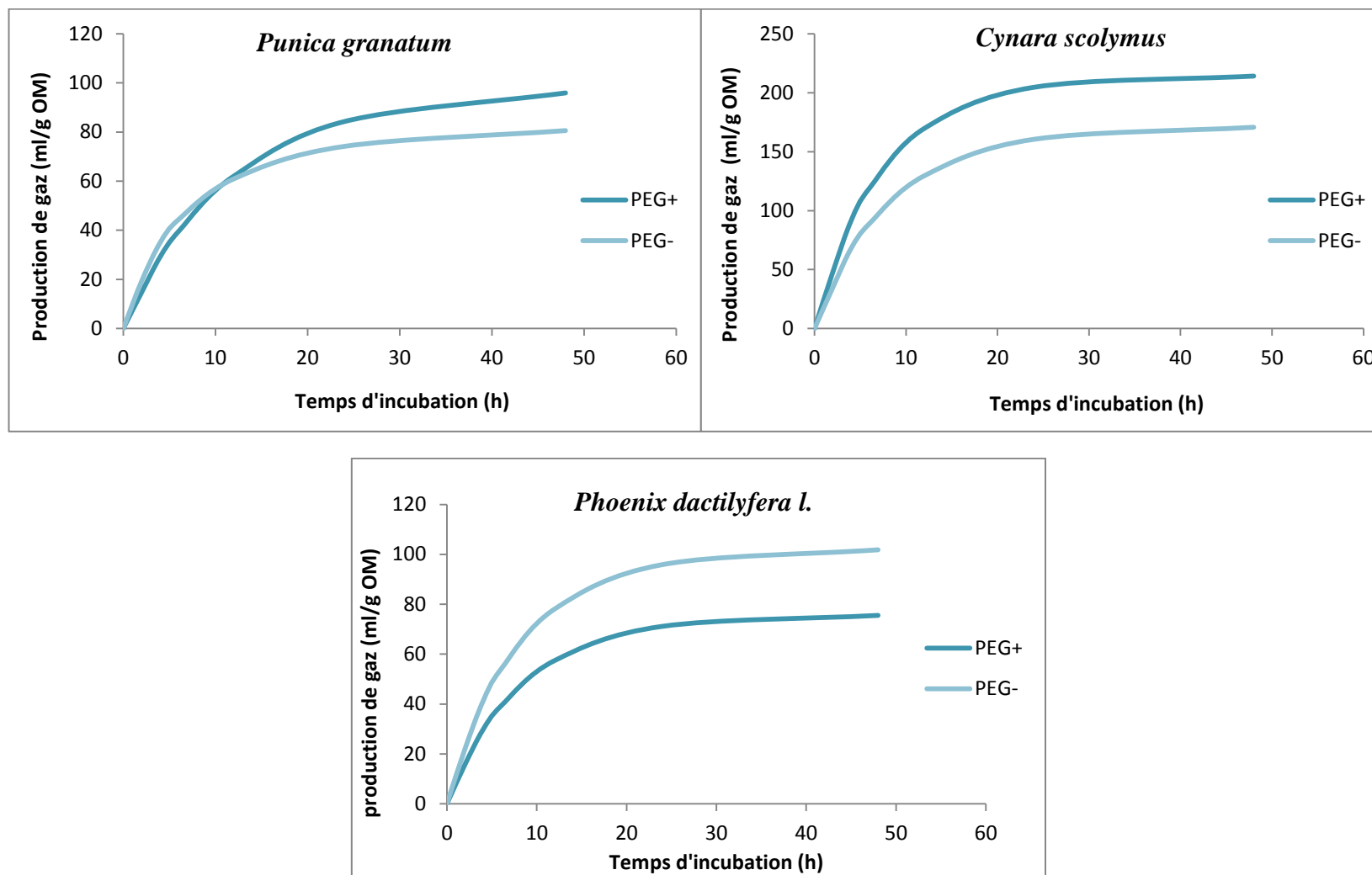
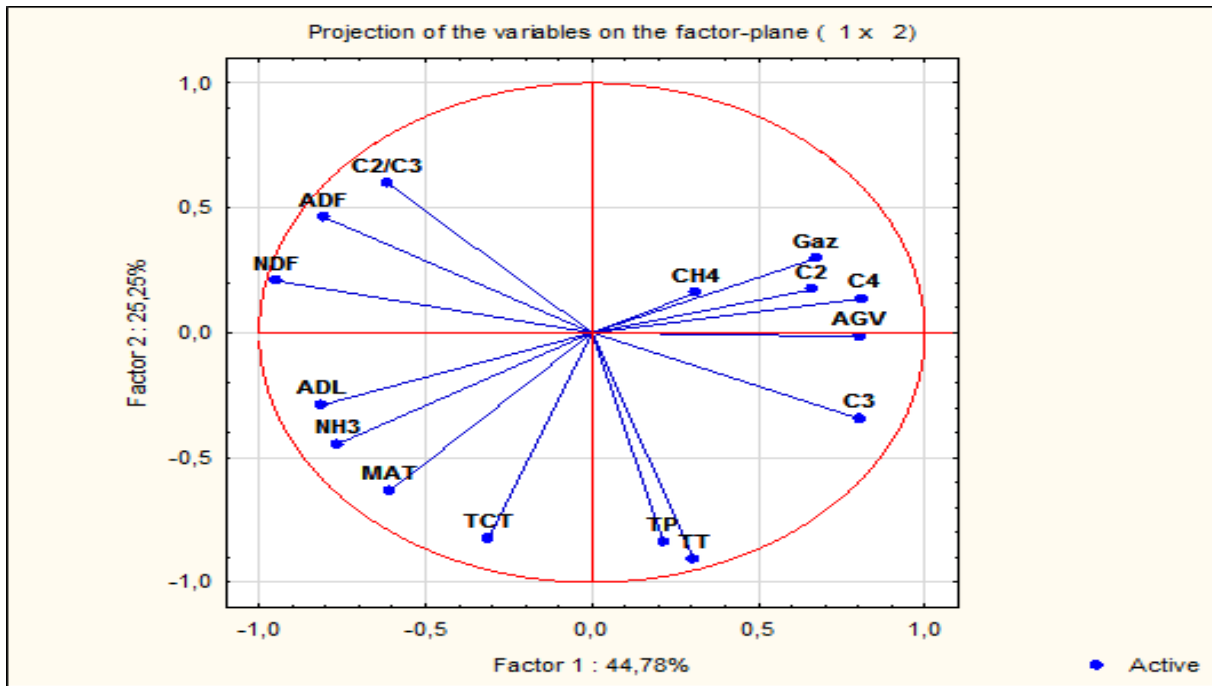


Figure 19. Profil de production de gaz (ml/g OM) des sous-produits en absence et en présence du polyéthylène glycol



MAT: Matières azotées totales, **NDF:** Neutral detergent fiber, **ADF:** Acid detergent fiber, **ADL:** Acid detergent lignin, **TP:** Phénols totaux, **TT:** Tanins totaux, **TCT:** Tanins condensés totaux, **GP:** Production de gaz, **CH₄:** Méthane, **AGV:** Acides gras volatils, **C₂:** Acétate, **C₃:** Propionate, **C₄:** Butyrate, **C₂: C₃:** Acétate : Propionate.

Figure 20. Corrélation entre les constituants nutritifs, les composés phénoliques et les différents paramètres de fermentation *in vitro* en présence du polyéthylène glycol

3.1.3. Effet des tanins sur la production de méthane

Le méthane est essentiellement produit dans le rumen des ruminants, par la fermentation microbienne des glucides de la ration. Les composés cellulosiques, l'amidon des fourrages et des concentrés sont dégradés en acides gras volatils (acétate, propionate, butyrate), qui sont les nutriments énergétiques majeurs des ruminants. Cette dégradation s'accompagne d'une production d'hydrogène. Cet hydrogène est converti en méthane (Hook *et al.*, 2010). Beaucoup d'études ont démontré que les plantes contenant des tanins réduisent la méthanogénèse ruminale (Carulla *et al.*, 2005; Puchala *et al.*, 2005; Tavendale *et al.*, 2005). Dans notre étude, l'effet des tanins sur la production de méthane a été mesurée par l'incubation de nos substrats avec et sans PEG, l'augmentation de la production de méthane suite à l'inactivation des tanins par l'inclusion du PEG représente leur effet antiméthanogénique.

L'effet du PEG sur la production de CH₄ est présenté dans la figure 21. Il en ressort que le PEG a influencé la production de méthane différemment selon les substrats. Cependant, ces

différences sont statistiquement comparables ($P > 0,05$). L'augmentation de la production de CH_4 la plus élevée est observée chez *A. pycnantha* (54,5%). Cela signifie que leurs tanins sont les plus efficaces dans la réduction de la production de méthane. En se liant aux protéines et aux glucides, les tanins peuvent diminuer la méthanogénèse en limitant l'utilisation des nutriments dans le rumen (McAllister *et al.*, 1994; Makkar *et al.*, 1995; Jayanegara *et al.*, 2012).

En contrepartie, aucune augmentation de la production de méthane en présence du PEG n'a été enregistrée pour *C. scolymus* et *A. horrida*, signifiant que leur tanins n'ont aucun effet sur la production de méthane. Des résultats similaires ont été rapportés par De Oliveira *et al.*, (2007) et Beauchemin *et al.*, (2007). Cet effet est principalement indépendant des concentrations en tanins. Ces résultats ne concordent pas avec ceux notés par Rira *et al.*, (2015). Ces auteurs ont rapporté que la production de CH_4 a été réduite de 37,5% et 56,25% avec l'incorporation de 30% et 60% tanins d'*A. Cyanophylla*. Dans notre étude, il apparaît que la structure des tanins est plus responsable de leur activité biologique que leur concentration (Arhab *et al.*, 2009; Rodriguez *et al.*, 2014). Cette observation a été corroborée par le résultat obtenu pour *A. horrida* (-3,84%). Ce substrat a la teneur la plus élevée en tanins condensés mais n'a eu aucun effet sur la production de CH_4 . Ces observations sont cohérentes avec celles enregistrées par Bhatta *et al.* (2012) qui ont noté que *Terminalia chebula* contenant la teneur la plus élevée en TT, a présenté un pouvoir suppressif de la production de méthane le plus faible.

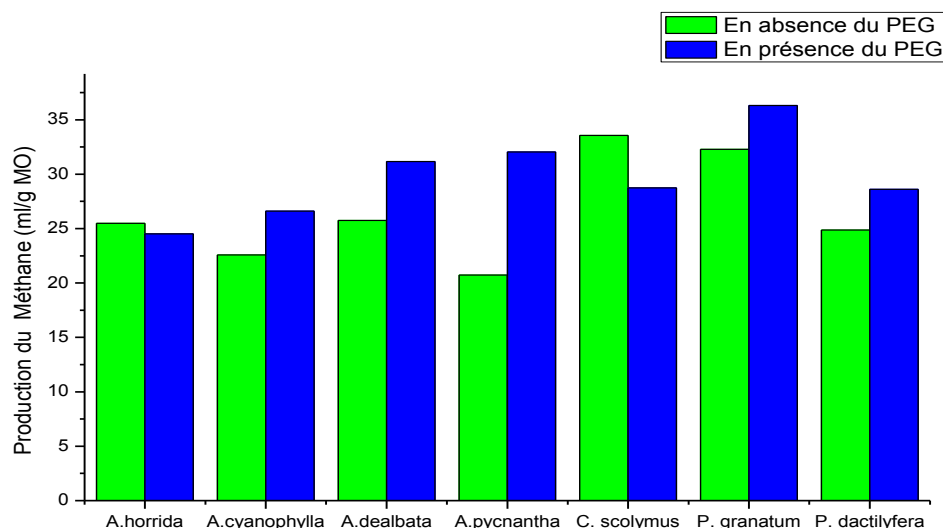


Figure 21. Effet du polyéthylène glycol sur la production de méthane (ml/g OM)

L'analyse en composantes principales en présence du PEG a confirmé le rôle de la structure dans la réactivité des tanins condensés; aucun effet corrélatif n'a été enregistré entre la teneur en TC et la production de méthane tandis que des corrélations positives ont été enregistrées avec les phénols totaux et les tanins totaux (fig.20).

D'autres composants alimentaires tels que la fraction fibreuse, peut contribuer à expliquer la production de méthane. Une teneur élevée en composés fibreux et/ou leur faible digestibilité peut limiter la production de méthane. L'ACP montre que la fraction pariétale (NDF, ADL) exerce un effet corrélatif négatif sur la production de méthane (fig. 17).

Les tanins agissent par deux mécanismes pour réduire la production de CH₄ par les ruminants: (i) indirectement par une réduction de la digestion des fibres, ce qui diminue la production de H₂; et (ii) directement par inhibition de la croissance des méthanogènes (Wanapat *et al.*, 2013). Dans la présente étude, la réduction de la production de CH₄ enregistrée pour les différents arbustes: *A. pycnantha*, *A. dealbata*, *A. cyanophylla* et les sous-produits peut être associée à l'action toxique des tanins sur les méthanogènes, en particulier les Archaea, qui utilisent le H₂ présent dans le rumen pour réduire le CO₂ en CH₄ (Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2015) ou à la défaunation des protozoaires qui vivent en symbiose avec ces Archaea (Puchala *et al.*, 2012).

Des changements dans la production de CH₄ se produisent généralement avec une modification du profil des AGV ; une augmentation de la concentration d'acide propionique entraîne des émissions de CH₄ plus faibles car la formation d'acide propionique est consommatrice d'hydrogène (Hales *et al.*, 2014) tandis que la synthèse de l'acide acétique et l'acide butyrique favorise la production de H₂ qui sert à réduire le CO₂ en CH₄ (Kennedy et Charmley, 2012). Effectivement, la production de méthane est liée à celle de l'acide acétique et l'acide butyrique. En revanche, il est important de signaler qu'elle est également corrélée à celle de propionate (fig. 17). Cette situation est différente de celle observée en littérature.

3.1.4. Effet des tanins sur les paramètres fermentaires

3.1.4.1. Production de l'azote ammoniacal

La dégradation des protéines alimentaires dans le rumen est assurée par la population microbienne protéolytique et aboutit à la formation d'ammoniac. Cet ammoniac est ensuite utilisé par les bactéries pour la synthèse de leurs propres protéines microbiennes. L'effet du PEG sur la production de l'azote ammoniacal (N-NH₃) après 24h d'incubation est résumé dans le tableau 11. À l'exception de *C. scolymus*, des augmentations de la production de N-NH₃ sont observées suite à l'inclusion du PEG (p= 0.0382). L'augmentation la plus élevée est notée pour *A. dealbata* (43,2%) et la plus faible pour l'écorce de grenade (6,0%).

L'augmentation de la production de N-NH₃ dans les batchs contenant du PEG montre que les tanins ont réduit la concentration de ce dernier. L'effet négatif des tanins sur la production de N-NH₃ a été bien documenté dans la littérature, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Min *et al.*, 2005; Bauchemain *et al.*, 2007; Gurbuz *et al.*, 2009; Min *et al.*, 2012; Bhatta *et al.*, 2015). La réduction de la production de N-NH₃ est probablement attribuée à la formation des complexes tanins-protéines, ces complexes préviennent la dégradation ruminale de l'azote et diminuent sa perte sous forme d'ammoniac (Rodriguez *et al.*, 2014). Les tanins sont caractérisés par leur capacité de se lier aux protéines. Cette propriété est principalement due à la présence d'un grand nombre de groupements hydroxyles (Martinez *et al.*, 2004; Shimada, 2006). Dans le rumen, où des conditions de pH neutre sont dominantes, les protéines ne peuvent pas être scindées de ces liaisons, elles ne sont donc pas dégradées par les micro-organismes, Dans la caillette où le pH est acide (2-3), certaines liaisons tanins-protéines sont rompues et les protéines sont donc dégradées en acides aminés puis absorbées dans l'intestin (Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2015). Dans notre étude, les facteurs antinutritionnels (TT) sont liés négativement avec la production d'ammoniac (fig.20).

Aucune augmentation de la production de N-NH₃ en présence de PEG n'a été enregistrée pour *C. scolymus*, ce résultat peut s'expliquer par la teneur faible en tanins condensés de ce substrat. D'après la littérature les TC sont plus efficaces dans la formation des complexes tanins-protéines.

La réduction de la concentration de N-NH₃ par les tanins peut être due non seulement à un faible taux de la dégradation des protéines, mais également à une consommation de N-NH₃ pour la synthèse des protéines microbiennes (Niderkorn *et al.*, 2012). Cette synthèse est liée

positivement à deux facteurs principaux, la teneur en matières azotées dégradables et l'énergie produite par la fermentation des glucides (sous forme d'ATP).

