

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

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



N° d'Ordre : 22/D3C/2015
N° de Série : 04/MICB/2015

Thèse

Présentée pour l'obtention du **Diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle LMD**
En Biotechnologies microbiennes, Génomes et Environnement

Par

Hind ZITOUNI

**Valorisation nutritionnelle d'algues marines du littoral Algérien
chez le ruminant via des méthodes chimiques, biologiques et
moléculaires**

Soutenue le 01/07/2015

Devant le Jury

Président:

Mr. BOULAHROUF Abderrahmane Pr. Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie

Directeur de thèse:

Mr. ARHAB Rabah Pr. Université Oum El Bouaghi, Algérie

Examineurs :

Mr. HAMIDECHI Abdelhafid Pr. Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie

Mr. CHERMITI Amor Directeur de recherche, INRA, Tunisie

Mr. DJABRI Belgacem M.C.A. Université de Tébessa, Algérie

Invité :

Mr. BECKERS Yves Pr. Université de Liège, Belgique

Année Universitaire : 2014/2015

Au terme de ce travail, je tiens à remercier mon Directeur de thèse Monsieur ARHAB Rabah, professeur et vice doyen chargé de la post-graduation à l'Université de Oum El Bouaghi, pour m'avoir proposé ce sujet sur la valorisation des macroalgues marines et pour m'avoir dirigée tout au long de la réalisation de ce travail, pour son esprit scientifique, ses précieux conseils et ses encouragements.

C'est avec un grand honneur et un grand plaisir que je remercie Monsieur le Professeur BECKERS Yves Directeur de l'Unité de Zootechnie, Faculté Gembloux Agro Bio-Tech Université de Liège (Belgique), qui m'a ouvert les portes de son laboratoire et m'a fait profiter de ses nombreuses idées et précieux conseils. Je le remercie pour l'accueil qu'il m'a réservé, sa disponibilité sans faille et l'honneur qu'il me fait en venant jusqu'à Constantine évaluer cette thèse.

Je remercie les membres du jury; à commencer par mon enseignant Monsieur BOULAHROUF Abderrahmane Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine, pour avoir accepté de juger ce travail et pour l'insigne honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de ma thèse. Qu'il trouve ici le témoignage de ma haute considération.

Que Monsieur le Professeur CHERMITI Amor, Directeur de recherche à l'INRA Tunisie, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour son amabilité d'avoir accepté malgré ses nombreuses occupations de se rendre à Constantine afin de nous honorer et faire partie du jury d'évaluation de cette thèse.

J'adresse un grand merci à mon enseignant Monsieur HAMIDECHI Abdelhafid professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine, qui me fait le plaisir et l'honneur de juger ce travail. Sa contribution me sera très bénéfique.

Un grand merci à Monsieur DJABRI Belgacem Maître de conférences à l'université de Tébessa qui me fait l'honneur d'examiner ce travail.

Je remercie également Monsieur le professeur BOUSSEBOUA Hacène ancien Directeur du laboratoire de Génie microbiologique et Applications de l'Université des Frères Mentouri Constantine où j'ai effectué mes analyses durant mes premières années de thèse.

J'exprime mes vifs remerciements à mon enseignant Monsieur BENGUEDOUAR Ammar Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine pour ses réponses à mes nombreuses questions et pour ses encouragements depuis le début de ma thèse.

Je tiens également à témoigner ma profonde gratitude à Monsieur MERGHEM Rachid professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine qui m'a ouvert les portes de son laboratoire de Phytochimie durant une période très délicate.

Je remercie Madame RACHED Dalila professeur à l'Université Constantine 3 et directrice du laboratoire de Biologie et Environnement pour les analyses qu'elle m'a permis de réaliser au niveau de son laboratoire et pour les notions qu'elle m'a communiquées pour la réalisation d'alguier et la caractérisation botanique des algues.

Je remercie également Monsieur le professeur FRIHI Houcine spécialiste en biologie marine à l'Université Badji mokhtar de Annaba pour la caractérisation botanique de mes échantillons d'algues et pour les notions qu'il m'a communiquées particulièrement pour le choix des espèces.

Je n'oublie pas de remercier Monsieur CHIRI Karim plongeur professionnel et membre du club de plongée sous marine «Hippone-sub Annaba » pour la collecte des échantillons et leur identification.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur BOUKERROU ancien Directeur de l'Institut Technique des Grandes Cultures à Constantine, pour les échantillons de foin de vesce-avoine.

Mes remerciements vont aussi à certains membres de l'unité de Zootechnie Faculté Gembloux-Agro Bio-Tech de l'Université de Liège: ancien Directeur du laboratoire Monsieur THEWIS André, Ingénieur du laboratoire BOUDRY Christelle, les secrétaires GEAN Geneviève et RUSSO Cécile, et les techniciennes BERA Emilie et MABILLE Sylvie.

Je n'oublie pas de remercier les membres du laboratoire de microbiologie de la Faculté Gembloux-Agro Bio-Tech de l'Université de Liège grâce auxquels j'ai réalisé mes analyses de biologie moléculaire en Particulier Madame STROUBANTS Aurore.

Merci aux deux adorables personnes: Michel Dufrasne et Corinne Bothy, pour leur accueil chaleureux en Belgique, leur gentillesse, leur soutien moral, leurs encouragements et sans qui je n'aurais jamais pu prolonger mon visa et terminer mes analyses.

Je remercie ma très chère maman pour son soutien indéfectible.

Je remercie mon époux pour son soutien moral et ses encouragements au cours de la finalisation de ce travail.

Je remercie mes sœurs et mes beaux frères pour leur soutien et leurs encouragements.

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

Je dédie cette thèse

*A la mémoire de mon Père
qui aimait tant les sciences*

*A ma très chère Mère
Pour tous ses sacrifices,
ses encouragements et à qui,
cette thèse revient en premier*

*A mes deux sœurs pour leur affection et leur soutien
Elles me sont très chères*

*A mes beaux frères
pour leur aide,
leur générosité
et leur disponibilité*

*A mon époux
pour son soutien
et ses encouragements*

*A mes adorables neveux et nièces
pour toutes les joies qu'ils m'apportent*

*A mes grand-mères,
Mes oncles et tantes
Et l'ensemble de m'a famille*

A toutes les personnes qui me sont chères.

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

➤ Publications

▪ Article publié

Zitouni Hind, Arhab Rabah, Boudry Christelle, Bousseboua Hacène, Beckers Yves., (2014). Chemical and biological evaluation of the nutritive value of Algerian green seaweed *Ulva lactuca* using *in vitro* gas production technique for ruminant animals. International Journal of Advanced Research, Volume 2, Issue 4, 916 -925.

➤ Communications scientifiques

▪ Communications orales dans des séminaires internationaux

1). Hind ZITOUNI, R. ARHAB, C. BOUDRY, H. BOUSSEBOUA, Y. BECKERS. Etude des interactions digestives entre deux substrats locaux chez le ruminant. **Les neuvièmes journées scientifiques de la société tunisienne de microbiologie. Hammamet, Tunisie, 15-17 Novembre 2013.**

2). Hind ZITOUNI, R ARHAB, A CHENTLI, Y BECKERS, H BOUSSEBOUA. Suivi de la fermentation *in vitro* de mélanges à base d'algue verte et de foin de vesce avoine en présence de microbiote ruminal. **Les huitièmes journées scientifiques de la société tunisienne de microbiologie. Hammamet, Tunisie, 22-25 Novembre 2012.**

▪ Communications affichées dans des séminaires et congrès internationaux

1). Hind ZITOUNI, R.ARHAB, H. BOUSSEBOUA, C. BOUDRY, Y. BECKERS .Valeur alimentaire d'une Algue verte marine du littoral Algérien chez le ruminant. **Congrès Francophone international (Rencontres, Recherches, Ruminants), Paris, France, 4-5 Décembre 2013.**

2). Hind ZITOUNI, R. ARHAB, C. BOUDRY, H. BOUSSEBOUA, Y. BECKERS. Contribution de l'espèce marine *Ulva lactuca* à la production de méthane par le microbiote ruminal. **Les neuvièmes journées scientifiques de la société tunisienne de microbiologie. Hammamet, Tunisie, 15-17 Novembre 2013.**

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

▪ **Communications affichées dans des séminaires nationaux**

1).Hind ZITOUNI, R.ARHAB, H. BOUSSEBOUA, C. BOUDRY, Y. BECKERS. Effets d'addition d'une algue verte *in vitro* sur le profil fermentaire et l'équilibre des trois principales espèces cellulolytiques du rumen » **19èmes journées nationales de microbiologie, Ouargla, Algérie, 9-10 Décembre 2013.**

2).Hind ZITOUNI, A.CHENTLI, R.ARHAB, S. AMOKRANE, H.BOUSSEBOUA. Evaluation *in vitro* de la fermentation ruminale d'une algue verte *Enteromorpha sp* et de sa mixture avec un substrat conventionnel » **Les 17èmes journées nationales de microbiologie. Sétif, 20-21 Novembre 2011. .**

3). A.CHENTLI, H.ZITOUNI, R.ARHAB, S.AMOKRANE, H.BOUSSEBOUA. Etude *in vitro* des effets associatifs du cactus avec un substrat conventionnel par l'évaluation de l'activité métabolique ruminale. **Les 17èmes journées nationales de microbiologie. Sétif, Algérie, 20-21 Novembre 2011.**

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements.....	I
Dédicaces.....	III
Productions scientifiques.....	IV
Liste des illustrations.....	XIII
Liste des tableaux.....	XV
Liste des abréviations.....	XVII

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

Première partie: Etude bibliographique

Chapitre I: Généralités sur les algues marines, leurs caractéristiques nutritionnelles et leurs applications

1. Définition	5
2. Les bases de la classification des grandes lignées d'algues	6
2.1. La pigmentation.....	6
2.2. Les polysaccharides de réserve.....	6
2.3. Les polysaccharides pariétaux.....	8
3. Les grands groupes des algues marines.....	7
3.1. Les algues vertes (Chlorophycées).....	8
3.2. Les algues brunes (Phéophycées)	8
3.3. Les algues rouges (Rhodophycées).....	8
3.4. Les Cyanobactéries.....	8
4. Facteurs de répartition des algues	8
5. Reproduction des algues.....	9
6. Caractéristiques nutritionnelles des macroalgues marines.....	9
61. Composition chimique.....	9

6.1.1. La fraction minérale.....	11
6.1.2. Les polysaccharides.....	10
6.1.3. Les protéines.....	10
6.1.4. Les lipides.....	11
6.1.5. Les vitamines.....	12
6.1.6. Les caroténoïdes.....	13
6.1.7. Les polyphénols.....	13
6.1.7.1. Les tannins.....	13
A. Les tannins condensés.....	14
B. Les tannins hydrolysables.....	14
C. Les phlorotannins.....	15
7. Production mondiale des algues marines.....	16
8. Applications des Algues marines.....	17
8.1. En alimentation animale.....	17
8.2. En alimentation humaine.....	18
8.3. Dans l'industrie alimentaire.....	19
8.4. En agriculture.....	19
8.5. Dans le domaine pharmaceutique et médical.....	20
8.6. Dans la biotechnologie.....	20
8.7. Dans le traitement des eaux usées.....	20

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

1. Rappels d'anatomie et de physiologie du rumen.....	22
1.1. Anatomie.....	22
1.2. Conditions du milieu.....	23
1.2.1. L'anaérobiose.....	23
1.2.2. Le pH.....	23
1.2.3. La température.....	24
1.2.4. Humidité et pression osmotique.....	24

2. Le microbiote ruminal	25
2.1. Les bactéries fibrolytiques.....	25
2.1.1. Les bactéries cellulolytiques.....	25
2.1.1.1. Les bacilles cellulolytiques.....	26
2.1.1.2. Les coques cellulolytiques.....	27
2.1.2. La digestion de la cellulose par les bactéries cellulolytiques.....	27
2.1.2.1. Adhésion des microorganismes ruminiaux.....	27
2.1.2.2. Mécanisme de digestion de la cellulose.....	28
2.1.3. Les bactéries hémicellulolytiques.....	30
2.1.4. Les bactéries pectinolytiques.....	30
2.2. Les bactéries amylolytiques.....	31
2.2.1. Mécanismes de dégradation de l'amidon par la flore amylolytique ruminale.....	32
2.3. Les bactéries utilisatrices des glucides simples.....	33
2.4. Les bactéries utilisatrices d'acide.....	33
2.5. Les bactéries uréolytiques.....	33
2.6. Les bactéries protéolytiques.....	33
2.7. Les bactéries utilisatrices de lipides.....	34
2.8. Les archaebactéries.....	35
2.9. Les protozoaires.....	36
2.10. Les champignons.....	37
3. Fonctions digestives	38
3.1. Le métabolisme glucidique.....	38
3.2. Le métabolisme azoté.....	40
3.3. Métabolisme des lipides.....	41
3.4. La méthanogénèse.....	41
4. Effets de la composition de la ration sur la population microbienne du rumen	41
5. Techniques de détermination du microbiote digestif	43
5.1. Dénombrement et culture.....	44
5.2. Techniques moléculaires.....	44
5.2.1. Les puces à ADN.....	44
5.2.2. Les empreintes moléculaires.....	44

5.2.3. La PCR quantitative.....	44
5.2.4. Les séquençages.....	46

Deuxième partie: Matériel et Méthodes

1. Enquête et collecte des échantillons.....	47
1.1. Traitement des échantillons.....	49
2. Caractéristiques chimiques des substrats.....	49
2.1. Détermination de la teneur en matière sèche.....	49
2.2. Détermination de la teneur en cendres et en matière organique.....	49
2.2.1. Détermination des teneurs en Phosphore, Soufre et Cobalt.....	50
2.3. Détermination de la teneur en matières azotées totales (Méthode Kjeldahl).....	50
2.4. Détermination de la teneur en matières grasses (Appareil Soxhlet).....	51
2.5. Détermination des composés de la paroi végétale avec appareil automatisé.....	52
2.5.1. Estimation de la fraction NDF (Neutral Detergent Fibre).....	52
2.5.2. Estimation de la fraction ADF (Acid Detergent Fibre).....	53
2.5.3. Estimation de la fraction ADL (Acid Detergent Lignin).....	53
3. Détermination de la teneur en énergie brute avec calorimètre.....	53
4. Analyse phytochimique des composés secondaires.....	54
4.1. Analyse qualitative.....	54
4.2. Analyse quantitative des composés phénoliques.....	54
4.2.1. Préparation de l'extrait.....	56
4.2.2. Analyse des phénols totaux.....	56
4.2.3. Dosage des tanins totaux.....	56
4.2.4. Dosage des tanins condensés proanthocyanidines.....	57
4.2.5. Dosage des flavonoïdes.....	58
5. Fermentations <i>in vitro</i> des substrats par le microbiote ruminal.....	58
5.1. Technique de production de gaz <i>in vitro</i>	58
5.1.1. Principe.....	58
5.1.2. Description des systèmes de fermentation utilisés.....	59

5.1.2.1. Dans des flacons en système automatisé	59
5.1.2.2. Dans des Seringues	59
5.1.3. Préparation de l'inoculum	60
5.1.4. Eléments constitutifs du milieu de culture.....	61
5.1.5. Inoculation et incubation.....	61
5.2. Analyse qualitative des gaz produits.....	62
5.3. Détermination des paramètres cinétiques: Modèle mathématique Groot <i>et al.</i> (1996)	
6. Etude de la digestibilité des substrats	62
6.1. Digestibilité <i>in vitro</i> de la matière sèche.....	62
6.2. Digestibilité <i>in vitro</i> de la matière organique.....	63
6.3. Estimation de l'énergie métabolisable.....	63
7. Détermination des paramètres fermentaires.....	63
7.1. Mesure du pH.....	63
7.2. Dosage de l'azote ammoniacal (N-NH ₃) par spectrophotomètre (UV-Visible).....	63
7.3. Analyse qualitative et quantitative des acides gras volatils par (HPLC).....	64
8. Détermination des activités enzymatiques.....	65
8.1. Estimation de l'activité carboxy-méthylcellulase après fermentation.....	65
8.1.1. Extraction.....	65
8.1.2. Dosage.....	66
8.2. Analyse de la dégradabilité enzymatique de l'azote.....	67
9. Caractérisation du profil microbien après fermentation <i>in vitro</i>.....	68
9.1. Dénombrement des protozoaires (Comptage direct).....	68
9.2. Analyse de la microflore après fermentation par PCR en temps réel.....	69
9.2.1. Extraction d'ADN	70
9.2.2. Réalisation de la PCR en temps réel.....	70
9.2.2.1. Critères de choix des amorces.....	70
9.2.2.2. Conditions PCR.....	71
9.2.3. Expression des résultats.....	71
10. Analyses statistiques.....	73

Troisième partie: Résultats et Discussion

1. Composition chimique des algues et du fourrage	74
1.1. Teneur en matière sèche	74
1.2. Teneur en matières minérales.....	74
1.3. Teneur en matières azotées totales.....	77
1.4. Teneur en lipides.....	78
1.5. Teneur en constituants pariétaux.....	79
1.6. Teneur en énergie brute.....	81
2. Analyses phytochimiques	83
3. Interrelation entre les composés nutritifs et les composés phénoliques	87
4. Aspects nutritionnels	89
4.1. Fermentation <i>in vitro</i> des substrats singuliers algue et fourrage de référence par le microbiote ruminal.....	89
4.2. Fermentation de mélanges d'algue et de fourrage par le microbiote ruminal.....	92
4.2.1. Détermination de l'effet associatif entre l'algue verte et le fourrage de référence.....	93
4.3. Cinétiques de la production cumulative de gaz après 72h de fermentation <i>in vitro</i>	97
4.4. Paramètres cinétiques modélisés de la production de gaz <i>in vitro</i>	99
4.5. Effet de la composition chimique sur la production de gaz.....	102
5. Etude du profil fermentaire	103
5.1. Détermination du pH.....	103
5.2. Production d'azote ammoniacal (N-NH ₃).....	103
5.3. Production des acides gras volatils (AGV).....	106
6. Stœchiométrie des fermentations	109
7. Corrélations entre les composants des substrats et produits métaboliques	113
8. Etude de la digestibilité des substrats	114
8.1. Digestibilité apparente <i>in vitro</i> de la matière sèche et de la matière organique et estimation de l'énergie métabolisable	114
8.2. Dégradabilité enzymatique de l'azote.....	117

9. Caractérisation du profil microbien après fermentation <i>in vitro</i>	120
9.1. Impact de l’algue verte et de ses mixtures sur la population microbienne du rumen...	121
9.1. 1.Caractérisation de la faune ruminale (protozoaires).....	121
9.1.2. Caractérisation de la flore cellulolytique.....	124
9.1.2.1. Influence des substrats sur les trois bactéries: <i>Fibrobacter succinogenes</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> , <i>Ruminococcus albus</i>	125
9.1.2.2. Influence des substrats sur la population des champignons anaérobies totaux.....	131
10. Etude du profil enzymatique: activité spécifique de la carboxy-méthylcellulase (CMCase) après fermentation <i>in vitro</i>	132

Quatrième partie: Conclusions générales et perspectives.....135

Références bibliographiques	142
--	-----

Annexe 1

Annexe 2

Annexe 3

Résumé en arabe

Résumé en français

Résumé en anglais

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structures de la catéchine, de l'épicatéchine et d'une procyanidine dimérique.....	14
Figure 2: Acide gallique, acide ellagique et structures des gallotannins et des ellagitannins.	15
Figure 3: Structure du phloroglucinol (i) et des phlorotannins	16
Figure 4 : Tube digestif des ruminants.....	22
Figure 5: Représentation idéale de la fibre et ses composants (cellulose, microfibrilles, hémicellulose et lignine), dégradés par le complexe cellulose	29
Figure 6: Dégradation de la cellulose par les différentes enzymes cellulolytiques.....	30
Figure 7: Les différentes voies du métabolisme des glucides dans le rumen	39
Figure 8 : Vue générale du métabolisme protéique chez la vache laitière.....	40
Figure 9, A et B : Principe de la qPCR par SYBR Green (A) et par Taqman (B).	45
Figure 10: Algue verte <i>Ulva lactuca</i>	49
Figure 11: Algue brune <i>Halopteris scoparia</i>	49
Figure 12: Courbe étalon des phénols totaux.....	57
Figure 13: Courbe étalon des tanins condensés.....	57
Figure 14: Courbe étalon des flavonoïdes.....	58
Figure 15 : Système de fermentation automatisé	59
Figure 16: Prélèvement di liquide ruminal à partir d'une vache canulée du rumen.....	60
Figure 17: Courbe étalon pour le dosage de l'azote ammoniacal.....	64
Figure 18: Courbe étalon de glucose.....	68

Figure 19: Effets associatifs statistiquement significatifs (Tableau 14) pour des mélanges algue/foin en fonction du temps d'incubation.....	96
Figure 20 : Cinétiques de production de gaz (ml/g MS) des substrats singuliers et des différents mélanges.....	97
Figure 21: Cinétique modélisée du fourrage témoin.....	98
Figure 22: Cinétique modélisée de <i>Ulva lactuca</i>	98
Figure 23: Cinétique modélisée de la mixture M1.....	98
Figure 24: Cinétique modélisée de la mixture M2.....	98
Figure 25: Cinétique modélisée de la mixture M3.....	98
Figure 26: Cinétique modélisée de la mixture M4.....	98
Figure 27: Cinétique modélisée de la mixture M5	98
Figure 28: Production d'AGV totaux à partir des substrats singuliers et des mixtures.....	108
Figure 29: Relation entre la proportion molaire de l'acétate et la production de méthane...	110
Figure 30: Caractérisation de la faune ruminale évaluée par le nombre de protozoaires en fonction du substrat incubé.....	122
Figure 31: Relation entre la prolifération de la faune ruminale et la production de méthane (ml/gMS) lors de la fermentation de l'algue verte et de ses mixtures.....	123
Figure 32: Régression linéaire entre le nombre de protozoaires et le N-NH ₃	124
Figure 33: Abondance relative des principaux microorganismes cellulolytiques après 24h de fermentation <i>in vitro</i>	130
Figure 34: Activité enzymatique spécifique des substrats singuliers et de leurs mixtures...	133

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des principales lignées d’algues (Reviere, 2002).....	7
Tableau 2: Production mondiale de macroalgues marines (FAO, 2010)	17
Tableau 3 : Algues autorisées pour l’alimentation humaine (Burtin, 2003)	19
Tableau 4 : Caractéristiques botaniques et phénotypiques des algues marines collectées dans la région d’Annaba.....	48
Tableau 5: Composition de la salive artificielle utilisée lors de la fermentation ruminale, <i>in vitro</i> (Tampon Menke et Steingass, 1988).....	61
Tableau 6 : Composition des solutions A et B pour le dosage de l’azote ammoniacal.....	64
Tableau 7: Composition de la solution MFS (Ogimoto et Imai, 1981).....	65
Tableau 8 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées.....	72
Tableau 9: Teneur en matière sèche (g/Kg), composition chimique (g Kg ⁻¹ MS) et contenu en énergie brute (MJ Kg ⁻¹ MS) des échantillons.....	75
Tableau 10: Teneurs en phosphore, soufre et cobalt des échantillons étudiés.....	76
Tableau 11: Analyses phytochimiques et contenu en composés phénoliques (g/kg MS) des algues marines collectées de la région de Annaba et du fourrage de référence.....	84
Tableau 12: Matrice de corrélation entre les composés phénoliques, les constituants pariétaux et la teneur en azote des substrats étudiés.....	98
Tableau 13: Production cumulative de gaz (ml/g MS) des substrats singuliers et des mixtures, en utilisant du liquide ruminal d’animaux standardisés.....	90
Tableau 14 : Différence (%) entre la production cumulative de gaz observée et théorique de mixtures à base d’algue verte et de fourrage.....	94
Tableau 15: Paramètres cinétiques déduits du modèle de (Groot <i>et al.</i> , 1996) après 72h de fermentation des substrats singuliers et des mixtures en utilisant du liquide ruminal d’animaux standardisés.....	100
Tableau 16 : Mesure du pH, dosage de l’azote ammoniacal (N-NH ₃) et estimation des protéines microbiennes (PM) après fermentation <i>in vitro</i> des substrats singuliers et des mixtures.....	104
Tableau 17 : Acides gras volatils totaux (mmoles/g MS), proportions molaires des AGV (%) et ratio molaire des substrats singuliers et des mixtures.....	107
Tableau 18 : Stœchiométrie de la production de gaz <i>in vitro</i> (ml/g MS) des substrats singuliers et des mixtures après 72 h de fermentation.....	112

Tableau 19: Détermination de la digestibilité apparente de la matière sèche et de la matière organique et prédiction de l'énergie métabolisable des mixtures analysées.....	116
Tableau 20: Evaluation de la dégradabilité enzymatique des substrats après 1heure de réaction.....	119
Tableau 21: Evaluation de la dégradabilité enzymatique de l'azote après 24 heures de réaction.....	119
Tableau 22: Effet des substrats sur l'abondance relative des principales bactéries cellulolytiques et des champignons anaérobies totaux par PCR en temps réel et sur le nombre des protozoaires après 24h de fermentation comparativement au calibrant.....	128
Tableau 23: Corrélations entre les protozoaires, les bactéries cellulolytiques, les champignons et l'activité carboxy-méthylcellulasique.....	134

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A: Acétate

AC: Activité cellulasique

ACP: Allophycocyanines.

ADDM : Digestibilité apparente de la matière sèche

ADF: Acid Detergent Fiber (Fibre végétale résistante au détergent en milieu acide)

ADL: Acid Detergent Lignin (Lignine résistante au détergent en milieu très acide)

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADNr : Acide désoxyribonucléique ribosomique

ADS: Acid Detergent Solution

AGV: Acides Gras Volatils

AOMD : Digestibilité apparente de la matière organique

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

B : Butyrate

BSA: Sérum albumine bovine

C2: Acide acétique/acétate

C3: Acide propionique/propionate

C4: Acide butyrique/butyrate

CBM: Carbohydrate binding module

CBP : Cellulose Binding Protein

CH₄ :Méthane

CO₂ : Dioxyde de carbone

CP : Crude protein (protéines brutes)

CT : Cendres totales

CT : Threshold cycle (nombre de cycles)

DE: Dégradabilité enzymatique

EE : Extrait éthéré

EPA: L'acide eicosapentaénoïque

FC : contenu en flavonoïdes

GE: Gross energy (Energie brute)

GT: Gaz total

MAT : Matières azotées totales

MM : Matière minérale

MO : Matière organique

MS : Matière sèche

N: azote

NDF: Neutral Detergent Fiber (Fibre végétale résistante au détergent en milieu neutre)

NDS: Neutral Detergent Solution

NFC: Non fibrous carbohydrates (carbohydrates non structuraux)

NH₃ : Ammoniac

P : Propionate

PC : phycocyanine

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PDI : Protéines digérées dans l'intestin

PE : phycoérythrine

PE : Prise d'essai

PF : Poids frais

PIA : protéines intestinales d'origine alimentaire

PS: Poids sec

PVPP : Polyvinylpyrrolidone

TP: Phénols totaux

TT: Tanins totaux

TCT: Tanins condensés totaux

INTRODUCTION

L'environnement marin est un écosystème rendu unique en raison de la diversité des organismes qu'il abrite. Parmi ses organismes, les algues font preuve d'une incroyable richesse. De nouvelles espèces sont identifiées perpétuellement et des projections estimaient que les 36 000 espèces répertoriées ne représentaient en fait que 17% des 200 000 espèces supposées existantes (Radmer, 1994).

L'Algérie est un pays avec une face maritime s'étalant sur 1200 Km. L'étude de la flore algale d'Algérie a fait l'objet d'un certain nombre de travaux (Tebbal, 2011). Les premières études remontent à la fin du 19^{ème} siècle auxquelles se sont ajoutées celles de Perret Boudouresque et Séridi (1989). En regroupant tous les taxons et stades d'algues signalés sur les côtes Algériennes (d'Ouest en Est), plus de 468 taxons ont été inventoriés à partir de la compilation des travaux anciens et récents sur la communauté algale de l'Algérie. Selon Séridi (2007), la flore algale de l'Algérie reste peu étudiée. En adoptant la méthode phytosociologique, cet auteur signale que le nombre d'algues a légèrement augmenté (497 espèces). Cependant, ces travaux algologiques sont essentiellement de type inventaire floristique. D'autres études orientées sur l'aspect écologique ont été réalisées par Ould Ahmed (1994) dans la région d'Arzew (à l'Ouest d'Alger) et par Kadari-Méziane (1994) dans la baie de Bou-Ismaïl. Par ailleurs, des contributions d'ordre chimique ont porté sur l'extraction et la purification des alginates chez *Cystoseira sp.* des côtes algériennes (Benchabanne 1988;1989) et sur la détermination des stérols d'une algue rouge (El Hattab- Bouzidi, 2003).

Les algues marines sont utilisées dans le monde depuis des millénaires par les populations littorales pour leurs hautes valeurs nutritives. En effet, elles ont des potentialités nutritionnelles très riches. Ceci se justifie par: la présence d'une fraction minérale variée et abondante, qui constitue un apport important de macroéléments et oligoéléments, des protéines en quantités non négligeables, en général bien équilibrées en acides aminés, un contenu vitaminique varié où la plupart des vitamines sont représentées, une fraction lipidique faible mais, cependant, dans certaines espèces riche en acides gras polyinsaturés et un contenu en fibres ayant des structures variées et originales différentes des fibres des végétaux terrestres.

Les algues constituent aujourd'hui un enjeu majeur de développement économique. Les principales substances extraites sont les polysaccharides de la famille des agars, des carraghénanes et des alginates dont les propriétés physicochimiques, gélifiantes ou stabilisantes intéressent de nombreux secteurs industriels. Les domaines agroalimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques ou textiles en ont valorisé près de 8 millions de tonnes en (2003).

Depuis plusieurs années un regard particulier est porté sur la recherche de nouvelles substances d'intérêts biotechnologiques. Ainsi, sur le marché pharmaceutique et cosmétique, 30% des substances actives ont été développées à partir de substances naturelles dont 10 % ont été isolées à partir d'organismes marins.

La valorisation de la biomasse algale est considérée parmi les programmes internationaux les plus intéressants dans l'exploitation du milieu marin. En outre, c'est devenu une application de routine dans certains pays en tant que complément en alimentation animale, plus particulièrement en alimentation des ruminants. Arieli *et al.* (1993) ont montré que l'algue verte *Ulva lactuca* est un complément alimentaire intéressant pour les moutons mais pas pour les volailles. Ventura et Castanon. (1998) ont affirmé qu'il s'agit d'un substrat de qualité moyenne pour les chèvres avec une haute teneur en protéines. Hansen *et al.* (2003) ont estimé que les algues *Laminaria digitata* et *Laminaria hyperborea* peuvent être utilisées comme source alternative dans l'alimentation des petits ruminants sous certaines conditions. Rjiba Ktita *et al.* (2010) ont conclu que les algues *Ruppia maritima* et *Chaetomorpha linum*, peuvent être utilisées comme aliment de remplacement pour les agneaux, particulièrement en période de sécheresse. Mora Castro *et al.* (2009), ont suggéré l'incorporation de la *Kelp* à un certain seuil comme complément alimentaire non conventionnel.

La qualité de la nutrition est un facteur clé de tout système d'élevage des ruminants qui se veut efficace. Ces derniers doivent recevoir tous les éléments nutritifs essentiels en quantités optimales. Cependant, plusieurs facteurs sont impliqués et sont largement responsables des situations de carence. En effet, en Algérie, la croissance démographique accrue, les conditions climatiques difficiles caractérisées par des précipitations qui accusent une grande variabilité mensuelle et surtout annuelle (Djellouli, 1990), la qualité médiocre des sols et leur dégradation constante, ont contribué à diminuer fortement l'autosuffisance alimentaire entraînant une surexploitation des ressources génétiques naturelles. Cette situation a conduit à l'importation de produits agricoles (espèces et variétés) à haut potentiel génétique dans leur pays d'origine, qui n'ont pas toujours donné les rendements escomptés et ont même été la cause de la négligence, voire l'oubli des variétés locales (Arbouche *et al.*, 2008). Le contexte alimentaire chez les ruminants dans le pays se caractérise par une offre fourragère insuffisante tant qualitativement que quantitativement. En outre, l'analyse de la balance fourragère a permis de mettre en exergue la persistance d'un déficit fourrager estimé à 22% pour l'année (2001) et 32% en (2006), dû à la dégradation des parcours steppiques (Aidoud, 2006). Mais, ces moyennes recèlent des disparités régionales importantes.

En effet, l'analyse selon les diverses zones agro-écologiques montre que les déficits sont beaucoup plus prononcés dans les zones littorales, steppiques et sahariennes avec des taux respectifs de 58%, 32% et 29% (Deghnouche, 2011). Ce déficit fourrager a des répercussions négatives sur la productivité des animaux et se traduit par un recours massif aux importations de produits animaux à l'instar des produits laitiers et carnés. De ce fait, le recours à d'autres sources s'avère indispensable. Ainsi, l'usage de substrats non conventionnels présente un intérêt majeur pour le développement de l'élevage local.

Les ruminants sont des animaux capables de valoriser l'énergie des végétaux mobilisée dans leurs composés celluloseux alimentaires. Pour cela, ils dépendent entièrement de l'activité métabolique du microbiote ruminal, implanté essentiellement dans leur rumen, car à l'instar des autres mammifères ils ne possèdent pas d'enzymes digestives capables de digérer la cellulose. Ainsi, le potentiel de valorisation de substrats conventionnels ou non conventionnels peut, et devrait, être préalablement déterminé par une estimation des aptitudes fermentaires du microbiote ruminal à leur égard, en amont des études zootechniques.

La valeur nutritive des aliments des ruminants est classiquement déterminée par la teneur de leurs composants chimiques, ainsi que par leur vitesse et leur ampleur de dégradation (Getachew *et al.*, 1998). La méthode de base par excellence pour évaluer cette activité métabolique est la digestibilité *in vivo*. Elle représente le processus de dégradation entier (digestion et absorption des aliments), ayant lieu dans le tractus digestif de l'animal. Mais, elle est lourde et longue à mettre en œuvre et onéreuse. De même, qu'elle est largement inadaptée à l'évaluation d'aliments singuliers et donc inapte à l'estimation routinière de la valeur nutritive des aliments. Alternativement, les méthodes *in vitro* (production de gaz *in vitro* et dégradation *in sacco*), simulant une partie de ce processus digestif, offrent l'avantage d'être peu coûteuses, rapides et faciles à réaliser. De plus, elles sont fortement associées à la composition en éléments nutritifs des substrats, déterminée par les procédés chimiques (Blümmel and Orscov, 1993; Menke and Steingass, 1988; Menke *et al.*, 1979).

Dans ce contexte, ce travail de recherche vise à explorer une voie de valorisation jusque-là jamais entreprise en Algérie comme alternative alimentaire locale. Cette tentative est encouragée pour surmonter le déficit de fourrage dans l'alimentation du bétail et/ou améliorer la qualité des rations de base du cheptel local. L'originalité de notre travail se trouve dans le fait d'explorer un écosystème marin en ciblant la macroflore algale d'une côte algérienne. À notre connaissance, les macroalgues marines n'ont jusque-là jamais été exploitées par la communauté scientifique

algérienne dans l'alimentation des ruminants. Pourtant, leur richesse nutritionnelle incontestable en fait un substrat tout à fait valorisable et très prometteur pour les ruminants.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la caractérisation nutritionnelle de deux algues collectées de la région d'Annaba: Algue verte (*Ulva lactuca*) et Algue brune (*Halopteris scoparia*), en analysant leurs composés primaires et secondaires et en déterminant leur métabolisation *in vitro* en présence de microbiote ruminal. De plus, l'association algue verte/foin est étudiée en se basant sur les produits fermentaires (gaz, azote ammoniacal, acides gras volatils), la digestibilité et l'activité enzymatique. Dans un second volet, nous caractérisons le profil microbien associé particulièrement, la faune ruminale (protozoaires), les principales bactéries cellulolytiques et les champignons anaérobies totaux.

La présentation de ce travail est organisée en quatre parties :

La première est scindée en deux chapitres. Le premier présente des généralités sur les algues marines, leurs caractéristiques nutritionnelles et leurs applications. Le second est consacré à la composition du microbiote ruminal avec une présentation des différentes réactions (hydrolyses, fermentations..) produites et une présentation des techniques de détermination du microbiote digestif.

La seconde partie a pour objet la présentation du matériel biologique utilisé, les méthodes d'étude et d'expression des résultats, ainsi que les méthodes d'analyses statistiques employées.

Dans la troisième partie, les résultats sont exposés et discutés en les comparant à ceux publiés dans la littérature scientifique internationale.

Enfin, dans les conclusions générales, nous tentons de mettre en avant les points importants apportés par ce travail, ainsi que de futures perspectives.

PREMIÈRE PARTIE
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

GÉNÉRALITÉS SUR LES ALGUES MARINES, LEURS CARACTERISTIQUES NUTRITIONNELLES ET LEURS APPLICATIONS

1. Définition

Les algues regroupent un ensemble de végétaux photosynthétiques très divers et dont l'appareil végétatif relativement simple est appelé «thalle». Celui-ci contient une structure à sa base (rhizoïdes, crampons, disques...) permettant l'ancrage de l'algue sur un support: une roche (algues épilithes), ou une plante (algues épiphytes), ou un animal (algues épibiontes) ou parfois même le sable. Le thalle présente une grande diversité de formes allant de lames simples à des structures plus complexes semblables à des tubes, des tiges et des feuilles ou encore des boules remplies d'eau. La texture est également très variée: certaines algues sont gélifiées, voir de texture cartilagineuse ou spongieuse. Le nombre et le type de ramifications (insertion, organisation et hiérarchisation de ces ramifications par rapport à l'axe principal) sont des critères importants pour identifier les algues. Enfin, certaines algues présentent un thalle très rigide, suite à l'accumulation de carbonate de calcium ou aragonite, dans les parois de leurs cellules. Certaines algues rouges sont même presque entièrement calcifiées et forment des croûtes aussi dures que les rochers leur servant de support.

Les cellules des algues possèdent les mêmes éléments de structure que celles des plantes supérieures. Elles ont une paroi cellulaire partiellement cellulosique, des petits noyaux et des plastes pigmentés ou chromatophores (comportant de la chlorophylle souvent masquée par des pigments surnuméraires qui donnent aux thalles des couleurs (Garon-Lardiere, 2004).