De plus, les tanins peuvent réduire la production d'ammoniac ruminal en inhibant l'activité des bactéries et/ou des enzymes protéolytiques ruminales (Makkar, 2003; Patra et Saxena, 2010; Hao *et al.*, 2011). Molan *et al.*, (2001) ont démontré que les TC de *Lotus corniculatus* et *Lotus pedunculatus* ont inhibé la croissance de cinq souches de bactéries protéolytiques du rumen *in vitro*. Nshahlalai *et al.*, (2011) ont rapporté que les tanins d'*Acacia sieberiana* et d'*Acacia nilotica* ont diminué la digestibilité des protéines dans le rumen en affectant l'activité des enzymes protéolytiques.

3.1.4.2. Production des acides gras volatils

La dégradation des glucides solubles et structuraux par le microbiote ruminal en anaérobiose aboutit à la formation des acides gras volatils (AGV), et engendre la production de biogaz le méthane et le dioxyde de carbone (Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2015). Les acides gras volatils provenant de cette dégradation représentent la principale source d'énergie pour les ruminants, ils fournissent environ 60 à 75 % de l'approvisionnement énergétique pour l'animal (Durand, 1982; Jouany, 1994).

L'impact du PEG sur la production des acides gras volatils totaux et individuels est montré dans le tableau 11. Cet effet est statistiquement significatif ($P < 0,001$). L'augmentation de la production des acides gras volatils totaux dans les incubations renfermant du PEG la plus élevée est observée chez *A. dealbata* (58,4%) et la plus faible chez les feuilles du palmier dattier (3,57%).

L'effet négatif des tanins sur la production des AGV totaux, exprimé par l'augmentation de leur concentration en présence du PEG, est similaire aux résultats rapportés par Tiemann *et al.*, (2008), Bhatta *et al.*, (2012) et Rodriguez *et al.*, (2014). L'ACP montre un effet corrélatif positif des tanins totaux vis-à-vis de la production des AGV totaux (fig. 20).

En outre, la diminution de la concentration des AGV totaux peut être également attribuée au contenu fibreux élevé des substrats. En effet, un effet corrélatif négatif des composés fibreux a été enregistré vis-à-vis la production des AGV totaux (fig.17).

Quant aux acides gras volatils individuels, il ressort du tableau qu'à l'exception de *C. scolymus*, le PEG affecte la production d'acétate ($P < 0,0001$). La plus forte augmentation

suite à son inclusion est enregistrée chez *A. dealbata* (43,8%) et la plus faible chez les palmes sèches (3,8%). De même, le PEG influence la production de propionate, les augmentations les plus élevées sont enregistrées chez *A. horrida*, *A. dealbata* et *A. pycnantha*. Malgré cela, cet effet n'est pas statistiquement significatif ($P > 0,05$). Cependant, l'impact du PEG est significativement différent pour la production de butyrate et de valérate ($P < 0,05$).

Selon Cieslak *et al.*, (2012), la formation des AGV dépend des substrats disponibles dans le rumen, les hydrates de carbone fibreux favorisent la production de l'acide acétique alors que les hydrates de carbone facilement digestibles, tels que l'amidon favorisent la production de l'acide propionique.

L'effet des tanins sur la production des AGV totaux et d'acétate a eu une même tendance, la réduction la plus élevée des deux paramètres est notée pour *A. dealbata* et la plus faible pour les palmes sèches. Cependant aucune réduction n'a été enregistrée pour *C. scolymus*.

L'effet inhibiteur des tanins sur la dégradation des fibres a entraîné une réduction de la production des AGV totaux et a modifié le profil d'AGV de l'acétate et par conséquent a conduit à une baisse de la production d'hydrogène et une diminution de la production de méthane (Bhatta *et al.*, 2012). Ceci a été confirmé par les corrélations négatives entre les tanins condensés et la production des AGV totaux d'un côté et par les corrélations positives entre la production des AGV, l'acétate et le méthane d'un autre côté (fig. 20).

En contrepartie, la formation de propionate constitue une autre voie d'élimination d'hydrogène dans le rumen, elle peut être considérée comme voie concurrentielle pour la production du CH_4 (Moss *et al.*, 2000), l'augmentation des concentrations de méthane est souvent associée à une diminution de celles de propionate et vice versa. Cependant dans notre étude, les tanins ont réduit la production d'acétate, de méthane et celle de propionate. De plus les tanins n'ont eu aucun effet sur le rapport $\text{C}_2 : \text{C}_3$. Ces résultats ne concordent pas avec Bhatta *et al.*, (2009) Rira *et al.*, (2015). Ces auteurs ont noté une augmentation de la concentration de propionate suite à une supplémentation en TC. Cependant des résultats similaires ont été notés par Paengkoum *et al.*, (2015).

3.2. Effets des tanins purifiés d'*Acacia horrida* sur la fermentation *in vitro*

L'essai biologique de la production de gaz *in vitro* couplé au PEG nous a mené à sélectionner *Acacia horrida* comme substrat ayant l'activité biologique la plus élevée. Cependant, à l'exception de gaz, les TC purifiés de ce substrat n'ont montré aucun effet sur les différents paramètres de fermentation.

L'essai biologique de la production de gaz *in vitro* couplé au PEG est une méthode permettant de mesurer l'activité biologique des tanins et ne fournit pas d'informations sur les effets des autres composés phénoliques qui ne sont pas liés par le PEG, il est probable que ces composés aient contribué à l'effet biologique des tanins et donc il est possible qu'il y'ait une synergie entre les tanins et ces composés. Pour cette raison, il est possible que la supplémentation des tanins condensés purifiés seuls aux fourrages n'a pas eu d'effets sur la fermentation ruminale. Il est également possible, que la variation de la réponse des tanins entre les deux essais soit due à une variation de la composition de la liqueur ruminale échantillonnée dans chaque essai.

En outre, il est évident que les effets des TC ne sont pas uniquement liés à leur concentration, effectivement la supplémentation en TC d'*A. horrida* au foin de luzerne et à la paille d'orge à des concentrations similaires à celles rapportées par la littérature n'ont pas conduit aux mêmes effets. Il a été conclu que l'activité biologique des tanins dépend aussi de leur structure et de leur poids moléculaire (Cudjoe et Mlambo, 2014).

Etant donné que, la structure et le poids moléculaire de nos tanins purifiés n'ont pas été déterminés au cours de la présente étude, nous avons tenté de comparer nos résultats avec d'autres études afin de pouvoir prédire la structure de nos tanins condensés et par conséquent élucider les détails structurels responsables de leurs effets.

Les effets des tanins purifiés d'*A. horrida* incubés avec deux fourrages différents: le foin de luzerne et la paille d'orge à trois concentrations différentes: 50, 100 et 150 mg/g MS sur les paramètres de fermentation sont représentés dans le tableau 12. Les résultats indiquent que les tanins purifiés d'*A. horrida* n'ont eu aucun effet sur les paramètres de fermentation sauf sur la production de gaz. Ce paramètre a diminué avec toutes les concentrations de tanins purifiés comparativement au témoin. La diminution la plus élevée est observée pour la dose (50 mg/g de MS).

3.2.1. Production de l'azote ammoniacal

La supplémentation en extrait purifié de tanins condensés d'*Acacia horrida* aux fourrages (le foin de luzerne et la paille d'orge) n'a pas réussi à réduire la production d'ammoniac pour les trois doses utilisées (50, 100, 150 mg/kg). Une réduction de la production d'ammoniac était attendue, au niveau de supplémentation de TC de 50 mg/kg en s'appuyant sur l'étude de Hassanat et Benchaar, (2013). Ces auteurs ont étudié l'effet des tanins purifiés d'*Acacia mearnsii* à 20, 50 et 100 mg/g MS et ont signalé une réduction de la production d'ammoniac à une concentration ≥ 50 mg/g. La réduction de la production d'ammoniac est principalement due à la formation des complexes tanins-protéines. Ces complexes provoquent la précipitation des protéines et diminuent leur dégradation sous forme d'ammoniac (Mueller and Harvey, 2006; Patra et Saxena, 2011; Bhatta *et al.*, 2015).

De nombreuses études ont démontré que la précipitation des protéines est interdépendante de la structure des tanins et des protéines (McSweeney *et al.*, 2005; Zeller *et al.*, 2015). Selon Makkar, (1990), la capacité des tanins condensés à précipiter les protéines dépend du degré de polymérisation (DP). En effet Saminthan, (2014), Hatew *et al.*, (2016), Hyen *et al.*, (2016) ont rapporté des corrélations négatives entre le DP et la production de N-NH₃. Les mêmes auteurs ont constaté que les tanins constitués essentiellement d'unités de prodelphinidines ont été plus efficaces dans la réduction de la dégradation des protéines, car les prodelphinidines possèdent des sites de liaisons d'hydrogènes plus nombreux que les procyanidines et donc leur affinité pour les protéines est plus élevée. Les travaux de Harbertson *et al.*, (2014) et Zeller *et al.*, (2015), conduits *in vitro*, ont également confirmé que la précipitation des protéines a augmenté avec l'augmentation du DP.

De plus, il a été révélé à travers les études que les tanins condensés possédant un poids moléculaire élevé ont présenté des affinités de liaison aux protéines plus fortes que ceux ayant un PM faible (Huang *et al.*, 2010; Samithan *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent que les TC à PM élevé forment facilement avec les protéines des complexes insolubles non digérés dans le rumen et par conséquent diminuent la production d'ammoniac. Sur la base des résultats de ces études et des résultats enregistrés pour le paramètre ammoniac, nous suggérons que nos tanins purifiés pourraient être constitués d'unités de procyanidines et auraient un PM et Dp faibles.

Tableau 12. Effets des tanins purifiés d'*Acacia horrida* sur les paramètres fermentaires.

Paramètre	Foin de luzerne				S.E.M.	P. value	Pailled'orge				S.E.M.	P. value
	Dose en tanins purifiés (mg/g MS)						Dose en tanins purifiés (mg/g MS)					
	0	50	100	150			0	50	100	150		
Gaz (ml/g OM)	479.10 ^a	21.17 ^a	166.85 ^a	327.52 ^a	5.03	0.9704	350.50 ^a	67.62 ^a	172.65 ^a	280.07 ^a	5.46	0.9993
CH₄ (ml/g OM)	31.03 ^a	37.41 ^a	35.90 ^a	41.64 ^a	2.80	0.2912	27.94 ^a	29.28 ^a	31.60 ^a	32.05 ^a	2.63	0.9130
N-NH₃ (mg/100 ml)	23.67 ^a	25.52 ^a	27.21 ^a	26.25 ^a	2.33	0.9168	18.10 ^a	19.72 ^a	19.59 ^a	21.82 ^a	2.23	0.8854
AGVt (mM/g OM)	68.24 ^a	69.04 ^a	70.52 ^a	68.09 ^a	2.61	0.9164	51.81 ^a	52.66 ^a	51.55 ^a	50.19 ^a	3.42	0.9976
Acétate (%)	44.49 ^a	44.98 ^a	45.92 ^a	44.49 ^a	2.34	0.9600	33.87 ^a	34.48 ^a	33.64 ^a	32.99 ^a	2.86	0.9988
Propionate(%)	13.46 ^a	13.65 ^a	13.98 ^a	13.53 ^a	0.91	0.6037	10.00 ^a	10.01 ^a	9.74 ^a	9.73 ^a	1.33	0.9951
Butyrate (%)	6.09 ^a	6.23 ^a	6.42 ^a	6.17 ^a	1.04	0.9631	5.00 ^a	5.08 ^a	4.97 ^a	5.00 ^a	1.23	0.9995
Isobutyrate(%)	1.31 ^a	1.22 ^a	1.20 ^a	1.12 ^a	0.30	0.1142	0.92 ^a	0.96 ^a	1.01 ^a	0.95 ^a	0.37	0.9188
Valérate (%)	1.20 ^a	1.22 ^a	1.25 ^a	1.11 ^a	0.48	0.9456	0.72 ^a	0.76 ^a	0.74 ^a	0.69 ^a	0.43	0.9831
Isovalérate (%)	1.66 ^a	1.71 ^a	1.73 ^a	1.65 ^a	0.47	0.9878	1.28 ^a	1.36 ^a	1.43 ^a	1.24 ^a	0.55	0.9209
C₂ :C₃	3.31	3.29	3.28	3.29			3.38	3.44	3.45	3.39		

CH₄: Méthane, AGVt: Acides gras volatils totaux, C₂: C₃: Acétate: Propionate.

3.2.2. Production de méthane et des acides gras volatils

L'ajout des TC d'*A. horrida* aux fourrages (foin de luzerne et paille d'orge) à trois concentrations différentes (50, 100, 150 mg/kg MS) n'a pas réduit la production de méthane et la concentration des AGV, contrairement aux travaux de Tiemann *et al.*, (2008), Rira *et al.*, (2015), Hassanat et Benchaar, (2013) qui ont rapporté des réductions de la concentration des deux paramètres à des concentrations similaires. Selon Huang *et al.*, (2010) et Tan *et al.*, (2011), les effets des tanins sur la production de méthane et des AGV peuvent apparaître à des concentrations de 20 mg/g MS et de 10 mg/g MS, respectivement. Cependant, Jayanegara *et al.*, (2012) dans une méta-analyse a révélé que les effets des tanins ne peuvent être attendus qu'à partir d'une concentration > 20 mg/g de MS. La divergence entre les études suggère que, plus de la concentration, les effets des TC pourraient être liés à leurs structures chimiques (Aerts *et al.*, 1999) et à leurs poids moléculaires (Patra et Saxena, 2010).

Il a été également signalé que les effets des TC sur la production et la composition des AGV varient selon la source des TC (Beauchemin *et al.*, 2007; Bueno *et al.*, 2008; Hassanat et Benchaar, 2013).

De nombreuses études ont démontré que le poids moléculaire des TC a un effet direct sur la production de méthane, les travaux de Huang *et al.*, (2011) et de Saminthan *et al.*, (2014) ont noté que les fractions purifiées avec poids moléculaire élevé ont entraîné la diminution de la production de méthane la plus forte. Ces résultats peuvent nous laisser supposer que nos tanins purifiés ont un poids moléculaire faible.

De plus, les propriétés structurelles chimiques telles que la taille du polymère (ou degré de polymérisation), le pourcentage de prodelphinidines des TC semblent avoir des effets importants sur l'activité animéthanogénique. Hatew *et al.*, (2016) ont rapportés des différences significatives de l'activité antiméthanogénique entre les extraits de TC ayant des tailles de polymères différentes, Hyen *et al.*, (2016), ont également enregistré une corrélation négative entre le DP et la production de méthane. Tavendale *et al.*, (2005) ont constaté que les polymères de TC ayant une valeur de DP de 4 à 13 ont complètement inhibé la production de méthane, tandis que les oligomères de TC avec des valeurs de DP de 1 à 7 n'ont eu aucun effet inhibiteur. La taille des polymères peut avoir affecté la capacité des tanins à interagir avec les fibres et les protéines alimentaires ou les cellules microbiennes. Similairement aux résultats enregistrés pour l'ammoniac, ces données suggèrent que nos tanins ont un DP faible.

En revanche, dans une étude récente, Naumman *et al.*, (2018) n'ont pas enregistré une corrélation entre la structure des TC (ratios procyanidines /prodelphinidines: PC/ PD ou cis /trans et ampleur de la galloylation) et la production de méthane mais plutôt une forte corrélation entre l'inhibition de la production de méthane et l'activité antioxydante des TC contenant des procyanidines et des prodelphinidines.

3.2.3. Production de gaz

Contrairement aux résultats des paramètres étudiés, une diminution de la production de gaz a été enregistrée suite à la supplémentation en TC d'*A. horrida* au foin de luzerne et à la paille d'orge à trois concentrations différentes. La diminution la plus élevée a été enregistrée pour la dose (50 mg/g MS). La diminution de la production de gaz pourrait être due à une diminution de la dégradation des fibres causée par la formation des complexes tanins-lignocellulose, qui à leur tour empêchent la fermentation microbienne, ou par l'inhibition directe des microorganismes cellulolytiques ou une combinaison des deux (McSweeney *et al.*, 2001). Le résultat enregistré dans notre étude est en accord avec celui noté par Hassanat et Benchaar, (2013), ces auteurs ont rapporté que les TC d'*Acacia meransii* ont réduit la production de gaz à une concentration ≥ 50 mg / g MS.

Conclusion générale et Perspectives

L'objectif principal de ce travail de thèse est de mettre en évidence le pouvoir des tanins à enrober les protéines alimentaires composant les rations des ruminants. L'enrobage moléculaire permet de protéger les protéines de la dégradation microbienne dans le rumen et d'augmenter leur flux vers l'intestin et de ce fait il constitue une voie d'amélioration de la production animale. Dans cette optique, sept substrats riches en tanins ont été sélectionnés quatre arbustes du genre *Acacia* : *Acacia dealbata*, *Acacia horrida*, *Acacia cyanophylla* et *Acacia pycnantha*, et trois sous-produits: les feuilles du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*), tiges d'artichaut (*Cynara scolymus*) et l'écorce de grenade (*Punica granatum*). Les substrats sont caractérisés par leurs teneurs en macronutriments (matière sèche, cendres, protéines brutes, cellulose, hémicelluloses et lignine) et en composés phénoliques (phénols totaux, tanins totaux, tanins condensés). L'activité biologique des tanins a été déterminée par la technique de la production de gaz *in vitro* couplée à un agent chélateur, le polyéthylène glycol (PEG, PM= 4000 Da). Après ce screening, les tanins condensés purifiés du substrat ayant l'activité biologique la plus élevée sont extraits et purifiés par chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 et leur effets sur les différents paramètres de fermentation ruminale sont étudiés.

Les analyses chimiques révèlent que les arbustes renferment des teneurs relativement élevées en matières azotées totales, supérieures au taux de 8%, suggéré comme concentration requise chez les ruminants pour soutenir une activité microbienne optimale. Ainsi ils peuvent être utilisés comme suppléments protéiques pour ruminants nourris avec des fourrages de mauvaise qualité en particulier pendant la saison sèche. Cependant, des teneurs relativement faibles ont été enregistrées pour les sous-produits. En ce qui concerne les constituants de la paroi cellulaire, les substrats étudiés contiennent des concentrations modérées en paroi totale. Les teneurs enregistrées sont inférieures au seuil de 600g/kg MS, au-delà duquel la consommation de la matière sèche est diminuée. Cependant, cette relation ne tient pas toujours, parce que la digestibilité de la paroi cellulaire dépend beaucoup plus du degré de lignification. Il est à signaler que tous les substrats étudiés renferment des teneurs modérées en lignine.

L'analyse quantitative des composés phénoliques montre que tous les substrats sont riches en phénols totaux et en tanins totaux. Les teneurs en TC varient entre 120,5 et 680,4 g/kg MS dans les arbustes et entre 23,1 et 170,4 g/kg MS dans les sous-produits. Les teneurs élevées des arbustes et des palmes sèches en TC peuvent présenter un avantage nutritionnel aux ruminants. En effet, les TC peuvent agir avec les protéines en formant des complexes insolubles dans les conditions ruminales, ce qui protégerait l'azote de la dégradation ruminale

et qui pourra être par la suite digéré dans l'intestin. Par contre, l'utilisation potentielle de ces substrats comme suppléments dans le régime des ruminants nécessite l'évaluation de leur l'activité biologique car les TC sont des facteurs antinutritionnels qui peuvent avoir des effets négatifs sur la digestibilité des aliments.

Les résultats de la production de gaz *in vitro* montrent que l'effet biologique des tanins mesuré comme étant l'augmentation de la production de gaz après leur neutralisation par le PEG était plus prononcé pour les espèces d'*Acacia* renfermant les concentrations en tanins les plus élevées. En effet, les facteurs antinutritionnels (TT) sont corrélés positivement avec l'augmentation de la production de gaz. Pour les sous-produits, le PEG n'a pas augmenté la production de gaz dans les palmes sèches suggérant ainsi que les tanins présents dans ces dernières ont une activité biologique. L'effet des tanins sur la production de méthane a été également mesuré en présence et en absence du PEG. Les résultats révèlent que les tanins influencent la production de méthane différemment selon les substrats. Des réductions de la production de méthane ont été notées pour les différents substrats cependant aucun effet n'a été enregistré pour l'espèce *A. horrida* malgré le fait que ce substrat contient la teneur la plus élevée en TC. Ce résultat indique que la structure des tanins est plus responsable de leur activité biologique que leur concentration. L'analyse en composantes principales en présence du PEG a confirmé le rôle de la structure dans la réactivité des tanins condensés, aucun effet corrélatif n'a été enregistré entre la teneur en TC et la production de méthane.

L'étude de l'effet des tanins sur les paramètres fermentaires en présence et en absence du PEG montre que les tanins ont réduit la production d'ammoniac dans les différents substrats. Cette réduction peut être attribuée à la formation des complexes tanins-protéines, ces complexes préviennent la dégradation ruminale d'azote et diminuent sa perte sous forme d'ammoniac. De même, les tanins ont affecté négativement la production des AGV totaux et individuels. Ils ont réduit la production d'acétate et celle de propionate, cependant, ils n'ont eu aucun effet sur le rapport $C_2 : C_3$.

Les résultats du screening (première partie) font ressortir que l'espèce *A. horrida* est le substrat ayant l'activité biologique la plus élevée. Ainsi, ses tanins condensés ont été extraits puis purifiés par chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20.

L'incubation des tanins condensés purifiés avec deux fourrages différents : le foin de luzerne et la paille d'orge à trois concentrations différentes: 50, 100 et 150 mg/g MS n'ont eu aucun effet sur les différents paramètres de fermentation sauf sur la production de gaz. Ce paramètre a diminué avec toutes les concentrations de tanins purifiés comparativement au témoin. La diminution la plus élevée a été observée pour la dose (50 mg/g de MS). Les TC

d'*A. horrida* ont été ajoutés aux fourrages à des concentrations similaires à celles rapportées par la littérature, cependant, ils n'ont pas conduit aux mêmes effets. Il a été conclu que les effets des tanins peuvent être davantage liés à leur structure et à leur poids moléculaire qu'à leur concentration. De ce fait, Il serait intéressant de compléter ce travail par la détermination de la structure chimique et le poids moléculaire de ces tanins en utilisant des techniques avancées de la chimie analytique comme la spectrométrie de masse afin d'élucider la relation structure-activité biologique. De plus, des études *in vivo* sur des animaux accoutumés doivent être menées pour évaluer les effets de ces tanins.

Références Bibliographiques

- Abdallah Hassan Sallam S.M., da Silva Bueno I.C., de Godoy P.B. Nozella E.F., Silber Schmidt Vitti D.M., Abdalla A.L. 2010. Ruminant fermentation and tannins bioactivity of some browses using a semi-automated gas production technique. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12: 1 – 10.
- Abdelguerfi A., Laouar M. 1999. Autoécologie et variabilité de quelques légumineuses d'intérêt fourrager et/ou pastoral. Possibilité de valorisation en région méditerranéenne. *Pastagens e Forragens* 20 : 81-112.
- Abdelguerfi A., Laouar M., M'Hammedi Bouzina M. 2008. Les productions fourragères et pastorales en Algérie : Situation et Possibilités d' Amélioration. *Agriculture & développement (INVA, Alger)* 6: 14-25.
- Abd El Tawab A.M., Abdellatif Khattab M.S. 2018. Utilization of Polyethylene Glycol and Tannase Enzyme to Reduce the Negative Effect of Tannins on Digestibility, Milk Production and Animal Performance. *Asian. J. Anim. Vet. Adv.* 13(3): 201-209.
- Abdulrazak S.A., Fujihara T., Ondiek T., Orskov E.R. 2000. Nutritive evaluation of some *Acacia* from Kenya. *Anim. Feed Sci. Technol.* 85: 89–98.
- Abebe A., Tolera A., Holand O., Adnoy T., Eik L.O. 2012. Seasonal variations in nutritive value of some browse and grass species in Borana rangeland, Southern Ethiopia. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 15(2): 261-271.
- Actis-Goretta L., Romanczyk L.J., Rodriguez C.A., Kwik-Urbe C., Keen C.L. 2008. Cytotoxic effects of digalloyl dimer procyanidins in human cancer cell lines. *J. Nutr. Biochem.* 19: 797–808.
- Addisu S. 2016. Effect of dietary tannin source feeds on Ruminant fermentation and production of cattle; a review. *Online J. Anim. Feed Res.* 6(2): 45-56.
- Aerts R.J., Barry T.N., McNabb W.C. 1999. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agric. Ecosyst. Environ.* 75(1-2): 1–12.
- Agarwal N., Kamra D.N., Chaudhary L.C. 2015. Rumen Microbial Ecosystem of Domesticated Ruminants. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution* 17–30.
- Alain K.Y., Cokou Pascal A.D., Boniface Y., Paul T. F., Alain A. G., Felicien A., Akpovi A., Codjo Dominique S. K. 2015. Chemical characterization and biological activities of extracts from two plants (*Cissus quadrangularis* and *Acacia polyacantha*) used in veterinary medicine in Benin. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 3(6): 91-96.
- Ali R., Mlambo V., Mangwe M.C., Dlamini B. J. 2016. Chemical composition, nitrogen degradability and in vitro ruminal biological activity of tannins in vines harvested from four tropical sweet potato (*Ipomoea batatas L.*) varieties. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 100: 61–68.
- Alonso-Díaz M.A., Torres-Acosta J.F.J., Sandoval-Castro C.A., Hoste H., Aguilar-Caballero A.J., Capetillo-Leal C.M. 2009. Sheep preference for different tanniniferous tree fodders and its relationship with in vitro gas production and digestibility. *Animal Feed Science and Technology* 151: 75–85.
- Alonso-Díaz M.A., Torres-Acosta J.F.J., Sandoval-Castro C.A., Hoste H., Aguilar-Caballero A.J., Capetillo-Leal, C.M. 2009. Sheep preference for different tanniniferous tree fodders and its

relationship with *in vitro* gas production and digestibility. *Animal Feed Science and Technology* 151: 75–85.

Al-Soqeer A. A. 2008. Nutritive value assessment of *Acacia* species using their chemical analyses and *in vitro* gas production technique. *Res. J. Agric. & Biol. Sci.* 4 (6): 688-694.

Anderson R.C., Vodovnik M., Min B.R., Pinchak W.E., Krueger N.A., Harvey R.B., Nisbet D.J. 2012. Bactericidal effect of hydrolysable and condensed tannin extracts on *Campylobacter jejuni* *in vitro*. *Folia Microbiologica* 57(4): 253–258.

Andrabi S.M., Ritchie M.M., Stimson C., Horadagoda A., Hyde M., McNeill D.M. 2005. *In vivo* assessment of the ability of condensed tannins to interfere with the digestibility of plant protein in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 122: 13–27.

Animut G., Puchala R., Goetsch A.L., Patra A.K., Sahlou T., Varel V.H., Wells J. 2008. Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from *lepedeza*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 144(3-4): 212–227.

AOAC 1990. Official Methods of analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, AOAC, Arlington, VA.

Aprianita A., Donkor O.N., Moate P.J., Williams S.R.O., Auldism M.J., Greenwood J.S., Hannah M.C., Wales W.J., Vasiljevic T. 2014. Effects of dietary cottonseed oil and tannin supplements on protein and fatty acid composition of bovine milk. *J. Dairy Res.* 81(02):183–192.

Archimède H., Bastianelli D., Boval M., Tran G., Sauvant D. 2011. Ressources tropicales : disponibilité et valeur alimentaire. In : Numéro spécial, Elevage en régions chaudes. Coulon J.B., Lecomte P., Boval M., Perez J.M. (Eds.), INRA Prod. Anim. 24 : 23-40.

Arco-Pérez A., Ramos-Morales E., Yáñez-Ruiz D.R., Abecia L., Martín-García A.I. 2017. Nutritive evaluation and milk quality of including of tomato or olive by-products silages with sunflower oil in the diet of dairy goats. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* 232: 57–70.

Arhab R. 2006. Étude de la fermentescibilité *in vitro* et de la digestibilité *in vivo* de végétaux des zones arides et de sous-produits de l'agronomie saharienne par l'estimation de l'activité métabolique du microbiote ruminale d'ovins. Thèse de doctorat, option: Biochimie appliquée. Université des frères Mentouri, Constantine1, Algérie. p.77.

Arhab R., Macheboeuf D., Aggoun M., Bousseboua H., Viala D., Besle J.M. 2009. Effect of polyethylene glycol on *in vitro* gas production and digestibility of tannin containing feed stuffs from North African arid zone. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10: 475 – 486.

Asanuma N., Iwamoto M., Hino T. 1999. Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 82: 780–787.

Aschenbach JR., Penner GB., Stumpff F., Gäbel G. 2011. Ruminant nutrition symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *J. Anim. Sci.* 89: 1092-1107.

Attia M.F.A., Nour El-Din A. N., El-Shazly K.A., Sallam S.M. 2013. Effect of Quebracho Tannins Supplementation on Nutrients Utilization and Rumen Fermentation Characteristics in Sheep. *Alex. J. Agric. Res.* 58 (2): 165-171.

- Aufrere J., Theodoridou K., Baumont R. 2012. Valeur alimentaire pour les ruminants des légumineuses contenant des tannins condensés en milieux tempérés. *INRA Prod. Anim.* 25 (1): 29-44.
- Bais H.P., Vepachedu R., Gilroy S., Callaway R.M., Vivanco J. M. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science* 301: 1377-1380.
- Balseca D. G., Cienfuegos E. G., López H. B., Guevara H. P., Martínez J. C. 2015. Nutritional value of Brachiarias and forage legumes in the humid tropics of Ecuador. *Cien. Inv. Agr.* 42 (1): 57-63.
- Barrau E., Fabre N., Fouraste I., Hoste H. 2005. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop.*) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology* 131(4): 531-538.
- Barry T.N., Duncan S.J., Manley T.R. 1986. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 4. Site of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. *British Journal of Nutrition* 55: 123-137.
- Barry T.N., McNabb W.C. 2000. The effect of condensed tannins in temperate forages on animal nutrition. In: *Tannins in Livestock and Human Nutrition*. Brooker J.D. (Ed.), Australian Centre for International Agricultural Research, Adelaide, Australia, pp. 30-35.
- Bauman D.E., Perfield J.W., De Veth M.J., Lock A. L. 2003. New Perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. *Proc. Cornell. Nutr. Conf.* 175-189.
- Baumer M. 1992. Trees as browse and to support animal production. In: *Legume trees and other fodder trees as protein source for livestock*. Speedy A., Pugliese PL. (Eds.), Proceedings of the FAO Expert consultation, Kuala Lumpur, Malaysia. 10: 1-10.
- Beauchemin K.A., McGinn S.M., Martinez T. F., McAllister T. A. 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 85: 1990-1996.
- Belanche A., De la Fuente G., Newbold C.J. 2014. Study of methanogen communities associated with different rumen protozoal populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90(3): 663-677.
- Bengaly K., Mhlongo S., Nsahlai I.V. 2007. Effects of dietary cottonseed oil and tannin supplements on protein and fatty acid composition of bovine milk. *J. Dairy Res. Livestock Research for Rural Development* 19 (4).
- Benoit St-P. 2018. Rumen anaerobic fungi. *J. Bacteriol. Mycol. Open Access.* 6 (2): 73-74.
- Ben Salem H., Nefzaoui A., Ben Salem L., Tisserand J.L., 1997. Effect of *Acacia cyanophylla Lindl.* foliage supply digestion by sheep fed lucerne hay-based diets. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* 68: 101-113.
- Ben Salem H., Nefzaoui A., Ben Salem L., Tisserand J.L. 1999. Different means of administering polyethylene glycol to sheep: effect on the nutritive value of *Acacia cyanophylla Lindl.* foliage. *Anim. Sci. J.* 68: 809-818.
- Ben Salem H., Nefzaoui A., Ben Salem L. 2002. Supplementation of *Acacia cyanophylla Lindl.* Foliage-based diets with barley or shrubs from arid areas (*Opuntia ficus-indica* and *Atriplex nummularia L.*) on growth and digestibility in lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 96: 15-30.