Elles ont des formes et des dimensions très variables. Certaines sont microscopiques et d'autres mesurent plusieurs mètres de longueur, mais elles ont toutes des caractères communs. Elles sont essentiellement aquatiques dans les eaux douces ou marines, et certaines vivent sur la neige ou la glace des régions polaires et des hautes montagnes. D'autres au contraire supportent dans les eaux des sources thermales des températures élevées (algues thermophiles). Elles comprennent 20 000 à 30 000 espèces dans le monde, soit 18% du règne végétal (Ramade, 2009).

2. Les bases de la classification des grandes lignées d'algues

De nombreux critères écologiques, physiologiques ou biochimiques interviennent dans la phylogénie des algues comme les structures cellulaires, le mode de nutrition, l'habitat ou même la nature et la localisation des pigments et glucanes de réserve. Malgré une extrême diversité et complexité structurale, tant d'un point de vue macroscopique que microscopique, les algues peuvent néanmoins être classées en une dizaine d'embranchements (Reviers, 2002) selon des critères basés sur leurs compositions pigmentaires, leurs polysaccharides de réserve ou des caractéristiques structurales.

2.1. La pigmentation

Les pigments ont dès le début du 19^{ième} siècle constitué un critère important dans la classification des algues. Le rôle physiologique de ces molécules est de capter l'énergie lumineuse. Selon la nature des pigments surnuméraires associés à la chlorophylle, les plastes sont parfois verts (Chlorophytes), parfois jaunes ou bruns (Chromophytes), ou encore rouges (Rhodophytes) (Ruiz, 2005).

2.2. Les polysaccharides de réserve

Les polysaccharides ou glucanes sont des polymères de glucides qui résultent du mécanisme photosynthétique. Il en existe deux familles, les polysaccharides de réserve et les polysaccharides pariétaux. Il existe des glucanes de réserve solubles en solution dans les vacuoles et d'autres insolubles qui forment des grains observables en microscopie. Composés de D-glucose, les glucanes de réserve se rencontrent sous deux formes: liés en (α -1,4) ils appartiennent à la catégorie des amidons et liés en (β -1,3), ils font parti de la catégorie des laminarines (Ruiz, 2005).

2.3. Les polysaccharides pariétaux

La classification des grandes familles d'algues repose également sur la nature chimique des colloïdes qu'elles produisent à la périphérie de leurs cellules (Mc Candless, 1978).

La paroi des cellules végétales est parfois considérée par les biologistes comme un organite à part entière. La paroi des algues diffère significativement de celles des autres organismes végétaux par son organisation et sa composition. Elle peut être interprétée comme étant généralement une structure biphasique, composée d'une phase fibrillaire cristalline squelettique

et d'une phase matricielle dont les structures de compositions variables selon les espèces, sont parmi les plus complexes connues dans la nature (Mc Neil *et al.*, 1984).

Ainsi, malgré leur extrême diversité et complexité tant structurale que morphologique, il est possible de réaliser, sur la base de caractères chimiques, une classification des principales lignées d'algues (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques des principales lignées d'algues (Reviere, 2002)

Embranchements	Types de Chlorophylles	Caractéristiques	
		Phycobiliprotéines	Polysaccharides de réserve
Bacillariophyta	a, c	-	Chrysolaminarane
Chlorophyta	a, b	-	Amidon intraplastidial
Chrysophyta	a, c	-	Chrysolaminarane
Cryptophyta	a, c	PE	Amidon périplastidial
Cyanophyta	a	PC, PE	Glycogène
Dinophyta	a, c	-	Amidon cytoplasmique
Euglenophyta	a, b	-	Paramylon cytoplasmique
Phaeophyta	a, c	-	Laminarane, mannitol
Rhodophyta	a, d	PC, PE, APC	Amidon floridéen
Xantophyta	a, c	-	Chrysolaminaranes

PC: phycocyanine; **PE:** phycoérythrine; **ACP:** allophycocyanines.

3. Les grands groupes des algues marines

En général, les algues regroupent quatre groupes qui sont différenciées par rapport à la couleur, Chaque groupe contient des classes, et chaque classe contient des centaines d'espèces (Garon-Lardiere, 2004).

3.1. Les algues vertes (Chlorophycées)

Elles sont de formes très variées, uni-ou pluricellulaires. Leurs plastes sont colorés en vert par les chlorophylles a et b, auxquelles sont associés des carotènes et des xanthophylles. La photosynthèse permet la formation d'amidon, comme pour les plantes supérieures, la plupart des algues vertes vivent en eau douce ou en milieux marins, mais certaines espèces peuvent

également se développer sur terre. Elles jouent un rôle important dans l'oxygénation des eaux, favorisant ainsi la vie animale (Garon-Lardiere, 2004).

3.2. Les algues brunes (Phéophycées)

La couleur brune de ces algues résulte de la dominance du pigment xanthophylle, la fucoxanthine, qui masque les autres pigments (chlorophylle a et c, ainsi que le bêta-carotène). Toutes possèdent une structure pluricellulaire, mais leurs dimensions varient depuis les éléments microscopiques jusqu'aux très grands spécimens. La grande majorité des algues brunes sont marines (Garon-Lardiere, 2004).

3.3. Les algues rouges (Rhodophycées)

Les rhodophytes ou algues rouges forment un groupe très diversifié. Ces algues doivent leur couleur à la présence de plastes roses dans lesquels un pigment rouge, la phycoérythrine, est associé à plusieurs autres pigments dont les chlorophylles. La plupart de ces algues rouges sont pluricellulaires et marines, mais il existe quelques formes unicellulaires et quelques unes vivent également en eau douce. Les algues rouges sont divisées en deux groupes: celui des Bangiophycées (qualifiées de primitives) et celui des Floridéophycées (plus complexes). Elles se distinguent généralement par leur cycle de reproduction particulièrement complexe (Garon-Lardiere, 2004).

3.4. Les Cyanobactéries

Les cyanobactéries ou les algues bleues sont constituées des colonies de taille, de forme et de couleur très variables. Comme les algues rouges, elles possèdent des pigments surnuméraires bleus (Phycocyanines) et rouges (Phycoérythrines) qui masquent la chlorophylle a. En dépit de leur nom ancien d'algues bleues, elles sont rarement bleues mais plus souvent rouges, vertes avec des reflets bleutés, violets, bruns, jaunes ou orangés. La plupart d'entre elles ont une consistance gélatineuse voire gluante en raison des mucilages qu'elles sécrètent (Garon-Lardiere, 2004).

4. Facteurs de répartition des algues

Les algues sont liées à l'eau et peuvent dès lors s'installer dans tous les types d'habitat suffisamment humides et éclairés. On peut les retrouver en eau douce, en mer, sur sol humide et même sur la neige. Les algues étant photosynthétiques, elles sont dépendantes

de la présence de la lumière. Aussi, les algues nécessitent d'être fixées à un substrat, par conséquent, la texture, le degré de cohésion et la nature chimique du substrat ont une importance sur la répartition spatiale des espèces (Schaechter, 2009).

5. Reproduction des algues

Dans de très nombreux cas, la reproduction des algues s'effectue par multiplication végétative. Il s'agit d'une multiplication sexuée qui consiste en la division d'une cellule isolée (cas des algues bleues), soit en une fragmentation de thalle aboutissant à la formation de plusieurs organismes identiques. Elle est souvent réalisée par la formation de cellules spécialisées: les spores. Les algues eucaryotes réalisent en plus une reproduction sexuée au cours de laquelle l'union de deux cellules reproductrices, ou gamètes, produit un œuf, ou zygote. La reproduction des algues se déroule ainsi selon une alternance de phases de reproduction asexuée assurée par les thalles (sporophytes), et de phases de reproduction sexuée, assurée par des thalles producteurs de gamètes (gamétophytes)(Garon-Lardiere, 2004).

6. Caractéristiques nutritionnelles des macroalgues

6.1. Composition chimique

Les algues ont des potentialités nutritionnelles très riches, ceci se justifie par: la présence d'une fraction minérale variée et abondante qui constitue un apport important de macroéléments et oligoéléments, par la présence de protéines en générale bien équilibrées en acides aminés et présentes en quantités non négligeables dans certaines espèces, par un contenu vitaminique varié où la plupart des vitamines sont représentées, par une fraction lipidique faible mais cependant, dans certaines espèces riche en acides gras polyinsaturés et enfin par leur contenu en fibres ayant des structures variées et originales différentes des fibres des végétaux terrestres.

La composition chimique des macroalgues marines varie suivant plusieurs facteurs: L'espèce, le stade de maturité, l'habitat naturel et les conditions environnementales (Kaimoussi *et al.*, 2004; Ortiz *et al.*, 2006).

6.1.1. La fraction minérale

Les algues puisent dans la mer une richesse incomparable d'éléments minéraux très variés. La teneur en minéraux varie entre 8 et 40% (MacArtain *et al.*, 2007; Mabeau and Fleurence, 1993).

Cette fraction minérale offre d'abord une grande diversité: macroéléments comme le sodium, calcium, magnésium, potassium, chlore, soufre, phosphore, mais également oligoéléments tels que l'iode, le fer, le zinc, le cuivre, le sélénium, le molybdène, ainsi que bien d'autres oligoéléments comme le fluor, le manganèse, le bore, le nickel, le cobalt.

Selon certains auteurs, les trois phylla d'algues (brunes, vertes, rouges) sont à peu près équivalente en quantités de matières minérales totales, on peut noter cependant un petit avantage pour les algues brunes et rouges (Marfaig, 2004).

6.1.2. Les polysaccharides

Les algues constituent des sources importantes de polysaccharides de (33 à 61%) ayant des structures variées et originales, différentes des fibres des végétaux terrestres. Du point de vue nutritionnel, la majorité des polysaccharides algaux sont représentés par des polysaccharides non digestibles, excepté pour l'amidon chez les algues vertes et le floridoside chez les algues rouges (Marfaing, 2004).

Selon ce même auteur, parmi les polysaccharides insolubles (21 à 40% des polysaccharides totaux), on trouve une fraction cellulosique, présente en faible proportion chez les trois phylla ainsi que de l'amidon floridéen, notamment chez les algues rouges.

D'une manière générale, hormis la cellulose, les structures chimiques précises des polysaccharides insolubles restent très mal connues. Plus intéressante, la fraction des polysaccharides solubles représente de (51% à 56%) des polysaccharides totaux chez les algues vertes et rouges, de (67 à 87%) chez les algues brunes. La nature de ces polysaccharides solubles est variable en fonction de phylum considéré:

- Les polysaccharides solubles des algues rouges sont les agars, carraghénanes, xylanes
- Les polysaccharides solubles des algues brunes sont les laminaranes, alginates et fucanes
- Les polysaccharides solubles des algues vertes sont constitués par les ulvanes.

6.1.3. Les protéines

La teneur en protéines des algues marines varie fortement entre les espèces et dépend des saisons et des conditions environnementales (Dawczynski *et al.*, 2007; De Oliveira *et al.*, 2009).

Généralement, la fraction protéique des macroalgues brunes est faible (3 à 15% de la matière sèche) comparée à celle des macroalgues vertes et rouges (10-47% de la matière sèche) (Arasaki et Arasaki, 1983 in Fleurence, 1999).

La plupart des macroalgues brunes industriellement exploitées (*Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* et *Himanthalia elongata*) ont une teneur en protéines plus faible que 15 % (MS) excepté pour l'espèce *Undaria pinnatifida* (Wakamé) qui possède un niveau protéique variable de (11 à 24%) (MS) (Fleurence, 1999).

Chez certaines macroalgues telles que les espèces appartenant au genre *Ulva*, la teneur en protéines peut représenter de 10 à 26 % de la MS. L'espèce *Ulva pertusa*, qui est fréquemment consommée sous le nom de "aonori" au Japon, possède un niveau protéique élevé entre 20 et 26% (MS) (Fleurence, 1999). L'espèce *Ulva lactuca* présente une teneur en protéines qui varie de 7,7 à 22,2% de MS (Chermiti *et al*, 2003).

Les teneurs protéiques élevées sont enregistrées chez les macroalgues rouges telles que *Porphyra tenera* (47 % de MS) ou *Palmaria palmata* (35% de MS) (Fleurence, 1999). Ces algues connues sous les noms de nori et dulse respectivement, possèdent une fraction protéique comparable du point de vue quantitatif, à celles des légumineuses (ex, soja) (Fleurence, 1999).

La teneur en protéines des algues marines dépend aussi des périodes saisonnières. Une étude annuelle au niveau protéique de *Palmaria palmata* (Dulse) a montré que sa teneur en protéines peut varier de 9 à 25% de la MS. Les contenus protéiques élevés sont observés durant les périodes de fin d'hiver et de printemps et les faibles quantités sont observées durant les mois d'été (Fleurence, 1999).

6.1.4. Les lipides

La teneur lipidique est très faible et varie de 1 à 3% de la matière sèche. Du point de vue qualitatif, les lipides des algues diffèrent de ceux des végétaux terrestres. Ils présentent une proportion en acides gras essentiels supérieure et les acides gras insaturés sont prédominants (Darcy-vrillon, 1993).

Les algues vertes dont la composition en acides gras est la plus proche de celle des végétaux supérieurs ont par rapport à ceux-ci, une teneur beaucoup plus élevée en acide oléique (C18:1) et en acide alpha-linolénique (α 3-C18:3).

Les algues rouges contiennent des taux élevés d'acides gras polyinsaturés à 20 carbones. L'acide eicosapentaénoïque (EPA) en particulier constitue 50% des acides gras polyinsaturés chez *Porphyra sp.* et *Palmaria palmata* (Marfaig, 2004).

L'étude de la fraction lipidique de l'algue brune *Cystoseira sedoïdes* des cotes algériennes, a montré une multitude d'acides gras de C12 à C20, parmi lesquels se distinguent les acides gras saturés et insaturés (Benchabane, 1989).

6.1.5. Les vitamines

Les travaux concernant les teneurs en vitamines de différentes algues marines sont peu nombreux. Schiewer (1970) a mené une étude sur les proportions vitaminiques de plusieurs algues de la mer baltique, il a démontré des différences non significatives entre les trois groupes d'algues (brunes, vertes et rouges). Cependant, des variations en vitamines chez une même espèce sont très élevées pour trois raisons :

- L'état de développement annuel,
- L'influence du lieu de prélèvement,
- Variations annuelles saisonnières, maxima estival, minima hivernal.

Selon Marfaig (2004), la composition vitaminique des algues est très intéressante, malgré de grandes variations saisonnières.

Les principales vitamines sont:

-Vitamine B12: Les algues contiennent une proportion non négligeable en vitamine B12, contrairement aux plantes terrestres qui en sont complètement dépourvues. Les travaux les plus récents semblent indiquer que la vitamine B12 des algues est bien bio disponible.

-Vitamine C: La vitamine C est présente en quantités importantes dans certaines algues vertes et brunes, à des taux variant entre (500 et 3000mg/Kg sec) alors que les algues rouges ont des teneurs en vitamine C de l'ordre de (100 à 800 mg/Kg sec).

-Vitamine E: Les algues brunes sont plus riches en vitamine E que les algues vertes et rouges. Parmi les algues brunes, les teneurs les plus élevées sont observées chez les Fucales (*Ascophyllum* et *Fucus sp.*) qui contiennent entre (200 et 600 mg de tocopherols/Kg sec).

6.1.6. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont de puissants antioxydants. Les algues brunes sont particulièrement riches en caroténoïdes et notamment en fucoxanthine, β -carotène et violaxanthine.

Les principaux caroténoïdes des algues rouges sont le β -carotène, α -carotène et leurs dérivés dihydroxylés : zeaxanthine et lutéine. La composition en caroténoïdes des algues vertes reste voisine de celle des plantes supérieures : Les principaux caroténoïdes présents sont le β -carotène, la lutéine, la violaxanthine, l'antheraxanthine, la zeaxanthine, et la neoxanthine.

Un grand nombre d'études a démontré les propriétés antioxydantes des caroténoïdes algaux et le rôle qu'ils jouent dans la prévention de plusieurs pathologies liées au stress oxydatif (Okuzumi *et al.*, 1993; Yan *et al.*, 1999 in Marfaing, 2004).

6.1.7. Les polyphénols

Certaines algues marines contiennent des polyphénols appelés aussi phlorotannins. Ces derniers constituent un groupe très hétérogène de molécules selon leur structure et leur degré de polymérisation, fournissant ainsi une grande variété d'activités biologiques potentielles. Les teneurs les plus élevées sont retrouvées dans les algues brunes et varient entre 5 et 15% du poids sec (Marfaing, 2004).

6.1.7.1. Les tanins

Les tanins sont des polyphénols naturels qui, à l'origine, sont connus pour leur capacité à précipiter les alcaloïdes et les protéines. Selon Bate-Smith (1973): « Les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre (500 et 3000 Da) et qui ont à coté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine, et d'autres protéines». Même si cette définition reste valable, elle a été complétée grâce aux méthodes récentes d'analyse qui ont permis d'éclaircir la structure de ces polyphénols. Ainsi, les tanins sont désormais définis comme des polyphénols de masse moléculaire allant jusqu'à 20000Da (Haslam, 1989; Hagerman, 2002). Les tanins peuvent, selon leurs caractéristiques structurales, être divisés en trois classes:

A. Les tanins condensés : Nommés également proanthocyanidines, les tanins condensés sont des oligomères et des polymères de flavonoïdes. Les plus connus sont les procyanidines qui sont des chaînes de catéchine et/ou d'épicatéchine liées par des liaisons



carbone-carbone en 4-6 ou 4-8 (Figure1) (Haslam, 1975; Porter, 1989). En général, les tanins condensés ont des poids moléculaires plus élevés que ceux des tannins hydrolysables (Hagerman, 1992).

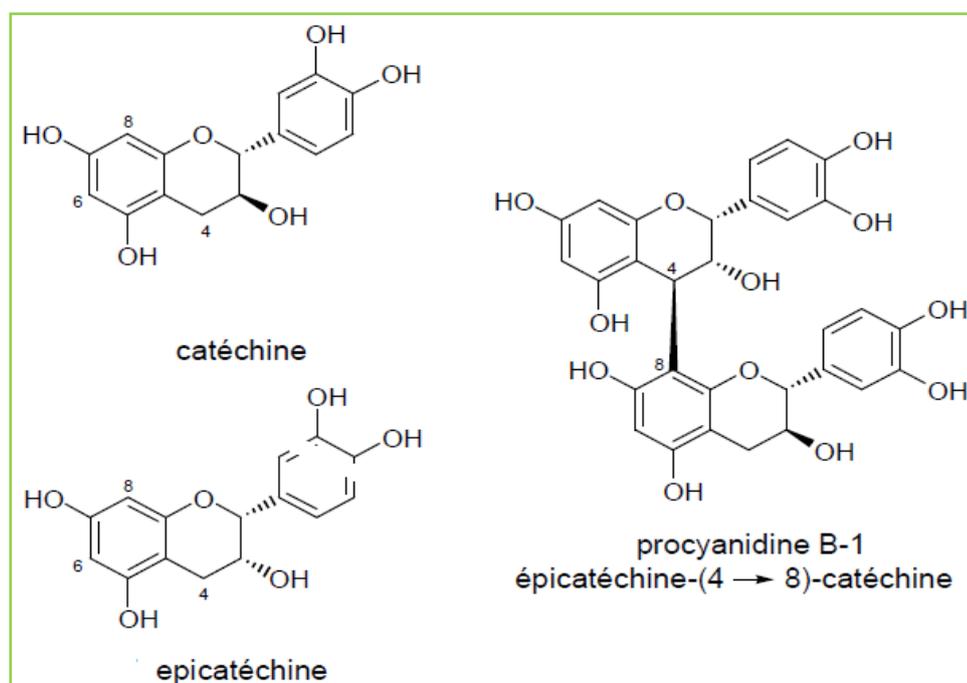


Figure 1. Structures de la catéchine, de l'épicatéchine et d'une procyanidine dimérique

B. Les tannins hydrolysables : Les tannins hydrolysables sont des oligo ou polyesters d'un sucre, en général le glucose, et de molécules d'acide-phénol (Jean-Blain, 1998; Bruneton, 1999; Mueller-Harvey, 2001). Ils sont classés selon la nature de l'acide-phénol: les tannins galliques possèdent un acide gallique, alors que les tannins éllagiques ont un acide hexahydroxyphénique (Hagerman, 2002). Le terme tannins hydrolysables indique leur sensibilité à l'hydrolyse acide. Ils sont notamment hydrolysés dans le tractus digestif des ruminants et leurs produits de dégradation sont absorbés. Ils peuvent être responsables d'intoxications, lors d'ingestion trop massive, et provoquent des lésions hépatiques et rénales, décrites chez les ovins (Zhu *et al.*, 1992) ou les bovins (Plumlee *et al.*, 1998).

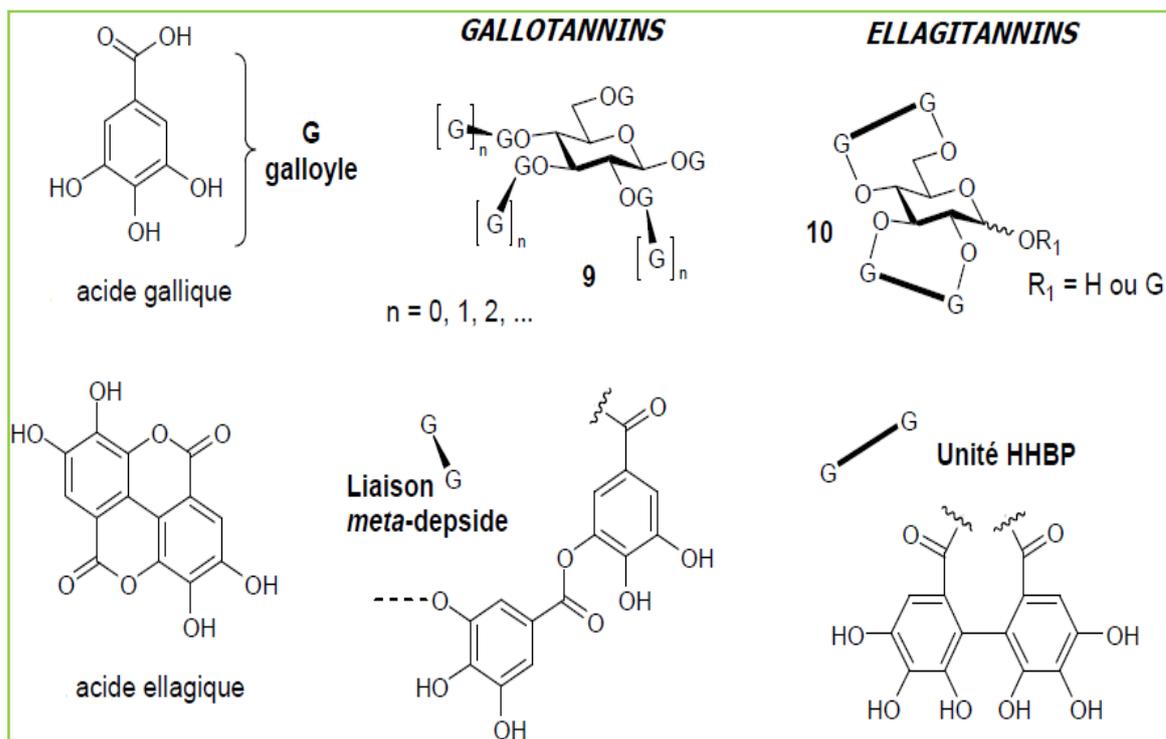


Figure 2: Acide gallique, acide ellagique et structures des gallotannins et des ellagitannins

C. Les phlorotannins : Chez les algues brunes (Phaeophyceae), le seul groupe de tannins présent est représenté par les phlorotannins. Ce sont des composés chimiques aromatiques uniques dans le monde végétal. Du fait de leur rôle d'antioxydants naturels, ces composés suscitent beaucoup d'intérêts pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives. Il s'agit de polymères de phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene) (Figure 3). Ils peuvent constituer jusqu'à 15% du poids sec des algues brunes (Ragan and Glombitza, 1986; Targett and Arnold, 1998). La relation entre les substances phénoliques et le phloroglucinol dans les algues brunes a été mentionnée en premier par Crato (1893) et ont par la suite été confirmés par Ragan. (1976). Le poids moléculaire des phlorotannins varie entre 126 Da et 650 KDa, mais le plus souvent ils se rangent entre (10 et 100KDa) (Boettcher and Targett, 1993; Mc Clintock and Baker, 2001).

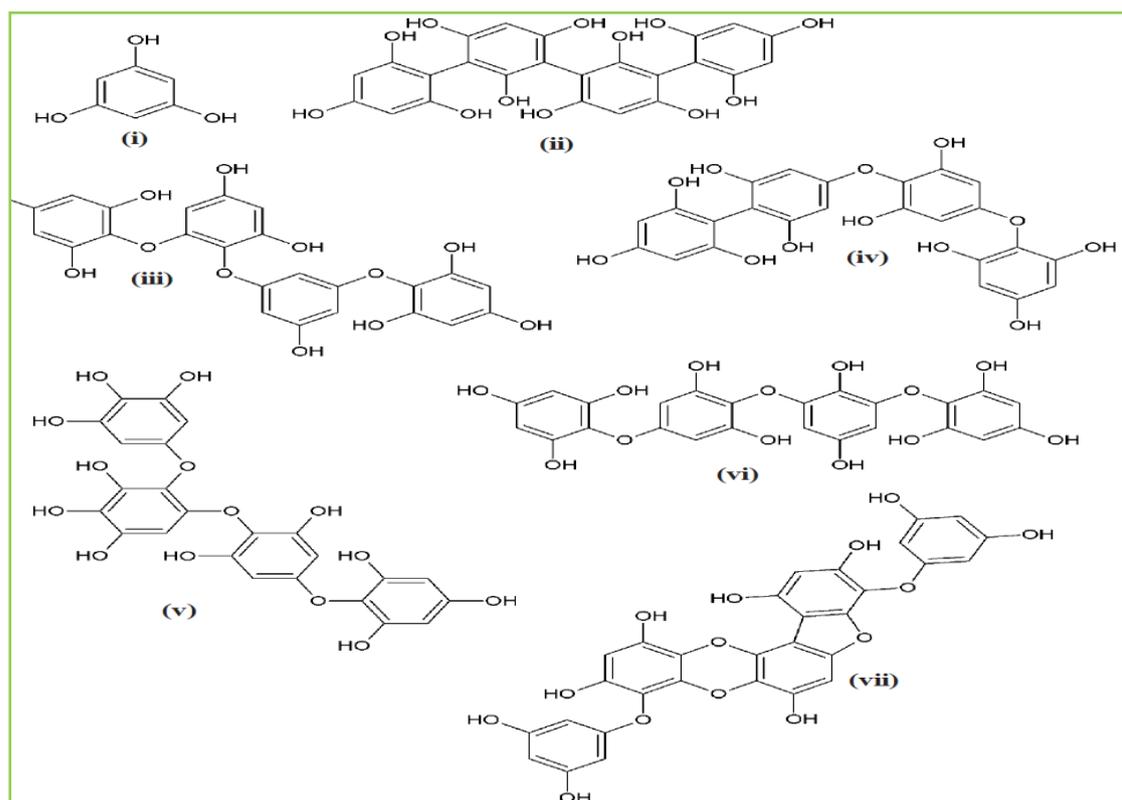


Figure 3: Structure du phloroglucinol (i) et des phlorotannins [tetrafucol A (ii), tetraphlorethol B (iii), fucodiphlorethol A (iv), tetrafuhalol A (v), tetraisofuhalol (vi), phlorofucofuroeckol (vii)] ((Ragan and Glombitza, 1986).

7. Production mondiale des algues marines

La quantité de macroalgues transformées annuellement dans le monde est de plus de 15,8 millions de tonnes (poids frais) soit 23% de toute la production aquacole et représente une valeur marchande de 7,4 Milliards de dollars US en 2008. La culture a bénéficié d'une expansion cohérente en production depuis 1970 avec un taux de croissance annuel moyen de 7,7 % (FAO, 2010). Approximativement 220 espèces sont cultivées.

Les producteurs principaux sont la Chine, l'Indonésie et les Philippines qui, à eux seuls, totalisent les quatre cinquièmes de la production. Cette production est majoritairement destinée à l'alimentation humaine directe (76,1%), à l'extraction des métabolites (11,2 %), le reste est exploité dans différents secteurs: l'alimentation animale et l'agriculture (FAO, 2010). L'ampleur de la consommation directe est due aux pays asiatiques.

L'algue y est présente depuis des millénaires et constitue même, sous certaines formes, un produit très prisé grâce à ses propriétés organoleptiques. Les Japonais consomment actuellement 1,6kg d'algues (poids sec) par an et par habitant (Fleurence, 1999).

Tableau 2: Production mondiale de macroalgues marines (FAO, 2010)

Région	Pays	Quantité (tonnes/poids frais) (2008)
Asie de l'Est et du Sud - Est	Chine	9 922 400 (62,8 %)
	Indonésie	2 164 600 (13,7%)
	Philippines	1 674 800 (10,6%)
	République de Corée	932 200 (5,9%)
	Japon	458 200 (2,9%)
	RPD-Corée	442 400 (2,8%)
	Amérique latine	Chili
Afrique	Tanzanie. Madagascar, Afrique du Sud	14 700 (0,093%)
Europe	Russie, France, Espagne	864

8. Applications des Algues marines

Il existe plusieurs domaines économiques qui font appel à des algues ou à des phycocolloïdes. Elles présentent actuellement une source nutritionnelle et un produit à valeur montante, surtout en Asie où elles sont utilisées directement comme aliments, ou indirectement surtout par l'industrie de phycocolloïdes (agars et alginates). Elles sont utilisées en agriculture comme engrais et fourrage, dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique, dans le textile, et dans bien d'autres domaines (Chopin, 1997).

8.1. En alimentation animale

Sur de longues périodes, les animaux (ovins, bovins et équidés) qui vivaient en zones côtières consommaient des macroalgues brunes, surtout dans les pays où celles-ci étaient rejetées sur le rivage, d'ailleurs l'algue rouge *Palmaria palmata* était appelée « goémon à vache ». Les premiers essais de supplémentation de la ration alimentaire d'animaux d'élevage ont fait apparaître une bonne acceptabilité, une bonne digestibilité et une bonne assimilation des algues.

Aujourd'hui, la disponibilité de macroalgues pour animaux s'est accentuée avec la production de farines. Les macroalgues utilisées en alimentation comme *Ascophylum nodosum* et

Laminaria digitata fraîchement coupées, sont broyées en fines particules et séchées. Leur analyse a montré qu'elles contenaient des quantités importantes de minéraux, oligoéléments et vitamines. Les oligo-éléments qui sont des éléments essentiels requis pour les mammifères à de petites quantités tels que le fer, le zinc, cobalt, chrome, molybdène, nickel, fluor et iode (Chouikhi, 2013).

Leurs avantages (Chouikhi, 2013):

- Augmentent la teneur en iode des volailles et des œufs.
- Augmentent la production laitière chez les vaches de 6,8% à 13%.
- Les brebis nourries aux macroalgues maintiennent leur poids beaucoup mieux durant la période hivernale et donnent une plus grande production de laine.
- Stimulent le système immunitaire de certains animaux.
- En aquaculture, la nourriture habituellement se compose de déchets de viande et de poissons mélangés avec des additifs secs contenant des nutriments supplémentaires (macroalgues), pour former une masse pâteuse servant à la préparation des granulés. L'addition de macroalgues leur permet de ne pas se désagréger ou de se dissoudre.

8.2. En alimentation humaine

Les algues sont consommées en Asie depuis l'aube de l'humanité. En Occident, cette consommation directe d'algues est plus marginale et plus récente. Elles ont été récemment approuvées pour une consommation humaine (comme légumes et condiments), ouvrant ainsi de nouvelles opportunités pour l'industrie agro-alimentaire (Mabeau et Fleurence, 1993).

Ces macroalgues contiennent des protéines, lipides, vitamines et minéraux et constituent donc une source d'aliment précieuse (Sanchez-Machado *et al.*, 2004; Noziah and Ching, 2000; Wong and Cheung, 2000). Environ 75% de la production d'algues produites mondialement (8 millions de tonnes d'algues fraîches) est destinée à l'alimentation humaine directe. Aujourd'hui, 14 macroalgues et microalgues alimentaires sont autorisées à la vente dans certains pays (tableau 2).

Tableau 3 : Algues autorisées pour l'alimentation humaine (Burtin, 2003)

Type	Nom
Algues brunes	<i>Ascophyllum nodosum</i> <i>Fucus vesiculosus</i> <i>Fucus serratus</i> <i>Himantalia elongata</i> <i>Undaria pinnatifida</i>
Algues rouges	<i>Porphyra umbilicalis</i> <i>Palmaria palmata</i> <i>Gracilaria verrucosa</i> <i>Chondrus crispus</i>
Algues vertes	<i>Ulva spp.</i> <i>Enteromorpha spp.</i>
Microalgues	<i>Spirulina sp.</i> <i>Odontella aurita</i>

Cette habilitation des algues en alimentation s'est accompagnée de la mise en place d'une réglementation visant à assurer la sécurité du consommateur.

8.3. Dans l'industrie alimentaire

L'algue en alimentation fait cependant partie du quotidien de l'homme, mais de façon discrète, utilisée pour ses propriétés technologiques et ceci depuis le début des années soixante. Agar, Alginate et carraghénanes sont ainsi devenus des ingrédients incontournables de l'industrie agroalimentaire (Marfaing, 2004).

Les algues rouges sont la source d'agar et de l'agarose. Les genres *Gelidium*, *Gracilaria*, *Acanthoptelid* et *Pterocladia* sont les principaux producteurs de ces matériaux (Chouikhi, 2013). Le mucilage extrait à chaud de ces algues donne après purification, déshydratation et broyage la poudre d'agar-agar utilisée essentiellement pour gélifier un grand nombre de produits alimentaires mais aussi les milieux de culture pour les microorganismes ou les cultures *in vitro* (Choikhi, 2013).

8.4. En agriculture

Depuis longtemps les populations littorales fertilisaient leurs terres à l'aide macroalgues surtout avec les grandes algues brunes qui sont recueillies généralement au niveau des plages, puis lavées et coupées.

Les effets des macroalgues comme fertilisants diffèrent selon l'algue utilisée. En général, ce n'est pas dû seulement aux composants chimiques de l'algue et à la valeur nutritionnelle de l'algue, mais aussi aux propriétés physiques des polysaccharides de l'algue lesquels aident à améliorer la structure du sol (Kim, 1970).

L'emploi des fertilisants naturels devrait permettre une diminution de la quantité d'engrais chimiques et des traitements phytosanitaires classiques polluant le sol ou/et la récolte (Pérez, 1997).

8.5. Dans le domaine pharmaceutique et médical

Plusieurs composés chimiques isolés des macroalgues sont biologiquement actifs dont certains possèdent une activité pharmacologique efficace (Rorrer and Cheney, 2004). Une étude sur l'isolement et la détermination de la structure chimique de nouveaux métabolites secondaires pouvant présenter des activités biologiques à potentialités pharmacologiques a été réalisée à partir de deux algues méditerranéennes *Cystoseira crinita* (Phéophycée) et *Lyngbya majuscula* (Cyanophycée) (Praud, 1994).

Aujourd'hui, environ 4000 nouveaux métabolites ont été isolés à partir de divers organismes marins et jusque dans les années 1990, ce sont les algues qui ont le plus intéressé les chercheurs (Praud, 1994).

8.6. Dans la biotechnologie

Le processus biotechnologique des macroalgues marines a trois éléments: La cellule et le développement de culture cellulaire, la conception de photobioréacteur, et l'identification des stratégies pour obtenir la biosynthèse de métabolites secondaires (synthèse biomimétique) (Rorrer and Cheney, 2004). L'ingénierie biotechnologique (biomoléculaire) des macroalgues marines pour la production de ces composés est un domaine nouveau émergeant de la biotechnologie marine. Les Rhodophycées contiennent une protéine particulière appelée phycoérythrine (PE) qui est déjà utilisée dans les applications biotechnologiques comme colorant ou teinture dans des réactions d'immunofluorescence (Fleurence, 1999).

8.7. Dans le traitement des eaux usées

La technique dite de lagunage représente une alternative économique et efficace à des systèmes de traitement (les rejets des villes, de l'industrie, des fermes aquacoles, des entreprises agricoles). La capacité des algues à absorber les nutriments issus d'élevages piscicoles a été démontrée à partir de cultures d'algues en bassin (Cohen et Nori, 1991).

L'intérêt de l'utilisation des macroalgues pour le traitement des eaux usées en eau salée a été démontré dès la fin des années 70 dans des mélanges d'eau usée et d'eau de mer (Guist et Humm, 1976). De plus, la biomasse algale formée est potentiellement valorisable, notamment pour l'alimentation des poissons. Toutefois, les milieux riches en azote comme les effluents des fermes piscicoles, où les macroalgues sont utilisées comme biofiltres, peuvent augmenter leur teneur en protéines (Lahaye *et al.*,1991).

CHAPITRE 2: Dynamique des aliments et du microbiote dans le rumen

1. Anatomie et physiologie du rumen

1.1. Anatomie

Le rumen est de loin le plus volumineux des réservoirs gastriques. Il a un volume de 150 litres chez un bovin adulte, pour un poids vide proche de 7Kg. 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. La continuité des fermentations ruminales est assurée par le réticulum qui sert également de tamis, retenant les particules trop grandes dans le rumen, tout en permettant aux petites de poursuivre leur transit vers l'omasum.

Dans le réticulo-rumen sont absorbés la majeure partie des acides gras volatils (AGV) résultant de la dégradation des glucides et une partie de l'ammoniac. L'omasum exerce une fermentation additionnelle et retient une partie de l'eau qui imprègne les aliments dans les premiers compartiments. C'est dans l'abomasum que la digestion proprement dite commence, sous l'effet des enzymes digestives de l'hôte (Papova,2011).

Finalement les nutriments sont acheminés au niveau de l'intestin, qui chez les ruminants est caractérisé par sa grande longueur et par l'existence d'un colon spiralé. Dans les intestins, la digestion est complétée et les éléments nutritifs (acides aminés d'origine microbienne et alimentaire, oses, acides gras) qui en résultent sont absorbés. Caecum et colon, constituent, après le rumino-réticulum, un deuxième compartiment où a lieu la fermentation microbienne. Au niveau du gros intestin sont absorbés l'eau, des sels minéraux, mais aussi les AGV synthétisés au niveau du caecum (Papova, 2011).