- Besharati M., Taghizadeh A. 2011. Effect of tannin-binding agents (polyethylene glycol and polyvinylpyrrolidone) supplementation on *in vitro* gas production kinetics of some grape yield by products. ISRN Veterinary Science p.8.
- Bhat T.K., Singh B., Sharma O. P. 1998. Microbial degradation of tannins – a current perspective. Biodegradation 9: 343–357.
- Bhatta R., Uyeno Y., Tajima K., Takenaka A., Yabumoto Y., Nonaka I., Enishi O., Kurihara M. 2009. Difference in the nature of tannins on *in vitro* ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. J. Dairy Sci. 92(11): 5512–5522.
- Bhatta R., Baruah L., Saravanan M., Suresh K.P., Sampath K.T. 2012. Effect of medicinal and aromatic plants on rumen fermentation, protozoa population and methanogenesis *in vitro*. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 97 (3): 446-456.
- Bhatta R., Saravanan M., Baruah L., Prasad C.S. 2015. Effects of graded levels of tannin-containing tropical tree leaves on *in vitro* rumen fermentation, total protozoa and methane production. J. Appl. Microbiol. 118 (3): 557-564.
- Booker F. L., Maier C. A. 2001. Atmospheric carbon dioxide irrigation and fertilization effects on phenolic and nitrogen concentrations in loblolly pine (*Pinus taeda*) needles. Tree Physiol. 21: 609–616.
- Bouazza L. 2014. Étude de la valeur nutritive de légumineuses arbustives du genre *Acacia* : Effets spécifiques de leurs hautes teneurs en tannins condensés sur la méthanogénèse ruminale d'ovins. Thèse de doctorat, option : Biotechnologies végétales. Université des frères Mentouri 1, Constantine, Algérie. p.70.
- Boufennara S., Bouazza L., López S., Bousseboua H., Bodas R. 2013. Effect of polyethylene glycol addition on methane production from some Algerian browse plant species in an *in vitro* gas system, in Ben Salem H., López-Fran cos A. (Eds.), Feeding and management strategies to improve livestock productivity, welfare and product quality under climate change. Zaragoza : CIHEAM / INRAT / OEP / IRESA / FAO. pp.283-287 (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens ; n. 107).
- Boufennara S., Bouazza L., De Vega A., Fondevila M., Amanzougarene Z., Lopez S. 2016. *In vitro* assessment of nutritive value of date palm by-products as feed for ruminants. Emir. J. Food Agr. 28(10): 695-703.
- Bravo L. 1998. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. Nutrition Reviews 56 (11): 317-333.
- Broadhurst R.B., Jones W.T. 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. J. Sci. Food Agric. 29: 788-794.
- Brod DL., Bolsen KK., Brent BE. 1982. Effect of water temperature on rumen temperature, digestion and rumen fermentation in sheep. J. Anim. Sci. 54: 179-182.
- Bruyne T.D., Pieters L., Deelstra H., Vlietinck A. 1999. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. Biochem. Syst. Ecol. 27: 445-459.
- Buccioni A., Pallara G., Pastorelli R., Bellini L., Cappucci A., Mannelli F., Minieri S., Roscini V., Rapaccini S., Mele M., Giovannetti L., Viti C., Pauselli M. 2017. Effect of Dietary Chestnut or

- Quebracho Tannin Supplementation on Microbial Community and Fatty Acid Profile in the Rumen of Dairy Ewes. *BioMed Research International* 1–12.
- Bueno I.C.S., Vitti D., Louvandini H., Abdalla A. L. 2008. A new approach for *in vitro* bioassay to measure tannin biological effects based on a gas production technique. *Animal Feed Science and Technology* 141:153–170.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 94(3): 223–253.
- Calabro S., Guglielmelli A., Iannaccone F., Danieli P.P., Tudisco R., Ruggiero C., Piccolo G., Cutrignelli M.I., Infascelli F. 2011. Fermentation kinetics of sainfoin hay with and without PEG. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96(5): 842-849.
- Carulla J.E., Kreuzer M., Machmiller A., Hess H.D. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Austr. J. Agric. Res.* 56: 961–970.
- Castillo-González AR., Burrola-Barraza ME., Domínguez-Viveros J., Chávez-Martínez A. 2014. Rumen microorganisms and fermentation. *Arch. Med. Vet.* 46: 349-361.
- Castro-Montoya J.M., Makkar H.P.S., Becker K. 2011. Chemical composition of rumen microbial fraction and fermentation parameters as affected by tannins and saponins using an *in vitro* rumen fermentation system. *Can. J. Anim. Sci.* 91(3): 433–448.
- Castro-Montoya J., Westreicher-Kristen E., Henke A., Diaby M., Susenbeth A., Dickhoefer U. 2017. *In vitro* microbial protein synthesis, ruminal degradation and post-ruminal digestibility of crude protein of dairy rations containing Quebracho tannin extract. *J. Anim. Physiol. Nutr.* 102 (1): e77–e86.
- Chanthakhoun V., Wanapat M., Wachirapakorn C., Wanapat S. 2011. Effect of legume (*Phaseolus calcaratus*) hay supplementation on rumen microorganisms, fermentation and nutrient digestibility in swamp buffalo. *Livestock Science* 140 (1-3): 17–23.
- Chaucheyras-Durand F., Ossa F. 2014. The rumen microbiome: Composition, abundance, diversity, and new investigative tools. *The Professional Animal Scientist* 30:1–12.
- Chaves N., Escuder J.C. 1999. Variation of flavonoid synthesis induced by ecological factors In: *Principles and Practices in Plant Ecology – Allochemical Interactions*. Inderjit K.M., Dakshini M., Foy C.L., (Eds.), CRC Press, Boca Raton. pp. 267–285.
- Chentli A., Gillmann L., Bouazza L., Medjkal S., Limami A.M., Le Paven M.-C.M., Bousseboua H. 2014. Effects of secondary compounds from cactus and acacias trees on rumen microbial profile changes performed by Real- Time PCR. *International Journal of Advanced Research* 2 (2): 660-671.
- Chentli A. 2015. Valorisation nutritionnelle d'*Opuntia* et *Acacia spp.* dans l'alimentation des ruminants. Effets de hautes teneurs en tannins et oxalates sur l'activité du microbiote ruminal. Thèse de doctorat, option : Biotechnologies microbiennes, Génomes et Environnement. Université des frères Mentouri 1, Constantine, Algérie. pp.77.
- Chung K.-T., Stevens S.E.Jr., Lin W.-F., Wei C. I. 1993. Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. *Lett. Appl. Microbiol.* 17: 29–32.

- Cieslak A., Zmora P., Pers-Kamczyc E., Szumacher-Strabel M. 2012. Effects of tannins source (*Vaccinium vats idaea L.*) on rumen microbial fermentation *in vivo*. Anim. Feed Sci. Techn. 176(1-4): 102–106.
- Cieslak A., Szumacher-Strabel M., Stochmal A., Oleszek W. 2013. Plant components with specific activities against rumen methanogens. Animal (7) 2: 253–265.
- Cieslak A., Zmora P., Pers-Kamczyc E., Stochmal A., Sadowinska A., Salem A.Z.M., Szumacher-Strabel M. 2014. Effects of Two Sources of Tannins (*Quercus L.* and *Vaccinium Vitis Idaea L.*) on Rumen Microbial Fermentation: an *in Vitro* Study. Ital. J. Anim. Sci.13 (2): 3133.
- Collingborn F.M.B., Gowen S.R., Mueller-Harvey I. 2000. Investigations into the biochemical basis for nematode resistance in roots of three *Musa* cultivars in response to *Radopholus similis* infection. J. Agric. Food Chem. 48: 5297-5301.
- Cortés J.E., Moreno B., Pabón M.L., Avila P., Kreuzer M., Hess H.D., Carulla J.E. 2009. Effects of purified condensed tannins extracted from *Calliandra*, *Flemingia* and *Leucaena* on ruminal and postruminal degradation of soybean meal as estimated *in vitro*. Anim. Feed Sci. Technol. 151 (3-4): 194–204.
- Costabil A., Sanghi S., Martín-Pelaez S., Mueller-Harvey I., Gibson G. R., Rastall R.A., Klinder A. 2011. Inhibition of *Salmonella Typhimurium* by tannins *in vitro*. J. Food Agric. Environ. 9 (1): 119 – 124.
- Cottle D.J., Nolan J.V., Wiedemann S.G. 2011. Ruminant enteric methane mitigation: a review. Anim. Prod. Sci. 51: 491–514.
- Crestini C., Lange H., Bianchetti G. 2016. Detailed chemical composition of condensed tannins via quantitative 31P NMR and HSQC analyses: *Acacia catechu*, *Schinopsis balansae*, and *Acacia mearnsii*. J. Nat. Prod. 79: 2287–2295.
- Croisier M., Croisier Y. 2012. Alimentation animale. Raisonnement de l'alimentation des animaux d'élevage. Educagri (ed). pp. 85.
- Cudjoe N., Mlambo V. 2014. Buffer nitrogen solubility, *in vitro* ruminal partitioning of nitrogen and *in vitro* ruminal biological activity of tannins in leaves of four fodder tree species. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 98: 722–730.
- Czerkawski J. W. 1986. An introduction to rumen studies, 1st edition. Elsevier (ed). pp. 32.
- Davies D.R., Theodorou M.K., Lawrence M.I.G., Trinci A.P.J. 1993. Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces. J. Gen. Microbiol. 139 (6): 1395–1400.
- Dawson L.E.R., McCoy M.A., Edgar H.W.J., Carson A.F. 2011. Effect of concentrate supplementation at pasture and inclusion of condensed tannins (Quebracho) in concentrates on lamb performance and faecal egg and worm counts. Livestock Science 135(2-3): 205–214.
- Debroas D., Depardon N., Blanchart G. 1998. Hydrolyse enzymatique des protéines par les bactéries du rumen. Année Biol. 78 : 233-248.
- Delteil L. 2004. Nutrition et alimentation des animaux d'élevage. Educagri (ed). pp. 92.

- Dentinho M.T.P., Belo A.T., Bessa R.J.B. 2014. Digestion, ruminal fermentation and microbial nitrogen supply in sheep fed soybean meal treated with *Cistus ladanifer* L. tannins. *Small Ruminant Research*. 119: 57–64.
- De Oliveira S.G., Berchielli T.T., Pedreira M.D.S., Primavesi O., Frighetto R., Lima M.A. 2007. Effect of tannin levels in sorghum silage and concentrate supplementation on apparent digestibility and methane emission in beef cattle. *Animal Feed Science and Technology* 135(3-4): 236–248.
- Di Trana A., Bonanno A., Cecchini S., Giorgio D., Di Grigoli A., Claps S. 2015. Effects of Sulla forage (*Sulla coronarium* L.) on the oxidative status and milk polyphenol content in goats. *J. Dairy Sci.* 98(1): 37–46.
- Doreau M., Ferlay A. 1994. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Anim. Feed Sci. Tech.* 45: 379-396.
- Doreau M., Chilliard Y. 1997. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. *Br. J. Nutr.* 78 (1): S15-S35.
- Dschaak C.M., Williams C.M., Holt M.S., Eun J.-S., Young A.J., Min B.R. 2011. Effects of supplementing condensed tannin extract on intake, digestion, ruminal fermentation, and milk production of lactating dairy cows¹. *J. Dairy Sci.* 94(5): 2508–2519.
- Durand M. 1982. Orientation du métabolisme du rumen au moyen des additifs. *Ann. Zoothe.* 31(1): 47-76.
- Durmic Z., Blache D. 2012. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176(1-4): 150–162.
- Elizondo A.M., Mercado E.C., Rabinovitz B.C., Fernandez-Miyakawa M.E. 2010. Effect of tannins on the *in vitro* growth of *Clostridium perfringens*. *Veterinary Microbiology* 145(3-4): 308–314.
- Fagundes G.M., Modesto E.C., Fonseca C.E.M., Lima H.R.P., Muir J.P. 2014. Intake, digestibility and milk yield in goats fed *Flemingia macrophylla* with or without polyethylene glycol. *Small Ruminant Research* 116(2-3): 88–93.
- Fikri Benbrahim K., Berrada H., El Ghachtouli N., Ismaili M. 2014. *Acacia*: Promising Nitrogen fixing trees for sustainable development in arid and semi-arid areas. *International Journal of Innovation and Applied Studies* 8 (1): 46-58.
- Fonty G., Joblin K.N. 1991. Rumen Anaerobic Fungi: Their Role and Interactions with Other Rumen Microorganisms in Relation to Fiber Digestion. In: *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminant*. Tsuda T., Sasaki Y., Kawashima R. (Eds.), Elsevier .pp.655-680.
- France J., Dijkstra J., Dhanoa M., Lopez S., Bannink A. 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations *Br. J. Nutr.* 83 (02): 143–150.
- Francisco A., Dentinho M.T., Alves S.P., Portugal P.V., Fernandes F., Sengo S., Jerónimo E. Oliveira M.A., Costa P., Sequeira A., Bessa R.J.B., Santos-Silva J. 2015. Growth performance, carcass and meat quality of lambs supplemented with increasing levels of a tanniferous bush (*Cistus ladanifer* L.) and vegetable oils. *Meat Science* 100: 275–282.

- Frutos P., Hervás G., Giráldez F.J., Mantecón A.R. 2004. Review. Tannins and ruminant nutrition. *Span. J. Agric. Res.* 2(2): 191-202.
- García-Hernández C., Arece-García J., Rojo-Rubio R., Mendoza-Martínez G.D., Albarrán-Portillo B., Vázquez-Armijo J.F., Avendaño-Reyes L., Olmedo-Juárez A., Marie-Magdeleine C., López-Leyva Y. 2016. Nutraceutical effect of free condensed tannins of *Lysiloma acapulcensis* (Kunth) benth on parasite infection and performance of Pelibuey sheep. *Trop. Anim. Heal. Prod.* 49(1): 55–61.
- Gebauer R.L.E., Strain B.R., Reynolds J.F. 1998. The effect of elevated CO₂ and N availability on tissue concentrations and whole plant pools of carbon-based secondary compounds in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Oecologia* 113: 29–36.
- Gerlach K., Pries M., Südekum K.-H. 2018. Effect of condensed tannin supplementation on *in vivo* nutrient digestibilities and energy values of concentrates in sheep. *Small Ruminant Research* 161: 57–62.
- Getachew G., Makkar H.P.S., Becker K. 2002. Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. *J. Agric. Sci.* 39: 341–352.
- Getachew G., Pittroff W., Putnam D.H., Dandekar A., Goyal S., De Peters E.J. 2008. The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on *invitro* rumen fermentation and microbial protein synthesis. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* 140 (3-4): 444–461.
- Ghosh D. 2015. Tannins from Foods to Combat Diseases. *International Journal of Pharma Research & Review* 4(5): 40-44.
- Goel G., Puniya A.K., Singh K., Aguilar C.N. 2005. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften* 92(11): 497-503.
- Grainger C., Clarke T., Auldred M.J., Beauchemin K.A., McGinn S.M., Waghorn G.C., Eckard R.J. 2009. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 89 (2): 241-251.
- Gross G.G. 1999. Biosynthesis, biodegradation, and cellular localization of hydrolysable tannins In: *Phytochemicals in Human Health Protection, Nutrition, and Plant Defense*. Romeo J.T. (Ed.), Springer Science and Business Media New York. 1999. pp. 185-223.
- Guerrero M., Cerrillo-Soto M.A., Ramirez R.G., Salem A.Z.M., González H., Juárez-Reyes A.S. 2012. Influence of polyethylene glycol on *in vitro* gas production profiles and microbial protein synthesis of some shrub species. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* 176(1-4): 32- 39.
- Gunun P., Wanapat M., Gunun N., Cherdthong A., Sirilaophaisan S., Kaewwongsa W. 2016. Effects of Condensed Tannins in Mao (*Antidesma thwaitesianum* Muel. Arg.) Seed Meal on Rumen Fermentation Characteristics and Nitrogen Utilization in Goats. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 29(8): 1111–1119.
- Guo Y.Q., Liu J.-X., Lu Y., Zhu W.Y., Denman S.E., McSweeney C.S. 2008. Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of mcrA gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Lett. Appl. Microbiol.* 47(5): 421–426.

- Gupta R. K., Haslam E. 1979. Vegetable Tannins - Structure and Biosynthesis. Proceedings of a symposium held during the 36th annual meeting of the Institute of Food Technologists. In: Polyphenols in cereals and legumes. Hulse J.H. (Ed.), St. Louis, Missouri. pp. 15-24.
- Gurbuz Y. 2009. Effects of condensed tannin content of some species of legumes in the emission of methane gas. Rev. Cuban. Cienc. Agríc. 43: 265-273.
- Hadjipanayiotou M., Economides S., Koumas A. 1985. Chemical composition, digestibility and energy content of leguminous grains and straws grown in a Mediterranean region. Ann. Zootech. 34 (1): 23-30.
- Hagerman A.E. 1987. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. J. Chem. Ecol. 13: 437-449.
- Hales K.E., Brown-Brandl T.M., Freetly H.C. 2014. Effects of decreased dietary roughage concentration on energy metabolism and nutrient balance in finishing beef cattle. J. Anim. Sci. 92: 264-271.
- Hanafy M.A., Abdul Aziz G.M., Fayed A., Ghandour M.M. 2014. *In vitro* evaluation of using tannins deactivation materials in *Acacia saligna* and *Tamrixaphylla*. Egyptian J. Nutrition and Feeds 17(1): 43-50.
- Hao X., Benke M.B., Li C., Larney F.J., Beauchemin K.A., Mcallister T.A. 2011. Nitrogen transformation and greenhouse gas emissions during composting of manure from cattle fed diets containing corn dried distillers grains with soluble and condensed tannins. J. Anim. Feed Sci. Technol. 166-167: 539-549.
- Harbertson J.F., Kilmister R.L., Kelm M.A., Downey M.O. 2014. Impact of condensed tannin size as individual and mixed polymers on bovine serum albumin precipitation. Food Chem. 160: 16-21.
- Harfoot C.G., Hazlewood G.P. 1997. Lipid metabolism in the rumen. In: The Rumen Microbial Ecosystem. Hobson P.N., Stewart C.S. (Eds.), Springer Netherlands, pp. 382-426.
- Haslam E. 1999. Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action. Trends in Food Science & Technology 10: 339.
- Hassanat F., Benchaar C. 2013. Assessment of the effect of condensed (acacia and quebracho) and hydrolysable (chestnut and valonea) tannins on rumen fermentation and methane production *in vitro*. J. Sci. Food Agric. 93 (2): 332-339.
- Hassanpour S., Maheri-Sis N., Eshratkhah B., Baghbani Mehmandar F. 2011. Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. Int. J. Forest, Soil and Erosion. 1 (1): 47-53.
- Hatew B., Stringano E., Mueller-Harvey I., Hendriks W.H., Hayot Carbonero C., Smith L.M.J., Pellikaan W.F. 2016. Impact of variation in structure of condensed tannins from sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on *in vitro* ruminal methane production and fermentation characteristics. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 100: 348-360.
- He F., Pan Q-H., Shi Y., Duan C-Q. 2008. Biosynthesis and Genetic Regulation of Proanthocyanidins in Plants. Molecules 13: 2674-2703.