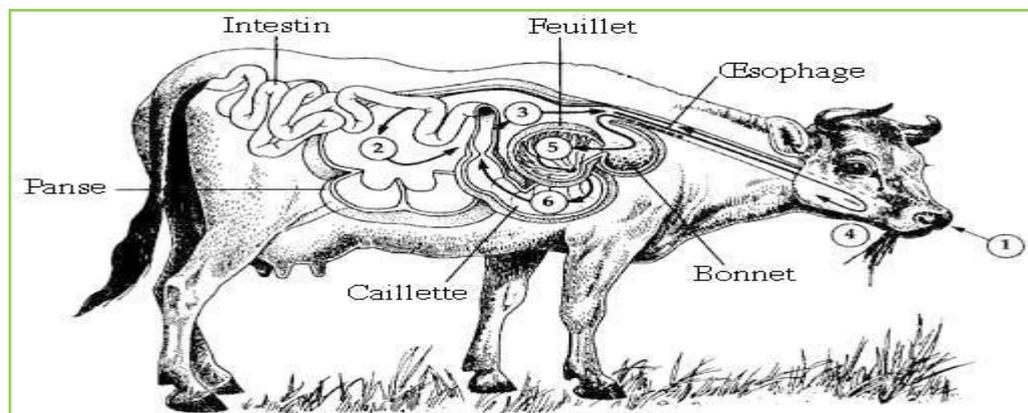


Figure 4 : Tube digestif des ruminants

1.2. Conditions du milieu

Le développement des microorganismes du rumen est directement dépendant des conditions physicochimiques du milieu.

1.2.1. L'anaérobiose

Le milieu ruminal est caractérisé par des conditions d'anaérobiose vraie. Les apports d'oxygène sont faibles (déglutition, diffusion à partir des vaisseaux des parois). Des souches de bactéries aérobies facultatives le font disparaître.

Stewart et Bryant rapportent que Samah et Wimpenny ont démontré la présence d'une NADH-oxydase soluble, supposée réduire l'oxygène en eau ou en H_2O_2 . Le superoxyde produit dans cette réaction serait par la suite métabolisé par une superoxyde dismutase, de sorte que l' O_2 ne représente pas 1% des gaz du sac dorsal. La teneur en CO_2 est toujours élevée (60% de la poche des gaz), celles en CH_4 de 27%, 7% en N_2 , et 0,2% en H_2 (Tiret, 2001). La majeure partie est éliminée par éructation. Une partie est incorporée dans divers métabolismes bactériens.

Le milieu ruminal est de ce fait très réducteur, et le métabolisme des microorganismes qu'il héberge, est de type fermentaire, ce qui permet la libération de composés organiques (acétate, lactate, butyrate, propionate), et non pas de gaz carbonique et d'eau comme dans le cas de la respiration (Brugère, 1983).

1.2.2. Le pH

Le pH a un rôle prédominant dans la sélection des microorganismes du rumen et dans l'orientation des fermentations. La valeur du pH du rumen est normalement comprise entre 5,5 et 7,3. Cette marge est cependant un peu large. Le pH normal ne correspond pas à la neutralité au sens physico-chimique 7,0.

Dans le rumen en fonctionnement, il apparaît des acides gras volatils (AGV), et il est normal que la réaction soit légèrement acide (par exemple de 6 à 6,8). Autour de ces valeurs, le pH peut varier sans qu'il y ait parallèlement de troubles, mais cela n'est pas pour autant la normalité. Les causes de variations les plus fréquentes du pH sont les fluctuations alimentaires. Le pH baisse dans la période postprandiale et s'élève pendant le jeûne. Les éléments responsables du pH du rumen sont, pour les acides: les AGV et l'acide lactique produits par les fermentations, et pour les bases, les bicarbonates et les phosphates de la salive, ainsi que, le cas échéant, l'ammoniac venant de la protéolyse ou de l'uréolyse.

Compte tenu des quantités de ces éléments et de la valeur du pH, le pouvoir tampon est assuré essentiellement par les bicarbonates. Ceux-ci sont apportés par la salive (un bovin adulte sécrète chaque jour environ 100 litres de salive riche en bicarbonates, à pH = 8). Le pouvoir tampon n'est pas une constante. Il dépendra en grande partie de l'alimentation (qui stimule plus ou moins la production salivaire). Le pouvoir tampon est maximal dans la zone de (pH <6), ce qui indique que le contenu ruminal est plus apte à maintenir sa constance dans la zone de légère acidité où il se trouve dans les conditions habituelles (Brugère, 1983).

1.2.3. La température

La température ruminale est supérieure d'au moins un degré par rapport à la température centrale, c'est-à-dire comprise entre 39,5°C et 40°C. Elle peut atteindre 41°C lorsque les fermentations sont très intenses mais aussi chuter de plusieurs degrés après ingestion de grandes quantités d'eau froide: de 5 à 10°C pour une à deux heures. Les conséquences de cette chute de température sont très faibles (Dehority, 2003).

1.2.4. Humidité et pression osmotique

L'humidité est en moyenne élevée de l'ordre de 85%; néanmoins cette valeur n'est pas homogène dans l'ensemble du rumen. La partie supérieure contient les éléments les plus grossiers, la partie inférieure les particules de petite taille baignant dans un milieu très liquide. L'eau du rumen représente une masse liquidienne plus importante en quantité que l'eau plasmatique et elle peut être utilisée, le cas échéant, comme réserve pour l'organisme. L'imbibition et la désagrégation progressive des particules alimentaires s'effectuent à la faveur des contractions régulières de la paroi ruminale et des cycles méryciques. Les apports hydriques sont assurés par l'eau ingérée et par une intense salivation (Brugère, 1983). La pression osmotique varie avec l'ingestion et l'abreuvement (Giger-Reverdin *et al.*, 1997).

2. Le microbiote ruminal

Le rumen accueille un microbiote anaérobie, complexe et très diversifié: plus de 200 espèces de bactéries (10^{10} à 10^{11} bactéries par ml), des archaebactéries (10^7 à 10^9 par ml), des protozoaires (de 10^4 à 10^6 par ml), des champignons (entre 10^3 et 10^5 zoospores par ml) et 10^7 à 10^9 particules de virus bactériophages par ml (Klieve and Swain, 1993; Mackie *et al.*, 2000).

La flore ruminale se caractérise par son extrême diversité, le nombre d'espèces bactériennes colonisant le rumen étant important, et présentant des activités enzymatiques variées. Les bactéries seules représentent environ 50% de la biomasse microbienne rumen (Fonty and Chaucheyras-Durand, 2007). Elle est composée essentiellement de bactéries anaérobies strictes non sporulées.

La population bactérienne du rumen a fait l'objet de nombreuses études au cours des 40 dernières années. Plusieurs études ont décrit l'isolement et l'identification d'un nombre important de souches bactériennes provenant de ruminants d'âge, de statut sanitaire, de localisation géographiques et soumis à des régimes différents. Néanmoins, ces descriptions ne permettent pas de refléter la distribution des espèces bactériennes dans le rumen, les méthodes de cultures bactériennes ne permettant l'isolement que d'une faible fraction d'espèces ruminales.

L'introduction de nouvelles techniques, comme l'analyse des séquences des ARN ribosomiaux (ARNr16S) à permis d'évaluer la diversité génétique et les relations phylogénétiques entre les microorganismes sans avoir recours aux techniques de cultures bactériennes. Les bactéries ruminales ont été classifiées en quatre groupes, en fonction de leur environnement:

- (1) les bactéries vivant libres, associées à la phase liquide ruminale;
- (2) les bactéries associées avec les particules alimentaires;
- (3) les bactéries associées à l'épithélium ruminal ;
- (4) les bactéries attachées à la surface des protozoaires (Czerkawski, 1988).

2.1. Les bactéries fibrolytiques

2.1.1. Les bactéries cellulolytiques

Deux types de bactéries cellulolytiques sont présents dans le rumen: des bacilles, parmi lesquels sont majoritairement isolés: *Fibrobacter succinogenes* et *Butyrivibrio fibrisolvens* et des coques, représentés par *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus*. Les bactéries *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* sont connues pour être les principales espèces cellulolytiques trouvées dans le rumen (Forsberg *et al.*, 1997).

La population cellulolytique représente selon les études entre 4 et 9% de la population bactérienne du rumen (Michalet-Doreau *et al.*, 2001), et peut même représenter jusqu'à 17% de cette population (Martin *et al.*, 2001).

L'utilisation d'outils de biologie moléculaire donne des indications permettant de déterminer la composition quantitative de la flore cellulolytique. Ainsi, selon Martin *et al.* (2001), ainsi que selon Weimer *et al.* (1999) la population des *Ruminococci* (incluant *R. albus* et *R. flavefaciens*) issus de rumen de vaches laitières était plus importante que celle de *F. succinogenes*, avec, dans l'étude de (Martin *et al.*, 2001), une prédominance de *R. albus*, alors que, chez le mouton *F. succinogenes* est l'espèce cellulolytique majoritaire ou au moins présente en quantité équivalente aux *Ruminococci* (Michalet-Doreau *et al.*, 2001).

2.2.1.1. Les bacilles cellulolytiques

Deux types de bactéries cellulolytiques en bâtonnets peuvent être trouvés en quantité importante dans le rumen. Il s'agit de *Fibrobacter succinogenes* (anciennement *Bacteroides succinogenes*) et de *Butyrivibrio fibrisolvens* (Hungate, 1966). *Fibrobacter succinogenes*, décrite par la première fois par Hungate en 1950 sous le nom de *Bacteroides succinogenes* (Stewart and Bryant, 1988) est aujourd'hui considérée comme l'une des principales bactéries cellulolytiques (Forsberg *et al.*, 1997).

Ses principaux substrats sont la cellulose, la cellobiose, et le glucose, alors que certaines souches fermentent également l'amidon, la pectine, le maltose et le lactose; les principaux produits de la fermentation étant l'acétate et le succinate (Stewart and Bryant, 1988), ainsi que, en moindre quantité, de l'isovalérate, du propionate et du formate.

L'autre bacille cellulolytique souvent découvert dans le rumen est *Butyrivibrio fibrisolvens*. C'est l'une des espèces bactériennes prédominantes dans le rumen, et a été isolée à partir de contenus ruminiaux dilués au $1/10^{8\text{ème}}$. Par ailleurs, *B. fibrisolvens* fermente un grand nombre de sucres, avec des variations importantes en fonction des souches considérées. Ainsi, dix neuf souches cellulolytiques ont été isolées de rumen de moutons, recevant des fourrages de mauvaise qualité (Stewart and Bryan, 1988). Ses principaux produits de fermentation sont le formate, le butyrate et l'acétate.

En culture axénique, *B.fibrisolvens* présente normalement une activité cellulolytique inférieure à celles de *F. succinogenes* et des ruminocoques, bien que ceci puisse être dû à une perte d'activité liée aux manipulations en laboratoire. L'importance de *B. fibrisolvens* dans la digestion des fibres est mal définie, si son activité est moindre par rapport aux autres bactéries fibrolytiques, le nombre important de souches de *B. fibrisolvens* détectées dans la flore associée aux fibres suggère l'importance de cette espèce bactérienne dans les mécanismes de la digestion fibrolytique.

2.1.1.2. Les coques cellulolytiques

Ces bactéries constituent un groupe distinct à l'intérieur des bactéries ruminales dégradant la cellulose, caractérisées par une morphologie coccoïde et un diamètre de (0,8 à 1 µm).

Elles ont été cultivées en culture pure par de nombreux chercheurs, et peuvent représenter jusqu'à 84% des bactéries cellulolytiques se développant sur gélose à la cellulose.

Il existe un certain nombre de variations entre les souches individuelles. Ainsi, *Ruminococcus flavefaciens* est un coque Gram positif, non mobile, d'un diamètre de (0,8 à 0,9 µm), que l'on retrouve seul ou associé par paires ou en chaînes. Un pigment jaune est produit, particulièrement durant la croissance sur cellulose. La majorité des souches de *R. flavefaciens* sont cellulolytiques, bien que d'autres activités fermentaires (fermentation du xylane, de la cellobiose, activité variable selon les souches avec le sucrose, le D-xylose, le L-arabinose, le glucose, le mannose et le lactose) soient présentes chez certaines souches.

Quand à *Ruminococcus albus*, reconnu comme étant l'autre principal coque impliqué dans la digestion des parois végétales dans le rumen, il s'agit d'un coque, Gram négatif à Gram variable, cellulolytique, non mobile, d'un diamètre de (0,8 à 2 µm), classiquement retrouvé sous la forme de diplocoque. *R. albus* est caractérisé par des colonies blanches, avec des cellules généralement seules, ou en chaînes courtes. Cette bactérie présente une activité cellulolytique rapide. *R.albus* fermente typiquement la cellulose, la cellobiose et le glucose, et peut fermenter un certain nombre d'autres glucides (sucrose, D-xylose, L-arabinose, fructose, mannose, lactose). Sa croissance requiert de l'ammoniac, et un (ou plus) des acides gras volatils suivant: isobutyrate, isovalérate, 2-méthylbutyrate et n-valérate (Hungate, 1966).

2.1.2. La digestion de la cellulose par les bactéries cellulolytiques

2.1.2.1. Adhésion des microorganismes

Les bactéries, tout comme les champignons et les protozoaires du rumen, colonisent presque toutes les parties des plantes qui pénètrent dans le rumen, à l'exception des surfaces des plantes intactes, qui ne sont colonisées par aucun microorganisme. La principale voie d'entrée de l'invasion semble se faire via les lésions de l'épiderme de la plante (Chesson and Forsberg, 1988). Les bactéries associées aux particules alimentaires sont considérées comme le groupe le plus important dans la dégradation des fibres, du fait de leur prédominance en terme de masse bactérienne, et d'activité endoglucanasique (Minato *et al.*, 1966). L'adhésion de la bactérie aux parois cellulaires semble être la première étape du processus de dégradation.

Les principales espèces bactériennes s'attachant de la sorte sont les bactéries cellulolytiques *R.albus*, *R. flavefaciens* et *F. succinogenes*. Les espèces de *Ruminococcus* semblent s'attacher de manière lâches, alors que *F. succinogenes* présente une adhésion serrée (Chesson and Forsberg, 1988).

L'adhésion de la bactérie à la cellulose au sein de l'écosystème ruminal peut être divisée en 4 phases pour les trois espèces précédemment citées :

- (1) transport de la bactérie non mobile jusqu'au substrat.
- (2) adhésion non spécifique à la bactérie sur les sites disponibles de la paroi cellulaire.
- (3) adhésion spécifique grâce à la formation de ligands avec le substrat, formation qui pourrait être facilitée par des structures comme les cellulosomes ou le glycocalyx.
- (4) prolifération des bactéries attachées sur des tissus potentiellement digestibles (Krause *et al.*, 2003).

L'adhésion bactérienne peut néanmoins être affectée par un certain nombre de facteurs, comme la nature du substrat, les facteurs environnementaux ou encore la compétition entre microorganismes. L'adhésion de *F.succinogenes* pourrait faire intervenir deux de ses endoglucanases et sa cellobiosidase stimulée par les chlorures. Ces trois enzymes présenteraient un CBM (Carbohydrate binding module), module se fixant aux glucides. D'autre part, selon Krause *et al.* 2003), sept CBP (Cellulose Binding Protein, protéine se liant à la cellulose) sont localisés dans la membrane externe de *F. succinogenes*, et interviendraient dans le processus d'adhésion. Par ailleurs, *R. flavefaciens* adhère immédiatement et de manière forte aux particules fibreuses. Krause *et al.* (2003), rapportent que certaines enzymes de *R. flavefaciens* (XynB, XynD, EndA, EstA) peuvent interagir entre elles, et former un complexe cellulosome-like qui pourrait être impliqué dans le mécanisme d'adhésion. Concernant l'autre ruminocoque ruminal, des observations au microscope électronique ont apporté certaines preuves de l'existence d'un tel complexe chez *R. albus*. De plus, un rôle des glycoprotéines du glycocalyx est suggéré dans le processus d'adhésion de *R. flavefaciens*.

2.1.2.2. Mécanisme de digestion de la cellulose

Le complexe des enzymes cellulolytiques comprend 3 principaux types d'enzymes qui fonctionnent en synergie pour hydrolyser la cellulose cristalline. Il s'agit des endo- β -glucanases, des exo- β -glucanases (uniquement retrouvées chez des champignons anaérobies dans le rumen) et des β -glucosidases.

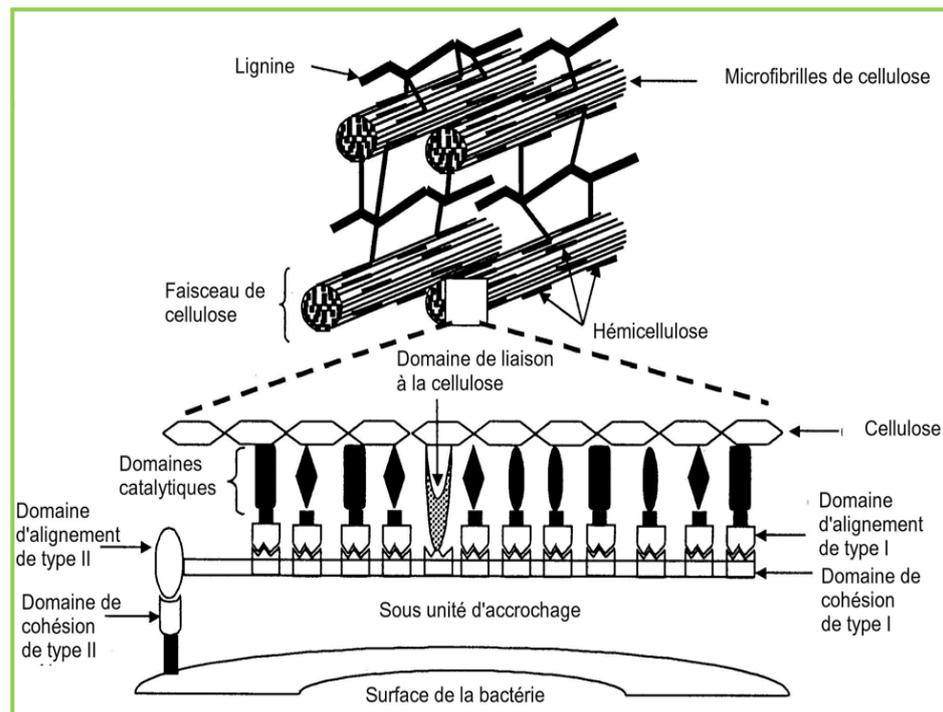


Figure 5: Représentation idéale de la fibre et ses composants (cellulose, microfibrilles, hémicellulose et lignine), dégradés par le complexe cellulose (Krause *et al.*, 2003)

Le mode d'action de chaque enzyme est le suivant: les endoglucanases, 1,4- β -D-glucan glucanohydrolases et carboxyméthylcellulase scindent de manière « aléatoire » les chaînes de cellulose en glucose et en cello oligosaccharides. Puis les exoglucanases et 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolases réalisent une dissociation d'unités de cellobiose à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne. Enfin, les β -glucosidases et cellobiases réalisent l'hydrolyse de la cellulose en glucose (Krause *et al.*, 2003).

L'inhibition par les produits terminaux, liée à une accumulation de cellobiose, est prévenue par l'action de la β -glucosidase. La figure 6, récapitule les différents mécanismes de dégradation de la cellulose par les enzymes ruminales.

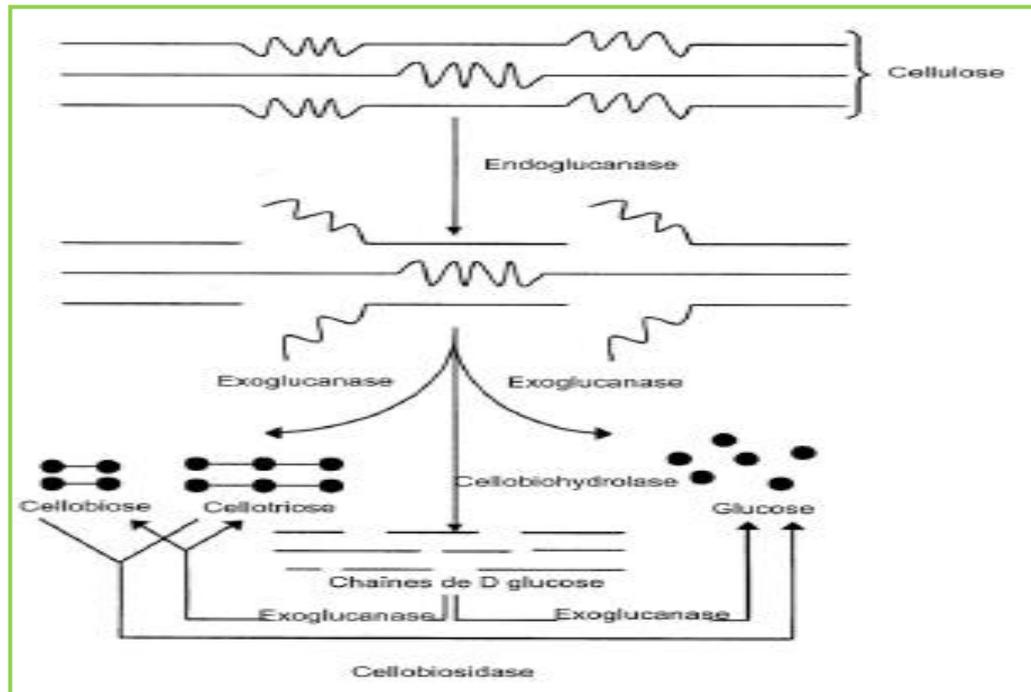


Figure 6: Dégradation de la cellulose par les différentes enzymes cellulolytiques
(Krause *et al.*, 2003)

2.1.3. Les bactéries hémicellulolytiques

L'hémicellulose, qui représente près de (37-48%) des parois de la plante, présente une structure très complexe, avec le xylane présent comme l'un des principaux polymères. Les principales bactéries hémicellulolytiques sont *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, ainsi que les Ruminococci (Tiret, 2001). Les xylanases présentent une répartition plus large que les cellulases parmi les bactéries ruminales. Les microorganismes produisent généralement plus d'une xylanase. Ainsi, quatre gènes codant pour des endoglucanases ont été clonés et caractérisés chez *F. succinogenes* (Krause *et al.*, 2003). Une activité xylanasique est également attribuée à *R. albus*, à *R. flavefaciens*. La bactérie *Butyrivibrio fibrisolvens* est considérée comme présentant une très importante activité de dégradation du xylane avec *Prevotella* (Krause *et al.*, 2003).

Enfin, des bactéries appartenant au genre *Eubacterium* ont été isolées du rumen et présentent une activité de dégradation du xylane. Il s'agit d'*Eubacterium ruminantium* et d'*Eubacterium xylanophilum* (Stewart and Bryant, 1988). D'autre part, les β -glucosidases et les α -L-arabinofuranosidases sont essentielles pour la dégradation complète des fragments

oligomériques produits par l'hydrolyse réalisée par les enzymes polysaccharidasiques; elles sont distribuées de manière large au sein de la microflore ruminale.

2.1.4. Les bactéries pectinolytiques

La digestion de la pectine est assurée par un certain nombre de bactéries, parmi lesquelles *Lachnospira multiparus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola* (Stewart and Bryant, 1988). L'activité fermentaire vis-à-vis du xylane et de la pectine est plus fréquente et plus importante chez les souches de *P. ruminicola sub sp. Ruminicola* que chez *subsp. Brevis*, *Succinivibrio dextrinosolvans*, *Treponema bryantii* et *Streptococcus bovis* (Tiret, 2001). Les enzymes pectinolytiques sont divisés en 2 principaux groupes: les pectines estérases, qui catalysent la dégradation du méthanol, et les enzymes de dépolymérisation, qui sont soit des hydrolases, soit des lyases.

2.2. Les bactéries amylolytiques

Un certain nombre des bactéries cellulolytiques ruminales sont également amylolytiques comme certaines souches de *F. succinogenes*, et la plupart des souches de *B. fibrisolvens*. Les espèces non cellulolytiques: *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Succinimonas amylolytica* et *Selenomonas ruminantium*, comprennent de nombreuses souches dégradant l'amidon.

Les souches de *Streptococcus bovis* rassemblent des coques ou des coccobacilles à Gram positif, immobiles, non sporulés, groupés par deux ou en courtes chaînes, aéro-anaérobies, homo fermentaires, catalase négative.

Les principaux substrats fermentés par *S. bovis* sont: l'amidon, certains glucides simples (maltose, cellobiose, sucrose, glucose, fructose, galactose, mannose, lactose), mais pas la cellulose. Dans des tubes de gélose à l'amidon, inoculés avec des dilutions suffisantes de contenu ruminal, et incubés à 39°C, les colonies de *S. bovis* apparaissent invariablement les premières, suivies de près par celles de *Butyrivibrio* (Hungate, 1966).

Le principal produit de ce type de fermentation est le lactate. Néanmoins, d'après Stewart et Bryant, Russel a démontré que *S. bovis* est capable de croître en utilisant des cellodextrines dérivées de la cellulose. Ainsi, cette bactérie est capable de survivre dans le rumen d'animaux uniquement nourris de fourrage. Lorsque le régime est à base de foin, *S. bovis* croît lentement et produit essentiellement de l'acétate, du formate et de l'éthanol (Roque, 1991).

2.2.1. Mécanismes de dégradation de l'amidon par la flore amylolytique ruminale

Au contraire des protozoaires, les bactéries amylolytiques sont trop petites pour ingérer les grains d'amidon, ou même l'amidon de haut poids moléculaire. Les bactéries doivent sécréter des amylases, produire des amylases associées à la surface, ou utiliser d'autres mécanismes à la surface de la cellule, afin d'hydrolyser l'amidon en malto-oligomères qui eux peuvent être transportés à l'intérieur de la cellule.

La présence d'amylase a été montrée dans les fluides extracellulaires de certaines souches de *S. bovis*. L'analyse des types d'amylases trouvées dans ces milieux extracellulaires a montré qu'une α -amylase était rapidement détectée, mais qu'aucune pullulanase ni β -amylase ne l'étaient (Kotarski *et al.*, 1995). La présence extracellulaire de cette enzyme n'était probablement pas due au relargage suite à la lyse de la bactérie. D'autre part, deux α -amylases liées à la cellule ont été détectées. L'une n'hydrolysait pas les granules d'amidon, et était probablement localisée dans la membrane cytoplasmique; alors que la seconde α -amylase liée à la cellule, et l' α -amylase extracellulaire présentaient des profils semblables.

Le principal produit de fermentation de l'amidon est le maltotriose (Kotarski *et al.*, 1995). Par ailleurs, le transport du maltose et du glucose, ainsi que la présence d'une maltase dont l'action est inductible, ont été démontré pour la souche *S. bovis* JB1, mais la question de l'existence d'autres amylases qui cliveraient les malto-oligomères formés par l' α -amylase avant de pénétrer dans la cellule demeure toujours (Kotarski *et al.*, 1995).

2.3. Les bactéries utilisatrices de glucides simples

Au sein de la microflore ruminale, un nombre important d'espèces bactériennes sont capables de dégrader les glucides simples à titre d'exemple: *S.ruminantium*, *S.bovis*, *B.fibrisolvens*, certaines souches de *Succinivibrio dextrinosolvens* et de Ruminocoques. Néanmoins, un groupe d'espèces au sein de ce pool de bactéries fermentant les sucres, n'a pas encore été abordé: il s'agit des lactobacilles, dont l'intervention dans la compréhension de la physiopathologie de l'acidose lactique ruminale justifie que l'on s'y arrête. Ainsi, chez des animaux recevant de grandes quantités de glucides rapidement fermentescibles, les lactobacilles prolifèrent souvent, en compagnie de *S. bovis*, créant ainsi des conditions de milieu très acide (Goad *et al.*, 1998). Selon Stewart et Bryant. (1988), les deux principaux lactobacilles sont *Lactobacillus ruminis*, et *Lactobacillus vitulinus*.

2.4. Les bactéries utilisatrices d'acide

Au sein des bactéries ruminales utilisatrices d'acides, un certain nombre d'entre elles est capable d'utiliser le lactate. Il s'agit principalement de *Selenomonas ruminantium*, *Megasphera elsdenii* et *Veillonella parvula*. Un certain nombre de souches de *Selenomonas ruminantium* fermentent le lactate. Les produits de fermentation du lactate sont le propionate, l'acétate et le dioxyde de carbone.

2.5. Les bactéries uréolytiques

La production d'ammoniac via l'hydrolyse de l'urée par les bactéries ruminales joue un rôle important dans le métabolisme de l'azote chez les ruminants. Une activité uréasique a été détectée chez certaines espèces bactériennes isolées du rumen, telles que *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Selenomonas sp.*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus bromii*, *Butyrivibrio sp.* et *Treponema sp.* (Tiret, 2001; Wonzy *et al.*, 1977).

Deux groupes bactériens dont l'importance relative est controversée se partageraient l'activité uréolytique. Tout d'abord, une population nombreuse d'anaérobies stricts avec une activité uréasique faible, dont font partie les genres suivants: *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*, *Treponema*, *Selenomonas*, *Bifidobacterium*, *Succinivibrio*. D'autre part, on trouverait également une population nettement plus faible d'anaérobies facultatifs, et beaucoup plus spécifiquement uréolytique (Wallace and Cotta, 1985),

Cette population est retrouvée dans le jus ruminal, mais se développe préférentiellement à la surface des cellules épithéliales du rumen et intervient certainement en priorité sur l'urée endogène qui diffuse naturellement à travers la paroi ruminale. Ces bactéries font parties des genres suivants: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Propioni bacterium* et *Corynebacterium*. *Succinivibrio dextrinosolvens*.

2.6. Les bactéries protéolytiques

Les premières études sur la flore protéolytique du rumen, dont l'isolement des principaux genres bactériens s'est avéré difficile, a permis de voir émerger deux principales notions sur cette flore: tout d'abord, ces bactéries sont, à part quelques exceptions, faiblement protéolytiques. Elles n'utilisent pas les protéines comme principale source d'énergie, ou même, dans certains cas, comme source principale d'azote.

De plus, une grande proportion de bactéries ruminales possède une activité protéolytique, et près de la moitié (entre 30 et 50 %) du total des bactéries viables isolées du rumen peuvent être protéolytiques (Wallace, 1986).

Les bactéries protéolytiques appartiennent à la plupart des principaux genres, bien que les principales bactéries cellulolytiques ne semblent pas être protéolytiques. L'activité protéolytique de la flore du rumen, qui est au final très faible en dépit de son importance dans la nutrition, est donc due à l'activité d'un grand nombre d'espèces présentant une activité faible (Wallace, 1986).

Les souches protéolytiques de l'ancien genre *Bacteroides* sont les bactéries protéolytiques prépondérantes sous certaines conditions d'alimentation. La bactérie *Ruminobacter amylophilus*, qui possède une importante activité amylolytique, est l'une des espèces protéolytiques isolée les plus actives, et est trouvée en grande quantité lorsque l'animal reçoit une alimentation riche en amidon (Wallace and Cotta, 1988).

Des souches protéolytiques de *Prevotella ruminicola* ont été obtenues à partir de ruminants nourris au fourrage, ainsi qu'avec des régimes contenant des concentrés. De même, des souches de *Butyrivibrio fibrisolvens* peuvent être trouvées sous certaines conditions, et peuvent même être l'organisme protéolytique prédominant isolé chez certains animaux (Wallace, 1986). Enfin, des souches de *Selenomonas*, *Succinivibrio*, *Lachnospira*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* et *Clostridium* ont également été isolées sous certaines conditions.

Les enzymes protéolytiques trouvées dans le contenu ruminal semblent être nombreuses et variées. L'utilisation d'inhibiteurs de protéases ont permis de démontrer que le type de protéase prédominant dans le rumen est du type cystéine-protéase (Wallace, 1986). D'autres types enzymatiques sont présents, mais de manière plus variable. Concernant la dégradation des peptides, le nombre d'études sur le sujet est faible. Les espèces bactériennes impliquées sembleraient être principalement *P. ruminicola*; *Selenomonas* et *Butyrivibrio*.

L'ammoniac est la plus importante source d'azote pour la croissance des bactéries ruminales. En fonction de l'alimentation, 60 à 90% de l'azote consommé journalière ment par le ruminant est converti en ammoniac, et de 50 à 70 % de l'azote bactérien est issu de l'ammoniac.

2.7. Les bactéries utilisatrices de lipides

Un certain nombre de bactéries ruminales sont impliquées dans l'utilisation des lipides présents dans le rumen, comme *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Treponema bryantii*, *Eubacterium sp.*, *Fusocillus sp.*, *Micrococcus sp.* et surtout *Anaerovibrio lipolytica* (Tiret, 2001).

Cette dernière est la bactérie la mieux connue pour son activité lipasique (Jenkins, 1993). Pendant de longues années, l'unique bactérie ruminale connue pour être capable de réaliser cette biohydrogénation était *B. fibrisolvans*. Par la suite, d'autres bactéries possédant les enzymes capables de catalyser cette réaction ont été isolées, comme certaines souches de *Treponema*, d'*Eubacterium* ou de *Fusocillus* (Wallace, 1985). Néanmoins, du fait de l'absence de méthode permettant d'énumérer sélectivement les bactéries réalisant la biohydrogénation des acides gras insaturés dans le rumen, il n'est pas possible de déterminer quelles souches isolées sont représentatives de ce type de bactéries.

2.8. Les archaebactéries

Les archées sont connues principalement pour leurs activités méthanogènes dans les fermenteurs anaérobies (Raskin *et al.*, 1994). En effet, ces organismes complètent les fermentations des bactéries anaérobies en utilisant l'hydrogène (produit lors de la fermentation des glucides par les bactéries) présent dans le rumen pour synthétiser et produire du méthane (Wolin *et al.*, 1997).

La quantité d'archées au niveau du rumen a été évaluée entre 10^8 et 10^9 archées/g de contenu ruminal par des méthodes culturales.

Chez les ruminants, 2 phyla sont retrouvés dans le rumen avec majoritairement le phylum Euryarchaeota et rarement le phylum Crenarchaeota (Shin *et al.*, 2004b). Les archées dans le rumen sont peu diversifiées et le genre majoritaire est *Methanobrevibacter* (Janssen and Kirs, 2008). Les genres *Methanomicrobium*, *Methanobacterium* et *Methanosarcina* sont aussi présents (Wolin *et al.*, 1997; Jarvis *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 2008).

Des études basées sur l'ADNr 16S, se sont intéressées à la phylogénie des archées et ont révélés l'existence de nouveaux groupes d'archées appartenant au phylum Euryarchaeota (Tajima *et al.*, 2001; Whitford *et al.*, 2001).

Les archées méthanogènes dans le rumen sont attachées aux particules du rumen, attachées à l'épithélium du rumen et associées au sein du rumen aux protozoaires (Ohene-Adjei *et al.*, 2007).

La densité en archées méthanogènes varie en fonction de la phase du rumen étudiée avec respectivement: 3.10^8 , 2.10^9 et 9.10^9 copies de gène de l'ARNr16S pour les phases liquides, solides et de l'épithélium du rumen (Pei *et al.*, 2010). Cette étude montrait aussi la prédominance du genre *Methanobrevibacter* au sein des 3 phases du rumen étudiées avec respectivement

84, 78 et 77% d'abondance pour les phases liquides, solides et de l'épithélium du rumen (Pei *et al.*, 2010). Cette étude révèle aussi un nombre plus ou moins important de taxa non identifiés au sein de chaque phase avec des abondances de respectivement 12, 24 et 25% pour les phases liquides, solides et de l'épithélium du rumen (Pei *et al.*, 2010).

Les communautés méthanogènes vivant en liberté ou associés aux protozoaires sont composées des trois genres: le groupe C (aussi appelé CCR apparenté de loin aux *Thermoplasma*), les *Methanobrevibacter* et les *Methanomicrobium* (Janssen et Kirs, 2008 ; Tymensen *et al.*, 2012). D'autre part il a été montré que les archées méthanogènes libres au niveau du rumen appartiennent aux groupes RCC et *Methanomicrobium* et les archées méthanogènes associées aux protozoaires appartiennent au groupe *Methanobrevibacter* (Tymensen *et al.*, 2012).

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

2.9. Les protozoaires

Les protozoaires sont majoritairement ciliés, anaérobies stricts et sont évalués entre 10^3 à 10^6 protozoaires/g de contenu ruminal par dénombrement sur cellule de comptage (Jouany, 1988; McAllister et Chang, 1996; Williams et Coleman, 1997).

Les protozoaires flagellés sont peu nombreux. Quatre espèces ont été mises en évidence: *Chilomastix sp.*, *Monocercomonas sp.*, *Pentatrichomonas sp.* et *Tetratrichomonas sp.* Cependant, leur rôle est peu connu. La densité des protozoaires est faible au regard de celle des bactéries mais ils représentent entre 20 et 50% de la biomasse microbienne (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007).

Les protozoaires ciliés sont composés de deux groupes: les entodiniomorphes et les holotriches. Dans le rumen chez l'adulte, on observe 9 genres de protozoaires appartenant au groupe des entodiniomorphes (*Entodinium*, *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Metadinium*, *Enoploplastron*, *Polyplastron*, *Epidinium* et *Ophryoscolex*). Le groupe des holotriches est majoritairement représenté dans le rumen par la famille *Isotrichidaea* avec deux genres prépondérants : *Isotricha* et *Dasytricha* (Williams et Coleman, 1997; Karnati *et al.*, 2003).

Au sein de la phase liquide du rumen, deux genres sont identifiés *Entodinium* et *Epidinium* (Shin *et al.*, 2004a). Au niveau de la phase solide du rumen, le genre *Entodinium* est majoritaire et aucun *Epidinium* n'a été observé. Au niveau de l'épithélium ruminal, aucun protozoaire n'a été détecté (Shin *et al.*, 2004a).

Les protozoaires ciliés participent aussi au métabolisme glucidique dans le rumen car ils ingèrent les particules alimentaires et les digèrent à l'intérieur de leurs vacuoles (Ushida et Jouany, 1994). Les hémicelluloses sont fortement dégradées par les entodiniomorphes alors que les holotriches fermentent plutôt les sucres solubles excepté le mannose et la glucosamine (Jouany et Ushida, 1998). *Isotricha* possède une forte activité amylolytique et la dégradation de l'amidon conduit à la formation d'acide butyrique, H₂, et CO₂ majoritairement et un peu d'acides propioniques et lactiques.

2.10. Les champignons

Chez le ruminant adulte, la densité de champignons mesurée par des méthodes de cultures, est comprise entre 10³ et 10⁴ champignons/ ml de contenu ruminal (McAllister and Cheng, 1996). Des densités similaires ont été observées via des techniques de biologie moléculaire (Lwin *et al.*, 2011). Les champignons du rumen sont totalement anaérobies (McAllister et Cheng, 1996).

La quantité de champignons dans le rumen chez l'adulte peut varier fortement en fonction du régime alimentaire et du délai entre les repas. Six genres différents de champignons du rumen ont pu être isolés et identifiés; ils appartiennent à la famille des *Neocallimastigomycetes* (*Anaeromyces*, *Caecomyces*, *Cyllamyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces* et *Piromyces* (Orpin and Joblin, 1997; Kittelmann *et al.*, 2012).

Les champignons du rumen sont souvent attachés aux fibres composant la phase solide et représentent environ 5 à 10% de la biomasse microbienne totale du rumen (Orpin, 1981). Par ailleurs, ils ont un fort potentiel fibrolytique grâce à une forte production de polysidases, qui permettent de dépolymériser la cellulose et les hémicelluloses, et d'hydrolyser les oligosaccharides libérés mais ne dégradent pas la pectine. Les produits terminaux générés par la fermentation des glucides sont du formate, de l'acétate, du lactate, de l'éthanol, du CO₂ et de l'H₂ (Bauchop and Mountfort, 1981).

3. Fonctions digestives

Le microbiote ruminal est complexe et varié. Cet écosystème possède l'équipement enzymatique nécessaire pour dégrader les substrats de la ration qui arrivent dans le rumen. Cette dégradation ruminale par les microorganismes est conditionnée par l'adhésion des microorganismes aux particules, l'accessibilité aux substrats et par les activités enzymatiques réalisées.

3.1. Le métabolisme glucidique

Le microbiote ruminal possède un large panel d'activités enzymatiques pour hydrolyser les constituants glucidiques fibreux (cellulose, hémicelluloses, pectines) et l'amidon de la ration. L'hydrolyse produit dans un premier temps des oses simples, qui sont ensuite fermentés pour donner les composants utilisables par le métabolisme de l'animal, principalement les AGV (Figure 7).

La première étape permet de fermenter les oses simples pour former l'acide pyruvique par les voies de la glycolyse (transformation du glucose pour produire du pyruvate et de l'ATP) et les voies des pentoses phosphates (transformation des xyloses phosphates en pyruvate).

La deuxième permet de fermenter le pyruvate pour former des AGV par les voies acétate, butyrate et/ou propionate (Andersen *et al.*, 1999). L'équilibre entre ces différentes voies dépend des substrats disponibles et donc des rations alimentaires ingérées par l'animal hôte. Les AGV produits sont majoritairement absorbés par la muqueuse ruminale, puis utilisés par l'animal hôte pour ses besoins d'entretien, mais sont aussi utilisés pour la croissance du microbiote du rumen. De plus ces AGV participent à la prolifération des cellules de l'épithélium ruminal.

Ces voies fermentaires produisent également du CO₂ et du H₂ qui ne s'accumulent pas dans le rumen car ces produits sont très rapidement utilisés par les microorganismes hydrogénéotrophes. Ces microorganismes sont les bactéries sulfato-réductrices, les bactéries acétogènes et surtout les archées méthanogènes.

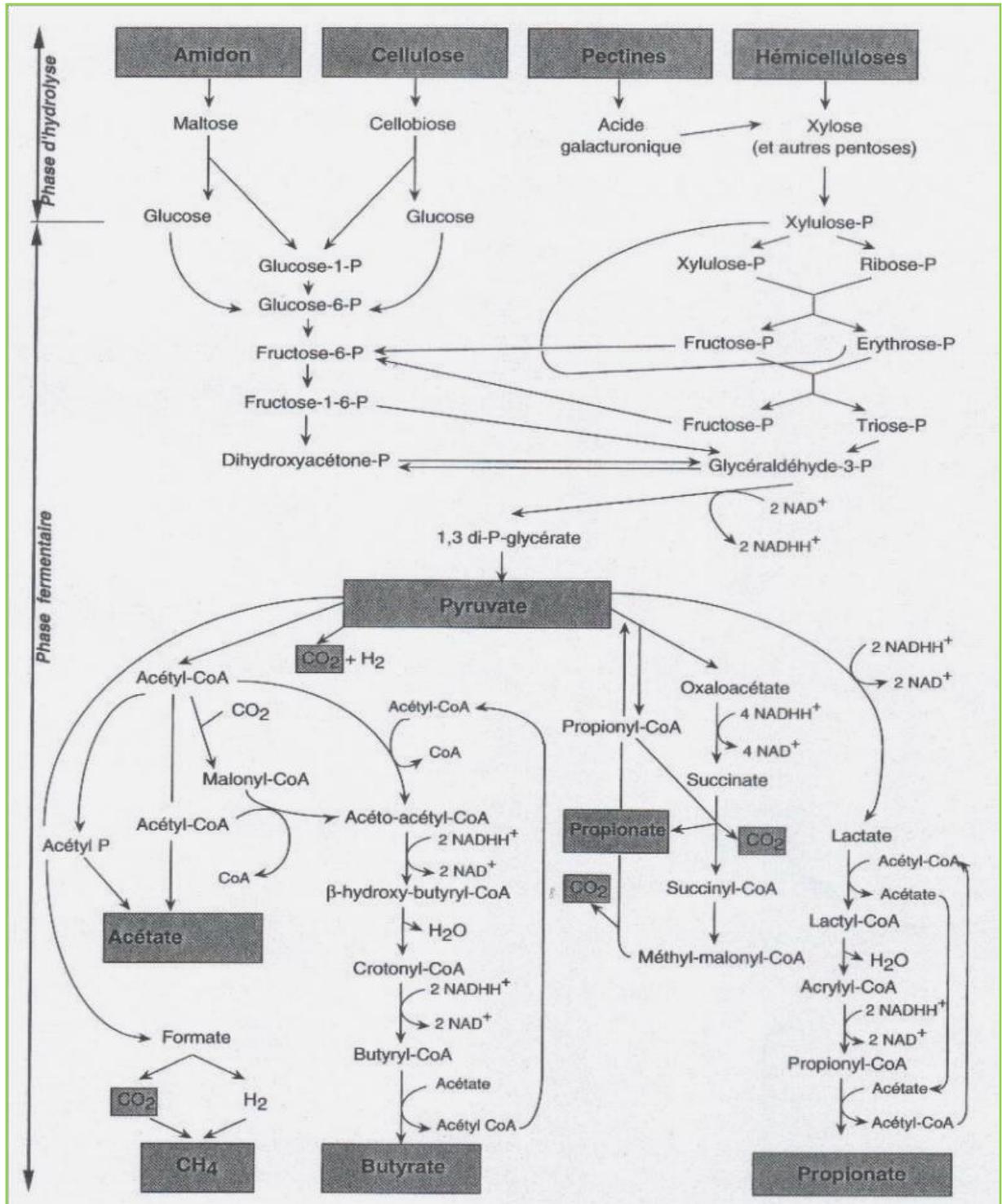


Figure 7: Les différentes voies du métabolisme des glucides dans le rumen (Jouany, 1994)

3.2. Le métabolisme azoté

Les protéines ingérées par l'animal sont dégradées par le microbiote ruminal et plus particulièrement par les bactéries et les protozoaires.

La première étape du métabolisme azoté dans le rumen est la protéolyse (Figure 8). Les enzymes bactériennes agissent directement sur les protéines solubles pour produire des peptides et des acides aminés, alors que les protozoaires ingèrent les résidus protéiques (acides aminés) et les bactéries elles-mêmes (Coleman, 1975)

Ces acides aminés présents dans le rumen sont désaminés majoritairement par les protozoaires pour former l'ammoniac (NH_3) et des squelettes carbonés dont des AGV ramifiés en particulier isobutyrate et isovalérate (Mackie and White; 1990; Hino and Russel, 1985; Jouany, 1994). L'activité uréolytique de certaines bactéries participe aussi à la production d'ammoniac, à partir d'urée alimentaire ou endogène.

La deuxième étape est une synthèse protéique par les microorganismes, réutilisant en partie les produits de dégradation (peptides, acides aminés et ammoniac). Ces protéines microbiennes sont ensuite digérées dans l'intestin grêle.

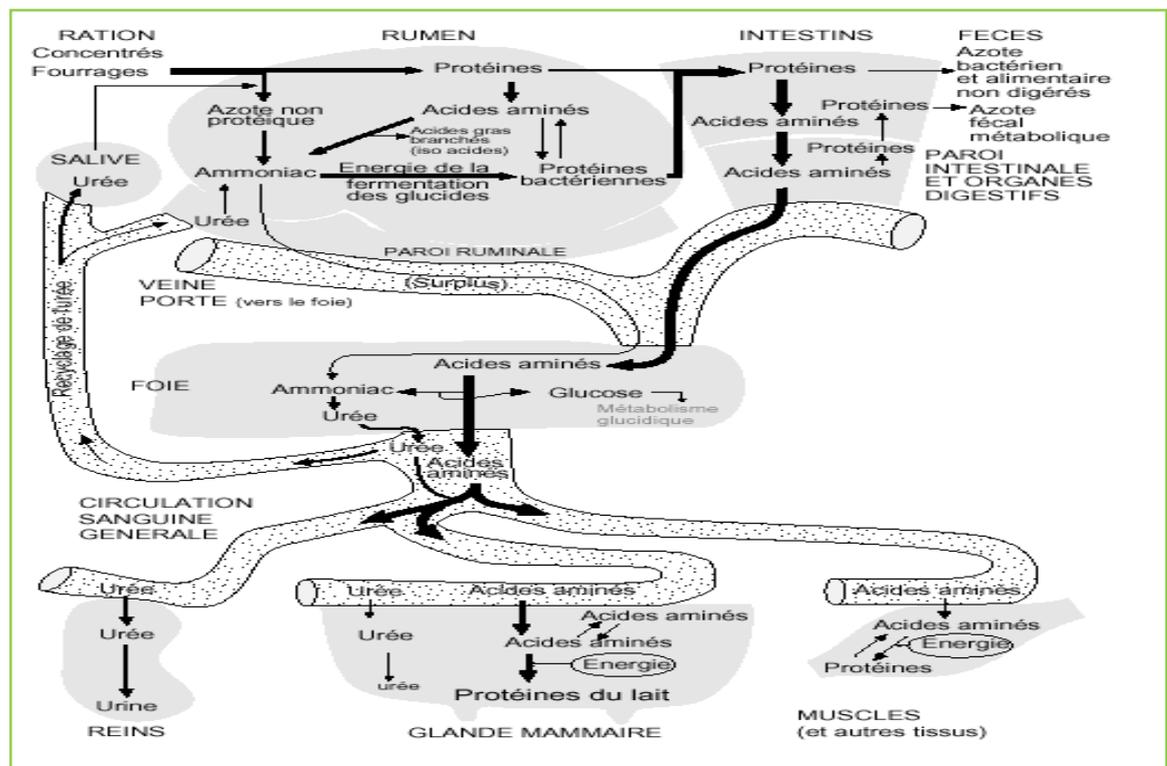


Figure 8 : Vue générale du métabolisme protéique chez la vache laitière (Site Internet 1)

3.3. Métabolisme des lipides

Les triglycérides, les galactolipides et les phospholipides sont rapidement hydrolysés par les bactéries lipolytiques en milieu extracellulaire. Ils engendrent alors des AG libres, du glycérol, des oses et du phosphore, qui subissent alors des transformations très diverses par d'autres micro-organismes. Dans le rumen, le glycérol et les oses sont fermentés en AGV, alors que les AG subissent différentes transformations dont les principales sont : l'isomérisation, l'hydrogénation et l'hydratation (Vossenberg and Joblin, 2003). Environ 80% à 92% des acides linoléiques et linoléiques sont hydrogénés dans le rumen (Doreau and Ferlay, 1994). Après être sortis du rumen, les AG seront digérés grâce aux enzymes pancréatiques dans l'intestin grêle puis absorbés. Le degré de saturation des AG a des conséquences directes sur la nutrition et la santé des consommateurs de produits issus de ruminants.

3.4. La méthanogénèse

Les nombreuses fermentations ruminales conduisent à la formation de gaz comme (CO_2 , N_2 , H_2 , H_2S ; figure 7) qui sont principalement éliminés par éructation. Une partie de ces gaz se dissout dans le liquide ruminal. Les archées du rumen vont alors pouvoir utiliser comme substrats les formes dissoutes de l'acétate, du méthanol, de l'hydrogène/ CO_2 , du formate et des méthylamines pour produire du méthane (CH_4) (Demeyer and Fievez, 2000). Les voies métaboliques de la méthanogénèse utilisées par les archées du rumen sont au nombre de trois: la voie hydrogénotrophe (via le CO_2/H_2), la voie méthylootrophe (via le méthanol et ses dérivés) et la voie acétoclaste (via l'acétate et ses dérivés) (Pelmont, 2005; Liu and Whitman, 2008; Popova *et al.*, 2011). Dans le rumen, il est considéré que la voie hydrogénotrophe est la voie principale.

4. Effets de la composition de la ration sur la population microbienne du rumen

L'un des principaux facteurs affectant la population microbienne est la composition de la ration. Un certain nombre de groupes bactériens, possédant des activités différentes vis-à-vis d'un certain nombre de substrats, sont présents dans le rumen. Il semblerait donc logique que, lors de prédominance d'un type de substrat, la part de cette flore microbienne, adaptée à cet élément, augmente. Bryant et Burkey. (1953), ainsi que Makir et Foster (1975) ont observé que le nombre des bactéries ruminales demeurerait constant avec différents types de rations, à l'exception des rations riches en concentrés.

Il est clair que la composition et l'activité de l'écosystème ruminal sont affectées au cours du passage d'un régime riche en fourrage à un régime riche en concentrés (Goad *et al.*, 1998). Il a été montré, par exemple, que les populations bactériennes cellulolytiques et leurs activités diminuaient significativement au début du changement de régime et qu'il fallait 3 à 4 semaines pour que celles-ci ré-augmentent (Zitnan *et al.*, 1994). Quelques études mettant en jeu des méthodes d'écologie moléculaire (Tajima *et al.*, 2001; Weimer *et al.*, 1999) montrent que la rapidité et l'amplitude de la réponse à un changement de régime alimentaire varient fortement d'un individu à l'autre.

Plusieurs études ont comparé les concentrations en bactéries chez différents animaux nourris à l'aide de rations riches en fourrages ou riches en concentrés. En général, les concentrations bactériennes sont supérieures chez les animaux recevant la ration riche en concentrés (Goad *et al.*, 1998). Néanmoins, certains résultats obtenus donnent une conclusion contraire (Dehority and Tirabasso, 2001), les concentrations étant égales ou supérieures chez les animaux recevant de grandes quantités de fourrages. Des différences telles que le pourcentage de concentrés dans la ration, la fréquence de distribution, la quantité d'aliment, et les variations entre individus, toutes apparaissent influencer les concentrations bactériennes, et rendent les comparaisons difficiles à réaliser.

En général, des régimes riches en amidon et/ou glucides rapidement fermentescibles ont un effet marqué sur le microbiote ruminal où on note une augmentation des populations amylolytiques (*Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*,...), saccharolytiques (Lactobacilles) et utilisatrices d'acide lactique (*Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii*,...) avec une diminution de l'activité de la population cellulolytique (*Butyrivibrio* spp., *Ruminococcus*, *Fibrobacter*,...), ce qui peut conduire au phénomène d'acidose ruminale (Nocek, 1997; Martin, 2002). Ces dernières sont en effet, très sensibles aux pH acides induits par les fermentations rapides et intenses des aliments (Russell and Wilson, 1996). Avec un niveau d'amidon élevé dans la ration, les bactéries amylolytiques se développent très rapidement. La structure du matériel végétal, notamment le degré de cristallinité de la cellulose, peut également influencer sur la prédominance d'une espèce bactérienne cellulolytique ou d'une autre: ainsi *F. succinogenes* serait favorisé avec des régimes riches en cellulose cristalline (paille de céréales par exemple) par rapport au *R. albus* et *R. flavefaciens* qui semblent préférer la cellulose amorphe (Fonty *et al.*, 1995).

Le changement de ration est à l'origine d'une chute du nombre de bactéries cellulolytiques. Des études ont montré que les quantités d'ADN de *R. flavefaciens* et *F. succinogenes* ont chuté de plus de 10 à 20 fois chez les animaux nourris au grain.

Martin *et al.* (2001) ont étudié l'effet de la supplémentation en céréales sur l'activité fibrolytique ruminale associée à la phase solide du contenu ruminal. Les auteurs ont démontré que l'apport d'orge dans la ration ne modifiait pas la proportion des 3 espèces cellulolytiques majeures attachées aux particules végétales. Si l'orge présente un effet dépressif sur la vitesse de dégradation du foin, c'est par une diminution de l'activité fibrolytique des bactéries associées à la phase solide et non par une modification de l'équilibre des trois espèces cellulolytiques majeures, que l'on peut expliquer ce phénomène.

Un écosystème est d'autant plus stable qu'il est diversifié en raison de la redondance fonctionnelle et de l'occupation maximale de toutes les niches écologiques. Cette théorie repose sur le fait que de nombreuses espèces de micro-organismes sont capables de réaliser les mêmes fonctions au sein de l'écosystème (Cardinale *et al.*, 2002). Ainsi, la disparition d'une espèce microbienne n'affectera pas le fonctionnement de l'écosystème, étant donné que d'autres espèces microbiennes peuvent remplir les mêmes fonctions. La compréhension de ces phénomènes au sein de l'écosystème ruminal permettrait de mieux appréhender son fonctionnement et donc une meilleure maîtrise de son efficacité. Aussi, l'étude du microbiote ruminal est dès lors indispensable.

5. Techniques de détermination du microbiote digestif du rumen

5.1. Dénombrement et culture

Pour caractériser le microbiote, un large panel de techniques a été utilisé: dénombrement en microscopie (dénombrement avec ou sans coloration), cytométrie de flux (caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules isolées en solution pour les bactéries par exemple) et méthodes culturales (par exemple, cultures sur milieu avec ensemencement sur boîte ou tube permettant l'isolement, la culture et l'identification des microorganismes) permettant de mettre en évidence une petite partie de la communauté microbienne d'un écosystème donné.

L'utilisation de ces techniques implique le besoin de connaître les conditions de croissance des micro-organismes à étudier, ce qui est contraignant sur certains écosystèmes complexes et denses quand on veut caractériser la communauté qui les compose (Rey, 2012).

5.2. Techniques moléculaires

Ces techniques permettent de s'affranchir de contraintes liées à la culture des souches de microorganismes et donnent une nouvelle vision des communautés microbiennes, plus exhaustive que les techniques par culture.

Les approches moléculaires permettent d'évaluer la diversité spécifique des écosystèmes en se basant sur les propriétés des acides nucléiques et donc le polymorphisme de l'ADN ribosomal 16S (ou 18S pour les eucaryotes). Ces approches permettent de différencier les microorganismes à différents niveaux taxonomiques et/ou de déterminer les degrés de similitude par les techniques d'hybridation par sonde d'oligonucléotides (exemple: FISH), d'empreinte moléculaire (exemple RFLP), de clonage ou de séquençage, de puces à ADN et la métagénomique (Rey,2012).

L'approche moléculaire comprend plusieurs types de techniques :

5.2.1. Les puces à ADN

Les puces à ADN (analyse de milliers de gènes) comme les biopuces ou les microarrays qui permettent d'étudier soit la diversité phylogénétique (par des sondes d'ARNr 16S spécifiques d'un taxon donné), soit la diversité métabolique (par des sondes représentant un panel de séquences ADN de gènes de fonction)(Rey,2012).

5.2.2. Les empreintes moléculaires

Les empreintes moléculaires qui donnent rapidement le profil de l'ensemble de la communauté contenue dans un échantillon (exemple T-RFLP, ARISA, DGGE, CE-SSCP...). Les empreintes moléculaires donnent une image globale de la communauté étudiée (structure, abondances relatives...) alors que les séquençages permettent de connaître plus en profondeur la composition de la communauté ciblée (Rey, 2012).

5.2.3. La PCR quantitative

La PCR quantitative (qPCR), technique automatisée permettant de quantifier précisément et rapidement un gène d'intérêt (spécifique d'un genre, d'une espèce...), une population totale (bactéries totales, archées totales...) dans de nombreux échantillons par quantification d'un signal fluorescent.

L'intensité de la fluorescence pour chaque cycle de PCR est proportionnelle à la quantité de séquences produites et donc proportionnelle à la quantité initiale d'ADN présente dans le milieu réactionnel (Elyse, 2002). Deux types de techniques existent: SYBR GREEN et TaqMan. Le SYBR Green est une molécule qui se fixe à l'ADN pendant les phases d'hybridation et d'élongation de la PCR et émet de la fluorescence (Figure 9, A). La technique de la TaqMan fait intervenir lors de la PCR une sonde Taqman (composée par des oligonucléotides uniques doublement marqués avec des fluorochromes en 5' par le reporter et en 3' par le quencher) en plus des deux amorces (Figure 9, B).

La PCR quantitative présente l'avantage d'être très sensible et spécifique pour quantifier une population donnée mais par contre un des inconvénients majeurs de cette technique est le côté laborieux de sa mise au point. En effet la recherche des amorces spécifiques de la population que l'on souhaite quantifier est longue et pas toujours facile (Rey,2012).

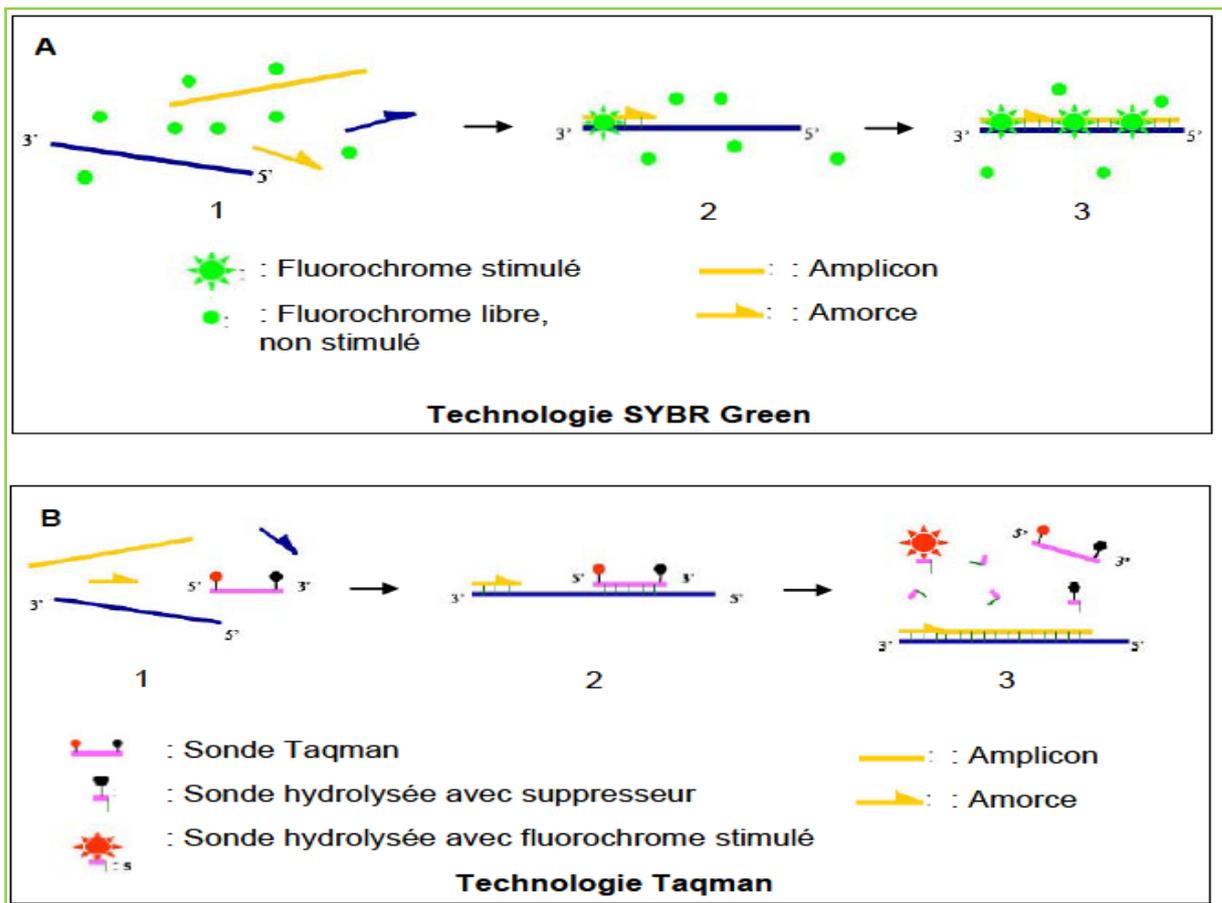


Figure 9, A et B : Principe de la qPCR par SYBR Green (A) et par Taqman (B). Les phases de la PCR quantitative sont : 1) Phase de dénaturation de l'ADN cible et mise en présence des séquences à amplifier avec le SYBR GREEN ou la sonde TaqMAN en fonction de la technique, les dNTP et la polymérase, 2) Phase d'hybridation ou d'appariement des amorces, 3) Phase d'élongation. Ce cycle est répété plusieurs fois. (Michelland, 2009)

5.2.4. Les séquençages

Les séquençages (par exemple le séquençage de Sanger ou le pyroséquençage) permettent de faire l'inventaire des populations présentes dans un échantillon sur la base du polymorphisme de l'ADNr 16S, et permettent donc de déterminer la diversité microbienne sans culture. Dans le cas d'un séquençage par la méthode de Sanger, les ADN extraits doivent être amplifiés par PCR, l'amplification est ensuite séquencée par la méthode de Sanger (PCR avec des ddNTP marqués. Cette technique est longue et variable entre échantillons car le recours au clonage fait qu'elle est peu reproductible (Edwards *et al.*, 2004). Le principe du pyroséquençage est de capter chaque nucléotide (A, T, C et G) qui s'incorpore à la nouvelle séquence synthétisée pendant la phase d'élongation de la PCR (Rey, 2012).

Afin d'étudier de façon précise la communauté, il est nécessaire de trouver un bon compromis pour discriminer au mieux les espèces microbiennes étudiées. Parmi toutes les techniques disponibles, la qPCR permet de quantifier de façon précise les groupes microbiens et le pyroséquençage semble être un bon choix pour l'étude d'une communauté constituant un écosystème complexe. Ces 2 techniques semblent être un bon compromis entre rapidité (analyses de nombreux échantillons en même temps), spécificité des amorces d'une communauté cible et une analyse sans aucun a priori. Afin d'étudier les différentes composantes du microbiote ruminal, une approche quantitative par qPCR et une approche semi quantitative et qualitative par pyroséquençage apparaissent complémentaires pour une caractérisation plus précise (Rey, 2012).

DEUXIÈME PARTIE
MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Enquête et collecte des échantillons

Une étude préliminaire est effectuée afin de définir les espèces d'algues largement distribuées au niveau du littoral algérien et particulièrement dans la région d'étude. La sélection et la collecte des espèces sont effectuées en se basant sur les connaissances de spécialistes en biologie marine de l'Université BADJI Mokhtar (Annaba) et sur l'expérience de plongeurs professionnels du club de plongée sous marine Hippone Sub (Annaba). En plus, des données sont assemblées des études sur des espèces d'algues comestibles.

Le site de collecte se situe dans la wilaya d'Annaba qui se trouve sur la rive sud du bassin méditerranéen et au Nord-Est de l'Algérie. Parmi les espèces d'algues collectées, deux sont retenues pour cette étude. Il s'agit d'une algue verte et d'une algue brune.

La caractérisation botanique est effectuée au département de biologie marine de l'Université BADJI Mokhtar Annaba. L'algue verte correspond à l'espèce *Ulva lactuca*, communément appelée «Salade de mer», elle est collectée dans son milieu naturel à 0,5m de profondeur dans une localisation qui correspond à (36°55'2" latitude, 7°46'6" longitude) (Figure 10, Tableau 4). L'algue brune correspond à l'espèce *Halopteris scoparia* anciennement appelée *Stypocaulon scoparium*, communément appelée «Balai de la mer», elle est collectée dans son milieu naturel en profondeur dans une localisation qui correspond à (36°58'10" latitude, 7°46'50" longitude) (Figure 11, Tableau 4). Plusieurs échantillons sont prélevés du même site à différents moments de la journée, en pleine période hivernale. Ils sont mélangés et conservés à +4°C jusqu'à leur transport au laboratoire.

Le foin de vesce-avoine (substrat témoin) est fourni par l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC, Constantine, Algérie). Il est récolté au stade vitreux pour l'avoine et au stade de formation de gousses pour la vesce. Il est retenu comme fourrage de référence dans notre étude pour deux raisons: il est largement utilisé comme fourrage commun et la plupart des études publiées en ce domaine l'utilise comme substrat standard.

Tableau 4 : Caractéristiques botaniques et phénotypiques des algues marines collectées dans la région d'Annaba

	Algue verte	Algue brune
Nom latin	<i>Ulva lactuca</i>	<i>Halopteris scoparia</i> (Ancien nom <i>Stypocaulon scoparium</i>)
Nom commun	Laitue de mer	Balai de mer
Classification	Règne: Plantae Embranchement: Chlorophyta Classe: Ulvophyceae Ordre : Ulvales Famille: Ulvaceae	Règne : Chromista Embranchement : Ochrophyta Classe : Phaeophyceae Ordre : Sphacelariales Famille : Stypocaulaceae
Description	Elle forme une lame très mince (bicouche cellulaire), orbiculaire et translucide elle ressemble à la laitue.	Touffes compactes de filaments de 5 à 15cm de hauteur, volumineuses et rêches, présente de nombreuses ramifications semblables à de petits balais.
Ecologie	Pousse généralement au niveau de l'étage supralittoral, mais elle peut se développer jusqu'à 10 mètres de profondeur. Elle peut se fixer sur n'importe quel substrat solide : rocher, digue...	Dans les fonds rocheux, de mode calme, espèce occasionnellement épiphyte, espèce photophyle, espèce épiphyte.
Thalle	Le thalle mesure jusqu'à 10 cm d'envergure, aplati et entier, membraneux et irrégulièrement perforé, il est fixé par un petit crampon discoïde. Une lame bistromatique possède des cellules de 20 à 23 µm de long et 20-21µm de haut, subrectangulaires et jointives, pourvues d'un chloroplaste unique pariétal. La bordure est un peu ébouriffée et souvent déchirée. Un thalle de la laitue de mer peut atteindre 18 centimètres de longueur ou plus, mais généralement beaucoup moins, et jusqu'à 30 centimètres de diamètre en tout.	Le thalle mesure jusqu'à 15cm. Arbustif à axes segmentés et souvent ramifiés, nombreux ramules disposés radicalement, rugueux, thalle ramifié de type alterne. De couleur marron blanchâtre, il se fixe par des rhizoïdes, de structure parenchymateuse.
Reproduction et cycle de vie	Leur durée de vie est de quelques mois, mais on en trouve toute l'année, le cycle est caractérisé par l'alternance régulière de générations haploïde (gamétophyte) et diploïde (sporophyte), qui sont de même importance et morphologiquement identiques.	Cette algue peut se multiplier de façon végétative, par fragmentation du thalle. Le cycle biologique de la reproduction sexuée est digénétique isomorphe (deux générations distinctes mais de même aspect): le sporophyte produisant des sporocystes uniloculaires pédicellés insérés à l'aisselle des ramules et le gamétophyte hermaphrodite (espèce monoïque) portant des spermatocystes et des oogones groupés sur un pédicelle inséré également à l'aisselle des ramules.

Source : www.ncbi.nlm.nih.gov, www.algaebase.org



Figure 10: Algue verte

Ulva lactuca



Figure 11: Algue brune

Halopteris scoparia

1.1. Traitement des échantillons

Les algues collectées sont d'abord lavées à l'eau de mer, puis transportées directement au laboratoire dans des sacs en plastique. Une fois au laboratoire, les algues sont triées manuellement afin d'éliminer toute source de contamination (épiphytes, larves, crustacées, sable...) puis lavées à l'eau distillée et séchées à l'air libre durant 48 à 72 heures. Les échantillons d'algue et le substrat de référence sont ensuite broyés dans un broyeur de laboratoire et calibrés à travers un tamis de 1mm.

2. Caractéristiques chimiques des substrats

Les analyses chimiques sont réalisées selon les normes décrites par l'AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Toutes les analyses sont faites en triple.

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

Elle est déterminée par dessiccation dans une étuve ventilée jusqu'à poids constant. 1g d'échantillon est introduit dans un creuset préalablement taré. Ce dernier est placé dans une étuve à 105°C pendant 48 heures. La différence de poids correspond à la perte d'humidité et le résidu caractérise la teneur en matière sèche de l'échantillon. AOAC, 934.01 (1990).

L'expression des résultats est faite comme suit :

$$\% \text{MS} = \frac{[(\text{T}+\text{PS})-\text{T}] \times 100}{[(\text{T}+\text{PF})-\text{T}]}$$

Avec:

T: Poids du creuset vide, (T+PF): Poids du creuset + échantillon frais, (T+PS): Poids du creuset + échantillon sec.

2.2. Détermination de la teneur en cendres et en matière organique

Cette analyse permet le calcul de la quantité des sels minéraux contenus dans l'échantillon. 3g de substrat préalablement séchés, sont placés dans un creuset en porcelaine, taré puis incinéré, dans un four à moufle à 550°C pendant 6 heures. La perte de poids observée au cours de la calcination correspond à la matière organique et le poids du résidu à la matière minérale AOAC, 942.05 (1990).

L'expression des résultats est faite comme suit :

$$\% \text{CT} = \frac{[(\text{T}+\text{PC})-\text{T}] \times 100}{[(\text{T}+\text{PS})-\text{T}]}$$

Avec:

T: Poids du creuset en porcelaine vide, (T+PS): Poids du creuset + échantillon sec, (T+PC): Poids du creuset + échantillon calciné.

2.2.1. Détermination des teneurs en Phosphore, Soufre et Cobalt

Le dosage des éléments : Phosphore, Soufre et Cobalt a été réalisé au niveau du laboratoire du BEAGx (Bureau d'études environnement et analyses). La détermination des concentrations des éléments recherchés est réalisée après une étape de digestion (minéralisation à reflux, eau régale). Pour le phosphore la méthode utilisée est la spectrophotométrie d'absorption moléculaire (méthode au bleu de molybdène), Pour le soufre, la néphélométrie a été utilisée avec (BaCl₂-Tween 20) et pour le Cobalt, la spectrométrie d'absorption atomique (AAS).

2.3. Détermination de la teneur en matières azotées totales ou protéines brutes

L'azote total (N) contenu dans les fourrages et celui lié à la fraction pariétale est dosé par la méthode de Kjeldahl. Cette méthode de dosage comporte deux étapes : la minéralisation et la titration.

L'azote organique de l'échantillon sec et broyé (prise d'essai 1g) est transformé en azote minéral (sulfate d'ammonium), en présence d'acide sulfurique concentré à chaud (20 ml H₂SO₄ à 420°C pendant 4 heures) et d'un catalyseur au titane/cuivre (Kjeltabs CT, Thompson et Capper LTD). Après transformation du sulfate d'ammonium en ammoniac par une base forte (NaOH, 10N), l'ammoniac est entraîné par la vapeur d'eau et repris dans une solution d'acide borique contenant un indicateur coloré. Il est alors titré par une solution d'HCl (0,1N). Les étapes de distillation et de titration sont réalisées sur un a appareil de type Kjeltac Auto Sampler 1035 Analyser (Tecator). AOAC, 981.10 (1990).

La teneur en azote de la matière sèche est obtenue par 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. Détermination de la teneur en matières grasses

Les lipides sont extraits en continu et à froid à l'éther diéthylique dans un appareil de Soxhlet. Les graisses ainsi dosées se nomment extrait étheré (EE). L'appareil de soxhlet comporte 3 parties, respectivement de bas en haut, un ballon à col rodé, un extracteur recevant une cartouche et un réfrigérant à reflux. Environ 5g d'échantillon (PE) sont pesés dans une cartouche en carton poreux, après introduction de 180 ml d'éther diéthylique dans le ballon à col rodé, la cartouche est déposée dans l'extracteur et les trois parties de l'appareil sont assemblées. L'éther diéthylique est alors porté à ébullition pendant 6h sur des plaques chauffantes jusqu'à obtention d'un maximum d'éther dans l'extracteur. Une fois l'éther éliminé, les cartouches sont séchées à l'étuve à 105°C pendant 1h30 à 2h00. AOAC, 920.39 (1990).

L'expression des résultats se fait comme suit :

$$\% \text{ EE} = \frac{[(T+EE)-T] \times 100}{(PE \times \text{MSa}/100)}$$

Avec :

T: Poids du ballon vide, PE: Prise d'essai, (T+EE) : Poids du ballon+ extrait étheré

2.5. Détermination des composés de la paroi végétale

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

2.5.1. Estimation de la fraction NDF (Neutral Detergent Fibre)

La fraction NDF correspond à la teneur en parois totales des fourrages (cellulose, hémicelluloses et lignine) et des cendres. La méthode au détergent neutre repose sur la solubilisation à pH neutre des protéines par le lauryl sulfate de sodium et des substances pectiques par l'EDTA. L'appareil utilisé est un appareil de digestion automatique (ANKOM^{RF} Fiber Analyzer, 120v, Domestic, ANKOM Technology Corp., Fairport, NY, USA).

-Réactifs utilisés

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

-Préparation de la solution NDS (Neutral Detergent Solution)(Annexe 1)

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

-Préparation de l'échantillon

Dans des sacs ANKOM (Fiber Filter bag, ANKOM Technology Corp., Fairport, NY, USA), sont introduits 500 mg de substrat préalablement séché.

Les sacs sont scellés par une thermoscelleuse (ANKOM R 220v 50/60 HZ Heat sealer ; ANKOM Technology Corp., Fairport, NY, USA). L'appareil est rempli de 2 litres de la solution NDS. Les sacs sont introduits dans l'appareil et portés à ébullition pendant une heure. L'appareil est vidangé de la solution NDS, les sacs sont alors rincés trois fois à l'eau distillée chauffée à 80°C environ 10 min. Les sacs sont par la suite lavés à l'acétone sous agitation 1min et séchés dans une étuve réglée à 105°C jusqu'à poids constant.

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

La fraction ADF correspond à la teneur en parois totales des fourrages (cellulose et lignine). Une solution détergente à base de bromure de cétyléthylammonium (CTAB) et d'acide sulfurique (1N) permet d'hydrolyser à chaud les constituants cytoplasmiques, les hémicelluloses et les protéines.