- Henke A., Dickhoefer U., Westreicher-Kristen E., Knappstein K., Molkentin J., Hasler M., Susenbeth A. 2016. Effect of dietary Quebracho tannin extract on feed intake, digestibility, excretion of urinary purine derivatives and milk production in dairy cows. *Archives of Animal Nutrition* 71(1): 37–53.
- Hess H.D., Tiemann T.T., Noto F., Carulla J.E., Kreuzer M. 2006. Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock. *International Congress Series*. 1293: 164 -167.
- Hindrichsen I.K., Wettstein H.R., Machmuller A., Kreuzer M. 2006. Methane emission, nutrient degradation and nitrogen turnover in dairy cows and their slurry at different milk production scenarios with and without concentrate supplementation. *Agric. Ecosyst. Environ.* 113 (1-4): 150–161.
- Hixson J., Durmic Z., Vadhanabhuti J., Vercoe P., Smith P., Wilkes E. 2018. Exploiting Compositionally Similar Grape Marc Samples to Achieve Gradients of Condensed Tannin and Fatty Acids for Modulating *In Vitro* Methanogenesis. *Molecules* 23(7): 1793.
- Hook S.E., Wright A.-D. G., McBride B.W. 2010. Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies. *Archaea* 1-11.
- Huang X.D., Liang J.B., Tan H.Y., Yahya R., Khamseekhiew B., Ho Y.W. 2010. Molecular weight and protein binding affinity of *Leucaena* condensed tannins and their effects on *in vitro* fermentation parameters. *Anim. Feed Sci. Technol.* 159 (3-4): 81–87.
- Huang X.D., Liang J.B., Tan H.Y., Yahya R., Ho, Y. W. 2011. Effects of *Leucaena* condensed tannins of differing molecular weights on *in vitro* CH₄ production. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* 166– 167: 373– 376.
- Hungate R.E. 1966. *The rumen and its microbes*, 1st edition. Elsevier (ed). pp. 56.
- Huntington G.B., Archibeque S.L. 2000. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. *J. Anim. Sci.* 77 (1): 2-11.
- Huyen N.T., Fryganas C., Uittenbogaard G., Muller-Harvey I., Verstegen M.W.A., Hendriks W.H., Pellikaan W.F. 2016. Structural features of condensed tannins affect *in vitro* ruminal methane production and fermentation characteristics. *J. Agric. Sci.* 154(08): 1474–1487.
- Ishlak A., Günal M., AbuGhazaleh A.A. 2015. The effects of cinnamaldehyde, monensin and quebracho condensed tannin on rumen fermentation, biohydrogenation and bacteria in continuous culture system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 207: 31-40.
- Jafari S., Ebrahimi M., Goh Y.M., Rajion M.A., Jahromi M.F., Al-Jumaili W.S. 2019. Manipulation of rumen fermentation and methane gas production by plant secondary metabolites (saponin, tannin and essential oil) – a review of ten-year studies. *Ann. Anim. Sci.* 19 (1): 3–29.
- Janssen P.H., Kirs M. 2008. Structure of the Archaeal Community of the Rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (12): 3619-3625.
- Jayanegara A., Leiber F., Kreuzer M. 2012. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from *in vivo* and *in vitro* experiments. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 96 (3): 365-375.
- Jerez M., Tourio S., Sineiro J., Torres J.L., Nuez MJ. 2007. Procyanidins from pine bark: Relationships between structure, composition and antiradical activity. *Food Chemistry* 104: 518–27.

- Joblin K.N., Matsui H., Naylor G.E., Ushida K. 2002. Degradation of fresh ryegrass by methanogenic co-cultures of ruminal fungi grown in the presence or absence of *Fibrobacter succinogenes*. *Current Microbiol.* 45(1): 46–53.
- Johnson K.A., Johnson D.E. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73(8): 2483–2492.
- Jones R.J., Palmer B. 2000. *In vitro* digestion studies using ¹⁴C-labelled polyethylene glycol (PEG) 4000: comparison of six tanniferous shrub legumes and the grass *Panicum maximum*. *Animal Feed Science and Technology.* 85: 215–221.
- Jordan E., Kenny D., Hawkins M., Malone R., Lovett D.K., O'Mara F.P. 2006. Effect of refined soy oil or whole soybeans on intake, methane output, and performance of young bulls¹. *Journal of Animal Science* 84(9): 2418–2425.
- Jouany J.-P. 1994. Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA Prod. Anim.* 7(3): 207–225.
- Jouany J.-P., Broudiscou L., Prins R., Komisarczuk-Bony S. 1995. Métabolisme et nutrition de la population : Nutrition des Ruminants Domestiques In : Ingestion et Digestion. Jarrige R., Ruckebusch Y., Demarquilly C., Farce M.-H., Journet M. (Eds.), INRA, Versailles, France. pp. 349-381.
- Junior F.P., Cassiano E.C.O., Martins M.F., Romero L.A., Zapata D.C.V., Pinedo L.A., Marino C.T., Rodrigues P.H.M. 2017. Effect of tannins-rich extract from *Acacia mearnsii* or monensin as feed additives on ruminal fermentation efficiency in cattle. *Livestock Sci.* 203: 21–29.
- Kadi S.A., Djellal F. 2009. Autonomie alimentaire des exploitations laitières dans la région de Tizi-Ouzou, Algérie. *Livestock Research for Rural Development.* Volume 21.
- Kamel H.E.M., Al-Dobaib S.N., Salem A.Z.M. 2019. Dietary supplementation of sunflower oil and quebracho tannins in sheep feeding: *In vivo* nutrient digestibility, nitrogen utilization and *in vitro* ruminal degradation kinetics. *J. Sci. Food Agr.* 99: 4211–4217.
- Kebede B., Kechero Y., Beyene A. 2014. Polyethylene glycol improves the utilization of high tannin forage in sheep. *Livestock Research for Rural Development* 26 (12).
- Kennedy P.M., Charmley E. 2012. Methane yields from Brahman cattle fed tropical grasses and legumes. *Anim. Prod. Sci.* 52: 225-239.
- Khazaal K.A., Boza J., Ørskov E.R. 1994. Assessment of phenolics-related antinutritive effects in Mediterranean browse: a comparison between the use of the *in vitro* gas production technique with or without insoluble polyvinylpyrrolidone or nylon bag. *Anim. Feed Sci. Technol.* 49: 133-149.
- Kok C.M., Sieo C. C., Tan H.Y., Saad W.Z., Liang J.B., Ho Y.W. 2013. Anaerobic cellulolytic rumen fungal populations in goats fed with and without *Leucaena leucocephala* hybrid, as determined by real-time PCR. *Journal of Microbiology* 51(5): 700–703.
- Kondo M., Hirano Y., Ikai N., Kita K., Jayanegara A., Yokota H. 2014. Assessment of Anti-nutritive Activity of Tannins in Tea By-products Based on *In vitro* Rumen Fermentation. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 27(11): 1571-1576.
- Koricheva J. 2002. The carbon-nutrient balance hypothesis is dead; long live the carbon-nutrient balance hypothesis? *Oikos* 98: 537–539.

- Kraus T.E.C., Dahlgren R.A., Zasoski R. J. 2003. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems - a review. *Plant and Soil* 256: 41–66.
- Krause KM., Oetzel GR. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 126: 215-236.
- Krueger W.K., Gutierrez-Bañuelos H., Carstens G.E., Min B.R., Pinchak W.E., Gomez R.R., Anderson R.C., Krueger N.A., Forbes T.D.A. 2010. Effects of dietary tannin source on performance, feed efficiency, ruminal fermentation, and carcass and non-carcass traits in steers fed a high-grain diet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 159 (1-2): 1–9.
- Kumar K., Chaudhary L.C., Kumar S. 2014. Exploitation of tannins to modulate rumen ecosystem and ruminants performance: A review. *Indian J. Anim. Sci.* 84 (6): 609–618.
- Lamy E., Pinheiro C., Rodrigues L., Capelae Silva F., Lopes O.S., Tavares S., Gaspar R. 2016. Determinants of Tannin-Rich Food and Beverage Consumption: Oral Perception vs. Psychosocial Aspects. In: *Tannins: Biochemistry, Food Sources and Nutritional Properties*. Combs C.A. (Ed.), Nova Science Publishers Inc, New York, USA. pp. 29-58.
- Le Bourvellec C., Renard C.M.G. 2012. Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52(3): 213–248.
- Lee M.A. 2018. A global comparison of the nutritive values of forage plants grown in contrasting environments. *J Plant Res.*131(4): 641–654.
- Leng R.A. 1993. L'application de la biotechnologie à l'alimentation animale dans les pays en développement. *FAQ* (ed). pp. 29, 31.
- Lin K.W., Patterson J.A., Ladisch M.R. 1985. Anaerobic fermentation: microbes from ruminants. *Enzyme Microb. Technol.* 7: 98-107.
- Liu H., Vaddella V., Zhou D. 2011. Effects of chestnut tannins and coconut oil on growth performance, methane emission, ruminal fermentation, and microbial populations in sheep. *Journal of Dairy Science* 94(12): 6069–6077.
- Liu X.-L., HaoY.-Q., Jin L., Xu Z.-J., McAllister T., Wang, Y. 2013. Anti-Escherichia coli O157:H7 Properties of Purple Prairie Clover and Sainfoin Condensed Tannins. *Molecules* 18(2): 2183–2199.
- Lodemann U., Martens H. 2006. Effects of diet and osmotic pressure on Na⁺ transport and tissue conductance of sheep isolated rumen epithelium. *Exp. Physiol.* 91: 539-550.
- Longo C., Hummel J., Liebich J., Bueno I.C.S., Burauel P., Ambrosano E.J., Abdalla A.L., Anele U.Y., Südekum K.-H. 2012. Chemical characterization and *in vitro* biological activity of four tropical legumes, *Stylobium aterrimum* L., *Stylobium deeringianum*, *Leucaena leucocephala*, and *Mimosa caesalpiniae* folia, as compared with a tropical grass, *Cynodon* spp. for the use in ruminant diets. *Czech J. Anim. Sci.* 57(6): 255–264.
- Longo C., Abdalla A.L., Liebich J., Janzik I., Hummel J., Correa P.S., Südekum K.-H., Burauel P. 2013. Evaluation of the effects of tropical tanniferous plants on rumen microbiota using qRT PCR and DGGE analysis. *Czech J. Anim. Sci.* 58 (3): 106–116.

- McAllister T. A., Martinez T., Bae H. D., Muir A. D., Yanke L. J., Jones, G. A. 2005. Characterization of Condensed Tannins Purified From Legume Forages: Chromophore Production, Protein Precipitation, and Inhibitory Effects on Cellulose Digestion. *Journal of Chemical Ecology* 31(9): 2049–2068.
- Machmuller A., Kreuzer M. 1997. Methane suppression by coconut oil & associated effects on nutrient and energy balance in sheep. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 6: 65–72.
- Machmüller A., Soliva C.R., Kreuzer M. 2003. Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep. *Reproduction Nutrition Development.* 43(1): 41–55.
- Magalhães K.A., Valadares Filho S.C., Detmann E., Diniz L.L., Pina D.S., Azevedo J.A.G., Araújo F.L., Marcondes M.I., Fonseca M.A., Tedeschi L.O. 2010. Evaluation of indirect methods to estimate the nutritional value of tropical feeds for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 15: 44–54.
- Makkar H.P.S., Singh B., Negi S.S. 1990. Tannin Levels and Their Degree of Polymerisation and Specific Activity in Some Agro-industrial By-products. *Biological Wastes* 31: 137-144.
- Makkar H.P.S., Bluemmel M., Borowy N.K., Becker K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods, *J. Sci. Food Agric.* 61(2):161–165.
- Makkar H.P.S., Blummel M., Becker K. 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in in vitro techniques. *Br. J. Nutr.* 73 (06): 897-913.
- Makkar H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research* (49): 241-256.
- Makkar H.P.S. 2003. Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage. A Laboratory Manual. Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Atomic Energy Agency (FAO/IAEA). P 49–53
- Malik P. K., Kolte A.P., Bakshi B., Baruah L., Dhali A., Bhatta R. 2017. Effect of tamarind seed husk supplementation on ruminal methanogenesis, methanogen diversity and fermentation characteristics. *Carbon Management* 8(4): 319–329.
- Martin C., Morgavi D.P., Doreau M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4: 351-365.
- Martinez J.A., Barcina Y., Larralde J. 1986. Zinc bioavailability from a faba bean diet to rats, *Rev. Esp. Fisiol.* 42: 123–124.
- Martinez TF, Moyano FJ, Diaz M., Barroso FG., Alarcon FJ. 2004. Ruminal degradation of tannin-treated legume meals. *J. Sci. Food Agric.* 84 (14): 1979-1987.
- McAllister T.A., Bae H.D., Jones G.A., Cheng K.J. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.* 72: 3004–3018.

- McMahon L.R., Mcallister T.A., Berg B.P., Majak W., Achrya S.N., Popp J.D., Coulman B.E., Wang Y., Cheng K.J. 2000. A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Can. J. Plant Sci.* 80: 469–485.
- McNabb W.C., Peters J.S., Foo L.Y., Waghorn G.C., Jackson F.S. 1998. Effect of condensed tannins prepared from several forages on the *in vitro* precipitation of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase (Rubisco) protein and its digestion by trypsin (EC 2.4.21.4) and chymotrypsin (EC 2.4.21.1). *J. Sci. Food Agric.* 77(2): 201–212.
- McSweeney C.S., Palmer B., McNeill D.M., Krause D.O. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 91: 83-93.
- McSweeney C.S., Gough J., Conlan L.L., Hegarty M.P., Palmer B., Krause D.O. 2005. Nutritive value assessment of the tropical shrub legume *Acacia angustissima*: anti-nutritional compounds and *in vitro* digestibility. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 121: 175-190.
- Mebirouk-Boudechiche L., Chaker-Houd K., Boukhris R., Abidi S., Cherif M. 2018. Effet du polyéthylène glycol sur la production de gaz *in vitro* et les paramètres de fermentation des feuilles de six arbustes fourragers du nord-est algérien. *Livestock Research for Rural Development* 30 (2).
- Meissner H.H., Köster H.H., Nieuwoudt S.H., Coertze R.J. 1991. Effects of energy supplementation on intake and digestion of early and mid-season ryegrass and Panicum/ Smuts finger hay, and on *in sacco* disappearance of various forage species. *South African Journal of Animal Science* 21: 33–42.
- Melesse A., Steingass H., Schollenberge M., Rodehutschord M. 2017. Screening of common tropical grass and legume forages in Ethiopia for their nutrient composition and methane production profile *in vitro*. *Tropical Grasslands-ForrajesTropicales* 5(3):163–175.
- Menke K.H., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritz D., Schneider W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci.* 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. *J. Anim. Res. Dev.* 28 : 7–55.
- Merghem R. 2009. *Eléments de Biochimie Végétale*, 1^{ère} édition. Bahaeddine (ed). pp. 124-126.
- Merkel R.C., Pond K.R., Burns J.C., Fisher D.S. 1999. Intake, digestibility and nitrogen utilization of three tropical tree legumes: I. As sole feeds compared to *Asystasia intrusa* and *Brachiaria brizantha*. *Animal Feed Science and Technology* 82: 91–106.
- Mezzomo R., Paulino P.V.R., Detmann E., Valadares Filho S.C., Paulino M.F., Monnerat J.P.I.S., Duarte M.S., Silva L.H.P., Moura L.S. 2011. Influence of condensed tannin on intake, digestibility, and efficiency of protein utilization in beef steers fed high concentrate diet. *Livestock Science* 141(1): 1–11.
- Min B.R., Pinchak W.E., Fulford J.D., Puchala R. 2005. Wheat pasture bloat dynamics, *in vitro* ruminal gas production, and potential bloat mitigation with condensed tannins. *J. Anim. Sci.* 83:1322-1331.

- Min B.R., Pinchak W.E., Anderson R.C., Fulford J.D., Puchala R. 2006. Effects of condensed tannins supplementation level on weight gain and *in vitro* and *in vivo* bloat precursors in steers grazing winter wheat. *J. Anim. Sci.* 84: 2546-2554.
- Min B.R., Solaiman S., Gurung N., Behrends J., Eun J.-S., Taha E., Rose J. 2012. Effects of pine bark supplementation on performance, rumen fermentation, and carcass characteristics of Kiko crossbred male goats. *J. Anim. Sci.* 90: 3556-3567.
- Min B.R., Pinchak W.E., Hernandez K., Hernandez C., Hume M.E., Valencia E., Fulford J.D. 2012. Effects of plant tannin supplementation on animal responses and *in vivo* ruminal bacterial populations associated with bloat in heifers grazing wheat forage. *The Professional Animal Scientist* 28: 464-472.
- Min B.R., Wright C., Ho P., Eun J.-S., Gurung N., Shange R. 2014. The Effect of Phytochemical Tannins-Containing Diet on Rumen Fermentation Characteristics and Microbial Diversity Dynamics in Goats Using 16S rDNA Amplicon Pyrosequencing. *Agric. Food Anal. Bacteriol.* 4 (3): 195-211.
- Min B.R., Solaiman S., Shange R., Eun J.-S. 2014. Gastrointestinal Bacterial and Methanogenic Archaea Diversity Dynamics Associated with Condensed Tannin-Containing Pine Bark Diet in Goats Using 16S rDNA Amplicon Pyrosequencing. *International Journal of Microbiology* 1–11.
- Min B.R., Perkins D., Wright C., Dawod A., Min B.J., Terrill T.H., Eun J.-S., Shang R., Yanf S.Y., Gurung N. 2015. Effects of feeding two different tannin-containing diets on ruminal fermentation profiles and microbial community changes in meat goats. *Agric. Food Anal. Bacteriol.* 5 (3): 153-165.
- Mirzaei-Aghsaghali A., Maheri-Sis N., Mansouri H., Razeghi M. E., Mirza-Aghazadeh A., Cheraghi H., Aghajanzadeh-Golshani A. 2011. Evaluating potential nutritive value of pomegranate processing by-products for ruminants using *in vitro* gas production technique. *ARPJ Journal of Agricultural and Biological Science* 6: 1990-6145.
- Mlambo V., Mould F.L., Smith T., Owen E., Sikosana J.L.N., Mueller-Harvey I. 2009. *In vitro* biological activity of tannins from *Acacia* and other tree fruits: Correlations with colorimetric and gravimetric phenolic assays. *South African Journal of Animal Science* 39:2-8.
- Molan A.L., Attwood G.T., Min B.R., McNabb W.C. 2001. The effect of condensed tannins from *Lotus pedunculatus* and *Lotus corniculatus* on the growth of proteolytic rumen bacteria *in vitro* and their possible mode of action. *Can. J. Microbiol.* 47: 626–633.
- Molan A.-L., Faraj A.M. 2010. The effects of condensed tannins extracted from different plant species on egg hatching and larval development of *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Folia Parasitologica* 57(1): 62–68.
- Morales A., Leon J., Cárdenas E., Afanador G., Carulla J. 2013. Chemical composition of the milk, *in vitro* digestibility of dry matter and production in grass-fed cows alone or associated with *Lotus uliginosus*. *Magazine of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics* 60: 32-48.
- Morgavi D.P., Forano E., Martin C., Newbold C. J. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* 4 (7): 1024–1036.
- Morrison I.M. 1979. Carbohydrate chemistry and rumen digestion. Symposium on carbohydrate metabolism in the ruminant. *Proc. Nutr. SOC.* 38: 269-274.

- Moss A.R., Jouany J.P., Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de zootechnie* 49(3): 231-253.
- Motilva M.J., Martinez J.A., Ilundain A., Larralde J. 1983. Effects of extracts from bean (*Phaseolus vulgaris*) and field bean (*Vicia faba*) varieties on intestinal D-glucose transport in rat *in vivo*. *J. Sci. Food Agric.*34: 239–246.
- Moujahed N., Kayouli C., Thewis A., Beckers Y., Rezgui S. 2000. Effects of multinutrient blocks and polyethylene glycol 4000 supplies on intake and digestion by sheep fed *Acacia cyanophylla* Lindl. Foliage-based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 88: 219-238.
- Mueller-Harvey I., McAllan A.B. 1992. Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *Adv. Plant Cell Biochem. Biotechnol.* 1: 151-217.
- Mueller-Harvey I. 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86 (13): 2010-2037.
- Nafikov R.A., Beitz D.C. 2007. Carbohydrate and Lipid Metabolism in Farm Animals. Symposium: History of Nutrition: Impact of Research with Cattle, Pigs, and Sheep on Nutritional Concepts. *J. Nutr.* 137: 702–705.
- Naumann H.D., Muir J.P., Lambert B.D., Tedeschi L.O., Kothmann M.M. 2013. Condensed tannins in the ruminant environment: a perspective on biological activity. *Int. J. Agric. Sci.* 1(1): 8-200.
- Naumann H.D., Tedeschi L.O., Zeller W.E., Huntley N.F. 2017. The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions. *Revista Brasileira de Zootecnia* 46(12): 929–949.
- Naumann H., Sepela R., Rezaire A., Masih S.E., Zeller W.E., Reinhardt L.A., Robe J.T., Sullivan M.L., Hagerman A.E. 2018. Relationships between structures of condensed tannins from Texas legumes and methane production during *in vitro* rumen digestion. *Molecules* 23(9): 2123.
- Nguyen T.T.G., Wanapat M., Phesatcha K., Kang S. 2017. Effect of inclusion of different levels of *Leucaena* silage on rumen microbial population and microbial protein synthesis in dairy steers fed on rice straw. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 30(2).
- Niderkorn V., Mueller-Harvey I., Le Morvan A., Aufrère J. 2012. Synergistic effects of mixing cocksfoot and sainfoin on *in vitro* rumen fermentation. Role of condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology* 178: 48– 56.
- Njidda A.A. 2010. Chemical Composition, Fibre Fraction and Anti-Nutritional Substances of Semi-arid Browse Forages of North-Eastern Nigeria. *Nigerian Journal of Basic and Applied Science* 18(2): 181-188.
- Njida A.A., Nasiru A. 2010. *In vitro* gas production and dry matter digestibility of tannins containing forages of semi-arid region of north eastern Nigeria. *Pak. J. Nutr.* 9(1): 60-66.
- Njidda A.A., Olatunji E.A., Garba M.G. 2013. *In Sacco* and *In Vitro* Organic Matter Degradability (OMD) Of Selected Semi-Arid Browse Forages. *J. Agric. Vet. Sci.* 3(2): 09–16.

- Ningrat R.W.S., Zain M., Suryani E., Suryani H. 2016. Effects of doses and different sources of tannins on *in vitro* ruminal methane, volatile fatty acids production and on bacteria and protozoa populations. *Asian Journal of Animal Sciences* 11(1): 47-53.
- Novobilský A., Mueller-Harvey I., Thamsborg S.M. 2011. Condensed tannins act against cattle nematodes. *Veterinary Parasitology* 182(2-4): 213-220.
- Noziere P., Ortigues-Marty I., Loncke C., Sauvant D. 2010. Carbohydrate quantitative digestion and absorption in ruminants: from feed starch and fibre to nutrients available for tissues. *Animal* 4 (7): 1057-1074.
- Nsahlai I.V., Fon F.N., Basha N.A.D. 2011. The effect of tannin with and without polyethylene glycol on *in vitro* gas production and microbial enzyme activity. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 41 (4): 338-344.
- Okuda T. 2005. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry* 66: 2012-2031.
- Orlandi T., Kozloski G.V., Alves T.P., Mesquita F.R., Ávila S.C. 2015. Digestibility, ruminal fermentation and duodenal flux of amino acids in steers fed grass forage plus concentrate containing increasing levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. *Anim. Feed Sci. Tech.* 210: 37-45.
- Orpin G.C., Joblin K.N. 1997. The rumen anaerobic fungi. In: *The rumen microbial ecosystem*. Hobson P.N., Stewart C.S. (Eds.), Springer Netherlands, pp. 140-195.
- Ossipov V., Salminen J.-P., Ossipova V., Haukioja E., Pihlaja K. 2003. Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch changes in tannic compounds of evergreen oak leaf litter. *Can. J. Bot.* 66: 663-667.
- Osuga I.M., Maindi C.N., Abdurazak S.A., Nishino N., Ichinohe T., Fujihara T. 2007. Potential nutritive value and tannin bioassay of selected *Acacia* species from Kenya. *J. Sci. Food Agric.* 87: 1533-1538.
- Paengkoum P., Phonmun T., Liang J.B., Huang X.D., Tan H.Y., Jahromi M.F. 2015. Molecular Weight, Protein Binding Affinity and Methane Mitigation of Condensed Tannins from Mangosteen-peel (*Garcinia mangostana* L). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 28 (10): 1442-1448.
- Pal K., Patra A.K., Sahoo A., Kumawat P.K. 2015. Evaluation of several tropical tree leaves for methane production potential, degradability and rumen fermentation *in vitro*. *Livestock Science* 180: 98-105.
- Pascual J.J., Fernandez C., Diaz J.R., Garce C., Rubert-Alema J. 2000. Voluntary intake and *in vivo* digestibility of different date-palm fractions by Murciano-Granadina (*Capra hircus*). *J. Arid. Environ.* 45(2): 183-189.
- Pathak A.K., Dutta N., Banerjee P.S., Pattanaik A.K., Sharma K. 2013. Influence of Dietary Supplementation of Condensed Tannins through Leaf Meal Mixture on Intake, Nutrient Utilization and Performance of *Haemonchus contortus* Infected Sheep. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 26(10): 1446-1458.
- Pathak A.K., Dutta N., Pattanaik A.K., Chaturvedi V.B., Sharma K. 2017. Effect of condensed tannins from *Ficus infectoria* and *Psidium guajava* leaf meal mixture on nutrient metabolism, methane emission and performance of lambs. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 30(12): 1702-1710.

- Patra A.K., Saxena J. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek* 96(4): 363–375.
- Patra A.K., Saxena J., 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71: 1198–1222.
- Patra A.K, Saxena J. 2011. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *J. Sci. Food Agric.* 91 (1): 24–37.
- Patra A.K., Min, B.-R. Saxena J. 2012. Dietary Tannins on Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract in Ruminants. In: *Dietary Phytochemicals and Microbes*. Patra A.K. (Ed.), Springer Science and Business Media Dordrecht.
- Phesatcha K., Wanapat M. 2016. Tropical legume supplementation influences microbial protein synthesis and rumen ecology. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 101(3): 552–562.
- Piluzza G., Sulas L., Bullitta S. 2013. Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. *Grass and Forage Sci.* 69 (1): 32–48.
- Piñeiro-Vázquez AT., Canul-Solís JR., Alayón-Gamboa JA., Chay-Canul AJ., Ayala-Burgos AJ., Aguilar-Pérez CF., Solorio-Sánchez FJ., Ku-Vera JC. 2015. Potential of condensed tannins for the reduction of emissions of enteric methane and their effect on ruminant productivity. *Arch. Med. Vet.* 47(3): 263-272.
- Piñeiro-Vázquez A.T., Jiménez-Ferrer G., Alayon-Gamboa J.A., Chay-Canul A.J., Ayala-Burgos A.J., Aguilar-Pérez C.F., Ku-Vera J.C. 2017. Effects of quebracho tannin extract on intake, digestibility, rumen fermentation, and methane production in crossbred heifers fed low-quality tropical grass. *Trop. Anim. Heal. Prod.* 50(1): 29–36.
- Piñeiro-Vázquez A.T., Canul-Solis J.R., Jiménez-Ferrer G.O., Alayón-Gamboa J.A., Chay-Canul A.J., Ayala-Burgos A.J., Aguilar-Pérez C.F., Ku-Vera J.C. 2018. Effect of condensed tannins from *Leucaena leucocephala* on rumen fermentation, methane production and population of rumen protozoa in heifers fed low-quality forage. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 31(11):1738-1746.
- Pinski B., Gunal M., AbuGhazaleh A.A. 2015. The effects of essential oil and condensed tannin on fermentation and methane production under *in vitro* conditions. *Anim. Prod. Sci.*
- Poornachandra KT., Malik PK., Trivedi S., Thirumalaisamy G., Kolte AP., Dhali A., Bhatta R. 2019. Effect of Individual vs. Combined Supplementation of Tamarind Seed Husk and Soapnut on Methane Production, Feed Fermentation and Protozoal Population *in vitro*. *Appro. Poult. Dairy & Vet. Sci.* 6(4): 572-581.
- Porter L.J., Hrstich L.N., Chan B.G. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25(1): 223-230.
- Puchala R., Min B.R., Goetsch A.L., Sahlou T. 2005. The effect of condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. *J. Anim. Sci.* 83:182–186.
- Puchala R., Animut G., Patra A.K., Detweiler G.D., Wells J.E., Varel V.H., Sahlou T. 2012. Methane emissions by goats consuming *Sericea lespedeza* at different feeding frequencies. *Anim. Feed Sci. Tech.* 175: 76-84.

- Qi M., Jakober K.D., McAllister T.A. 2010. Rumen microbiology. In: Animal and plant productivity. Hudson R.J. (Ed.), Encyclopedia of Life Support Systems. EOLSS, Oxford. pp. 161–176.
- Ramsay A., Drake C., Grosse Brinkhaus A., Girard M., Copani G., Dohme-Meier F., Bee G., Niderkorn V., Mueller-Harvey I. 2015. Sodium Hydroxide Enhances Extractability and Analysis of Proanthocyanidins in Ensiled Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 63(43): 9471–9479.
- Rira M., Chentli A., Boufenera S., Bousseboua H. 2015. Effects of plants containing secondary metabolites on ruminal methanogenesis of sheep *in vitro*. Energy Procedia 74: 15 – 24.
- Rira M., Morgavi D.P., Archimède H., Marie-Magdeleine C., Popova M., Bousseboua H., Doreau M. 2015. Potential of tannin-rich plants for modulating ruminal microbes and ruminal fermentation in sheep. J. Anim. Sci. 93(1) : 334–347.
- Rivera-Méndez C., Plascencia A., Torrentera N., Zinn R.A. 2016. Effect of level and source of supplemental tannin on growth performance of steers during the late finishing phase. Journal of Applied Animal Research 45(1): 199–203.
- Rodríguez R., Mota M., Castrillo C., Fondevila M. 2010. *In vitro* rumen fermentation of the tropical grass *Pennisetum purpureum* and mixtures with browse legumes: effects of tannin contents. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 94: 696–705.
- Rodríguez R., de la Fuente G., Gómez S., Fondevila M. 2014. Biological effect of tannins from different vegetal origin on microbial and fermentation traits *in vitro*. Anim. Prod. Sci. 54(8): 1039–1046.
- Rodríguez R., Frutos P., Fondevila M. 2015. A new index to estimate reactivity and biological effect of tannins, using tropical browse legumes as a model. Animal Feed Science and Technology 1-7.
- Rubanza C.D.K., Shemb M.N., Otsyina R., Bakengesa S.S., Ichinohed T., Fujiharad T. 2005. Polyphenolics and tannins effect on *in vitro* digestibility of selected *Acacia* species leaves. Anim. Feed Sci. Technol. 119(1-2): 129–142.
- Ruckebusch Y., Kay R.N.B. 1971. Etude critique de la motricité gastrique chez les bovins. Ann. Rech. Vet. 2: 99-136.
- Rufino-Moya P.J., Blanco, M., Lobón S., Bertolín J. R., Armengol R., Joy M. 2019. The Inclusion of Concentrate with Quebracho Is Advisable in Two Forage-Based Diets of Ewes According to the In Vitro Fermentation Parameters. Animals 9(7): 451.
- Russell J.B., Strobel H.J. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 55(1):1–6.
- Sadq S.M., Ramzi D.O.M., Hamasalim H.J., Ahmed K.A. 2016. Growth Performance and Digestibility in Karadi Lambs Receiving Different Levels of Pomegranate Peels. Open Journal of Animal Sciences 6: 16-23.
- Salem A.Z.M., Olivares M., Lopez S., Gonzalez-Ronquillo M., Rojo R., Camacho L.M., Cerrillo S.M.A., Mejia, H.P. 2011. Effect of natural extracts of *Salix babylonica* and *Leucaena leucocephala* on nutrient digestibility and growth performance of lambs. Anim. Feed Sci. Technol. 170 (1-2): 27–34.