-Réactifs utilisés: Bromure de tri méthyle ammonium cétylique (Sigma), solution d'acide sulfurique 1N (Biochem).

-Préparation de la solution ADS (Acid Detergent Solution) (Annexe 1)

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

-Préparation de l'échantillon

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

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

Cette méthode comporte un traitement à l'acide sulfurique concentré. Le résidu correspond en plus des cendres, à la lignine brute. Les sacs récupérés, après analyse ADF, sont traités par l'acide sulfurique concentré à 72 % pendant trois heures. Les sacs sont rincés trois fois à l'eau distillée bouillante pendant 10 min. Ils sont ensuite lavés à l'acétone et mis au séchage jusqu'à poids constant dans une étuve à 105°C.

3. Détermination de la teneur en énergie brute

La teneur en énergie brute de l'échantillon est déterminée lors de la combustion complète d'une quantité connue d'échantillon dans une chambre adiabatique avec un calorimètre (Adiabatic Calorimeter 1241, PARR). La chaleur dégagée lors de la combustion augmente la température d'une quantité précise d'eau. Cette augmentation est convertie en une quantité connue de calories mesurées lors de la combustion d'un échantillon standard (AOAC, 1990).

- Réactifs

Phénolphtaléine (1% dans l'éthanol ou alcool dénaturé), carbonate de sodium (Na_2CO_3 , 3,76g/l).

- Procédure

-La première étape est la calibration qui consiste à calciner une quantité précise d'acide benzoïque dont la teneur en énergie brute est connue. Cette opération est réalisée une dizaine de fois avec chaque bombe de combustion. La moyenne obtenue pour chaque bombe est indiquée au poste de commande avant chaque série d'analyses.

-La seconde étape est la mesure qui consiste à peser 1g d'échantillon (PE) dans une capsule. Couper un fil métallique à une longueur de 10 cm et le peser (PI). Par la suite, introduire 5 ml d'eau distillée dans la bombe à combustion et la saturer en O_2 (pression 30 atm) et enfin la placer dans un sceau contenant 2 litres d'eau déionisée et standardisée à la température de 25°C. Le sceau est alors placé dans la chambre du calorimètre pour démarrer la combustion, jusqu'au signal sonore pour noter le résultat (Energie) affiché par le poste de commande (calorimeter controler, 1710, PARR). Après dépressurisation de la bombe, les résidus de fil métallique sont récupérés et pesés (PR). Par la suite, le liquide est récupéré dans un bécher et 2 à 3 gouttes de l'indicateur coloré, le phénolphtaléine sont additionnées. Une titration est alors effectuée avec la solution de carbonate de sodium (V) en ml (Annexe 2).

Le résultat est exprimé comme suit :

$$\text{EB (cal/g MS)} = [\text{Energie} - (\text{PI} - \text{PR}) \times 1000 \times 1.4 - \text{V}] / (\text{PE} \times \text{MSa} / 100)$$

4. Analyses phytochimiques des composés secondaires**4.1. Analyse qualitative**

La présence de facteurs antinutritionnels est mise en évidence qualitativement suivant les méthodes décrites par Larrahondo (1985) et Rosales *et al.* (1989). Un extrait est préparé et un virage de couleur est observé suite à l'addition de différents réactifs indiquant la présence de composés phénoliques, de saponines ou de stéroïdes.

-Procédé d'extraction

L'extraction des composés secondaires est réalisée par une solution aqueuse de méthanol à 80% (v/v). 15g d'échantillon sec sont traités pendant 40 min par 30 ml de méthanol. L'extraction est répétée trois fois et le mélange obtenu est filtré. Le résidu est incubé dans de l'eau chaude

pendant 20 min puis filtré à son tour. L'opération d'extraction permet l'obtention de deux phases : une phase polaire correspondant à la fraction aqueuse et une phase apolaire représentée par la phase méthanolique. Les deux phases sont utilisées pour les différentes analyses.

➤ **Mise en évidence des différents composés**

-Mise en évidence des saponines

1 ml d'extrait aqueux est énergiquement agité pendant 30 secondes. Après 5 minutes, la hauteur de mousse dans les tubes à essais est mesurée et donne une indication sur la teneur de saponines dans les fourrages selon le barème suivant :

- moins de 5 mm : absence de saponines,
- 5 à 9 mm : contenu faible en saponines,
- 10 à 14 mm : contenu moyen en saponines,
- plus de 15 mm : contenu élevé en saponines.

-Mise en évidence des phénols totaux

1 ml de l'extrait méthanolique est dilué par addition de 2 ml d'eau distillée. Deux à trois gouttes de chlorure ferrique (FeCl_3 à 2%) sont ajoutés et le virage de couleur indique la présence de composés phénoliques comme suit :

- aucun changement de couleur : absence de phénols ou de tanins,
- bleu foncé : présence de phénols ou de tanins hydrolysables,
- vert foncé : présence de tanins condensés.

-Mise en évidence des stéroïdes

10 ml de l'extrait aqueux sont traités par une solution d'acide chlorhydrique (HCl, 10%) pour obtenir un pH=2, et sont mélangés avec 10 ml d'éther. Après évaporation, 0,5ml de chloroforme et d'acide acétique sont ajoutés. L'addition de 1 à 2 ml d'acide sulfurique concentré permet le virage de la couleur au bleu verdâtre, indiquant la présence de stéroïdes.

4.2. Analyse quantitative des composés phénoliques

4.2.1. Préparation de l'extrait

Les composés phénoliques sont extraits par une solution aqueuse d'acétone (70%). Il s'agit d'une double extraction dans laquelle 0,2g d'échantillon sont dilués dans 10 ml d'acétone (70%) puis centrifugés à 3000 g pendant 10 min, à 4°C. Le surnageant (S1), qui en résulte, est recueilli et conservé dans la glace à 4°C. Le culot est remis en suspension dans 10 ml d'acétone (70%) et il est, à nouveau, centrifugé comme précédemment. Le culot est alors éliminé, l'extrait final est obtenu en mélangeant le surnageant (S1) et (S2). L'extraction est répétée 4 fois jusqu'à épuisement (Makkar *et al.*, 1993).

4.2.2. Analyse des phénols totaux

Elle est réalisée selon le procédé décrit par Makkar *et al.* (1993). Les phénols totaux sont directement déterminés dans l'extrait. Ils sont estimés quantitativement par l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu (1N). Le milieu réactionnel est composé de 0,1 ml d'extrait, 0,5 ml d'eau distillée, 0,25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (1N) et 1,25 ml d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3 , 20%). Le mélange est agité au vortex et l'absorbance est mesurée à 750 nm après 40 min. La teneur en phénols totaux est exprimée en équivalent d'acide tannique/kg de MS (Figure 12).

4.2.3. Dosage des tanins totaux

Cette méthode se base sur la quantification des tanins totaux par leur précipitation, grâce à l'utilisation d'un chélateur chimique: le polyvinypolypyrrolidone (PVPP). 100 mg de PVPP sont introduits dans des tubes à essai et ajoutés de 1 ml d'eau distillé et 1 ml d'extrait de l'échantillon. La solution, agitée au vortex, est maintenue à 4°C pendant 15 min. Elle est agitée une seconde fois puis centrifugée à 3000 g pendant 10 min. Après centrifugation, le surnageant comporte uniquement les phénols simples autres que les tanins.

Leur contenu est alors mesuré comme décrit dans la section (4.2.2). La teneur en tanins totaux correspond à la différence entre la teneur en phénols totaux et celle additionnée du PVPP. Elle est exprimée en équivalents g d'acide tannique/kg MS.

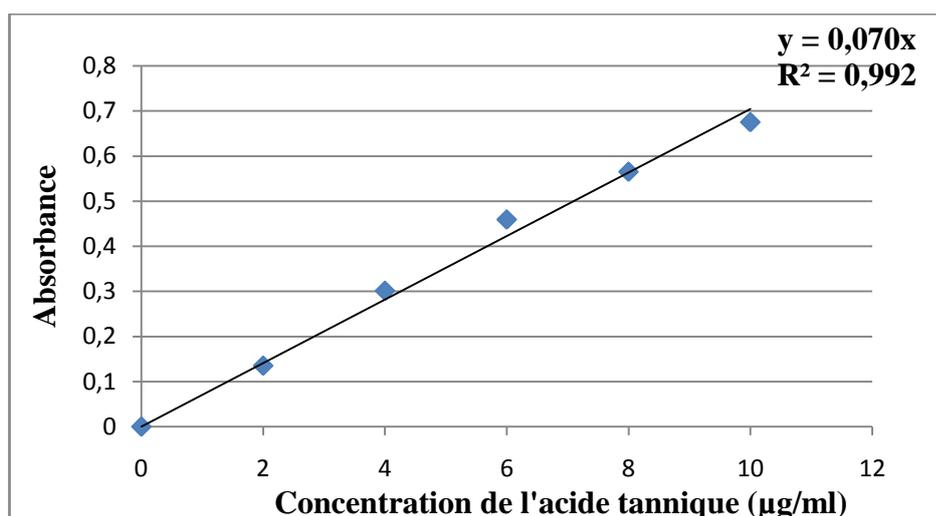


Figure 12: Courbe étalon des phénols totaux

4.2.4. Dosage des tannins condensés proanthocyanidines

Cette analyse est faite selon la technique de (Porter *et al.*, 1986) avec des modifications de Makkar (2003a) et l'utilisation des tanins condensés du quebracho comme standard. 3ml du réactif butanol-HCl (95:5 v/v) et 0,1 ml d'une solution ferrique (sulfate d'ammonium ferrique 2%, dilué dans l'HCl 2N) sont ajoutés dans chaque tube contenant 0,5 ml de l'extrait. Les tubes sont ensuite fermés à l'aide de bouchons et ils sont agités vigoureusement. Les tubes sont incubés dans un bain marie bouillant pendant 60min puis ils sont refroidis à l'abri de la lumière. Les absorbances de ces solutions sont déterminées à 550nm. les résultats sont exprimés en se référant à une courbe étalon de quebracho tanin (Figure 13).

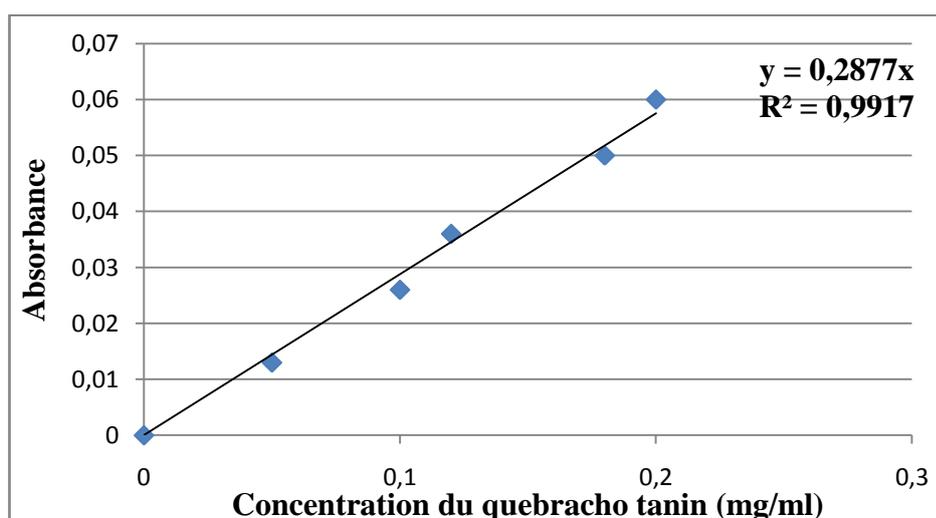


Figure 13: Courbe étalon des tanins condensés

4.2.5. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes contenus dans les extraits sont estimés par le mélange de 0,5 ml d'une solution éthanolique d'AlCl₃ 2% avec 0,5 ml de l'extrait de la plante. Après 30 minutes d'incubation à une température ambiante, l'absorbance du mélange est lue à 420nm. La concentration en flavonoïdes est exprimée en équivalent de quercétine (Figure 14).

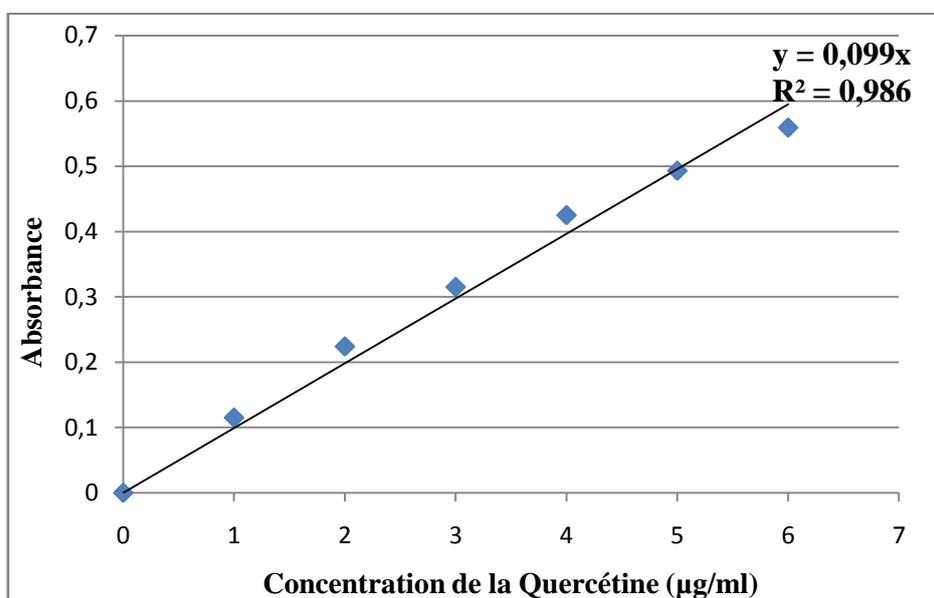


Figure 14: Courbe étalon des flavonoïdes

5. Fermentations *in vitro* des substrats par le microbiote ruminal

5.1. Technique de production de gaz *in vitro*

5.1.1. Principe

La technique de production de gaz *in vitro* est une simulation de la dégradation des aliments par les microorganismes dans le rumen. Elle a été, à l'origine, développée par Menke *et al* (1979) puis modifiée par Menke and Steingass (1988). C'est une technique rapide, simple et peu coûteuse, elle se base sur la mesure de la production de gaz (méthane et gaz carbonique) qui sont les produits fermentaires essentiels résultant de la dégradation microbienne, en plus des gaz libérés à partir du système tampon, induits par la production des acides gras volatils (Blümmel and Orskov.,1993; Mould, 2003). Elle permet la prédiction des performances métaboliques du microbiote ruminal, donc de la dégradation des fourrages et elle est aussi adaptée au suivi de la cinétique de leur fermentation.

5.1.2. Description des systèmes de fermentation utilisés

5.1.2.1. Dans des flacons en verre

En principe, cette technique est similaire au procédé de production de gaz décrit par Menke *et al.* (1988). Elle en diffère, cependant, par le fait que les incubations ont lieu dans des flacons en verre (batch) de 250 ml de capacité, ANKOM^{RF} gas production system (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, USA). Chaque flacon du système ANKOM, est fermé avec une tête contenant une pile.

La pression de gaz est enregistrée toutes les 5 minutes. Un système sans fil, permet la mesure des changements de pression à l'intérieur de chaque flacon, par rapport à la pression atmosphérique. Les changements sont dus aux gaz produits durant les fermentations. Les modules communiquent les informations à un ordinateur en utilisant une transmission à fréquence radio. A l'interface de l'ordinateur, l'opérateur peut contrôler de nombreuses variables, telle que la libération des gaz à travers les valves internes et enregistrer une valeur toutes les 5min.



Figure 15 : Système de fermentation automatisé (ANKOM^{RF})

5.1.2.2. Dans des Seringues

Les fermentations sont réalisées dans des seringues en polypropylène de 60 ml. Le bout de l'aiguille de la seringue est connecté à un tube en silicone de 4 à 5 cm, fermé avec une pince de Mohr pour éviter la perte des gaz produits pendant la fermentation. Les pistons des seringues sont graissés avec de la vaseline ou de la graisse de silicone. Le niveau de la fermentation des substrats est suivi par l'enregistrement cinétique du volume de gaz produit, indiqué par le déplacement du piston.

5.1.3. Préparation de l'inoculum

Le jus de rumen utilisé comme inoculum dans le système automatisé provient de deux vaches Holstein belges (Poids =750Kg), munies d'une canule au rumen, et élevées au niveau d'un centre d'étude et de production animale (C.E.P.A), selon les normes.

La ration totale des vaches est composée de 8 Kg d'un foin de prairie (0.69UFL/Kg MS) et de 3Kg d'une mixture de concentrés (Bovi Brio 20, SCAM, Belgique). La ration est calculée afin de satisfaire les besoins d'entretien de l'animal. Les vaches reçoivent deux rations par jour et ont un accès libre à l'eau.

Le prélèvement du liquide (phase liquide et phase solide) est réalisé à l'aide d'une pompe juste avant le repas du matin, et transféré dans des bouteilles thermos préalablement chauffées à 39°C et saturées en CO₂. Les liquides provenant des deux vaches sont filtrés et mélangés.

Le jus de rumen utilisé comme inoculum dans le système manuel, provient de moutons de race locale (Ouled Djellal) après leur abattage à l'abattoir de Boussouf (Constantine). Le liquide est obtenu par filtration du contenu du rumen à travers 4 couches de gaze chirurgicale. Il est ensuite transféré au laboratoire dans un thermos préchauffé à 39°C et saturé par le CO₂.

Dans les deux systèmes, toute la manipulation est réalisée sous un flux constant en CO₂, pour minimiser les changements de la population microbienne et pour éviter toute contamination en O₂.



Figure 16: Prélèvement du liquide ruminal à partir d'une vache canulée du rumen

5.1.4. Éléments constitutifs du milieu de culture

Dans les deux procédés de fermentation, le milieu de culture est composé d'une solution tampon, d'une solution de macrominéraux, d'une solution d'oligo-éléments, d'un indicateur du potentiel d'oxydoréduction et d'une solution réductrice (tableau 5). Le mélange de couleur bleue est chauffé jusqu'à virage de la couleur vers le rose. Ensuite, la solution est barbotée avec un flux continu de CO₂, ce qui entraîne la réduction de la salive artificielle indiquée par le virage de la couleur du rose au blanc transparent. A cette étape, le jus de rumen filtré est ajouté dans les proportions 1/2 (v/v) selon le procédé de Menke *et al.*(1988). Enfin, un barbotage en surface est maintenu pendant 10 min de manière à maintenir une atmosphère totalement anaérobie.

5.1.5. Inoculation et incubation

Dans la technique de (Menke *et al.*, 1988), 200 mg de substrat: algue brune, algue verte et cinq mixtures à base d'algue verte et de foin de vesce-avoine aux proportions (5%, 10%, 20%, 40%, 80% d'algue incorporée) sont introduits dans chaque batch et mis à fermenter avec 30 ml de milieu de culture (10 ml de jus de rumen filtré plus 20 ml de salive artificielle). Pour chaque série d'incubation et pour chaque substrat, trois répétitions sont réalisées. Dans les mêmes conditions, trois fermenteurs témoins, sans substrat (blanc : jus de rumen plus salive artificielle) sont incubés. L'incubation est réalisée à 39°C sous agitation au bain marie.

Tableau 5: Composition de la salive artificielle utilisée lors de la fermentation ruminale *in vitro* (Tampon Menke et Steingass, 1988)

Solution	Composition	Quantité
Solution des éléments majeurs C	Na ₂ HPO ₄	5,74 g
	KH ₂ PO ₄	6,2 g
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,6 g
	Eau distillée	1000 ml
Solution des éléments traces A	CaCl ₂ ×2H ₂ O	13,2 g
	MnCl ₂ ×4H ₂ O	10,0 g
	CoCl ₂ ×6H ₂ O	1 g
	FeCl ₃ ×6H ₂ O	0,8 g
	Eau distillée	1000 ml
Solution tampon B	NaHCO ₃	35 g
	NH ₄ Cl	2,7 g
	Eau distillée	1000 ml
Solution indicatrice d'oxydo réduction D	C ₁₂ H ₆ NO ₄ Na	100 mg
	Eau distillée	100 ml
Solution réductrice E	Na ₂ S×9H ₂ O	285 mg
	NaOH (1N)	2 ml
	Eau distillée	47,5 ml

Pour 1 Litre: 1,2 ml solution A, 237 ml solution B, 237 ml solution C, 1,22 ml solution D, 47,5 ml solution E.

5.2. Analyse qualitative des gaz produits

Le volume des gaz produits méthane et dioxyde de carbone (CH₄,CO₂), est déterminé par un traitement à la soude (NaOH,10N) pour les fermentations effectuées en seringues. Les gaz produits à chaque intervalle de temps sont transférés dans des seringues vides, Ces dernières sont injectées de manière étanche par la soude qui réagit avec le CO₂ par absorption, entraînant le déplacement du piston d'un volume correspondant au volume de CH₄. Le volume de CO₂ est déterminé par soustraction du volume net de CH₄ enregistré, par rapport au volume de gaz total produit (Jouany *et al.*, 1986).

5.3. Détermination des paramètres cinétiques : modèle mathématique (Groot *et al.*, 1996)

Les données de gaz produits durant la fermentation sont modélisées selon le modèle mathématique monophasique proposé par (Groot *et al.*,1996):

$$G = A / (1 + (B/t)^C)$$

G (ml g⁻¹MS) indique la quantité de gaz accumulé au temps t après incubation,

A (ml g⁻¹MS) le volume maximal de gaz produit (pour t=∞),

B (h) le temps au demi-volume maximal de gaz produit quand G= A/2

Rmax (ml g⁻¹ MS h⁻¹) correspond au taux de fermentation maximal

Tmax (h) le temps auquel le taux de fermentation maximal est atteint

6. Etude de la digestibilité des substrats

6.1. Digestibilité apparente de la matière sèche (ADDM)

Après fermentation, le contenu de chaque batch de fermentation est vidé et transféré dans des tubes Falcon préalablement tarés. Il est centrifugé à 5000 rpm pendant 10 min. Le surnageant est récupéré, alors que le culot est complété avec les particules collées dans le batch après son rinçage par 10 ml d'eau distillée. Une seconde centrifugation est effectuée à 5000 rpm pendant 10 min. Le surnageant est jeté et le culot est récupéré et séché à 80°C pendant 48 heures (Mellenberger, 1970).

$$\text{ADDM} = 100 * ((\text{MSi} - \text{MSr}) - \text{MSb} / \text{MSi})$$

MSi : correspond à la prise d'essai (substrat sec) introduite dans chaque batch,

MSr : correspond à la matière sèche résiduelle dans chaque batch de fermentation

MSb : représente la moyenne du résidu sec du blanc

6.2. Digestibilité *in vitro* de la matière organique (AOMD)

Pour l'estimation de la digestibilité apparente de la matière organique, le contenu sec des tubes est transféré dans un creuset en porcelaine, préalablement taré et incinéré pendant 6 heures à 550°C.

$$\text{AOMD} = 100 * ((\text{MOi} - \text{MOr}) - \text{MOB} / \text{MOi})$$

MOi : correspond à la matière organique introduite dans chaque batch

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

MOB : représente la moyenne du résidu organique du blanc

6.3. Estimation de l'énergie métabolisable (ME)

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

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

GP: Production de gaz (ml/200mg MS) après 24h de fermentation, CP : Protéines brutes

7. Détermination des paramètres fermentaires

7.1. Mesure du pH

Le pH du jus de rumen et des contenus des fermenteurs est déterminé à l'aide d'un pH mètre (Model 3110 SET 2, Germany).

7.2. Dosage de l'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 (NH₃) se fixe sur une molécule de phénol en présence du chlore. La réaction est catalysée par le nitroprussiate de sodium. Il se forme un complexe de type indophénol qui donne une coloration bleue.

Les échantillons (contenus de jus de rumen et des fermenteurs anaérobies) sont acidifiés avec l'acide chlorhydrique à raison de 10 ml d'acide pour 10 ml de contenu, et ils sont conservés à -20°C. Avant analyse, les échantillons sont décongelés et centrifugés à 12000 rpm.

-Dosage

5 ml d'une solution A (tableau 6) sont mélangés avec 2 µl de l'échantillon. Après une bonne homogénéisation, 5ml d'une solution B (tableau 6) sont ajoutés. Ce mélange homogénéisé est maintenu dans un bain marie à 37°C pendant 20 min.

La densité optique est mesurée à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-1650 PC Shimadzu Corporation, Japan). Les résultats sont rapportés à une courbe étalon standard et exprimés en équivalent de chlorure d'ammonium (NH_4Cl) (Figure 17).

Tableau 6: Composition des solutions A et B pour le dosage de l'azote ammoniacal

<i>Solution A :</i>	<i>pour 500 ml Eau distillée</i>	
	Phénol	5 g
	Nitroprosside de sodium	25 g
<i>Solution B :</i>	<i>pour 500 ml Eau distillée</i>	
	Hydroxyde de sodium	2,5 g
	Hypochlorite de sodium	5 ml

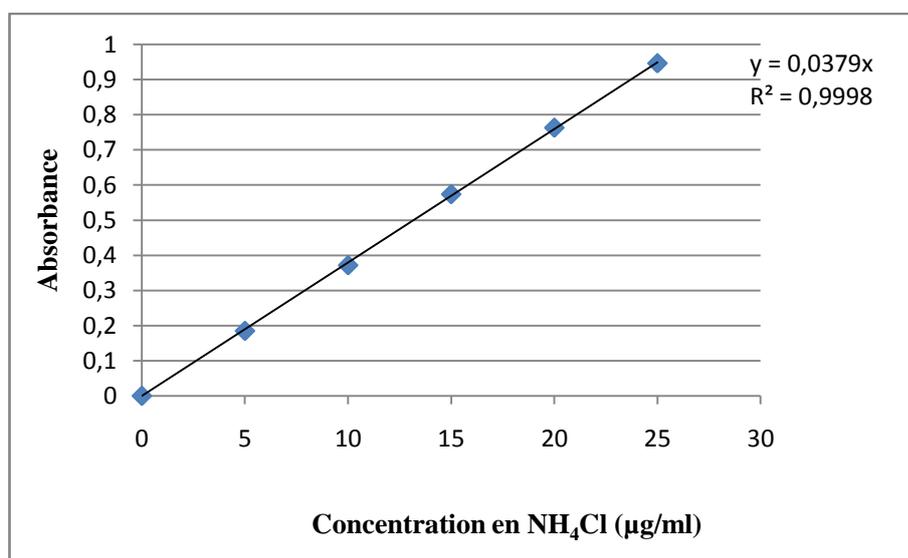


Figure 17: Courbe étalon pour le dosage de l'azote ammoniacal

7.3. Dosage des acides gras volatils par HPLC

Après fermentation *in vitro*, le contenu de chaque fiole est récupéré et conservé à -20°C . Au moment de l'analyse, les échantillons sont décongelés à 4°C , bien homogénéisés au vortex. Par la suite, 1,4 ml sont centrifugés à 3000 g pendant 15 min. 1 ml de surnageant est acidifié par du H_2SO_4 pour atteindre un pH compris entre 3 et 4. Une filtration est alors réalisée par des petits filtres ($0,45\ \mu\text{m}$) et des petites seringues en polypropylène. 0,2 ml du filtrat, sont alors injectés dans des flacons d'injection spéciaux et placés dans l'HPLC (Alliance 2690 de Waters).

-Conditions chromatographiques

-La colonne utilisée (colonne Aminex HPX-87H), elle est à base d'un copolymère sulfoné (forme H) de divinyl benzène et de styrène, sa température est de 40°C.

La régénération de la colonne se fait après 18 à 25 injections en faisant éluer le solvant de régénération (H₂SO₄ 25mM) à 0,2 ml/min et 65°C pendant 4 à 16h. Laisser reposer la colonne 15 min et la replacer.

- Le détecteur UV (286 de Waters)

- Éluant H₂SO₄ 3mM à 5% CH₃CN: (6ml H₂SO₄ 1M+100ml CH₃CN)

- Standard interne (SI): Acide 2-méthyl-valérique à 2mg/ml et/ou Acide 4-méthyl-valérique à 2mg/ml, il est pesé dans un ballon jaugé et dissous avec l'éluant.

- La première injection concerne l'éluant et à partir de la deuxième se sont les échantillons.

- Les aires des pics obtenus servent à calculer les concentrations de chaque AGV. En fonction des rapports entre surface de chaque acide avec le standard interne; quantité ajoutée à l'échantillon et la droite de calibration.

8. Détermination des activités enzymatiques

8.1. Estimation de l'activité carboxyméthylcellulase (CMCase)

L'activité cellulase est mesurée selon la méthode de Miller (1959) dont le principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur des sucres libérés lors de l'hydrolyse de la cellulose. Les sucres réducteurs sont dosés par une réaction colorimétrique due à la présence de l'acide dinitrosalicylique (DNS). L'activité cellulase est exprimée par l'unité internationale correspondant à une micromole de glucose libéré par minute et par ml de milieu.

8.1.1. Extraction

Au terme de 24 heures de fermentation, le contenu de chaque batch de fermentation est vidé et soumis à une surgélation immédiate à -40°C pendant 48 heures. Les échantillons sont par la suite décongelés dans un bain marie à 39°C (Hristov *et al.*, 2011). Par la suite les échantillons sont soumis à une sonification (10 ml jus de rumen + 30 ml tampon phosphate) à 50 mV pendant 6 minutes avec 30 secondes pulsations et 30 secondes d'intermittence par min. Enfin, une centrifugation est effectuée (17000xg, à 4°C pendant 30 minutes), le surnagent est récupéré pour la détermination de l'activité enzymatique (Singh *et al.*, 2011).

8.1.2. Dosage

A. Préparation des tubes test

0,5 ml de l'extrait enzymatique sont mélangés avec 1ml de tampon phosphate et 0,5 ml de CMC dans un tube à essai et agités vigoureusement.

Les tubes sont par la suite incubés dans un bain marie pendant 20 minutes à 39°C. La réaction est stoppée par ajout de 3 ml de DNS.

B. Préparation des tubes témoins

Ils sont préparés en mélangeant, 1ml de tampon phosphate avec 0,5 ml extrait, 3ml de DNS et 0,5 ml de CMC, (Le DNS doit être rajouté avant la CMC pour empêcher la réaction de l'enzyme avec le substrat).

C. Les tubes (tubes test + témoins) sont soumis à ébullition pendant 10 minutes.

D. 1ml de sels de rochelle sont rajoutés dans chaque tube, les tubes sont ensuite refroidis à température ambiante.

E. L'absorbance est lue à 575 nm.

8.1.3. Expression des résultats

$A = \text{Absorbance du test} - \text{Absorbance du témoin}$

Lire le ΔA à partir de la courbe d'étalonnage (Figure 18) pour déterminer la quantité de glucose (μg) libérée pendant l'incubation où :

$$\text{Activité enzymatique (unité)} = \mu\text{mol glucose/ml/min} = (\mu\text{g glucose})/T \times S \times 180$$

T=Temps d'incubation (min), S=Volume de l'extrait enzymatique (ml), 180= Poids moléculaire du glucose

Le résultat de l'activité enzymatique totale est rapporté à la quantité de protéines totales de l'échantillon afin de déterminer l'activité spécifique de la CMC ase. La quantité des protéines est déterminée selon la méthode (Lowry *et al.*, 1951) en utilisant la BSA comme protéine étalon. L'activité enzymatique est calculée en unité internationale par ml (UI/ml). Une unité de l'activité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme qui libère une micromole d'équivalent glucose (lorsque le glucose est utilisé comme étalon sucre réducteur) par minute et par ml d'enzyme. L'activité spécifique est exprimée en unité par mg de protéines.

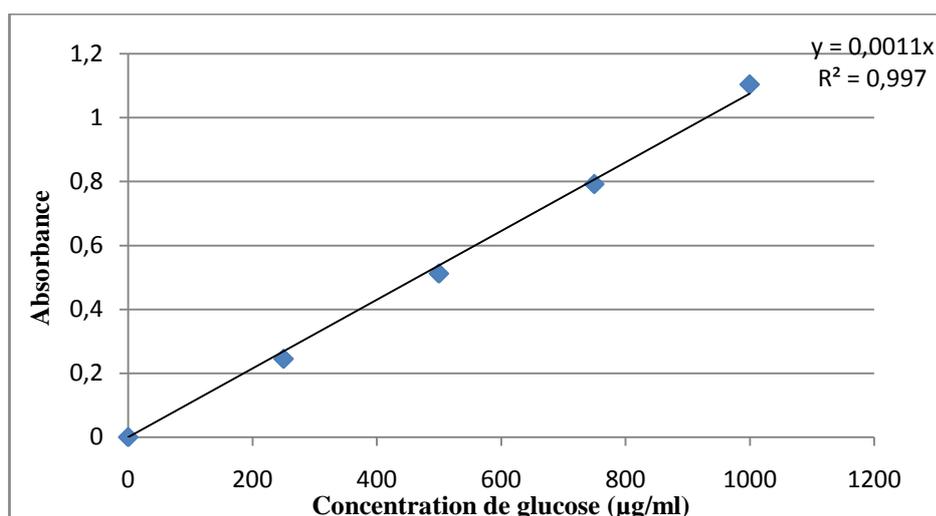


Figure 18: Courbe étalon de glucose

8.2. Analyse de la dégradabilité enzymatique de l'azote

La dégradabilité enzymatique de l'azote est estimée suivant la méthode de Aufrère et Cartailier (1988). Cette méthode analytique estime *in vitro* la dégradabilité des matières azotées totales (MAT) des aliments dans le rumen. Son principe est de mesurer le % d'N solubilisé suite à l'hydrolyse des MAT par des protéases. L'échantillon subit une hydrolyse par une protéase d'origine bactérienne dans un tampon borate phosphate à pH=8 aux temps 1h et 24h. Le dosage de l'azote dégradé est effectué sur le surnageant par la méthode Kjeldhal.

-Préparation de la solution enzymatique

2g d'enzyme/l tampon borate-phosphate. Le tampon borate-phosphate est préparé comme suit (12,2g/l Na₂HPO₄·2H₂O; 8,91g/l Na₂B₄O₇·10H₂O) pH8. L'enzyme est une protéase extraite de *Streptomyces griseus* (type XIV, Sigma n°p-5147). Elle est dissoute dans le tampon borate-phosphate, ajustée à pH 8 et filtrée à travers du papier Whatman (filtre Whatman n°41), la solution doit être préparée extemporanément.

-Préparation des solutions d'antibiotique et d'antifongique

La solution antibiotique est préparée en mélangeant 10 mg de Tétracycline (sigma n° T-3258) avec 100 ml de tampon borate-phosphate à pH 8. La solution antifongique est préparée en mélangeant 10 mg de Nystatine (sigma n° T-3503) dans 1litre de tampon borate phosphate.

-Procédure

0,5g d'échantillon broyé sont pesés dans un tube à centrifuger de 80 ml (Chaque point de cinétique est réalisé en double), Un témoin est introduit dans chaque série (temps 1h et 24h) ainsi que deux tubes sans échantillons (blancs) qui permettent de connaître la teneur en azote de la préparation enzymatique. 50ml de solution enzymatique, 0,5ml de la solution antibiotique et 0,5 ml de la solution antifongique sont ajoutés. Les tubes sont fermés et incubés dans un bain marie thermostaté à 40°C, en veillant à agiter manuellement aux temps: 0mn, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, puis 24h. Deux séries de tubes sont analysés et correspondent aux temps d'incubation 1h et 24h. Après incubation, tous les tubes sont centrifugés 5mn à 3000 tours/mn, le surnageant est alors filtré à travers des filtres (Durieux 2B) préalablement humidifiés avec de l'eau distillée, et l'azote est dosé sur le surnageant selon la méthode Kjeldhal.

-Expression des résultats

Les valeurs de l'azote dégradé sont rapportées d'abord à la matière sèche de départ puis en % de l'azote de l'échantillon.

$$\text{Quantité d'azote dégradé dans le surnageant en \% de MS} = \frac{(14 \times T \times (V - V_0))}{m \times 1000} \times 100$$

Avec

T: Normalité de l'acide chlorhydrique, V: Volume en ml d'acide chlorhydrique nécessaire à la neutralisation pour la prise d'essai, V₀: Volume en ml d'acide chlorhydrique nécessaire à la neutralisation pour le blanc, M: Masse en g de la prise d'essai (exprimée par rapport à la MS)

$$\text{DE\%} = \left(\frac{\text{Quantité d'azote solubilisé dans le surnageant}}{\text{Teneur d'azote total}} \right) \times 100$$

9. Caractérisation du profil microbien après fermentation *in vitro*

9.1. Dénombrement des protozoaires (comptage direct)

Les protozoaires sont traités avec une solution de MFS (vert de méthyle saline) (tableau 7) qui permet la fixation des cellules par le formaldéhyde et la coloration des noyaux par le vert de méthyle (Ogimoto, 1981). Le dénombrement est réalisé sur une cellule de Malassez, qui est une lame épaisse en verre dans laquelle est creusée une chambre de comptage constituée de 100 rectangles, parmi lesquels 25 sont subdivisés en 20 petits carrés pour faciliter le comptage. Le volume total de la cellule est égal à 1µl, soit 0,01µl par rectangle, ce qui permet une évaluation quantitative.

Tableau 7: Composition de la solution MFS (Ogimoto et Imai, 1981)

Composés	Quantité
Formaldéhyde à 35%	100ml
Eau distillée	900ml
Vert de méthyle	0,6g
Chlorure de sodium	8g
	QSP,1000ml

-Echantillonnage

Après 24h de fermentation, un volume de 100µl du contenu de chaque seringue est mélangé avec le même volume de la solution MFS, les échantillons traités sont conservés 30 minutes à l'obscurité avant le comptage.

-Comptage et calcul

L'échantillon à compter est mis entre lame et lamelle à l'aide d'une pipette pasteur en évitant la formation de bulles d'air. Le comptage est fait sur les 25 rectangles subdivisés en petits carrés à l'aide d'un microscope à l'objectif ×40. Chaque échantillon est compté deux fois est si la différence entre les deux résultats est supérieure à 10% le dénombrement doit être refait.

Le nombre des protozoaires est exprimé selon la relation suivante :

$$N = n1 * v * n2 * f * 1000$$

Avec:

N: nombre de cellules par ml; n1: nombre de cellules comptées;

v: volume d'un rectangle=0,01µl; n2: nombre de rectangles comptés= 25; f: facteur de dilution.