- Saminathan M., Sieo C.C., Abdullah N., Vui Ling Wong C.M., Hao Y.W. 2014. Effects of condensed tannin fractions of different molecular weights from a *Leucaena leucocephala* hybrid on *in vitro* methane production and rumen fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 95 (13): 2742-2749.
- Saminathan M., Gan H.M., Abdullah N., Wong C.M.V., Ramiah S.K., Tan H.Y., Sieo C.C., Ho Y.W. 2017. Changes in rumen protozoal community by condensed tannin fractions of different molecular weights from a *Leucaena leucocephala* hybrid *in vitro*. *J. Appl. Microbiol.* 123(1): 41–53.
- Santos-Buelga C., Scalbert A. 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds– nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 80: 1094-1117.
- Scalbert A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30: 3875 –3883.
- Schofield P., Bugua M., Pell A.N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91: 21-40.
- Serrano J., Puupponen-Pimi R., Dauer A., Aura A-M., Saura-Calixto F. 2009. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol. Nutr. Food Res.* 53: S310 –S329.
- Seresinhe T., Pathirana K.K. 2003. Forage tannins in ruminant nutrition. *Tropical Agricultural Research and Extension.* 6: 39-43.
- Shabtay A., Eitam H., Tadmor Y., Orlov A., Meir A., Weinberg P., Weinberg Z.G., Chen Y., Brosh A., Izhaki I., Kerem Z. 2008. Nutritive and antioxidative potential of fresh and stored pomegranate industrial byproduct as a novel beef cattle feed. *J. Agric. Food Chem.* 56(2): 10063–10070.
- Sharp R., Ziemer C.J., Stern M.D., Stahl D.A. 1998. Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26 (1): 71–78.
- Sieniawska E. 2015. Activities of Tannins – From *In Vitro* Studies to Clinical Trials. *Natural Product Communications* 10 (11): 1877 – 1884.
- Shimada T. 2006. Salivary proteins as a defense against dietary tannins. *J. Chem. Ecol.* 32(6): 1149–1163.
- Singh B., Sahoo A., Sharma R., Bhat T. K. 2005. Effect of polyethylene glycol on gas production parameters and nitrogen disappearance of some tree forages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123: 351-364.
- Śliwiński B. J., Kreuzer M., Wettstein H.-R., Machmüller A. 2002. Rumen fermentation and nitrogen balance of lambs fed diets containing plant extracts rich in tannins and saponins, and associated emissions of nitrogen and methane. *Archives of animal nutrition* 56 (6): 379–392.
- Smith R.H. 1969. Reviews of the progress of Dairy Science Section G. General. Nitrogen metabolism and the rumen. *J. Dairy Res.* 36: 313-331.
- Smith A.H., Zoetendal E., Mackie R.I. 2005. Bacterial Mechanisms to Overcome Inhibitory Effects of Dietary Tannins. *Microbial Ecology* 50 (2): 197-205.
- Spear J. 1994. Mineral in forages. In: Forage Quality, Evaluation, and Utilisation, National Conference on Forage Quality. Lincoln Faher J.R. (Ed.) pp. 281–317.

- Stewart C.S., Flint H.J., Bryant M.P. 1997. The rumen bacteria. In: The rumen microbial ecosystem. Hobson P.N., Stewart C.S. (Eds.), Springer Netherlands, pp.10-72.
- Supreena S., Peangkoum P. 2011. Lauryl Sulfate in Meat Goat Diets on Nematode Eggs and Protozoa Interaction in the Rumen. J. Agric. Sci. Technol. 1: 1291-1294.
- Sutto J.D. 1971. Digestion and metabolism of carbohydrates. Proc. Nutr. SOC. 30: 243-248.
- Sutto J.D. 1979. Carbohydrate fermentation in the rumen-variations on a theme. Proc. Nutr. Soc. 38: 275-281.
- Swain T. 1979. Tannins and lignins. In: Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites. Rosenthal G.A., Janzen D.H. (Eds.), pp. 657-682. Academic Press, New York.
- Tadele Y. 2015. Important Anti-Nutritional Substances and Inherent Toxicants of Feeds. Food Science and Quality Management 36: 40-47.
- Takechi M., Tanaka Y., Takehara M., Nonaka G.I., Nishioka I. 1985. Structure and antiherpetic activity among the tannins. Phytochemistry 24: 2245–2250.
- Tamminga S. 1979. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. J. Anim. Sci. 49(6): 1616-1630.
- Tan H.Y., Sieo C.C., Abdullaha N., Liang J.B., Huang X.D., Ho Y.W. 2011. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. J. Anim. Feed Sci. Technol. 169 (3-4): 185-193.
- Tavendale M.H., Meagher L.P., Pacheco D., Walker N., Attwood G.T. Sivakumaran S. 2005. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. J. Anim. Feed Sci. Technol. 123-124: 403-419.
- Tefera S., Mlambo V., Dlamini B.J., Dlamini A.M., Koralagama K.D.N., Mould F.L. 2008. Chemical composition and *in vitro* ruminal fermentation of common tree forages in the semi-arid rangelands of Swaziland. J. Anim. Feed Sci. Technol. 142 (1-2): 99–110.
- 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 concentrates meals and cereal grains. J. Sci. Food Agric. 58: 321-329.
- Tharwat M., Al-Sobayil F., Ali A., Buczinski S. 2012. Transabdominal ultrasonographic appearance of the gastrointestinal viscera of healthy camels (*Camelus dromedaries*). Res. Vet. Sci. 93: 1015-1020.
- Theodorou M.K., Williams B.A., Dhano M.S., McAllan A.B., France J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Technol. 48(3-4): 185–197.
- Theodoridou K., Aufrère J., Andueza D., Pourrat J., Le Morvan A., Stringano E., Mueller-Harvey I., Baumont R. 2010. Effects of condensed tannins in fresh sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on *in vivo* and *in situ* digestion in sheep. Anim. Feed Sci. Technol. 160: 23-38.

- Thivend P., Fonty G., Jouany J. P., Durand M., Gouet Ph. 1985. Le fermenteur rumen. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 25(4B): 729-753.
- Tiemann T.T., Avila P., Ramirez G., Lascano C.E., Kreuzer M., Hess H.D. 2008. *In vitro* ruminal fermentation of tanniniferous tropical plants: Plant-specific tannin effects and counteracting efficiency of PEG. *Anim. Feed Sci. Technol.* 146 (3-4): 222–241.
- Uyeno Y. 2015. Selective Inhibition of Harmful Rumen Microbes. In: *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Puniya A.K., Singh R., Kamra D.N. (Eds.), Springer India.
- Valenti B., Natalello A., Vasta V., Campidonico L., Roscini V., Mattioli S., Pauselli M., Priolo A., Lanza M., Luciano G. 2018. Effect of different dietary tannin extracts on lamb growth performances and meat oxidative stability: comparison between mimosa, chestnut and tara *Animal* 1–9.
- Van Soest P.J., Robertson J.B., Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dai. Sci.* 74: 3583-3597.
- Van Soest P. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2nd edition. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Van Swinderen H.V. 1991. Les arbres et arbustes fourragers : rêve ou réalité ? *Tropicultura* 8(1): 36-39.
- Vasta V., Yanez-Ruiz D.R., Mele M., Serra A., Luciano G., Lanza M., Lanza M., Biondi L., Priolo A. 2010. Bacterial and Protozoal Communities and Fatty Acid Profile in the Rumen of Sheep Fed a Diet Containing Added Tannins. *Applied and Environmental Microbiology* 76(8): 2549–2555.
- Vieira E.L., Batista Â.M.V., Guim A., Carvalho F.F., Nascimento A.C., Araújo R.F.S., Mustafa A.F. 2008. Effects of hay inclusion on intake, *in vivo* nutrient utilization and ruminal fermentation of goats fed spineless cactus (*Opuntiaficus-indica Mill*) based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141(3-4): 199–208.
- Wahrmund J.L., Ronchesel J.R., Krehbiel C.R., Goad C.L., Trost S.M., Richards C.J. 2012. Ruminal acidosis challenge impact on ruminal temperature in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 90: 2794-2801.
- Wanapat M., Kongmun P., Pongchompu O., Cherdthong A., Khejornsart P., Pilajun R., Kaenpakdee S. 2012. Effects of plants containing secondary compounds and plant oils on rumen fermentation and ecology. *Trop. Anim. Heal. Prod.* 44(3): 399–405.
- Wanapat M., Kang S., Polygraph S. 2013. Development of feeding systems and strategies of supplementation to enhance rumen fermentation and ruminant production in the tropics. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4(1): 32.
- Wang J.-K., Ye J.-A., Liu J.-X. 2012. Effects of tea saponins on rumen microbiota, rumen fermentation, methane production and growth performance- review. *Trop. Anim. Health Prod.* 44: 697–706.
- Wang Y., Jin L., Ominski K. H., He M., Xu Z., Krause D.O., Acharya S.N., Wittenberg K.M., Liu X.L., Stanford K., Mcallister T.A. 2013. Screening of Condensed Tannins from Canadian Prairie Forages for Anti-Escherichia coli 0157:H7 with an Emphasis on Purple Prairie Clover (*Dalea purpurea* Vent). *Journal of Food Protection* 76 (4): 560-567.

- Weatherburn M. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39(8): 971–974.
- Williams AG, Orpin CG. 1987. Glycoside hydrolase enzymes present in the zoospores and vegetative growth stages of the rumen fungi *Neocallimastix patriciarum*, *Piromonas communis*, and an unidentified isolate grown on a range of carbohydrates. *Can. J. Microbiol.* 33 (5): 427–434.
- Williams A.G., Coleman G.S. 1992. The rumen protozoa, 1st edition. Springer-verlag (ed). pp. 6.
- Williams C. M., Eun J.-S., MacAdam J.W., Young A.J., Fellner V., Min B.R. 2011. Effects of forage legumes containing condensed tannins on methane and ammonia production in continuous cultures of mixed ruminal microorganisms. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167: 364–372.
- William-Walker C. 1981. Lipid metabolism in ruminant animals, 1st edition. Elsevier (ed). pp. 56.
- Wina E., Abdurrohman D. 2005. The Formation of ‘Ruminal Bypass Protein’ (*In Vitro*) by Adding Tannins Isolated from *Calliandra calothyrsus* Leaves or Formaldehyde. *JITV* 10(4): 274-280.
- Wright A., Kennedy P., O’Neill C.J., Toovey A.F., Popovski S., Rea S.M., Pimma C.L., Klein L. 2004. Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens. *Vaccine.* 22(29-30): 3976–3985.
- Yisehak K., De Boever J.L., Janssens G.P.J. 2013. The effect of supplementing leaves of four tannin-rich plant species with polyethylene glycol on digestibility and zootechnical performance of zebu bulls (*Bos indicus*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 98(3): 417–423.
- Yurtseven S., Kaya Z., Takim K., 2018. The effect of pomegranate peel and pistachio hulls on performance and enteric methane emissions in straw-fed lambs (*Ovisaries L.*). *Appl. Ecol. Env. RES.* 17 (1): 305-316.
- Zeller W.E., Sullivan M.L., Mueller-Harvey I., Grabber J.H., Ramsay A., Drake C., Brown R.H. 2015. Protein Precipitation Behavior of Condensed Tannins from *Lotus pedunculatus* and *Trifolium mrepens* with Different Mean Degrees of Polymerization. *J. Agric. Food Chem.* 63: 1160–1168.
- Zeller W.E. 2019. Activity, Purification, and Analysis of Condensed Tannins: Current State of Affairs and Future Endeavors. *Crop Sci.* 59: 886–904.
- Zemmer N., Cordesse R. 1996. Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA Prod. Anim.* 9(3): 167-79.
- Ziaei N., Sharifi Hosseini S.M.M. 2009. Feeding value and *in vitro* digestibility of Date-Palm Leaves supplemented with different supplementary energy. *Pak. J. Biol. Sci.* 12(10): 817-820.
- Zhang J., Xu X., Cao Z., Wang Y., Yang H., Azarfar A., Li S. 2019. Effect of Different Tannin Sources on Nutrient Intake, Digestibility, Performance, Nitrogen Utilization, and Blood Parameters in Dairy Cows. *Animals* 507(9): 1-12.
- Zirmi-Zembri N., Kadi S.A. 2016. Valeur nutritive des principales ressources fourragères utilisées en Algérie. 1- Les fourrages naturels herbacés. *Livestock Research for Rural Development* 28 (8).

Résumés

Résumé

Les tanins sont des métabolites secondaires de haut poids moléculaire qui sont largement distribués dans les plantes. Leur rôle principal consiste à se défendre contre les herbivores prédateurs et les microorganismes. Ils ont divers effets sur les systèmes biologiques: ce sont des antioxydants biologiques, des chélateurs d'ions et des agents précipitants des protéines. Dans la nutrition des ruminants, les tanins peuvent diminuer la dégradation des protéines alimentaires et augmenter leur absorption intestinale via leur enrobage moléculaire. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse dont l'objectif est de mettre en évidence cette voie biotechnologique via un ensemble de travaux expérimentaux: (i) sélection de substrats autochtones et de sous-produits riches en tanins, (ii) caractérisation de leur composition en macronutriments (matières minérales, azote et fibres) et en métabolites secondaires (phénols totaux, tanins totaux, tanins condensés), (iii) évaluation de leur activité biologique par la méthode de production de gaz *in vitro* couplé au polyéthylène glycol et (iv) étude des effets des tanins condensés purifiés sur les paramètres de fermentation ruminale.

Une enquête préliminaire a été menée et nous a permis de sélectionner sept substrats: quatre arbustes du genre *Acacia* (*Acacia dealbata*, *Acacia horrida*, *Acacia cyanophylla* et *Acacia pycnantha*) et trois sous-produits (les feuilles du palmier dattier, les tiges d'artichaut et l'écorce de grenade). Tous les substrats présentent une teneur élevée en protéines brutes, à l'exception des sous-produits (<100 g/kg de MS) et des concentrations modérées en composants de la paroi cellulaire. La teneur en TC est comprise entre 120,5 et 680,4 g/kg de MS chez les arbustes et entre 23,1 et 170,4 g/kg de MS chez les sous-produits. L'évaluation de l'activité biologique des tanins brutes via la technique de polyéthylène glycol montre que l'ajout de ce dernier a augmenté le volume de gaz produit ainsi que la concentration des différents paramètres fermentaires (méthane (CH₄), ammoniac (NH₃) et les acides gras volatils (AGV)) dans tous les fourrages. Les augmentations les plus élevées ont été enregistrées pour l'espèce *Acacia horrida*. De ce fait, cette espèce a été retenue et ses tanins condensés ont été extraits et purifiés par chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20.

Les tanins purifiés d'*A. horrida* ont été incubés *in vitro* avec deux fourrages différents le foin de luzerne et la paille d'orge à trois concentrations différentes: 50, 100, 150 mg/g MS. Les résultats montrent que les tanins purifiés d'*A. horrida* n'ont eu aucun effet sur les paramètres de fermentation malgré sa teneur élevée en TC. Les effets des tanins d'*A. horrida* peuvent être fortement liés à leur structure et à leur poids moléculaire qu'à leur concentration. Pour cette raison, il serait intéressant de compléter ce travail par la détermination de la structure et du poids moléculaire de ces tanins et par l'étude des interactions tanins-protéines. De plus, des études *in vivo* sur des animaux accoutumés doivent être menées pour évaluer les effets de ces tanins.

Mots clés: *Acacia*, sous-produits, tanins condensés, purification, sephadex LH-20, polyéthylène glycol, production de gaz *in vitro*, méthane, paramètres fermentaires.

Abstract

Tannins are secondary metabolites with high molecular weight which are widely distributed in plants. Their main role is to defend against predatory herbivores and microorganisms. They have various effects on biological systems: they are biological antioxidants, ion chelators and protein precipitation agents. In ruminants nutrition, tannins can reduce the breakdown of food proteins and increase their intestinal absorption via their molecular coating. It is in this context that this thesis work falls, the objective is to highlight this biotechnological path through a set of experimental works: (i) selection of native substrates and by-products rich in tannins, (ii) determination of their composition in macronutrients (minerals, nitrogen and fibers) and in secondary metabolites (total phenols, total tannins, condensed tannins), (iii) evaluation of their biological activity by *the in vitro* gas production method coupled with polyethylene glycol, (iv) study the effects of purified condensed tannins from the substrate having the highest biological activity on the various ruminal fermentation parameters.

An investigation was carried out and allowed to select seven substrates: four shrubs of the genus *Acacia* (*Acacia dealbata*, *Acacia horrida*, *Acacia cyanophylla* and *Acacia pycnantha*) and three by-products (leaves of date palm, artichoke stems and pomegranate bark). All substrates present high crude protein content, except by-products (<100 g/kg DM) and moderate concentrations of cell wall components. The CT content is comprised between 120.5 and 680.4 g/kg DM in shrubs and between 23.1 and 170.4 g/kg DM in by-products. The evaluation of the biological activity of crude tannins via the polyethylene glycol technique shows that its addition increased the volume of gas produced as well as the concentration of the various fermentation parameters (methane (CH₄), ammonia (NH₃) and volatile fatty acids (VFA)) in all forages. The highest increases were recorded for the species *Acacia horrida*. Therefore, this species was retained and these condensed tannins were extracted and purified by chromatography on a Sephadex LH-20 column.

Purified tannins from *A. horrida* were incubated *in vitro* with two different forages, alfalfa hay and barley straw at three different concentrations: 50, 100, 150 mg/g DM. The results show that the purified tannins of *A. horrida* have no effect on the fermentation parameters ($P > 0.05$) despite its high CT content. The effects of *A. horrida* tannins may be strongly related to their structure and molecular weight more than to their concentration. For this reason, it would be interesting to complete this work by determining the structure and molecular weight of these tannins and by studying tannin-protein interactions. Moreover, *in vivo* studies in habituated animals should be conducted to assess the effects of these tannins.

Keywords: Molecular coating, *Acacia*, by-products, *Acacia horrida*, purified tannins, *in vitro* gas production.

ملخص

التانينات هي نواتج أيض ثانوية ذات وزن جزيئي كبير موزعة بشكل واسع في النباتات. دورها الرئيسي هو الدفاع ضد الحيوانات العاشبة المفترسة و الكائنات المجهرية. لها تأثيرات مختلفة على النظم البيولوجية: فهي مضادات أكسدة بيولوجية، ومخَلِّبات الأيونات وعوامل ترسيب البروتين. في تغذية الحيوانات المجترّة يمكن للتانينات أن تقلل من تحلل البروتينات الغذائية والزيادة من امتصاصها المعوي عن طريق تغليفها الجزيئي. في هذا السياق تم إنجاز هذه الأطروحة ، حيث الهدف هو إبراز هذا المسار البيوتكنولوجي من خلال مجموعة من الأعمال التجريبية: (1) اختيار ركائز أصلية و منتجات ثانوية غنية بالتانينات (2) تحديد تكوينها من المغذيات الكبيرة (المعادن والنيتروجين والألياف) والمستقلبات الثانوية (إجمالي الفينولات، إجمالي التانينات، التانينات المكثفة) (3) تقييم نشاطها البيولوجي من خلال طريقة إنتاج الغاز في المختبر بوجود البولي إيثيلين جلايكول (4) دراسة آثار التانينات المكثفة المنقاة من الركيزة ذات النشاط البيولوجي الأعلى على مختلف معاملات التخمر الكمي.

تم إجراء تحقيق وسمح باختيار سبعة ركائز: أربعة شجيرات من جنس أكاسيا (*Acacia dealbata*, *Acacia*) وثلثة منتجات ثانوية (أوراق النخيل، سيقان الخرشوف ولحاء الرمان). تظهر جميع الركائز محتوى عالي من البروتين الخام باستثناء المنتجات الثانوية (>100 غ/كغ مادة جافة) وتركيزات معتدلة لمكونات جدار الخلية . محتوى التانينات المكثفة بين 120.5 و 680.4 غ/كغ مادة جافة في الشجيرات و بين 23.1 و 170.4 غ/كغ مادة جافة في المنتجات الثانوية. يوضح تقييم النشاط البيولوجي للتانينات الخام باستخدام تقنية البولي إيثيلين جلايكول الى أن إضافة هذا الأخير زادت من حجم الغاز المنتج بالإضافة إلى زيادة تركيز مختلف معاملات التخمر الميثان (CH_4) الأمونيا (NH_3) والأحماض الدهنية المتطايرة (AGV). تم تسجيل أعلى الزيادات في النوع *Acacia horrida* . لذلك فهي تمثل الركيزة ذات النشاط البيولوجي الأعلى. لذلك ، تم الاحتفاظ بهذا النوع وتم استخراج التانينات المكثفة بواسطة تنقيته كروماتوجرافيا على عمود Sephadex LH-20.

تم تحضير التانينات المنقاة في المختبر مع اثنين من الأعلاف، قش البرسيم وقش الشعير بثلاثة تركيزات مختلفة 50، 100، 150 مغ/غ مادة جافة. أظهرت النتائج أن التانينات المنقاة من *A. horrida* ليس له تأثير على معاملات التخمر . قد تكون تأثيرات التانينات مرتبطة بشكل قوي ببنيته ووزنها الجزيئي أكثر من تركيزها. لهذا السبب، سيكون من المثير للاهتمام إكمال هذا العمل من خلال تحديد البنية والوزن الجزيئي لهذه التانينات ودراسة التفاعلات بروتين-التانين. بالإضافة إلى ذلك، يجب إجراء دراسات في الجسم الحي على الحيوانات المعتادة لتقييم تأثيرات هذه العفص

الكلمات المفتاحية: التغليف الجزيئي، *Acacia* ، منتجات ثانوية، *Acacia horrida* ، تانينات نقية، إنتاج الغاز في المخبر .

Annexes

Annexe 1

Composition des solutions NDS et ADS

1. Solution NDS (Neutral Detergent Solution)

Solution 1

- Peser 60 g de soduim dodecyl sulfate dans une fiole de 2 L.
- Ajouter 1 L d'eau distillée chaude.
- Ajouter 20 ml d'éther monoéthylique de l'éthylène glycol (C₄H₁₀O₂).

Solution 2

- Peser 13.6 g de tétraborate disodium décahydraté (NA₂B₄O₇.10H₂O) dans un bécher de 500 ml.
- Ajouter 37.2 g d'éthylène diamine tétra acétique disodique dihydraté (EDTA).

Solution 3

- Peser 9.12 g de Phosphate disodique anhydre (Na₂HPO₄) dans un bécher de 500 ml.
- Ajouter de l'eau distillée chaude et agiter.
- Ajouter 22.98 g de Phosphate disodique dihydraté et agiter jusqu'à l'obtention d'une solution transparente.
- Mélanger les solutions 2 et 3 à la solution 1, agiter et porter au trait de jauge le lendemain avec de l'eau distillée. Le pH de la solution doit être compris entre 6.9 et 7.1.

2. Solution ADS (Acid Detergent Solution)

- Remplir une fiole de 2 L d'eau distillée.
- Ajouter 55.4 ml de H₂SO₄ concentré à 96%.
- Verser la quantité lentement par petites fractions dans une fiole préalablement placée dans un évier rempli d'eau froide (mélanger entre les ajouts avec risque d'échauffement).
- Ajouter 40 g de CTAB (Cetyl Triméthylammonium Bromide) (C₁₉H₄₂BrN).
- Après refroidissement complet, porter au trait de jauge avec de l'eau distillée et agiter.

Annexe 2

Composition et préparation de la salive artificielle

1. Solutions nécessaires

Solution de macrominéraux (q.s.p. 1000 ml)

-Na₂HPO₄: 5.7 g

-KH₂PO₄: 6.2 g

-MgSO₄.7H₂O: 0.6 g

Solution de microminéraux (q.s.p. 100 ml)

-CaCl₂.2H₂O: 13.2 g

-MnCl₂.4H₂O: 10.0 g

-CoCl₂.6H₂O: 1.0 g

-FeCl₂.6H₂O: 8.0 g

Solution tampon (q.s.p. 1000 ml)

-NaHCO₃: 35.0 g/l

- (NaH₄) HCO₃: 4 g

Solution indicateur du potentiel d'oxydoréduction (q.s.p. 100 ml)

-Résazurine (C₁₂H₆NO₄): 0.1 g

Solution réductrice

-NaOH (1N): 2 ml

-Na₂S.9H₂O: 258 mg

- H₂O: 47.5 ml

2. Préparation

Les solutions sont mélangées dans l'ordre suivant : Eau distillée : 474.0 ml, la solution de microminéraux : 0.12 ml, la solution tampon : 237.0 ml, la solution de macrominéraux : 237.0 ml, la solution de résazurine : 1.22 ml, la solution réductrice : 50 ml.

Le mélange de solutions est chauffé au bain marie à 39°C et barboté avec un flux continu de CO₂ jusqu'à virage de sa couleur bleue en rose puis au transparent indiquant ainsi sa réduction. A ce moment, le jus de rumen filtré est ajouté avec un rapport (1/3, v/v) avec la salive artificielle. Un barbotage du milieu avec du CO₂ est maintenu pendant 15 min pour garder une atmosphère anaérobie.

Annexe 3

Composition des solutions du dosage de l'azote ammoniacal (N-NH₃)

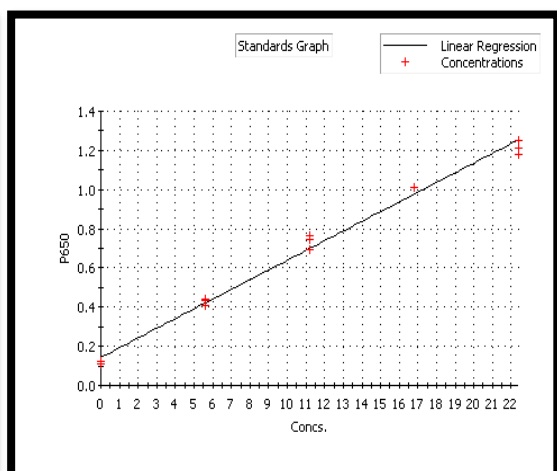
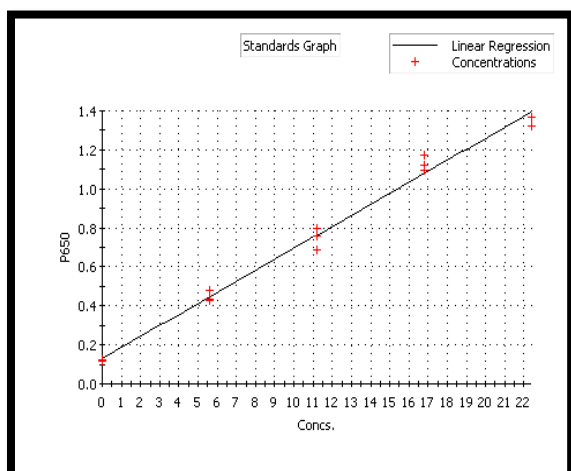
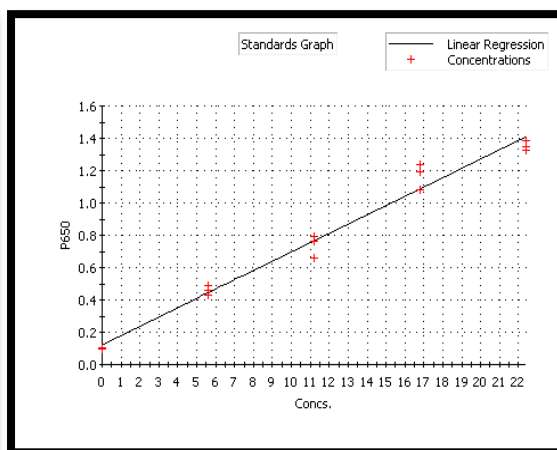
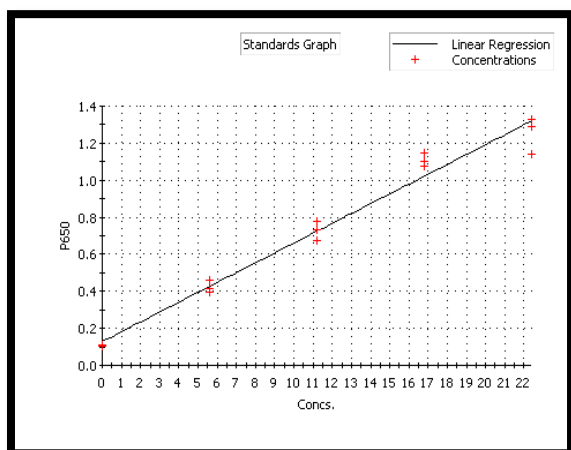
Solution A: 13 g d'hydroxyde de sodium (NaOH) et 4 g d'éthylène diamine tétra acétique disodique (EDTA) dissoutes dans 1000 ml d'eau distillée.

Solution B: 10 g de phénol et 0.057 g de nitroprussiate de sodium dissoutes dans 1000 ml d'eau distillée.

Solution C: 5 g de NaOH et 10 ml de solution d'hypochlorite de sodium dissoutes dans 1000 ml d'eau distillée.

Annexe 4

Courbes étalon de l'azote ammoniacal (N-NH₃)



Annexe 5

Corrélations entre les variables et les facteurs (ACP)

En absence du PEG :

Variable	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Facteur 4	Facteur 5	Facteur 6
GP	0,866902	0,423132	0,241869	0,027057	0,068105	-0,074625
CH ₄	0,922123	-0,274537	-0,124389	-0,068031	0,191507	-0,132452
NH ₃	-0,459138	0,551247	0,602156	-0,283858	0,205278	0,003599
AGV	0,843271	0,266960	0,443985	0,101698	-0,100769	0,002755
C ₂	0,778567	0,360451	0,477140	0,136580	-0,132428	-0,007393
C ₃	0,798395	-0,070118	0,577866	0,032926	-0,136382	0,063532
C ₄	0,947932	0,090979	-0,296031	-0,067624	0,013115	0,027724
C ₂ : C ₃	-0,108186	0,901402	-0,340957	0,233934	0,068705	-0,008578
MAT	-0,825985	-0,111707	0,521430	0,004310	0,016806	-0,181880
NDF	-0,706962	0,600605	-0,030369	0,342183	-0,133971	-0,059320
ADF	-0,508700	0,848713	-0,038132	-0,046931	0,122372	-0,047746
ADL	-0,877749	0,203237	0,131370	-0,222323	-0,345611	0,046038
TP	-0,181336	-0,938948	0,033797	0,256999	-0,113236	-0,074031
TT	-0,176676	-0,975007	0,055784	-0,109140	-0,016557	-0,053390
TCT	-0,603029	-0,498961	0,432651	0,275695	0,323060	0,140824

En présence du PEG :

Variable	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Facteur 4	Facteur 5	Facteur 6
Gaz	0,672430	0,297471	0,641075	0,041906	0,021367	-0,214846
CH ₄	0,314940	0,161048	-0,735100	-0,523788	-0,224729	-0,098223
NH ₃	-0,764436	-0,445534	0,106582	-0,437348	0,054143	-0,107571
AGV	0,804239	-0,015584	0,532151	-0,199401	-0,170946	0,028087
C ₂	0,659143	0,172387	0,638230	-0,125325	-0,331928	0,050919
C ₃	0,807435	-0,346791	0,365456	-0,270816	0,117776	0,083749
C ₄	0,815386	0,137754	-0,553086	-0,045205	0,017209	-0,089024
C ₂ : C ₃	-0,615359	0,598777	-0,002425	0,373231	-0,349840	-0,033240
MAT	-0,604595	-0,631071	0,421748	-0,152294	-0,137394	-0,127561
NDF	-0,946782	0,207243	0,121738	0,068592	-0,202743	-0,005012
ADF	-0,806025	0,463523	0,228923	-0,204715	0,161409	-0,122896
ADL	-0,809921	-0,289203	0,035751	-0,463048	-0,135376	0,162389
TP	0,214410	-0,839110	-0,265706	0,307111	-0,289811	-0,031874
TT	0,306382	-0,907924	-0,264517	0,020891	-0,070333	-0,080321
TCT	-0,310715	-0,823460	0,291630	0,350132	0,132652	-0,011501

Productions Scientifiques

Productions Scientifiques

Publications

Khaoula Khelalfa, Rabah Arhab, Antonio Ignacio Martín-García, Nabila Zaabat, Alejandro Belanche. Effect of *Acacia* purified tannins extract and polyethylene glycol treatment on *in vitro* ruminal fermentation pattern and methane production. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology. Vol. 28 (2): 50-62.

Communications Scientifiques

Khaoula Khelalfa, David R. Yáñez-Ruiz, Alejandro Belanche, Rabah Arhab, Antonio Ignacio Martín-García. Efecto de los taninos condensados purificados de *Acacia horrida* (L.) sobre la metanogénesis en ganado caprino. VII Workshop Remedía At: Lugo (Spain), 27-28 Mars 2019.

Khelalfa Khaoula, Zaabat Nabila, Arhab Rabah. Purification des tanins condensés d'une espèce du genre *Acacia*. VII^{ème} Congrès International de la Société Tunisienne de Biotechnologie et Valorisation de Bio-Ressources. Tabarka, Tunisie, 20-23 Mars 2019.

Khelalfa Khaoula, Arhab Rabah. Extraction et évaluation de la teneur en tanins totaux des espèces du genre *Acacia*. VI^{ème} Congrès International de la Société Tunisienne de Biotechnologie et Valorisation de Bio-Ressources. Tabarka, Tunisie, 20-23 Mars 2018.