9.2. Analyse de la microflore après fermentation par PCR en temps réel

Les bactéries totales, les trois principales bactéries cellulolytiques (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*) et les champignons anaérobies totaux sont quantifiés après 24h de fermentation par PCR quantitative en temps réel. Après 24 h de fermentation, le contenu de chaque bouteille est vidé dans deux tubes Falcon et conservé à -20°C jusqu'à analyse.

9.2.1. Extraction de l'ADN

Les échantillons placés à -20°C sont décongelés à température ambiante et bien homogénéisés par un vortex. Deux aliquotes de $1000\mu\text{l}$ sont prélevées et représentent une même fiole. Une étape préliminaire consiste à faire passer les échantillons dans un bead-beating pour destruction des parois cellulaires et détachement des bactéries. Une étape de centrifugation est ensuite réalisée pour la sédimentation des particules. Toutes les autres étapes qui doivent être suivies pour l'extraction sont mentionnées dans le guide qui vient avec le Kit d'extraction (QIAamp DNA Stool Mini) (**Annexe 3**).

Une fois l'ADN obtenu, il est conservé à -20°C . Pour une conservation de longue durée plus d'un mois, il est préférable de conserver à -80°C .

La pureté et la quantité d'ADN extrait dans chaque échantillon ont ensuite été déterminées avec le spectrophotomètre Nano-Drop/ND-1000 (Nano-Drop Technologies, Wilmington, Allemagne) à 260 nm. Les différents ADN sont ensuite dilués afin de partir de la même concentration d'ADN dans chaque puits de la plaque PCR.

9.2.2. Réalisation de la PCR en temps réel

9.2.2.1. Critères de choix des amorces

Les amorces des bactéries totales, des deux bactéries cellulolytiques (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*) et des champignons anaérobies totaux sont tirées des travaux de Denman *et al.* (2006). Les amorces de *Ruminococcus albus* sont tirées de l'étude de Ghasemi *et al.* (2012).

Le choix s'est orienté vers celles-ci, d'une part, parce qu'elles ont donné de bons résultats à travers plusieurs travaux et d'autre part, une différence non significative entre la méthode de quantification absolue (présence de standards) et quantification relative (absence de standards) a été soulignée avec ces amorces.

Les amorces utilisées ont été comparées aux séquences disponibles dans le (NCBI) à travers un BLAST. Pour les bactéries, elles représentent des séquences cibles de l'ADNr16S (Target DNA), tandis que pour les champignons, il s'agit de séquences obtenues en réalisant des alignements multiples de l'ADNr 18S et de la séquence du gène ITS1. Celles-ci sont représentatives de toutes les séquences disponibles de champignons anaérobies ou de certaines espèces qui s'en approchent de près ou de loin (Tableau 8).

9.2.2.2. Conditions PCR

Le kit de PCR utilisé est choisi pour des raisons techniques (absence de sondes). Il s'agit du SYBR Green PCR Master Mix Kit. Les concentrations des amorces sont rapportées à 300nm. Les températures et le nombre de cycles diffèrent entre les auteurs, le choix est fait en se basant sur l'appareil utilisé (Applied Biosystems) et les amorces sélectionnées.

Pour une dénaturation initiale, un premier cycle est réalisé à 50°C pendant 2 min puis 95°C pendant 2 min, par la suite 40 cycles à 95°C pendant 15s et 60°C pendant 1min, pour une hybridation des amorces et une élongation. La détection de la fluorescence s'effectue à la fin de chaque étape de dénaturation et d'extension.

9.2.3. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en utilisant la méthode comparative de Ct en se basant sur la formule mathématique ci-dessous (Livak and Schmittgen, 2001). Les Ct obtenus après amplification des bactéries totales, de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavofaciens*, *Ruminococcus albus* et les champignons anaérobies totaux sont utilisés pour le calcul.

$$\text{Quantification relative} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Tableau 8 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées

Séquences des amorces	
Bactéries totales^a	Forward TotbacF - (5'- CGGCAACGAGCGCAACCC -3')
	Reverse TotbacR - (5'- CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC-3')
<hr/>	
Champignons anaérobies totaux^a	
	Forward TotfungiF-(5'- GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC-3')
	Reverse TotfungiR-(5' - CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT- 3')
<hr/>	
<i>Fibrobacter succinogenes</i>^a	
	Forward FibrobacsucciF- (5'-GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA-3')
	Reverse FibrobacsucciR - (5'- CGCCTGCCCCCTGAACTATC- 3')
<hr/>	
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>^a	
	Forward RuminoflaF- (5'-CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG-3')
	Reverse RuminoflaR - (5'- CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC-3')
<hr/>	
<i>Ruminococcus albus</i>^b	
	Forward RuminoalbusF - (5'-CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG -3')
	Reverse RuminoalbusR -(5'- CCTCCTTGCGGTTAGAACA -3')

a: Citées par Denman and McSweeney (2006)

b: Citées par Ghasemi *et al.* (2012)

10. Analyses statistiques

Une analyse de la variance à un seul facteur (ANOVA) est réalisée sur la majorité des données, en prenant en compte l'espèce comme source de variation (effet fixe) et la source d'inoculum (effet aléatoire) comme facteur de blocage. Les erreurs standards de moyennes correspondent aux écarts types déduits de l'analyse de la variance. Le test de comparaison multiple de Tukey's est utilisé pour déterminer la moyenne qui diffère du reste du groupe. Elles sont considérées significativement différentes pour une valeur de probabilité ($P < 0,05$). Le test de Student est utilisé pour la comparaison deux à deux des résultats de l'algue et du foin ainsi que pour la comparaison entre la production de gaz théorique et observée. Des coefficients de corrélations linéaires de Pearson (r) sont déterminés par paires entre les variables étudiées. Des analyses de la variance (PROC GLM) et les matrices de corrélations (PROC CORR) sont réalisées par les programmes MIXED, CORR et FACTOR, avec le logiciel SAS (Statistical Analysis System) (SAS Institute, 2000).

TROISIÈME PARTIE
RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Composition chimique des algues et du fourrage de référence

La composition chimique et les teneurs en énergie brute des algues (*Ulva lactuca*, *Halopteris scoparia*) et du fourrage de référence (foin de vesce-avoine) sont représentés dans le tableau 9.

1.1. Teneur en matière sèche

Il ressort du tableau 9, que les teneurs en matière sèche sont relativement élevées pour le fourrage de référence (911,5 g/kg) comparativement à l'algue verte *Ulva lactuca* (836,4 g/Kg) et à l'algue brune *Halopteris scoparia* (811,1 g/Kg). Cette différence notée est tout à fait justifiée. En effet, les algues proviennent d'un milieu marin, elles sont immergées dans de l'eau durant tout leur cycle de vie, c'est ce qui explique leur contenu élevé en humidité. Tandis que, le foin de vesce avoine qui est récolté au stade vitreux pour l'avoine et au stade de formation de gousses pour la vesce, provient d'un milieu terrestre pauvre en eau.

Concernant les deux espèces d'algues, la différence notée pour le contenu hydrique peut s'expliquer par la profondeur à laquelle se situe les deux algues. Il a été admis que la composition pigmentaire des algues soit la cause de leur répartition altitudinale. Les algues vertes riches en chlorophylles sont limitées aux zones peu profondes, tandis que, les algues brunes riches en caroténoïdes sont localisées plus profondément. De plus, les algues vertes situées au niveau de l'étage supralittoral sont sujettes à des périodes d'émersion et de dessiccation, ce qui est très rare chez les algues brunes.

De ce qui précède, il apparaît que les deux algues renferment une teneur intéressante en matière sèche, malgré leur provenance, ce qui en fait un substrat valorisable en alimentation animale.

2.2. Teneur en matières minérales

Les teneurs en matières minérales des trois échantillons sont également représentées dans le tableau 9. Les deux algues se distinguent par un contenu plus important en minéraux comparativement au fourrage de référence avec (391,4 g Kg⁻¹MS et 280,6 g Kg⁻¹MS) pour *Ulva lactuca* et *Halopteris scoparia* respectivement et (77,4 g Kg⁻¹ MS) pour le foin. Ce résultat est expliqué encore une fois par leur provenance différente.

Tableau 9: Teneur en matière sèche (g/Kg), composition chimique (g Kg⁻¹ MS) et contenu en énergie brute (MJ Kg⁻¹MS) des échantillons

Constituants chimiques	<i>Ulva lactuca</i>	<i>Halopteris scoparia</i>	Foin de vesce avoine
MS (g/Kg)	836,4	811,1	911,5
MM	391,4	280,6	77,4
MO	608,6	719,4	922,6
Azote	24,5	17,6	12,9
MAT	153,2	110,3	80,5
EE	10,2	20,5	25,8
NDF	228,4	450,6	547,8
ADF	76,0	222,9	356,7
ADL	18,9	50,6	93,0
Cellulose	57,1	171,9	263,8
Hémicelluloses	152,2	227,7	191,1
NFC	216,9	138,0	269,3
GE	9,4	13,1	17,8

MS: Matière sèche; **MM:** Matière minérale; **MO:** Matière organique; **MAT:** Matières azotées totales; **EE:** Extrait éthéré; **NDF:** Neutral detergent fiber, **ADF:** Acid detergent fiber ; **ADL:** Acid detergent lignin, **GE:** Gross energy (énergie brute); **NFC:** Non fibrous carbohydrates: 100 – (% NDF + % CP + % EE + % Ash) NRC (2001).

En effet, l'eau de mer est très riche en minéraux, permettant aux végétaux marins de puiser une richesse incomparable de macroéléments et d'oligoéléments, ce qui en fait leur principal attrait, car les colloïdes des algues ont une forte attraction pour les sels minéraux hydrosolubles.

D'après la littérature, la teneur en minéraux chez les algues varie généralement entre 8% et 40% (MacArtain *et al.*, 2007; Mabeau and Fleurence, 1993). Les valeurs obtenues dans notre étude correspondent à cet intervalle, mais, elles sont considérablement plus élevées que celles rapportées par d'autres auteurs particulièrement pour l'algue verte. En effet, pour *Ulva lactuca*, Yaich *et al* (2011) et Ortiz *et al* (2006) ont rapporté respectivement 11% et 19,6% par rapport à la MS.

La différence peut être expliquée par le fait que le contenu minéral des algues varie en fonction de plusieurs facteurs: espèce, localisation géographique, saison, variations environnementales et physiologiques, procédure de minéralisation (Mabeau and Fleurence, 1993; Kaehler and Kennish, 1996; Sanchez-Machado, 2004; Siddique *et al.*, 2013). Les teneurs en minéraux obtenues avec les deux algues constituent un facteur intéressant pour combler les carences en minéraux de certains régimes alimentaires et assurer une bonne croissance du microbiote ruminal.

Dans cette une attention particulière est portée sur l'analyse des trois éléments minéraux (phosphore, soufre et cobalt), en raison de leur implication potentielle dans l'optimisation des activités fibrolytiques au niveau du rumen. Plusieurs auteurs en démontré les implications de ces éléments dans la stimulation des activités cellulolytiques et lignolytiques des champignons, la stimulation des cellulases en particulier les endoglucanases (CMCase) des bactéries associées à la phase solide et la stimulation de la croissance des protozoaires (Nasser *et al.*, 2014 ; Denman and Mc Sweeney, 2006; Durand *et al.*, 1987). Les teneurs spécifiques en phosphore, soufre et cobalt des échantillons étudiés sont exposés au niveau du tableau 10.

Tableau 10: Teneurs en phosphore, soufre et cobalt des échantillons étudiés

Variables	Algue verte	Fourrage
Teneur en P (%MS)	0,19	0,05
Teneur en S (%MS)	0,65	0,14
Teneur en Co (mg /Kg MS)	16,0	0,11

1.3. Teneur en matières azotées totales

D'après le tableau 9, les deux algues étudiées montrent des teneurs en protéines brutes considérablement élevées (>100g/KgMS). La teneur la plus importante est enregistrée avec l'algue verte *Ulva lactuca* (153,2gKg⁻¹MS), suivie de l'algue brune *Halopteris scoparia* (110,3gKg⁻¹MS). Le fourrage de référence montre par contre une teneur en MAT plus faible (80,5gKg⁻¹MS). Les valeurs enregistrées avec les deux algues rejoignent la littérature. En effet, d'après Fleurence (1999), la teneur protéique dans les algues varie entre (10 et 21%).

L'intérêt nutritionnel des protéines dépend aussi de leur digestibilité, car certaines algues ont des fibres représentés par des polysaccharides non digestibles, qui en se fixant sur les protéines, empêchent une bonne assimilation de celles-ci.

Généralement, la fraction protéique des macroalgues brunes est faible 3 à 15% MS comparativement à celle des macroalgues vertes et rouges (10-47% MS) (Arasaki et Arasaki, 1983 in Fleurence, 1999). La plupart des macroalgues brunes industriellement exploitées (*Laminaria digitata*, *Ascophylum nodosum*, *Fucus vesiculosus* et *Himanthalia elongata*) ont une teneur en protéines plus faible que 15% MS excepté pour l'espèce *Undaria pinnatifida* (Wakamé) qui possède un niveau protéique variable de 11 à 24 % MS (Fleurence, 1999).

Il est rapporté que la teneur en protéines des algues marines varie fortement entre les espèces et dépend des saisons et des conditions environnementales (Dawczynski *et al.*, 2007; De Oliveira *et al.*, 2009). Ceci est confirmé d'après notre étude, car, la valeur en (MAT) obtenue avec l'espèce *Ulva lactuca* locale est plus élevée que celle enregistrée par Wong *et al.* (2000) et plus faible que celle enregistrée par Ventura and Castanon (1998). Concernant le substrat de référence, la teneur en (MAT) est plus faible que celle enregistrée par Fonseca *et al.* (1998) mais elle est comparable à celle d'un foin de bonne qualité mesurée par Hadjigeorgio *et al.* (2003).

Toutefois, la teneur élevée en (MAT) de certains substrats doit être considérée avec précaution car elle peut se révéler comme paramètre trompeur. Du fait, que toutes les protéines sont en principe dégradées mais les facteurs anti-nutritifs peuvent réduire leur disponibilité en dessous de la concentration nécessaire. Par conséquent, la teneur en matière azotée ne devrait pas être le seul critère pour juger des caractéristiques d'une plante fourragère ou d'un quelconque autre substrat alimentaire. En effet, des résultats obtenus par quelques auteurs (Barry *et al.*, 1986; Waghorn *et al.*, 1994; Arhab, 2006) indiquent que la réactivité, la structure, le poids moléculaire des végétaux et les interactions de leurs différents métabolites secondaires, sont plus importants

que les niveaux contenus dans la détermination de l'aptitude d'une espèce végétale donnée, comme complément protéique.

Selon les travaux de Paterson *et al* (1996), les fourrages dont les teneurs en MAT sont inférieures à (70 mg/g de MS) exigent une supplémentation azotée pour améliorer leur ingestion par les ruminants. Norton *et al.* (2003) stipulent que ce type de fourrages ne peut pas fournir les minima d'azote nécessaire au microbiote ruminale pour assurer une activité métabolique maximale. Van Soest. (1994), rapporte que le niveau minimum de 7 à 8% est requis pour un bon fonctionnement du rumen et une alimentation convenable des ruminants. Cappellozza. (2013) a confirmé cette information.

Tenant compte des données bibliographiques citées, il ressort que les deux algues étudiées représentent une source protéique excellente en alimentation animale vu qu'elles favorisent la prolifération bactérienne et assurent les besoins des ruminants en azote.

1.4. Teneur en lipides

Les teneurs en lipides des échantillons analysés sont représentées par le tableau 9. Les deux algues et le substrat de référence se révèlent très pauvres en lipides. L'algue verte enregistre une valeur de (10,2 g Kg⁻¹ MS), l'algue brune enregistre une valeur de (20.5 g Kg⁻¹ MS) et le fourrage de référence enregistre une valeur de (25,8 g Kg⁻¹ MS).

Le contenu en lipides de l'algue verte *Ulva lactuca* est très faible mais en accordance avec le résultat obtenu par Wong *et al.* (2000) qui a enregistré une valeur de (16 g Kg⁻¹ MS). Par contre Yaich *et al.* (2011) ont noté une valeur sept fois supérieure à celle obtenue dans cette étude (79 g Kg⁻¹ MS).

D'après la littérature, les teneurs en lipides dans les algues varient entre les espèces, la localisation géographique, la saison, la température, la salinité, l'intensité lumineuse, mais encore l'interaction entre ces facteurs, et enfin la méthode d'extraction utilisée (Myachita *et al.*, 2013; Sanchez-Machado *et al*, 2004 a,b ; Yaich *et al.*, 2011).

Il est rapporté que les algues marines ne sont pas une source conventionnelle en énergie, avec un contenu faible en lipides, mais, leurs acides gras polyinsaturés, peuvent être aussi élevés que ceux des végétaux terrestres (Darcy Vrillon, 1993). De plus, du point de vue qualitatif, les lipides des algues diffèrent de ceux des végétaux terrestres.

Ils présentent une proportion en acides gras essentiels supérieure et les acides gras insaturés sont prédominants (Darcy-vrillon, 1993). Les algues vertes dont la composition en acides gras est la plus proche de celle des végétaux supérieurs ont par rapport à ceux-ci, une teneur beaucoup plus élevée en acide oléique (C18:1) et en acide alpha-linolénique (α 3-C18:3). Les algues rouges contiennent des taux élevés d'acides gras polyinsaturés à 20 carbones. L'acide eicosapentaénoïque (EPA) en particulier constitue 50% des acides gras polyinsaturés chez *Porphyra sp.* et *Palmaria palmata* (Marfaig, 2004).

L'étude de la fraction lipidique de l'algue brune *Cystoseira sedoïdes* des côtes algériennes, a montré une multitude d'acides gras de (C12 à C20), parmi lesquels se distinguent les acides gras saturés et insaturés (Benchabane, 1989).

Les teneurs en lipides enregistrées pour les deux algues sont de loin inférieures aux normes préconisées néfastes pour les ruminants.

1.5. Teneur en constituants pariétaux et en carbohydrates non fibreux (NFC)

Les résultats de l'analyse des polysaccharides pariétaux et de l'estimation des hydrates de carbone non fibreux des échantillons sont représentés par le tableau 9. Globalement, l'analyse de la fraction pariétale des substrats étudiés démontre une composition très distincte.

Concernant la fraction insoluble qui représente la paroi totale (cellulose + hémicellulose + lignine), elle est plus élevée pour l'algue brune (450,6 g Kg⁻¹ MS) comparativement à l'algue verte (228,4 g Kg⁻¹ MS). Le fourrage de référence enregistre par contre la valeur la plus élevée (547,8 g Kg⁻¹ MS). La valeur NDF (228,4 g Kg⁻¹ MS) enregistrée pour l'algue verte est moins importante que celle rapportée par Ventura and Castanon (1998) pour *Ulva lactuca* collectée d'Espagne (331 g Kg⁻¹ MS), et se révèle aussi moins importante que celle étudiée par Yaich *et al.* (2011) qui ont rapporté (312,9 g Kg⁻¹ MS) pour *Ulva lactuca* collectée de Tunisie, et pareillement, plus faible que la teneur (329 g Kg⁻¹ MS) rapportée par Marsham *et al.*(2007).

Une nouvelle fois, les conditions environnementales et le site de collecte sont à l'origine de la dissemblance observée. En effet, la fraction NDF dépend fortement des conditions environnementales. Dans leur travaux, Pascal *et al.*(2000) ont indiqué que les températures élevées et les faibles précipitations tendent à augmenter la fraction pariétale (NDF) et à diminuer le contenu soluble des végétaux.

Les teneurs de la fraction ADF (lignocellulose) sont également distinctes entre les substrats. La teneur la plus élevée est enregistrée pour le fourrage de référence (356,7 g Kg⁻¹ MS). L'algue verte se révèle très pauvre (76 g Kg⁻¹ MS) comparativement à l'algue brune qui enregistre (222,9 g Kg⁻¹ MS). Ventura and Castanon (1998) ont rapporté (151 g Kg⁻¹ MS) pour *Ulva lactuca*.

Quand aux résultats des concentrations en lignine des différents échantillons, ils sont variables mais relativement faibles pour les deux algues qui enregistrent (18,9 g Kg⁻¹ MS et 50,6 g Kg⁻¹ MS) respectivement pour l'algue verte et brune.

Dans les végétaux terrestres, la lignine qui est considérée comme un composé phénolique synthétisé par la plante pendant les périodes les plus avancées de sa croissance et intervient dans la rigidité de la plante. Etant donné que les algues marines ont une structure végétale assez particulière, la lignine n'est que faiblement présente. Ventura and Castanon. (1998) ont rapporté (27 g Kg⁻¹ MS), Yaich *et al.* (2011) ont rapporté (15.6 g Kg⁻¹ MS).

Le fourrage de référence montre des teneurs élevées en fractions ADF et ADL, ce qui est expliqué par la formation de complexes insolubles entre les tannins et les autres constituants, ce qui pourrait éventuellement engendrer une diminution de sa digestibilité *in vitro*.

L'absence de travaux sur la fraction pariétale de l'algue brune *Halopteris scoparia* ne permet pas de se référer. Ceci dit, les algues en général sont connues pour avoir une haute teneur en polysaccharides qui renferment des teneurs élevées en fibres solubles et insolubles (Lahaye, 1991).

Dans leur étude, Ortiz *et al.* (1991) ont montré que l'algue verte *Ulva lactuca* contient des fibres solubles et insolubles avec une teneur plus élevée que celle des fruits et des végétaux. D'après notre étude, l'analyse des fibres insolubles (cellulose, hémicellulose, lignine) montre que l'hémicellulose est la fraction la plus abondante (152,2 g Kg⁻¹ MS). Ce résultat est aussi obtenu avec l'algue brune *Halopteris scoparia* (227,7 g Kg⁻¹ MS). Pour l'algue verte *Ulva lactuca*, ce résultat est en accord avec celui obtenu par Yaich *et al.* (2011).

La lignine est la fraction la moins abondante dans les trois substrats. La cellulose étant une fraction essentielle utilisée par les microorganismes du rumen comme source principale des acides gras volatils (AGV) enregistre une valeur intermédiaire entre la lignine et l'hémicellulose avec (57,1 g Kg⁻¹ MS et 171,9 g Kg⁻¹ MS) respectivement pour l'algue verte et brune.

Les algues constituent des sources importantes de polysaccharides de 33 à 61% ayant des structures variées et originales, différentes des fibres des végétaux terrestres. Du point de vue nutritionnel, la majorité des polysaccharides algaux sont représentés par des polysaccharides non digestibles, excepté pour l'amidon chez les algues vertes et le floridoside chez les algues rouges (Marfaing, 2004).

D'une manière générale, hormis la cellulose, les structures chimiques précises des polysaccharides insolubles restent très mal connues. Plus intéressante, la fraction des polysaccharides solubles représente de 51% à 56% des polysaccharides totaux chez les algues vertes et rouges, et de 67 à 87% chez les algues brunes. Parmi la proportion des fibres solubles polysaccharidiques, on y retrouve alginate, agar-agar, carraghénanes, fucoïdane, laminarane, ... Utilisés dans les aliments en tant qu'agents épaississants, gélifiants et émulsifiants, ces polysaccharides ont également récemment démontré de nombreuses activités biologiques, notamment anticoagulante, anti-inflammatoire, antivirale, immunostimulante.

Dans cette étude, les teneurs en NFC calculés, sont différents entre les trois substrats. L'algue verte *Ulva lactuca* renferme une teneur plus élevée (216,9 g Kg⁻¹ MS) que celle de l'algue brune *Halopteris scoparia* (138 g Kg⁻¹ MS). Le fourrage de référence renferme une teneur assez proche de celle de l'algue verte. L'explication apportée est en relation avec la composition chimique différente de ces trois substrats. En effet, la relation appliquée prend en compte les principaux constituants chimiques de ces substrats. Pour *Ulva lactuca*, Márcia *et al.* (2004) ont rapporté (584 g Kg⁻¹MS) pour les carbohydrates calculés et Ventura and Castanon (1998) ont enregistré (381 g Kg⁻¹ MS).

Le contenu en polysaccharides dans les macro-algues est influencé par plusieurs facteurs environnementaux, biologiques et physiques. Par exemple, la période de récolte, l'espèce d'algue et le protocole d'extraction influencent les rendements en polysaccharides mais aussi leur structure. Ceci aura des conséquences importantes sur leur activité biologique. La masse molaire, la nature des unités de base, la proportion de sulfates et leurs positions, le type de liaison glycosidique ainsi que la géométrie de la molécule sont des caractéristiques structurales très importantes qui peuvent influencer positivement ou négativement l'activité biologique.

1.6. Teneur en énergie brute

L'alimentation des animaux a une répercussion sur la qualité des produits animaux dérivés. Cette alimentation doit répondre aux besoins des animaux pour leur entretien, leur production,

leur croissance et leur reproduction. D'une manière générale, les animaux ont des besoins nutritifs en: énergie, protéines, minéraux et nutriments essentiels. L'énergie brute que les animaux consomment à partir de ses aliments se décompose en énergie digestible et énergie des fèces.

Dans notre étude, l'analyse de la teneur en énergie brute par bombe calorimétrique a donné les résultats exposés dans le tableau 9. D'après le tableau, les deux algues montrent des résultats comparables dans leur teneur en énergie brute avec (9,4 MJ Kg⁻¹ MS) et (13,1 MJ Kg⁻¹ MS), respectivement pour l'algue verte et brune. Le foin de vesce-avoine enregistre la valeur la plus élevée (17,8 MJ Kg⁻¹ MS).

Pour l'espèce *Ulva lactuca*, Marsham *et al.* (2007) ont rapporté (15,7 MJ kg⁻¹ MS) et Ventura and Castanon.(1998) ont rapporté (14,1 MJ kg⁻¹ MS). Les valeurs plus élevées enregistrées par ces auteurs seraient probablement dues à des teneurs plus élevées en carbohydrates principalement en cellulose et hémicellulose. En ce qui concerne l'algue brune, l'absence de bibliographie ne permet pas la comparaison des résultats.

➤ D'après les résultats de la composition chimique, il s'avère que les substrats sont riches en matières azotées totales, riches en matières minérales et leurs composés pariétaux analysés se caractérisent par une prédominance de fibres digestibles. Ces constatations nous permettent de préconiser les algues comme fourrage de bonne qualité qui peut être utilisé comme supplément protéique ou minéral.

2. Analyses phytochimiques

L'analyse qualitative et quantitative des facteurs antinutritionnels des algues testées dans notre étude et du fourrage de référence est illustrée par le tableau 11. Il en ressort globalement que les algues et le fourrage de référence renferment des composés antinutritionnels à des concentrations élevées et variables qui sont indiquées par l'intensité de la couleur développée au cours des réactions phytochimiques (phénols et stéroïdes).

L'analyse qualitative et quantitative révèle la présence de composés phénoliques à savoir, les phénols totaux, les tanins totaux, les tanins condensés et les flavonoïdes.

Il est important de souligner que le milieu marin et les organismes qui l'habitent constituent une source infinie de molécules actives à structure chimique originale (Glombitza *et al.*, 1974; Smit *et al.*, 2004). Ces composés sont synthétisés par des voies métaboliques différentes de celles observées en milieu terrestre et les algues qui sont le plus souvent fixées sur un substrat, élaborent des défenses chimiques pour empêcher leur colonisation par d'autres espèces y compris les microorganismes (Steinberg *et al.*, 1997).

Dans notre étude, la teneur en phénols totaux (TP) est très variable entre les substrats. Elle est comprise entre (3,5 et 224,6 g/kg MS). La teneur la plus élevée est enregistrée pour l'algue brune *Halopteris scoparia* et la plus faible est notée pour le fourrage de référence foin de vesce-avoine. La teneur en phénols totaux, trois fois plus élevée chez l'algue brune que chez l'algue verte, peut être expliquée par le fait que les algues vertes du genre *Ulva* auraient tendance à coloniser les sites à l'hydrodynamisme important où les brouteurs y sont en quantités plus faibles, induisant ainsi des teneurs moindres en composés phénoliques.

Stiger *et al.* (2004) ont démontré ceci dans leur étude sur des Sargassaceae. La présence de composés phénoliques au niveau constaté dans cette étude selon certains auteurs (Frutos *et al.*, 2002; Khanal and subba, 2001) pourrait avoir un effet limité sur la disponibilité et la digestibilité des nutriments par le microbiote ruminal. Une tendance similaire est constatée pour les tanins totaux dont la concentration la plus élevée est constatée chez l'algue brune (222,8 g/Kg MS) et la plus faible chez le fourrage (1,9 g/Kg MS). Concernant les tanins condensés totaux, l'algue brune domine toujours avec une valeur enregistrée (87,2 g/Kg MS) deux fois plus élevée que l'algue verte (39,1 g/Kg MS). Ce résultat est en accordance avec la littérature.

Tableau 11: Analyses phytochimiques et contenu en composés phénoliques (g/kg MS) des algues marines collectées de la région de Annaba et du fourrage de référence

	Algue verte	Algue brune	Standard
Espèce	<i>Ulva lactuca</i>	<i>Halopteris scoparia</i>	Vesce-avoine
Analyse qualitative			
Saponines	-	-	-
Phénols totaux	+	++	+
Stéroïdes	+	+	-
Analyse quantitative des composés secondaires			
TP	85,3	224,6	3,5
TT	76,1	222,8	1,9
TCT	39,1	87,2	50,2
Flavonoïdes	18,3	23,6	5,6

TP: Phénols totaux, TT: Tanins totaux, TCT: Tanins condensés totaux, - : Absence, + : Présence, ++ : Teneur élevée.

A propos de la teneur en flavonoïdes, l'algue brune enregistre la plus forte teneur (23,6 g/Kg MS) suivie de près de l'algue verte (18,3 g/Kg MS). Le fourrage de référence contient une très faible teneur (5,6 g/Kg MS).

Il existe peu de littérature sur le contenu en flavonoïdes dans les algues marines (Meenakshi and Gnanambigai., 2009; Sava and Sirbu., 2010; Zeng *et al.*, 2001) mais, il est rapporté que les algues vertes contiennent des teneurs variant entre (8,43 et 33,39 mg/g MS), les algues brunes des teneurs variant entre (20,72 et 32,89 mg/g MS) et les algues rouges des teneurs variant entre (6,03 et 20,91 mg/g MS).

Les teneurs en flavonoïdes dans les algues marines varient pour plusieurs raisons: l'espèce, la saison et d'autres conditions géographiques (Sarojini *et al.*, 2012). Ce qui explique parfaitement la différence observée dans cette étude.

Chez les algues brunes marines, il existe une catégorie spécifique de polyphénols appelés phlorotanins, ces derniers ont une structure moins complexe que celle des tanins terrestres et sont représentés par des polymères de phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene). Ils peuvent constituer jusqu'à 15% du poids sec des algues brunes (Ragan and Glombitza, 1986; Targett and Arnold, 1998 ; Waterman and Mole., 1994). Concernant la nutrition des ruminants, les tanins terrestres ont largement été étudiés, particulièrement en ce qui concerne le métabolisme des protéines (Mc Leod, 1974; Mueller-Harvey and McAllan, 1992). Contrairement à cela, les phlorotanins des algues marines ont rarement été étudiées par les scientifiques, particulièrement, dans le secteur de la nutrition animale, néanmoins, des fonctions multiples ont été élucidées. A savoir, des actions antimicrobiennes (Targett and Arnold.,1998; Horikawa *et al.*, 1999 ; Nagayama *et al.*, 2002), des activités antioxydantes (Nakamura *et al.*, 1996; Pavia and Brock., 2000; Hwang *et al.*, 2006) et le broutage (Targett and Arnold., 1998; Pavia and Toth., 2000).

D'après la littérature, les phlorotanins affectent les bactéries du rumen. Ils réduisent la population des bactéries cellulolytiques et augmentent les populations des bactéries non cellulolytiques et des bactéries totales. En effet, Wang *et al.* (2009), ont démontré que les phlorotannins inhibent la croissance de l'espèce ruminale *Fibrobacter succinigenes* et ont un effet minime sur les deux espèces du rumen: *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus*. Ils favorisent par contre, la croissance de *Selenomonas ruminantium*, *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella bryantii* et *Streptococcus bovis*. Un effet marqué sur les produits fermentaires a également été observé (production de gaz, profile des acides gras volatils et accumulation de l'ammoniac) (Wang *et al.*,2008; Wang *et al.*, 2009).

Chez les ruminants, plusieurs types de phénols incluant les phénols simples et les polyphénols, affectent la valeur nutritive des aliments (Ahn *et al.*, 1989). Leurs effets peuvent s'expliquer par divers aspects : modification de la composition du microbiote ruminal, complexation ou inhibition d'enzymes microbiennes, complexations avec les protéines, les polysaccharides et les minéraux. Ils peuvent aussi diffuser avec leurs produits métaboliques dans les tissus et provoquer une toxicité (Cheeke and Palo., 1995). Ainsi les concentrations élevées en tanins dans certains substrats peuvent être considérées comme un facteur limitant à l'utilisation de ces substrats comme suppléments effectifs aux fourrages de base. Cependant, Kumar and Vaithyanathan. (1990) rapportent des effets bénéfiques des tanins condensés dans les aliments des ruminants (<50 g/Kg MS). D'autres chercheurs ont constaté que la teneur, la qualité et la quantité des composés secondaires ne déterminent pas toujours l'effet souhaité mais d'autres facteurs comme la réactivité, la structure, le poids moléculaire et l'interaction des différents composés secondaires peuvent intervenir et influencer l'ingestion (Haslem, 1998; Mc Neil *et al.*, 1984).

Par conséquent, il peut être difficile de suggérer définitivement l'utilisation d'un substrat comme constituant des rations alimentaires, en se basant essentiellement sur sa composition chimique. Selon Okuda *et al.* (1993), la synthèse des composés secondaires présents dans les végétaux est liée aux facteurs génétiques, mais aussi à des facteurs environnementaux en réponse à des agressions : températures élevées, stress hydrique, mécanismes de défense contre les parasites et les herbivores (Makkar *et al.*, 1998).

3. Interrelation entre les composés nutritifs et les composés phénoliques

Les corrélations existantes entre les constituants nutritifs et les composés phénoliques des substrats étudiés sont résumés dans le tableau 12. Il en ressort que le contenu azoté est négativement et significativement corrélé au contenu en cellulose ($r = -0,998$, $P < 0,05$). Par contre, il est négativement et non significativement corrélé à la fraction NDF, à la fraction ADF, à l'hémicellulose et aux tanins condensés totaux. Ces résultats sont en accord avec ceux de Arhab. (2006). La fraction NDF est positivement corrélée aux autres constituants de la paroi cellulaire: ADF, cellulose et hémicellulose ($r = 0,980$; $0,987$; $0,691$, respectivement), de même elle est positivement et non significativement corrélée aux tanins condensés totaux ($r = 0,429$) mais elle est négativement associée aux phénols totaux ($r = -0,151$, $p > 0,05$). Au contraire, la fraction ADF n'est corrélée à aucun paramètre ($p > 0,05$) exceptée la cellulose ($r = 0,999$, $P < 0,05$). Bien que les hémicelluloses soient significativement et négativement corrélées aux contenus des phénols totaux ($r = -0,609$, $P < 0,05$) et aux tanins totaux ($r = -0,639$, $P < 0,05$). La lignine n'est pas corrélée aux constituants chimiques des substrats. Des résultats similaires sont enregistrés par Singh *et al.* (2005), Nashalai *et al.* (1994) et Reed (1986).

Dans notre étude, les phénols totaux sont positivement et significativement corrélés aux tanins totaux ($r = 0,999$, $P < 0,05$) et sont positivement et non significativement corrélés aux tanins condensés totaux ($r = 0,827$, $P > 0,05$). De même, les tanins totaux sont positivement et non significativement corrélés aux tanins condensés totaux ($r = 0,848$, $P > 0,05$). D'après les travaux de Arhab.(2006); Vitti *et al.* (2005); Ammar *et al.* (2004a); Makkar *et al.*(1993), les composés phénoliques sont hautement et significativement corrélés entre eux. Ces derniers auteurs rapportent que les tanins mesurés par gravimétrie, après précipitation avec le polyvinyle-pyrrolidone (PVPP) qui est en principe similaire au Folin-Ciocalteu, sont reliés aux tanins condensés totaux mesurés par d'autres méthodes.

Tableau 12: Matrice de corrélation entre les composés phénoliques, les constituants pariétaux et la teneur en azote des substrats étudiés

	MO	N	MAT	EE	NDF	ADF	ADL	CELL	HEMIC	NFC	TP	TT	TCT	FC
MO	1													
N	-0.962 ^{ns}	1												
MAT	-0.963 ^{ns}	0.999**	1											
EE	0.939 ^{ns}	-0.997*	-0.996*	1										
NDF	0.925 ^{ns}	-0.993 ^{ns}	-0.992 ^{ns}	0.999*	1									
ADF	0.981 ^{ns}	-0.996 ^{ns}	-0.997*	0.987 ^{ns}	0.980 ^{ns}	1								
ADL	0.996 ^{ns}	-0.981 ^{ns}	-0.982 ^{ns}	0.964 ^{ns}	0.953 ^{ns}	0.993 ^{ns}	1							
CELL	0.973 ^{ns}	-0.998*	-0.999*	0.992 ^{ns}	0.987 ^{ns}	0.999*	-0.989 ^{ns}	1						
HEMIC	0.364 ^{ns}	-0.605 ^{ns}	-0.601 ^{ns}	0.662 ^{ns}	0.691*	0.538 ^{ns}	-0.442 ^{ns}	0.568 ^{ns}	1					
NFC	0.544 ^{ns}	-0.294 ^{ns}	-0.299 ^{ns}	0.222 ^{ns}	0.184 ^{ns}	0.371 ^{ns}	0.471 ^{ns}	0.336 ^{ns}	-0.582 ^{ns}	1				
TP	-0.516 ^{ns}	0.262 ^{ns}	-0.267 ^{ns}	-0.190 ^{ns}	-0.151 ^{ns}	-0.340 ^{ns}	0.441 ^{ns}	-0.305 ^{ns}	-0.609*	-0.999*	1			
TT	-0.483 ^{ns}	0.225 ^{ns}	0.230 ^{ns}	-0.152 ^{ns}	-0.113 ^{ns}	-0.304 ^{ns}	-0.407 ^{ns}	-0.269 ^{ns}	-0.639*	-0.997*	0.999*	1		
TCT	0.053 ^{ns}	-0.325 ^{ns}	-0.320 ^{ns}	0.394 ^{ns}	0.429 ^{ns}	0.246 ^{ns}	0.138 ^{ns}	-0.282 ^{ns}	0.949 ^{ns}	-0.808 ^{ns}	0.827 ^{ns}	0.848 ^{ns}	1	
FC	-0.798 ^{ns}	0.603 ^{ns}	0.607 ^{ns}	-0.542 ^{ns}	-0.509 ^{ns}	-0.666 ^{ns}	-0.744 ^{ns}	-0.639 ^{ns}	0.269 ^{ns}	-0.939 ^{ns}	0.927 ^{ns}	0.912 ^{ns}	0.557 ^{ns}	1

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; ns: non significiant ($p > 0,05$); MO: Matière organique ; MAT: Matières azotées totales; EE: Extrait éthéré; NDF: Neutral detergent fiber ; ADF: Acid detergent fiber ; ADL: Acid detergent lignin ; CELL: Cellulose; HEMIC: Hémicellulose; NFC: Non fibrous carbohydrates; TP: Phénols totaux; TT: Tanins totaux; TCT: Tanins condensés totaux; FC: Contenu en flavonoïdes.

4. Aspects nutritionnels

4.1. Fermentation *in vitro* des substrats singuliers algue et fourrage de référence par le microbiote ruminal

Les résultats de la production cumulative de gaz après 72h de fermentation et les paramètres cinétiques modélisés déduits du modèle de Groot *et al.* (1996) de l'algue verte *Ulva lactuca* et du foin de vesce avoine, sont représentés par les tableaux (13,14). Concernant l'algue brune *Halopteris scoparia*, la fermentation *in vitro* à la fois par le microbiote ruminal d'animaux sous régime libre non contrôlé et d'animaux standardisés s'est avérée peu satisfaisante (résultats non présentés). Ainsi, l'étude des fermentations est consacrée à l'algue verte *Ulva lactuca* comparativement au fourrage de référence (foin de vesce-avoine).

Il faut rappeler que la méthode de production de gaz *in vitro* de Menke *et al.* (1979) est aujourd'hui largement utilisée pour estimer la digestibilité et l'énergie métabolisable des aliments pour les ruminants (Menke et Steingass, 1988 ; Getachew *et al.*, 2004). Cette méthode permet d'évaluer rapidement la valeur nutritive des aliments et de mettre en évidence la présence d'éléments ayant des propriétés anti-nutritionnelles dans leur composition (Sandoval-Castro *et al.*, 2003).

D'après le tableau 13, la production de gaz *in vitro* est significativement différente ($p < 0.0001$) entre le fourrage et l'algue verte aux différents temps d'incubation. Après 72h de fermentation, le foin de vesce avoine enregistre la plus grande quantité de gaz (132.8ml/g MS). Alors que pour l'algue verte on note au terme de la fermentation (31.5ml/g MS). Après 24h de fermentation la production de gaz chez l'*Ulva lactuca* représente (89,5%) du gaz total, ce qui n'est pas très loin de la vesce-avoine qui enregistre (87,2%) du gaz total. De plus, il est à souligner qu'après (6h, 12h et 24h) de fermentation, l'algue verte produit respectivement (23%, 42% et 89%) de la production cumulative totale.

Cette variation de la production de gaz est associée à la composition chimique des substrats, surtout à leurs teneurs en composés phénoliques et tanins condensés variables en fonction de l'espèce et la famille botanique. La plupart des publications mentionnent que la production de gaz *in vitro* est négativement influencée par le contenu fibreux des aliments (Aposi *et al.*, 1998; Fructos *et al.*, 2004; Getachew *et al.*, 2000; Larbi *et al.*, 1998; McAllister *et al.*, 1994).

Tableau 13: Production cumulative de gaz (ml/g MS) des substrats singuliers et des mixtures, en utilisant du liquide ruminal d'animaux standardisés

Substrats	2h	4h	6h	8h	10h	12h	16h	20h	24h	48h	72h
Algue verte	2,4	7,0	7,3	9,4	11,7	13,3	16,3	22,2	28,2	31,5	31,5
Fourrage	14,8	28,7	40,4	55,2	70,0	82,2	98,3	108,7	115,9	132,8	132,8
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Mixtures	2h	4h	6h	8h	10h	12h	16h	20h	24h	48h	72h
M1	15,0 ^a	29,7 ^a	41,6 ^a	56,4 ^a	72,1 ^a	83,2 ^a	98,7 ^a	109,4 ^b	115,9 ^b	132,7 ^a	132,7 ^a
M2	14,5 ^{ab}	28,9 ^a	40,1 ^b	55,2 ^a	69,6 ^b	83,5 ^a	99,7 ^a	111,9 ^a	117,4 ^a	130,1 ^b	130,1 ^b
M3	13,2 ^b	26,9 ^b	38,2 ^c	51,8 ^b	67,1 ^c	79,6 ^b	95,0 ^b	107,1 ^c	114,3 ^c	127,0 ^c	127,0 ^c
M4	10,7 ^c	22,2 ^c	29,9 ^d	43,0 ^c	54,4 ^d	64,3 ^c	77,2 ^c	87,3 ^d	95,2 ^d	106,1 ^d	106,1 ^d
M5	5,1 ^d	12,0 ^d	14,2 ^e	19,2 ^d	24,1 ^e	28,0 ^d	32,8 ^d	39,2 ^e	45,4 ^e	46,4 ^e	46,4 ^e
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S.E.M	0,973	1,746	2,708	3,681	4,746	5,633	6,755	7,305	7,302	8,659	8,659

^{a,b, d,e} moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes ($p < 0.05$); **P**: probabilité; **S.E.M**: erreur standard des moyennes; **M1** (5% algue verte + 95% foin); **M2** (10% algue verte + 90% foin); **M3** (20% algue verte + 80 % foin); **M4** (40% algue verte + 60% foin); **M5** (80% algue verte + 20% foin).

Dans cette étude, malgré un contenu élevé en constituants pariétaux, le foin de vesce-avoine se révèle mieux fermenté par le microbiote ruminal comparativement à l'algue. Cette différence pourrait s'expliquer par la nature de la fraction pariétale du contrôle.

Les algues marines se caractérisent par des polysaccharides ayant des structures variées et originales différentes des fibres des végétaux terrestres. Dans notre situation, l'*Ulva lactuca* se caractérise par sa teneur faible en cellulose (5% de la MS) et sa richesse en hémicellulose (15% de la MS). D'autre part, cette algue est riche en composés phénoliques (8% de la MS) aussi bien en phénols totaux (8% de la MS), tanins totaux (7% de la MS) et flavonoïdes (1,83% de la MS). Pour qu'il y ait production de gaz, il faut un substrat fermentescible et des microorganismes capables de le dégrader. La faible production de gaz chez *Ulva lactuca* pourrait être due, d'une part à l'incapacité du microbiote ruminal à se développer et, d'autre part, à l'existence de substances anti-nutritionnelles qui inhiberaient la croissance bactérienne.

Des études antérieures ont montré que les tanins condensés peuvent provoquer un fort effet dépressif sur l'activité microbienne et par conséquent sur la production de gaz mesurée *in vitro* (Salawu *et al.*, 1997; Hervas *et al.*, 2003) ainsi que sur l'efficacité de la croissance microbienne (Getachew *et al.*, 2008). Notre hypothèse est appuyée par les constatations de Hansen *et al.* (2003). En effet, ces auteurs ont confirmé la présence de composés phénoliques anti-nutritives chez deux algues brunes (*Laminaria digitata* et *Laminaria huperborea*). Ces auteurs ont constaté une différence significative dans la production de gaz *in vitro* après incubation des algues en présence de polyéthylène glycol (PEG). Ce dernier possède une grande affinité pour les tanins, il les rends inertes par la formation de complexes PEG-tanins (Makkar *et al.*, 1995; Seresinhi *et al.*, 2003).

En outre, l'algue verte se distingue par son contenu élevé en protéines, ce qui contribue peu à la production de gaz mais beaucoup plus à la production de biomasse microbienne. La production de gaz relativement faible de l'*Ulva lactuca* (51ml/g MO), en dépit de sa teneur élevée en contenu protéique, ce qui confirme les constatations de Aregheore *et al.* (2000), Long *et al.* (1993) et Khazaal *et al.* (1993). En effet, ces auteurs rapportent que la contribution de la matière azotée totale (MAT) à la production de gaz ne constitue pas un facteur d'influence significatif.

Dans cette étude, la différence entre les deux substrats pourrait s'expliquer par le fait que le fourrage de référence renferme soit, une fraction NDF hautement digestible, soit, par une dégradation des tanins par le microbiote ruminal et/ou une combinaison de ces deux facteurs. Cette plante, retenue comme témoin de référence, la vesce-avoine, se montre très fermentescible. Ceci semble être dû à sa nature d'association d'une légumineuse (*Viscia sativa*) et d'une graminée (*Avena sativa*). Cette situation suggère une stimulation de l'activité fermentaire du microbiote ruminal quand ce dernier se trouve en présence d'un aliment riche en azote et en énergie (Fadel El seed *et al.*, 2002 ; Getachew *et al.*, 1998b). Il est pertinent de noter que le foin est l'aliment le plus couramment donné aux ruminants, par conséquent le microbiote ruminal est parfaitement adapté à sa dégradation. C'est pour cette raison que la plupart des auteurs le considère comme une référence idéale.

4.2. Fermentation *in vitro* de mixtures d'algue et de fourrage par le microbiote ruminal

Les résultats de la production cumulative de gaz après 72h de fermentation de l'algue verte *Ulva lactuca* en mixture avec le fourrage utilisé comme contrôle le foin de vesce avoine sont représentés par le tableau 13. D'après le tableau, une différence significative ($P < 0.0001$) entre les mixtures est remarquée dans la production de gaz total aux différents temps d'incubation sélectionnés. Au terme de la fermentation, la mixture M1 (5% algue + 95% foin) enregistre la production cumulative de gaz la plus élevée (132.7 ml/g MS) et la mixture M5 (80% algue verte+20% foin) la plus faible (46.4 ml/g MS). L'incorporation de l'algue à 5% à 10% et à 20% n'a pas d'effet significatif sur la production de gaz total comparativement au contrôle. En effet, une différence variant entre (0,1 et 5,8 ml/g MS) est notée pour ces concentrations. Au delà de 20% d'incorporation, une diminution significative linéaire dans la production de gaz total est obtenue probablement en raison des interactions digestives entre les différents composants des deux substrats. Dans leur étude sur *Ulva lactuca*, El-Waziri *et al.* (2015) n'ont rapporté aucun effet significatif sur la production de gaz *in vitro* et sur la digestibilité de la matière organique comparativement au contrôle, jusqu'à 5% d'incorporation. Ces auteurs ont préconisé son inclusion à pourcentage plus élevé.

Dans notre étude, l'inclusion de l'algue verte induit une réduction dans la production de gaz *in vitro*, cette chute est plus sensible aux concentrations d'algue (40% et 80%) avec (25,7 et 85,4 ml/g MS) de gaz en moins. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'algue verte riche en matières azotées totales et en éléments minéraux, stimule efficacement la fermentation du foin de vesce-avoine riche en fraction pariétale jusqu'à un certain pourcentage d'incorporation. En effet, il a été démontré que les minéraux sont indispensables d'une part à la fixation de la flore cellulolytique impliquée dans la dégradation des fibres et d'autre part à l'activité enzymatique des microorganismes du rumen (cofacteurs enzymatiques). De plus, l'algue verte pourrait stimuler la production de biomasse microbienne via un apport important d'azote, une hypothèse qui peut être confirmée par le calcul de la production de la biomasse microbienne. Ces résultats sont corroborés aux calculs de l'effet associatif illustrés dans le tableau 14 et la figure 19.

4.2.1. Détermination de l'effet associatif entre l'algue verte et le fourrage de référence en se basant sur la production cumulative de gaz

Les résultats de l'étude de l'effet associatif entre les deux substrats de chaque mixture sont exposés dans le tableau 14 et la figure 19. Il ressort que les productions de gaz théoriques obtenues après (3h, 6h, 12h, 24h et 48h) sont toutes différentes par rapport aux résultats observés. En effet, à tous les temps d'incubation sélectionnés, et pour toutes les mixtures la production théorique est moins importante que la production observée. Une exception apparaît avec la mixture M5 (80% algue +20% foin) aux temps 24h et 48h. Ce phénomène constitue ce qu'il est convenu d'appeler interactions digestives ou un effet associatif, plus exactement, une non-additivité des valeurs potentielles des aliments au sein d'un régime. L'approche commune pour étudier les effets associatifs de mélanges d'aliments *in vitro* est d'observer les différences entre les substrats simples et mixtes pour différentes variables mesurées (par exemple la production de gaz, la digestibilité) (Sandoval-Castro *et al.*, 2002). Ces interactions, nommées effet associatif, peuvent modifier les processus métaboliques dans le tube digestif, en particulier dans le rumen, de sorte que la réponse d'un animal à une combinaison de fourrages peut différer des valeurs médianes équilibrées des composants pris individuellement. Ce type de réponse peut être synergique ou antagoniste (Niderkorn *et al.*, 2014; Rosales and Gill., 1998).

Dans notre étude, des niveaux considérables d'association (effet associatif) se produisent lorsque les deux substrats fourrage et algue verte sont incubés simultanément. Ceci est probablement causé par une synchronisation ou une asynchronisation dans la libération des protéines ou d'autres constituants alimentaires.

Tableau 14 : Différence (%) entre la production cumulative de gaz observée et théorique de mixtures à base d'algue verte et de fourrage

Algue : Fourrage (%)	Production de gaz théorique					Différence (%)				
	PCG 3h	PCG 6h	PCG 12h	PGG 24h	PCG 48h	PCG 3h	PCG 6h	PCG 12h	PGG 24h	PCG 48h
5:95	21,1	38,7	78,7	111,5	127,8	5*	7***	6***	4***	4***
10:90	20,3	37,1	75,3	107,1	122,7	9**	8**	11***	10***	6***
20:80	18,7	33,8	68,4	98,4	112,6	11**	13***	16***	16***	13***
40 :60	15,3	27,2	54,6	80,8	92,3	12*	10***	18***	18***	15***
80:20	8,7	14,0	27,1	45,7	51,7	7 ^{ns}	2 ^{ns}	3*	-1 ^{ns}	-10***

* : P<0,05 ; **P<0,01;***: P <0,0001; ns: non significatif (P>0.05)

Valeur théorique= (Valeur observée de l'algue verte incubée individuellement× sa proportion dans le mélange+Valeur observée du fourrage incubé individuellement× sa proportion dans le mélange)

Différence (%) = ((valeur observée-valeur théorique)/valeur théorique) ×100.

PCG(3h,6h,12h,24h,48h):Production cumulative de gaz aux temps 3h,6h,12h,24h,48h.

D'après le tableau 14, un effet synergique significatif est remarqué pratiquement pour toutes les mixtures aux différents temps d'incubation sélectionnés (3h, 6h, 12h, 24h, 48h). La valeur la plus importante est enregistrée avec la mixture M4 (40% algue+60 % foin) avec 18% de différence après 12h de fermentation, elle est suivie de la mixture M2 (20% algue+80% foin) qui enregistre 16% de différence après 12h de fermentation.

L'effet associatif positif est probablement dû à la concentration élevée en minéraux dans l'algue verte dont certains sont connus pour leur implication dans les fonctions fibrolytiques des microorganismes du rumen. Ceci trouve probablement son explication dans la stimulation des cellulases en particulier les endoglucanases (CMCase) des bactéries associées à la phase solide. En effet, des travaux *in vivo* ont montré une amélioration marquée de la valorisation des fourrages de médiocre valeur nutritive par l'addition de soufre, élément assez élevé dans l'algue verte étudiée. Une synergie entre un apport complémentaire de soufre et d'azote qu'il soit protéique ou non est souvent observée. En général, les auteurs considèrent que ces résultats sont associés à la stimulation de l'activité des microorganismes du rumen, particulièrement de leur capacité à dégrader les structures pariétales des fourrages. Mcsweeney and Denman (2007) ont confirmé par des méthodes de biologie moléculaire *in vitro* et *in vivo* la stimulation de la croissance de la biomasse microbienne et fongique par l'addition de soufre, ainsi qu'une augmentation de l'activité fibrolytique et protéosynthétique de ces micropopulations.

Un effet associatif négatif non significatif est remarqué avec la mixture M5 (80% algue +20% foin) à 24h, de même qu'un effet antagoniste très significatif après 48h de fermentation, ce dernier pourrait être dû au fait que l'algue verte permet une meilleure dégradation du substrat, foin de vesce-avoine jusqu'à son épuisement.

D'après la figure 19, une synchronisation dans la dégradation des nutriments se produit à différents temps durant l'incubation (3h, 6h, 12h, 24h, 48h) caractérisée dans les cinétiques de fermentation des mixtures. De plus, il s'est avéré que les effets associatifs varient avec le temps et avec les niveaux des substrats singuliers dans chaque mélange. Ce résultat est en accord avec les constatations de Robinson *et al* (2009). D'après la figure 19, l'effet associatif s'accroît durant les premières heures d'incubation (entre 6h et 12h).

Il faut rappeler que, la quantité de nutriments que peut extraire un ruminant d'un substrat peut être modifiée en fonction du type et de la quantité des autres nutriments consommés le même jour. Ces processus interactifs peuvent avoir des conséquences importantes sur l'ingestion et la digestibilité des aliments, ainsi que, sur les performances de l'animal (Arhab *et al.*, 2010). Par ailleurs, certaines associations ont pu contribuer au développement de systèmes d'élevage durables en conciliant intérêts agronomique, écologique et zootechnique (Baumont *et al.*, 2008).

De ce fait, des essais *in vivo* doivent être menés pour déterminer les conséquences de l'effet associatif observé.

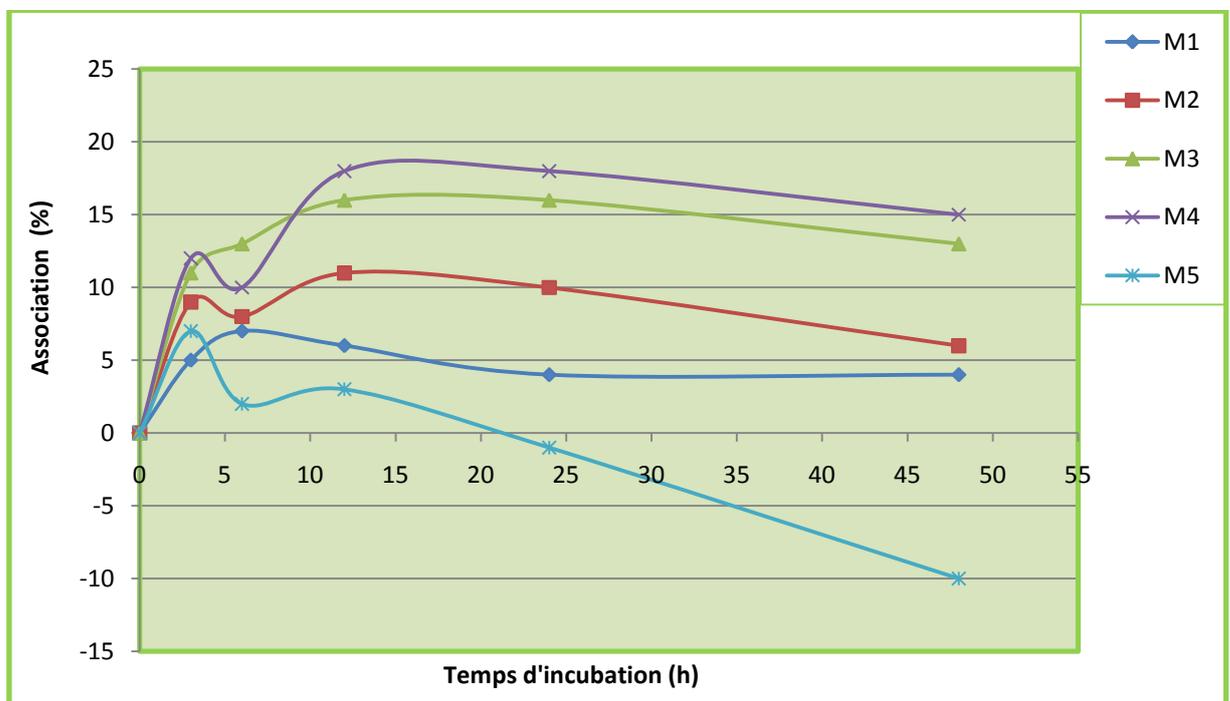


Figure 19: Effets associatifs statistiquement significatifs (Tableau 14) pour des mélanges algue/foin en fonction du temps d'incubation

4.3. Cinétiques de la production cumulative de gaz après 72h de fermentation *in vitro*

La figure 20 englobe les profils de production de gaz total. Il apparaît que les substrats singuliers et les mélanges évoluent progressivement juste après l'incubation de la même façon, suivant une allure ascendante pour atteindre un pic vers 24h. Le profil de fermentation des substrats s'allonge jusqu'à 48h pour se stabiliser. Tous les profils indiquent une production accrue durant les premières 24h. D'après la figure, l'algue verte est faiblement et lentement dégradée par le microbiote ruminal lorsqu'elle est incubée comme substrat unique. Ceci est lié à sa composition chimique (charge minérale importante) et particulièrement la nature de sa fraction pariétale et à la présence de composés anti nutritionnels qui inhiberaient la croissance bactérienne.

D'après la figure 20, il est difficile de dissocier les profils : témoin, M1 (5% algue+ 95% foin), M2 (10% algue+ 80% foin) et M3 (20% algue+ 80% foin). Jusqu'à 20% d'incorporation de l'algue, on constate une fermentation pratiquement similaire, ce qui signifie que le microbiote ruminal n'est pas perturbé jusqu'à cette proportion. On constate par contre qu'avec la mixture M5 (80% algue + 20% foin) le profil obtenu est très éloigné de celui du profil témoin en raison d'une faible production de gaz. Cette situation est expliquée par une orientation de la fermentation vers une production de biomasse étant donné la faible incorporation de la vesce-avoine. Les cinétiques modélisées (Groot *et al.*, 1996) de production de gaz des différents substrats et mélanges sont illustrées par les figures (21-27).

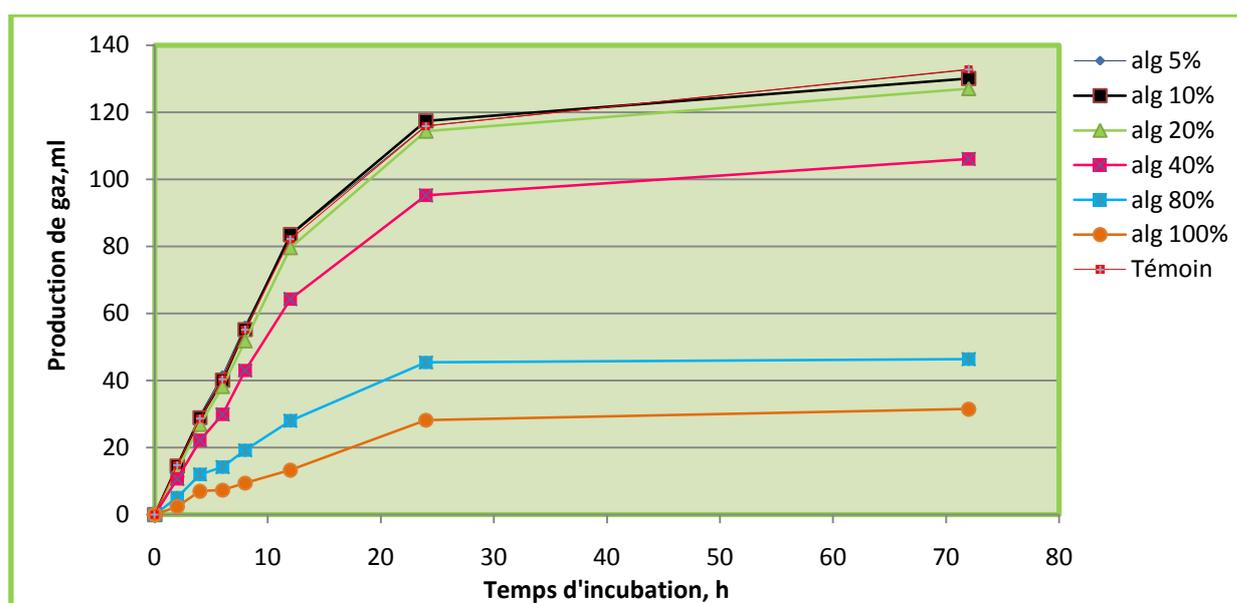


Figure 20 : Cinétiques de production de gaz (ml/g MS) des substrats singuliers et des différents mélanges

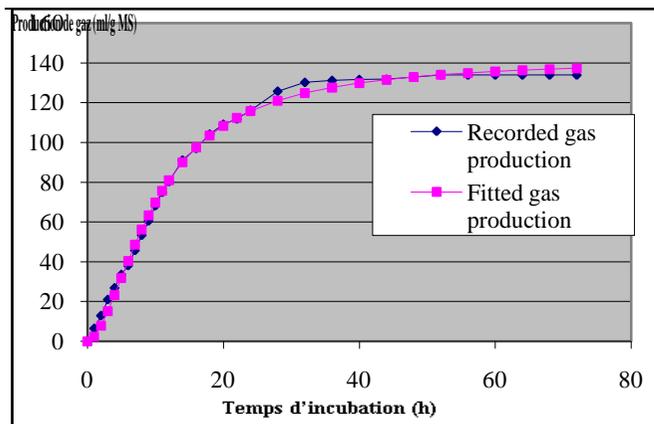


Figure 21: Cinétique modélisée du fourrage témoin

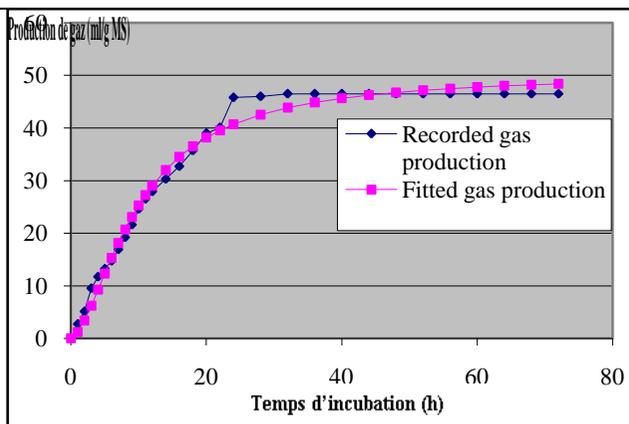


Figure 22: Cinétique modélisée de *Ulva lactuca*

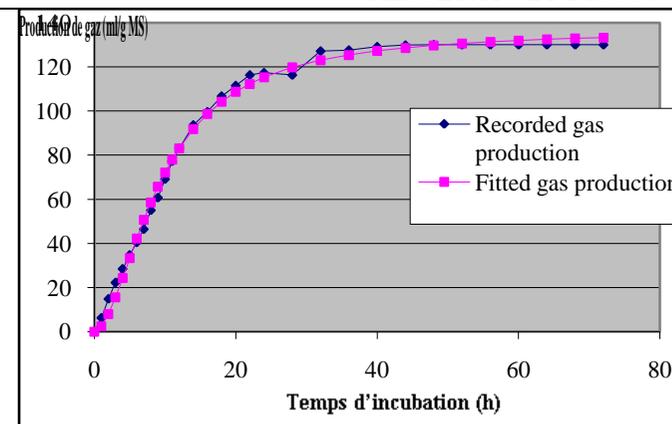


Figure 23: Cinétique modélisée de la mixture M1

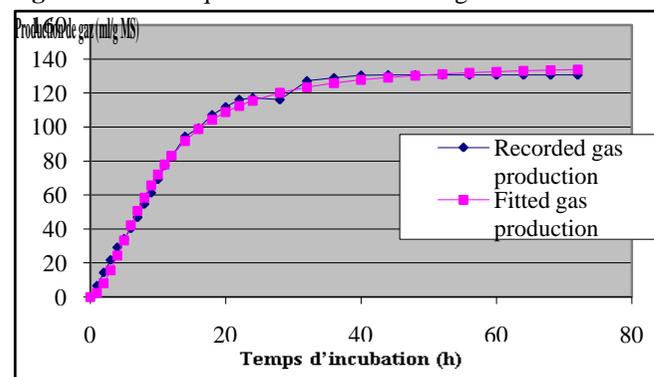


Figure 24: Cinétique modélisée de la mixture M2

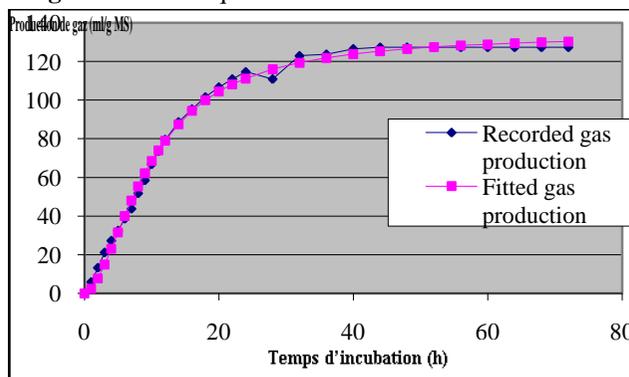


Figure 25: Cinétique modélisée de la mixture M3

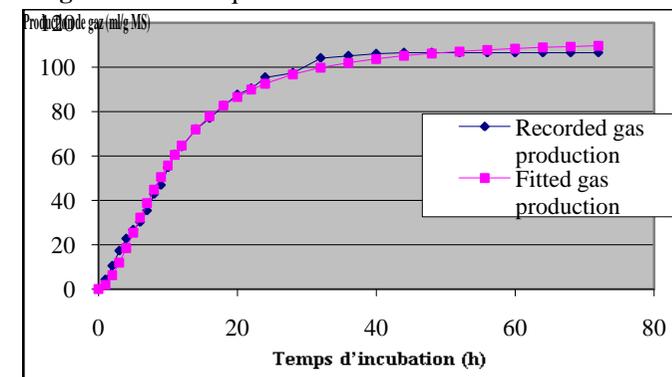


Figure 26: Cinétique modélisée de la mixture M4

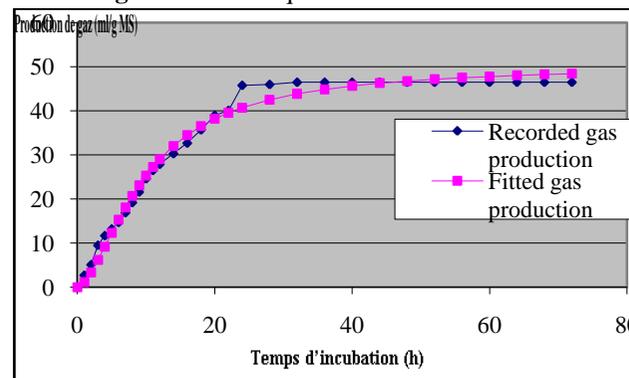


Figure 27: Cinétique modélisée de la mixture M5

4.4. Paramètres cinétiques modélisés de la production de gaz *in vitro*

Dans le domaine des fermentations microbiennes ruminales, la diversité et la complexité du microbiote est très étendue, les possibilités des différents paramètres du rumen sont extrêmes et hors de portée d'une expérimentation complète. Dès lors, l'apport de la simulation peut apporter un soutien indispensable pour écarter les combinaisons les moins probablement intéressantes et identifier les conditions les plus applicables.

Dans cette étude, la production de gaz est suivie en continu durant les 72 heures de fermentation. Les courbes de dégagement gazeux obtenues sont alors modélisées en utilisant le modèle mathématique monophasique de Groot *et al.* (1996) permettant de dégager 5 paramètres principaux de la cinétique de fermentation pour la comparaison statistique des différents substrats et mélanges. Les paramètres obtenus à partir du modèle sigmoïde sont l'asymptote (A) qui correspond à la quantité finale de gaz produite durant la fermentation en ml. (B) qui est le temps au demi volume de gaz produit. (R_{max}) qui est le taux de fermentation maximale. (T_{max}) qui correspond au temps d'atteinte du taux de fermentation maximal (C) qui est la courbure de la pente.

Les paramètres cinétiques de la fermentation *in vitro* des différents substrats déduits à partir du modèle de Groot (1996) à la fois pour les substrats incubés singulièrement et en mixtures sont exposés dans le tableau 15. Il apparaît que le volume de gaz maximal produit (A) à partir des substrats singuliers est significativement différents à tous les temps d'incubation sélectionnés ($p < 0.0001$). Le foin de vesce-avoine a la valeur la plus élevée (141,52 ml/g MS) et l'algue verte enregistre une faible valeur de (34,61 ml/g MS). Par ailleurs, le fourrage démontre une fermentation plus rapide, avec un taux de fermentation de (8,81 ml/g MS) contre (1,52 ml/g MS) pour l'algue verte et avec un (T_{max}) et (B) plus courts comparativement à l'algue. Ce résultat est plus que prévisible, en effet, l'algue verte se caractérise par une teneur moins importante en parois totales comparativement au fourrage, mais, leur nature pose problème car, la structure, la disposition et la configuration des polysaccharides pariétaux dans la paroi cellulaire peuvent affecter la dégradabilité d'un substrat. Un autre facteur peut également être en cause, notamment la présence de composés anti-nutritionnels comme les tanins. Ces derniers peuvent agir directement sur le microbiote ruminal en modifiant sa composition et/ou la perméabilité de la membrane bactérienne, comme ils peuvent inhiber les enzymes impliquées dans la dégradation des composés cellulotiques (Barry *et al.*, 1999; Hervas *et al.*, 2003; Leinmüller *et al.*, 1991).

Tableau 15: Paramètres cinétiques déduits du modèle de (Groot *et al.*, 1996) après 72h de fermentation des substrats singuliers et des mixtures en utilisant du liquide ruminal d'animaux standardisés

Paramètres cinétiques modélisés de la production cumulative de gaz <i>in vitro</i> des substrats singuliers					
	A (ml g⁻¹ MS)	B (h)	C	R_{max} (ml g⁻¹ MS h⁻¹)	T_{max} (h)
Algue verte	34,61	13,92	1,74	1,52	6,60
Fourrage	141,52	9,89	1,70	8,81	4,47
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Paramètres cinétiques modélisés de la production cumulative de gaz <i>in vitro</i> des mixtures					
	A (ml g⁻¹ MS)	B (h)	C	R_{max} (ml g⁻¹ MS h⁻¹)	T_{max} (h)
M1	140,79 ^a	9,36 ^c	1,80 ^a	9,1 ^a	4,18 ^b
M2	136,64 ^b	9,65 ^b	1,66 ^c	8,94 ^b	4,67 ^a
M3	133,81 ^c	9,75 ^b	1,76 ^b	8,52 ^c	4,70 ^a
M4	112,75 ^d	10,17 ^a	1,73 ^b	6,84 ^d	4,75 ^a
M5	50,19 ^e	10,21 ^a	1,61 ^c	3,04 ^e	4,87 ^a
P	<0,0001	<0,01	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S.E.M	9,018	0,082	0,019	0,608	0,077

^{a,b,c,d,e} moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes ($p < 0,05$); P: probabilité; S.E.M: erreur standard des moyennes ; A (ml g⁻¹ MS) le volume maximal de gaz produit (pour $t = \infty$); B (h) le temps au demi-volume maximal de gaz produit quand $G = A/2$; R_{max} (ml g⁻¹ MS h⁻¹) correspond au taux de fermentation maximal; T_{max} (h) le temps auquel le taux de fermentation maximal est atteint.

Aussi, la faible production de gaz à partir de l'algue verte peut être due à la formation d'un complexe tanins et minéraux, indispensables à la croissance des bactéries, et/ou à une inactivation des cellulases. Une autre explication, que les tanins seraient fixés aux protéines plutôt qu'à la fraction pariétale. Ces conclusions pourraient être confrontées par un suivi microscopique de la dégradation ruminale de la fraction pariétale de ces substrats. Par conséquent, leur faible dégradabilité peut être probablement due à un manque d'azote pour le microbiote ruminal et/ou une inhibition des enzymes par les tanins.

Concernant les mélanges, une différence très significative ($P < 0.001$) est constatée entre les mixtures pour l'ensemble des paramètres cinétiques. La mixture M1 (5% algue + 95% foin) enregistre la valeur la plus élevée (140,79 ml/g MS) et la mixture M5 (80 % algue+ 20% foin) la valeur la plus faible (50,19 ml/g MS). De plus, une diminution linéaire de la valeur (A) est observée avec l'augmentation de la proportion de l'algue. Ce résultat, était prévisible, étant donné que l'algue est moins fermentée que le foin. Le taux de fermentation maximale le plus élevé est enregistré avec la mixture M1 ($9,1 \text{ ml g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$), jusqu'à 10% d'incorporation de l'algue ce taux de fermentation est plus élevé que le témoin foin de vesce-avoine. Par ailleurs, avec un taux de fermentation qui augmente proportionnellement avec la diminution de la quantité de l'algue dans chaque mixture et pareillement avec, (Tmax) et (B) qui s'allongent avec l'augmentation de la proportion de l'algue, on peut souligner l'efficacité de l'algue à diminuer la production globale de gaz (A) et/ou à allonger le temps d'atteinte de la production maximale de gaz (Tmax). Ce paramètre peut plus simplement être assimilé à une mesure du temps de latence. Cette phase correspond au temps nécessaire aux microorganismes cellulolytiques pour adhérer et coloniser les fibres alimentaires.

4.5. Effet de la composition chimique sur la production de gaz

Après fermentation *in vitro*, une étude des corrélations existantes entre les volumes de gaz produit, les paramètres cinétiques et la composition chimique et phénolique est effectuée. Il apparaît que la fraction NDF est positivement et significativement corrélée avec la production de gaz total au bout de 24h de fermentation ($r=0,984$, $P<0,0001$), de même que les fractions ADF et ADL ($P<0,0001$). La fraction NDF est positivement reliée à (A) qui représente la valeur asymptotique de la production de gaz ($r=0,989$, $P<0,0001$) et à (Rmax) qui représente le taux de fermentation ($r=0,990$, $P<0,0001$). Cette situation a été soulignée par d'autres auteurs (Nherera *et al* 1999), ces auteurs ont enregistré une corrélation positive et significative entre la fraction NDF et les paramètres cinétiques de production de gaz.

Les matières azotées totales sont négativement et significativement corrélées avec le volume de gaz produit au bout de 6h ($r=-0,994$, $P<0,0001$) de 24h ($r=-0,984$, $P<0,0001$) et de 48h ($r=0,988$, $P<0,0001$). Ce résultat a été rapporté par d'autres auteurs (Getachew *et al.*, 2004). D'autres ont démontré que la matière azotée totale n'est pas corrélée à la production de gaz à tous les points cinétiques (Aregherore., 2000; Khazaal *et al.*, 1995; Longuo *et al.*, 1989). Un taux élevé en protéine brute dans l'alimentation favorise la multiplication microbienne dans le rumen, qui à son tour détermine le taux de fermentation (Njidda and Nasiru., 2010).

Les composés phénoliques sont négativement corrélés et de manière significative à la production de gaz ($P<0,0001$). Les tanins condensés totaux semblent jouer un effet corrélatif négatif vers la fin de la fermentation.

Il faut signaler que les différences entre les paramètres cinétiques de la production de gaz signifient des différences de la valeur nutritive qui est, généralement étroitement liée à la composition chimique des substrats (Kamalak *et al*, 2005b ; Salem., 2005). La valeur élevée du paramètre G24 (production de gaz à 24 heures), pour la vesce-avoine et les mixtures aux faibles pourcentages en algues, renseigne sur la grande activité fermentaire dans les premières 24 heures de fermentation par rapport aux autres substrats. Les différences dans la production de gaz pourraient être dues, aussi, à la proportion et la nature des fibres (Rubanza *et al.*, 2003). En effet les niveaux élevés en fibres et en composés secondaires peuvent réduire la production de gaz. Les différences entre les substrats peuvent également être due à l'étendue de la lignification des NDF (Van Soest, 1994 ; Fonseca *et al.*, 1998).

5. Etude du profil fermentaire

Le tableau 16 englobe les résultats de mesure du pH, de dosage de l'azote ammoniacal (N-NH₃) et de dosage des acides gras volatils totaux (AGVt) ainsi que les teneurs molaires spécifiques en (acétate, propionate, butyrate). Les résultats sont obtenus après fermentation *in vitro* en présence de microbiote ruminal de bovins canulés du rumen.

5.1. Détermination du pH

Le pH enregistré dans les batch après 72h d'incubation, est compris entre 6,68 et 6,86. La valeur la plus élevée est obtenue pour l'algue, substrat dont la fermentation est la plus faible. La valeur la plus basse est enregistrée pour le foin de vesce-avoine. L'acidification du milieu de fermentation est essentiellement due à l'accumulation des acides gras volatiles (AGV).

En travaillant dans des conditions *in vivo*, certains auteurs ont rapporté que l'incorporation des algues dans le régime alimentaire des ruminants favorise l'augmentation du pH justifiée par une consommation plus accrue d'eau (Casas *et al.*, 2003; Mora *et al.*, 2009; Marin *et al.*, 2009).

Pour l'ensemble des substrats, algue, foin et les mixtures, les valeurs du pH restent au dessus du seuil critique d'inhibition de la croissance et de l'activité cellulolytique du microbiote ruminal (pH ≥ 6)(Hoover, 1986).

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

Le substrat algue contient une teneur plus élevée en protéines brutes par rapport au fourrage et nos résultats démontrent une valeur plus élevée (P<0,05) en azote ammoniacal (N-NH₃) après 24h de fermentation pour l'algue (Tableau 16). Ce résultat était prévisible et il est expliqué par la présence d'une plus forte teneur de protéines dégradables par les microorganismes du rumen.

Selon Blümmel *et al.* (1999) et Jouany *et al.* (1994a), la dégradation de la masse protéique alimentaire conduit essentiellement à la production d'ammoniac et de la biomasse bactérienne.

Par ailleurs, la concentration en azote ammoniacal mesurée après 24h d'incubation dans le surnageant des fermenteurs en batch est significativement différente entre les mixtures testées (P<0,0001). Une augmentation significative linéaire est observée avec l'augmentation de la quantité de l'algue. La production la plus élevée est notée pour la mixture M5 (285,25 mg/l).

Tableau 16 : Mesure du pH, dosage de l'azote ammoniacal (N-NH₃) et estimation des protéines microbiennes (PM) après fermentation *in vitro* des substrats singuliers et des mixtures

	pH	N-NH ₃ (mg/l)	PM (g/Kg MOD)
Algue	6,86	290,15	32,44
Fourrage	6,75	151,56	49,08
S.E.M	0,02	0,22	0,18
P	<0,001	<0,0001	<0,0001

	pH	N-NH ₃ (mg/l)	PM (g/Kg MOD)
M1	6,77	163,95 ^d	49,28 ^a
M2	6,77	194,33 ^{dc}	49,04 ^a
M3	6,80	212,34 ^{bc}	47,01 ^b
M4	6,85	243,89 ^c	48,24 ^{ab}
M5	6,85	285,25 ^a	36,80 ^c
S.E.M	0,01	0,58	1,26
P	0,09	<0,0001	<0,0001

^{a,b,c,d} moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes (p<0,05); P: probabilité ;

S.E.M: erreur standard des moyennes ; M: mixture ; PM : protéines microbiennes.

PM (g/Kg MOD) = MOD*19,3*6,25 selon Czerkawaski (1986)

MOD= Matière organique digérée (%)

Les mixtures avec une plus grande quantité en algue contiennent plus de protéines dégradables par les bactéries protéolytiques et ainsi un plus grand potentiel à produire des protéines microbiennes. Cependant, il existe une corrélation très forte entre le taux de fermentation des glucides et le taux de dégradation des protéines en N-NH_3 pour la protéosynthèse microbienne (Van soest, 1982).

En effet, Les carbohydrates sont la principale source d'énergie pour l'absorption du N-NH_3 par les microorganismes du rumen. Il est donc important que le taux de libération du N-NH_3 corresponde aussi étroitement que possible à la libération de l'énergie (NRC, 2007) (Effet de synchronisation). Dans notre cas, avec les mixtures contenant une proportion élevée en algue et de ce fait une proportion plus élevée en protéines brutes, le taux de dégradation de ces dernières dépasse le taux de fermentation des carbohydrates. Etant donné que l'énergie est un facteur limitant pour la synthèse des protéines microbiennes, un excès en N-NH_3 est observé. Ce résultat est corroboré par l'estimation des protéines microbiennes (Tableau 16).

Globalement, les substrats: algue, foin, et les différentes mixtures enregistrent des concentrations en azote ammoniacal assez élevées, et largement supérieures à la concentration (80 mg/l) rapportée par Negadi *et al.*(2000) et préconisée pour assurer une activité métabolique maximale du microbiote ruminal *in vitro*.

5.3. Production des acides gras volatils (AGV)

La digestion des composants alimentaires par le microbiote ruminale en anaérobiose aboutit à la formation d'AGV, de CO₂ et de CH₄ (Martin *et al.*, 2010). La concentration des acides gras volatiles dans le rumen à un certain moment reflète l'équilibre entre les taux de production et de perte. Immédiatement après la prise alimentaire, la production d'AGV dépasse leur perte, ce qui induit l'augmentation de leur concentration. Une situation qui est par la suite inversée induisant leur chute (France and Siddons., 1993; Marin *et al.*, 2009).

Au terme de la fermentation, le foin de vesce avoine et l'algue enregistrent des valeurs significativement différentes ($P < 0,0001$) avec respectivement (5,2 et 1,2 mmoles/g MS). Ce résultat est tout à fait justifié par leur composition chimique particulièrement leur teneur en carbohydrates.

Concernant les différentes mixtures, la production des acides gras volatils (AGVT) est significativement différente ($p < 0,0001$) (tableau 17). La valeur la plus élevée est obtenue avec la mixture M4 (40% algue + 60% foin) qui enregistre une valeur supérieure à celle du témoin (6,8 mmoles/g MS). La plus faible concentration est enregistrée avec la mixture M5 (80% algue + 20% foin) et reste plus élevée que celle de l'algue incorporée individuellement (2,90 mmoles/g MS). L'amélioration substantielle de la production des AGVT avec la mixture (M4) suggère une intensification de l'activité fermentaire et une production élevée de la masse des microorganismes probablement en raison de la présence d'une mixture riche en énergie et en protéines (Getachew *et al.*, 2000a).

Concernant l'aspect qualitatif, la production d'acétate (acide gras volatil majeur) est significativement différente entre l'algue et le foin ($P < 0,001$) qui enregistrent respectivement (64,28% et 67,37%). Les mixtures par contre enregistrent des concentrations non significativement différentes ($P > 0,05$). La valeur la plus élevée est obtenue avec la mixture contenant 40% d'algue, avec (66,73%) une valeur comparable à celle du témoin. La même tendance est constaté pour le propionate (autre AGV de valeur zootechnique majeure) pour lequel les mixtures enregistrent des valeurs non significativement différentes ($P > 0,05$). La mixture M5 avec 80% algue donne la valeur la plus élevée (23,22%). L'algue et le foin sont significativement différents pour le propionate ($P > 0,05$). Avec (25,74%), l'algue donne la valeur maximale en propionate, selon Selon Mc Donald *et al.* (1995), la fermentation d'aliments riches en amidon tend à produire plus de propionate, tandis que celle de substrat fibreux aboutit à la formation plus importante d'acétate.

Tableau 17 : Acides gras volatils totaux (mmoles/g MS), proportions molaires des AGV (%) et ratio molaire des substrats singuliers et des mixtures

	AGVT 1h	AGVT 24h	AGVT 72h	Proportions molaires (moles/100moles)			
				Acétate (C2)	Propionate (C3)	Butyrate (C4)	C2/C3
Algue	0,4	1,1	1,2	64,2	25,8	10,0	2,48
Fourrage	1,3	5,0	5,2	67,4	21,1	11,6	3,20
S.E.M	0,06	0,02	0,18	0,53	0,15	0,41	0,04
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,001	<0,0001	<0,001	<0,0001
M1	<i>nd</i>	<i>nd</i>	4,97 ^b	64,95 ^{ab}	21,53	13,52 ^a	3,01
M2	<i>nd</i>	<i>nd</i>	3,91 ^{bc}	63,48 ^b	22,88	13,64 ^a	2,77
M3	<i>nd</i>	<i>nd</i>	4,44 ^b	65,62 ^{ab}	23,31	11,07 ^b	2,81
M4	<i>nd</i>	<i>nd</i>	6,79 ^a	66,73 ^a	22,08	11,19 ^b	3,02
M5	<i>nd</i>	<i>nd</i>	2,90 ^c	63,86 ^b	23,22	12,92 ^{ab}	2,75
S.E.M	/	/	0,36	0,37	0,39	0,24	0,05
p	/	/	<0,0001	0,0079	0,0588	<0,0001	0,3306

AGVT: Acides gras volatils totaux; C2/C3: ratio acétate propionate; ^{a,b,c,d}: moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes (P<0,05); P : probabilité; S.E.M: erreur standard des moyennes; M1 (5% algue verte + 95% foin); M2 (10% algue verte + 90% foin); M3 (20% algue verte + 80 % foin); M4 (40% algue verte + 60% foin); M5 (80% algue verte + 20% foin).

Contrairement aux deux AGV (propionate et butyrate), les mixtures sont significativement différentes pour le butyrate. Les concentrations varient entre (11,07 et 13,64 %).

Les ratios acétate/propionate, les deux acides gras majeurs ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$). Ces ratios sont compris entre 2,48 valeur enregistrée avec l'algue et 3,20 pour le foin. Des auteurs ont indiqué qu'un ratio acétate/propionate élevé indique une digestibilité NDF appréciable des aliments (Getachew *et al.*, 2004 ; Blummel *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2002). D'autre part, Beuvink and Spoelstra. (1992) indiquent que la production d'acétate est liée à la production de gaz, engendrée par la dégradation des divers composants de l'aliment. Par contre, la formation de propionate serait plutôt en relation avec les gaz libérés à partir du système tampon. Ainsi, le profil en AGV obtenu confirme la bonne fermentescibilité *in vitro* de nos substrats et leurs mélanges par le microbiote ruminal.

Il est à noter que la fermentation *in vitro* des différents substrats conduit également à la formation d'acides isobutyrique, isovalérique, valérique et caproïque. Les valeurs obtenues dans notre étude sont négligeables.

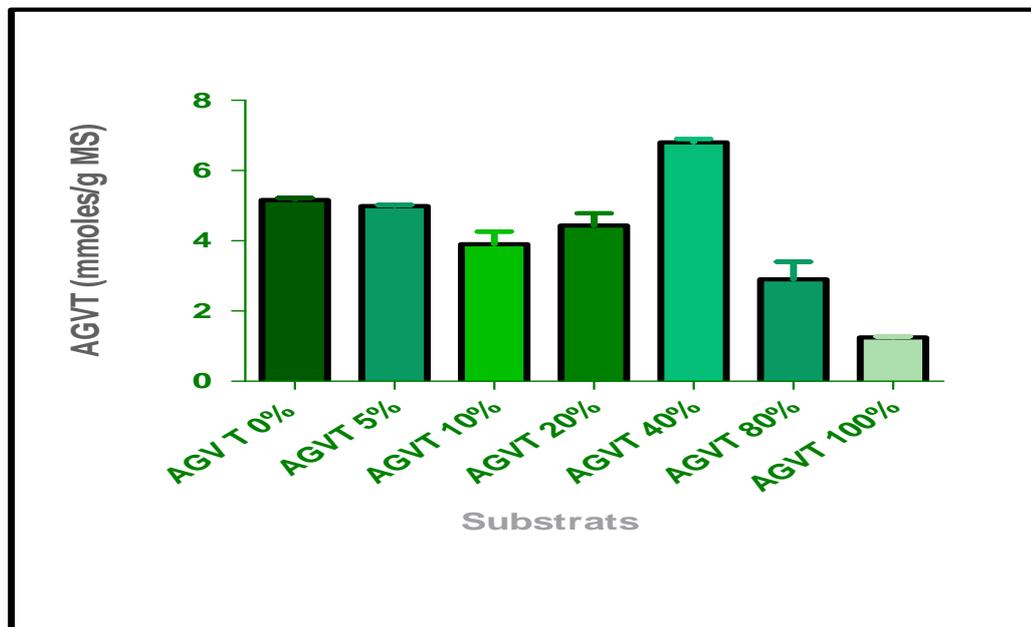


Figure 28: Production d'AGV totaux à partir des substrats singuliers et des mixtures

6. Stœchiométrie des fermentations

Le rôle du rumen est essentiel dans la partition globale de carbone. Au niveau de ce dernier, le flux de carbone fermenté se répartit entre la biomasse microbienne (25%), les acides gras volatils (AGV) (56%) et les gaz (19%) produits. Les principales causes de variation de cette répartition sont le profil des AGV et l'efficacité de la croissance microbienne (Sauvant et Giger Reverdin, 2009). Les résultats de la production du dioxyde de carbone (CO_2) et de méthane (CH_4) des substrats singuliers et leurs mixtures sont exposés dans le tableau (18).

Il ressort que les productions de CO_2 et de CH_4 sont statistiquement différentes ($P < 0,0001$) entre l'algue et le foin. En général, la fermentation des deux substrats engendre un profil fermentaire orienté principalement vers une production accrue en CO_2 . Ce gaz est produit soit directement de la dégradation des carbohydrates et/ou indirectement à partir du système tampon (HCO_3) lors de la neutralisation des acides gras volatils (AGV) générés (Archimed *et al.*, 1999).

Les volumes de méthane produit sont de (34,2 et 4,1 ml/g MS) respectivement pour le fourrage témoin et l'algue. Cette différence observée est principalement associée à leur composition chimique particulièrement la teneur en fibres, en sucres solubles et en composés phénoliques. Il est rapporté que les substrats riches en sucres solubles fermentescibles conduisent théoriquement après dégradation et en se basant sur l'équation chimique de Wollin à une production accrue d'acide propionique et butyrique. Par ailleurs, celle de l'acide acétique est associée à une production importante d'hydrogène dont l'élimination engendre une production accrue de gaz sous forme de CH_4 (Mc Allister *et al.*, 1996).

Il faut également signaler que l'algue est un substrat riche en composés phénoliques comparativement au fourrage de référence. Ces entités chimiques sont connues pour leur effet antagoniste vis-à-vis de la production de méthane. Elles agissent soit directement sur les archaeobactéries méthanogènes du rumen et/ou indirectement en limitant l'accessibilité des microorganismes aux substrats. D'autres études rapportent que les phénols simples diminuent fortement la production de méthane (Patra *et al.*, 2006). La présence des acides gras polyinsaturés peut représenter également un facteur limitant la production de méthane. Ces molécules réduisent la digestibilité des constituants alimentaires en particulier les glucides structuraux, en empêchant l'attachement des bactéries cellulolytiques sur les particules alimentaires. Les acides gras polyinsaturés pourraient également exercer un effet toxique directement sur les populations bactériennes.

Concernant les mixtures, une différence significative ($P < 0,0001$) est observée dans la production de méthane et de dioxyde de carbone. Globalement, toutes les mixtures enregistrent des valeurs inférieures à celle du fourrage témoin. La valeur la plus élevée en méthane est obtenue avec la mixture contenant (40% algue+60% fourrage)(33,9ml/gMS).

De plus, il apparaît que la production de méthane augmente proportionnellement avec l'augmentation de la proportion de l'algue jusqu'à 40%. Ceci est probablement dû à une amélioration de la dégradabilité des fibres. Ce résultat est corroboré avec la production de l'acide acétique (facteur favorable à la production de méthane). En effet, une relation positive (Droite de régression avec pente positive, figure 29) est obtenue entre les proportions molaires d'acétate et les productions de méthane.

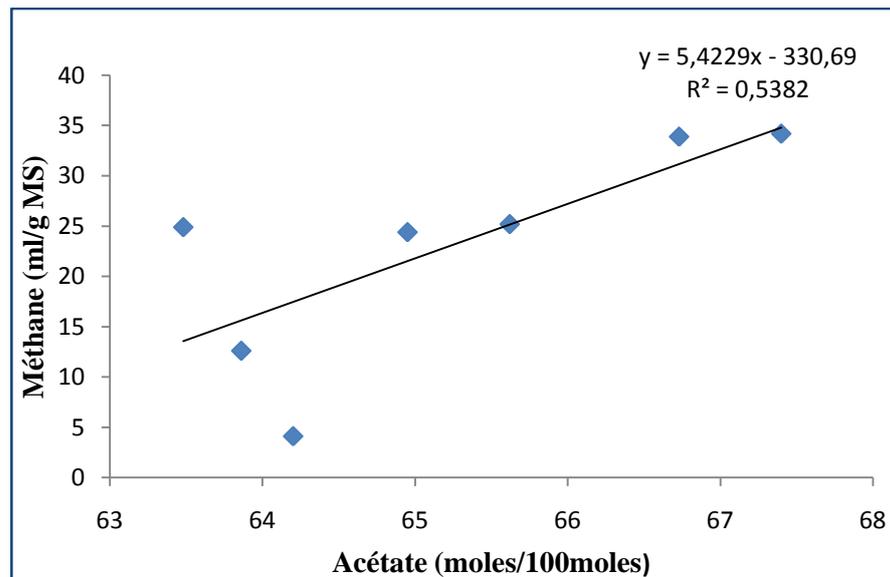


Figure 29 : Relation entre la proportion molaire de l'acétate et la production de méthane

L'analyse qualitative du pool gazeux, révélée par le rapport CO_2/CH_4 , indique que ce ratio est compris entre (2,1 et 6,6). Le rapport le plus élevé est noté pour l'algue incorporée individuellement et le plus faible pour (M4). La production de méthane observée pour les substrats étudiés conduit à s'interroger sur le devenir de l'hydrogène produit lors de la fermentation ???

Chez les ruminants, la digestion des glucides s'effectue principalement par l'action des microorganismes du rumen. La microfaune du rumen est très variée et abondante: ce compartiment du système digestif contient plusieurs espèces de bactéries, de protozoaires, d'archées et de champignons. Ces microorganismes digèrent les glucides en deux étapes distinctes. Premièrement, les glucides complexes sont dégradés en glucides simples. En second lieu, les glucides simples sont fermentés par les microorganismes, ce qui produit en outre de l'hydrogène. L'hydrogène produit est éliminé en grande partie sous forme de méthane car l'élévation de sa pression nuit à l'action des enzymes microbiennes.

La formation de propionate permet aussi d'éliminer de l'hydrogène libre du contenu ruminal, mais de façon moins efficace que la formation de méthane (utilisation de 4 molécules d'hydrogène par molécule de propionate versus 8 molécules d'hydrogène utilisées par molécule de méthane).

Le bilan d'hydrogène calculé montre qu'il s'agit d'une fermentation normale, et confirme l'absence d'acétogenèse réductrice en se basant sur le pourcentage de Demeyer (1990) (>78%). Les taux de récupération de l'hydrogène métabolique (tableau 18) indiquent des fermentations normales sans accumulation de produits fermentaires inconnus excepté pour l'algue incorporée seule et la mixture M5 avec respectivement 71% et 72,8%. Pour les autres valeurs elles sont comprises entre (78,1% et 93,1%). D'où il est possible de conclure que l'hydrogène produit lors de la dégradation des différents substrats est essentiellement incorporé en acétate. De ce fait, l'utilisation digestive des substrats étudiés par les ruminants ne va pas contribuer à la pollution atmosphérique et à l'effet de serre.

Tableau 18 : Stœchiométrie de la production de gaz *in vitro* (ml/g MS) des substrats singuliers et des mixtures après 72 h de fermentation

Substrats	CH ₄	CO ₂	CO ₂ /CH ₄	CH ₄ /GT	BH (%)
Algue	4,1	27,4	6,6	0,13	71,0
Fourrage	34,2	98,6	2,8	0,25	91,1
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	CH ₄	CO ₂	CO ₂ /CH ₄	CH ₄ /GT	BH (%)
M1	24,4 ^c	108,3 ^a	4,4 ^a	0,18 ^c	78,1 ^d
M2	24,9 ^b	105,2 ^a	4,2 ^a	0,19 ^c	93,1 ^a
M3	25,2 ^b	101,8 ^b	4,0 ^a	0,19 ^c	85,4 ^b
M4	33,9 ^a	72,2 ^c	2,1 ^c	0,31 ^a	80,8 ^c
M5	12,6 ^d	33,8 ^d	2,6 ^b	0,27 ^b	72,8 ^e
S.E.M	0,12	0,24	0,04	0,02	0,37
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

^{a,b,c,d,e} : moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes (P<0,05) ; P : probabilité ; S.E.M : erreur standard des moyennes; M1 (5% algue verte + 95% foin); M2 (10% algue verte + 90% foin) ; M3 (20% algue verte + 80 % foin); M4 (40% algue verte + 60% foin); M5 (80% algue verte + 20% foin); CH₄: méthane ; CO₂: dioxyde de carbone ; BH: bilan hydrogène.

$$\text{BH} = \text{TR } H_2 = \frac{4M + 2P + 2B}{2A + P + 4B} \quad (\text{Demeyer, 1990})$$

M (mmoles) production de méthane ; P (mmoles) production de propionate; B (mmoles) production de butyrate; A (mmoles) est la production d'acétate.

7. Corrélations entre les composants des substrats et produits métaboliques

Les corrélations existantes entre les acides gras volatiles, l'azote ammoniacal et les composés chimiques et phénoliques sont étudiés. Il en ressort que la fraction NDF est corrélée positivement et significativement au ratio acétate/propionate ($r=0,764$; $P=0,04$). Un ratio (A/P) élevé est une indication d'une bonne digestibilité des fibres NDF (Getachew *et al.*, 2004). De plus, elle est corrélée positivement et non significativement à l'acétate ($P>0,05$) et négativement et non significativement au propionate. De même, la fraction NDF est corrélée négativement et non significativement au contenu en AGV totaux, ce résultat est rapporté par d'autres auteurs qui soulignent l'effet négatif des constituants des parois végétales sur le profil fermentaire en acides gras volatiles. Les NFC sont corrélées positivement et non significativement à la production d'AGVT ($r=0,700$, $P>0,05$).

La corrélation très élevée obtenue entre les matières azotées totales et l'azote ammoniacal (N-NH₃) dans le surnagent ($r=0,957$; $P=0,0007$) appuie l'hypothèse d'une bonne dégradabilité des matières azotées totales. Par contre, une corrélation non significative est obtenue entre la production des AGVT et les MAT, ce qui indique que les protéines ne contribuent pas à la production des AGVT. Une corrélation négative et non significative est rapporté avec les trois principaux acides gras volatiles (acétate, propionate et butyrate) avec respectivement ($r= -0,094$; $r=-0,015$; $r= -0,457$). La production de l'acide gras volatile valérate étant négligeable confirme que la matière azotée totale ne contribue pas à la production des AGVT.

La production de gaz accompagne principalement les voies fermentaires productrices d'acétate et de butyrate, par contre le rendement en propionate est dû seulement au tampon acide du milieu (Wolin, 1975). Contrairement aux travaux de Getachew *et al.* (2002), aucune corrélation directe n'est établie entre la production de gaz et la production d'acides gras volatiles. Cependant, les productions de gaz pour les temps 6, 12, 24,72h sont corrélées positivement et significativement au ratio acétate/propionate ($r=0,727$, $P=0,05$; $r=0,724$, $P=0,04$; $r=0,723$, $P=0,027$; $r=0,734$, $P= 0,047$) respectivement.

Les phénols totaux ne montrent pas un effet corrélatif significatif sur le processus de production des AGV ($r= -0,700$; $P=0,079$). Les tanins totaux montrent par contre un effet corrélatif négatif sur la production des AGVT de même que sur les deux principaux AGV, acétate et propionate avec respectivement ($r=-0,835$, $P=0,04$; $r= -0,71$, $P=0,025$). Ce résultat confirme l'effet négatif des tanins sur la production des AGV.

8. Etude de la digestibilité des substrats

8.1. Digestibilité apparente *in vitro* de la matière sèche et de la matière organique et estimation de l'énergie métabolisable

Il est généralement admis que la composition chimique seule ne suffit pas pour apprécier la valeur nutritive d'un aliment. Celle-ci doit être consolidée par la détermination des taux de digestibilité et d'ingestion. Ces dernières déterminent le niveau de métabolisation des éléments nutritifs révélés par des analyses chimiques. La digestibilité de la matière sèche des substrats peut être déterminée par le recours à des animaux (méthode *in vivo*). Cette méthode est onéreuse et nécessite de gros moyens. En outre, elle n'est pas utilisable d'une manière courante pour de nombreux échantillons. Pour faire face à ce problème, plusieurs méthodes d'estimation de la digestibilité en laboratoire *in vitro* sont disponibles.

Les résultats de l'analyse de la digestibilité apparente de la matière sèche (ADDM), de la matière organique (AOMD), et de l'estimation de l'énergie métabolisable (EM) des substrats singuliers et leurs différentes mixtures sont exposés dans le tableau 19. La digestibilité apparente de la matière sèche après 72h de fermentation est significativement différente ($P < 0,0001$) entre les substrats singuliers. Pour la (ADDM) (78% contre 38%), le coefficient de digestibilité du foin est pratiquement le double de celui de l'algue, de même pour la (AOMD) ($P < 0,0001$) avec 40% pour le foin contre 26% pour l'algue. La différence notée entre les deux substrats est principalement due à leur composition chimique différente, particulièrement la proportion et la digestibilité des parois. La faible dégradabilité de l'algue peut être expliquée par une mauvaise dégradation des constituants pariétaux pour diverses raisons, entre autres la présence d'une fraction lignine très polymérisée, ou la formation de complexes entre les composés hémicellulosiques et la lignine. En effet, il est bien établi que la concentration en lignine est bien corrélée négativement avec la digestibilité (Jung et Deetz, 1993). La lignine, entièrement indigestible, représente une barrière physique limitant l'accès des enzymes microbiennes à la paroi cellulaire (Van Soest, 1994). Le fourrage de référence avec une teneur en lignine de (9% MS) est mieux dégradée que l'algue avec (1,8% MS). Cette situation nous laisse supposer d'une part que la lignine du foin est peu polymérisée et d'autre part à l'existence de substances limitant la digestibilité de l'algue. La teneur en fibres (NDF, ADF, ADL) est une composante importante des aliments pour ruminants. Elle représente la fraction la plus difficile à digérer et lorsqu'elles sont présentes dans un aliment en quantité importante, les fibres semblent altérer le métabolisme et les fermentations dans la panse.

Comparativement au fourrage de référence, l'algue contient des teneurs moindres en (NDF, ADF et ADL), cette situation nous laisse supposer que la nature des fibres des algues empêche leur dégradabilité par le microbiote cellulolytique. D'une manière générale, hormis la cellulose, les structures chimiques précises des polysaccharides insolubles des algues restent très mal connues. Concernant la digestibilité apparente de la matière organique (AOMD), une différence significative ($P < 0,0001$) est aussi soulignée, avec (26%) pour l'algue et (40%) pour le fourrage. L'explication la plus plausible est que l'algue possède une charge minérale trop importante (39%) comparativement au fourrage (7%). Une explication plus plausible de nos résultats rejoint les constatations de (Ventura et Castanon, 1998) qui ont obtenu (40,6 %) pour la dégradabilité effective de la matière organique de l'*Ulva lactuca* et ont relié ceci en partie à une faible dégradabilité de l'hémicellulose attachée aux protéines et principalement à la faible dégradabilité des carbohydrates non structuraux insolubles estimés dans leur étude à (35% MS). De plus, ils ont obtenu (62,1%) pour la digestibilité *in vitro* de la matière organique ce qui est nettement plus élevé que notre valeur (26%). Ce résultat est probablement dû d'une part, au contenu plus élevé en matière organique, un écart de (217g/Kg MS) est enregistré entre les deux études pour diverses raisons expliquées plus en détails dans la partie analyse chimique. D'autre part, à la méthode d'analyse utilisée et l'animal utilisé. Concernant l'énergie métabolisable (ME) la valeur obtenue pour l'algue (4 MJ/Kg MS) est plus faible que la valeur obtenue par Ventura and Castanon (1998) (10,2 MJ/Kg MS) et El-Waziri *et al.* (2015)(8,26 MJ/Kg MS).

Pour les mixtures analysées, une différence significative ($P < 0,0001$) est enregistrée pour la digestibilité apparente de la matière sèche et de la matière organique et pour l'énergie métabolisable. Jusqu'à 10 % d'incorporation de l'algue, une différence non significative ($P > 0,05$) est observée entre les mixtures et le fourrage témoin pour les trois paramètres. Ce résultat est en concordance avec celui d'El-Waziri *et al.* (2015) qui n'ont souligné aucun effet significatif sur la digestibilité *in vitro* de la matière organique et sur l'énergie métabolisable. A partir de 20% d'incorporation de l'algue, une chute significative est observée comparativement au fourrage témoin pour les trois paramètres. Ce résultat est corroboré avec l'analyse de la production cumulative de gaz. Jusqu'à 10% d'incorporation la digestibilité du fourrage témoin n'est pas perturbée, au delà une diminution marquée pour la (ADDM) est constatée avec (15%, 18% et 30%) de différence respectivement pour (20%, 40% et 80% d'algue incorporée).

Tableau 19: Détermination de la digestibilité apparente de la matière sèche et de la matière organique et prédiction de l'énergie métabolisable des mixtures analysées

	ADDM (%)	AOMD (%)	EM (MJ/Kg MS)
Témoin + 5% algue	84,25 ^a	40,85 ^a	6,28 ^a
Témoin + 10% algue	79,29 ^b	40,66 ^a	6,23 ^b
Témoin + 20% algue	62,76 ^c	38,97 ^b	6,19 ^c
Témoin + 40% algue	59,55 ^d	39,99 ^{ab}	5,70 ^d
Témoin + 80% algue	47,81 ^e	30,51 ^c	4,25 ^e
Témoin	78,14	40,69	6,28
S.E.M	3,56	1,04	0,20
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001

^{a,b,c,d,e} : moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes (P<0,05); **P**: probabilité; **S.E.M**: erreur standard des moyennes; **ADDM**: Digestibilité apparente de la matière sèche; **AOMD**: Digestibilité apparente de la matière organique; **EM**: Energie métabolisable.

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

PB: Protéines brutes (%); **PG**: Production de gaz après 24h de fermentation (ml/200mg MS)

8.2. Dégradabilité enzymatique de l'azote

La quantité de protéines arrivant dans l'intestin grêle d'un ruminant dépend de la teneur en matières azotées totales (M.A.T) des aliments et de la dégradabilité des matières azotées dans le rumen. La détermination précise de la dégradation *in vivo* des protéines dans le rumen est délicate à quantifier, en raison de la difficulté à distinguer entre l'azote arrivant au duodénum, l'azote alimentaire, de celui des microbes et de l'azote endogène (Aufrère *et al.*, 1988).

La plupart des techniques utilisées pour estimer la dégradation des protéines dans le rumen sont basées sur la solubilité dans des solvants qui varient par leur nature, leur pH, la température du milieu, la durée d'extraction. Ces méthodes, bien que faciles à mettre en œuvre, rapides et peu coûteuses, posent des problèmes pour certains aliments, le classement des aliments par la solubilité étant parfois différent de celui obtenu pour la dégradation *in vivo* ou *in sacco*. Les mesures utilisant du jus de rumen, «méthode *in sacco*» (Mehrez et Orskov., 1977), «fermentescibilité» *in vitro* (Vérité et Demarquilly.,1978; Raab *et al.*, 1983) donnent probablement une image plus exacte de la dégradation dans le rumen, mais elles nécessitent la présence d'animaux fistulés. L'emploi de préparations enzymatiques pourrait pallier cet inconvénient.

La méthode utilisée dans cette étude est simple, précise et applicable à tous les aliments et bien corrélée avec la méthode *in sacco* qui est actuellement utilisée comme base de calcul du système PDI en France (Vérité *et al.*, 1987). L'objectif de ce test est d'évaluer la nature des protéines contenues dans l'algue verte et le fourrage de référence en se basant sur leur dégradation *in vitro* par une protéase extraite de la bactérie *Streptomyces griseus*.

Les résultats de la dégradabilité des deux substrats après 1h et 24h de réaction sont exposés dans les tableaux (20 et 21). Il ressort que la dégradabilité enzymatique de l'azote est significativement différente ($P < 0,0001$) entre l'algue et le fourrage aux deux temps testés (1h, 24h). Le fourrage de référence enregistre des valeurs nettement plus élevées que l'algue avec (50% contre 26%) à T1 et (61% contre 38%) à T24. De plus, l'évaluation du ratio DE1/DE24 pour l'*Ulva lactuca* (68%) plus faible que le fourrage de référence (82%) indique que les protéines de l'algue sont dégradées à plus faible vitesse dans le rumen.

Ce résultat est plutôt étonnant, en effet, l'algue contenant (15,32% de MAT) pratiquement la teneur double du foin (8,05%) laissait présager l'obtention d'une dégradabilité enzymatique nettement plus élevée que le foin.

Effectivement, ce résultat est impressionnant, cependant, en calculant les taux de digestibilité on constate que l'algue est meilleure que le foin (témoin) avec respectivement (104,18 g/Kg MS) et (66,01 g/Kg MS). D'après Wallace *et al.*, (1987) la dégradabilité des protéines d'un aliment dépend des formes de protéines de réserve de l'aliment et de la localisation des protéines à l'intérieur des parois cellulaires. Les raisons exactes de la faible dégradabilité des MAT de l'algue d'après la méthode utilisée ne sont pas connues à travers cette étude, une probable raison serait la présence de substances anti-nutritionnelles, ces dernières en complexant les protéines inhibent leur dégradabilité par l'enzyme.

Quoi qu'il en soit, cette situation nous laisse supposer que la part des matières azotées de l'algue qui est non dégradée va probablement former des PIA (protéines intestinales d'origine alimentaire). D'après la littérature, 60 à 85% des PIA sont digérées dans l'intestin et deviennent alors des PDIA (protéines d'origine alimentaire digérées dans l'intestin) ce qui peut être très avantageux à l'animal.

Selon Fleurence (1999), les algues, particulièrement, les chlorophycées et les rhodophycées peuvent être une source protéique complémentaire en alimentation humaine et animale. En outre, la valeur alimentaire des protéines dépend de leur nature, de leur composition et enfin de la digestibilité de leurs acides aminés. Les protéines de l'*Ulva lactuca* contiennent des teneurs élevées en acides aminés spécialement des acides aminés essentiels comme: la valine, la leucine, la lysine et la thréonine (Yaich *et al.*, 2011). Ces derniers sont importants pour l'amélioration de la qualité de la viande et du lait lorsqu'ils sont valorisés dans l'intestin du ruminant.

Tableau 20: Evaluation de la dégradabilité enzymatique des substrats après 1 heure de réaction

Aliment	PE aliment (g)	MS (%)	MAT (%)	MAT/tube (mg)	Milieu réactionnel (ml)	Prise d'essai surnageant (g)	Titrant (ml)	Normalité	MAT blanc/tube (mg/50ml)	MAT sol/tube (mg/50ml)	DE (%)
Fourrage	0,5014	91,2	8,05	36,79	50	18,39	3,812	0,02	0,695	18,151	
Fourrage	0,5014	91,2	8,05	36,79	50	18,82	3,716	0,02	0,695	17,289	50%
Fourrage	0,5046	91,2	8,05	37,03	50	18,47	3,752	0,02	0,695	17,787	
Fourrage	0,5046	91,2	8,05	37,03	50	19,38	3,984	0,02	0,695	18,000	
Algue	0,5057	83,6	15,32	64,80	50	20,19	3,659	0,02	0,695	15,869	
Algue	0,5057	83,6	15,32	64,80	50	19,57	3,635	0,02	0,695	16,264	26%
Algue	0,5042	83,6	15,32	64,58	50	17,6	3,124	0,02	0,695	15,542	
Algue	0,5042	83,6	15,32	64,61	50	17,61	3,479	0,02	0,695	17,299	

Tableau 21: Evaluation de la dégradabilité enzymatique de l'azote après 24 heures de réaction

Aliment	PE aliment (g)	MS (%)	MAT (%)	MAT/tube (mg)	Milieu réactionnel (ml)	Prise d'essai surnageant (g)	Titrant (ml)	Normalité	MAT blanc/tube (mg/50ml)	MAT sol/tube (mg/50ml)	DE (%)
Fourrage	0,5049	91,2	8,05	37,04	50	17,4	3,897	0,02	0,312	19,611	
Fourrage	0,5049	91,2	8,05	37,04	50	19,35	4,141	0,02	0,312	19,739	61%
Fourrage	0,5074	91,2	8,05	37,23	50	18,05	4,673	0,02	0,312	19,116	
Fourrage	0,5074	91,2	8,05	37,23	50	18,98	4,372	0,02	0,312	20,170	
Algue	0,5072	83,6	15,32	64,99	50	18,33	4,61	0,02	0,312	22,022	38%
Algue	0,5072	83,6	15,32	64,99	50	18,85	4,688	0,02	0,312	21,777	
Algue	0,5042	83,6	15,32	64,57	50	17,77	3,913	0,02	0,312	21,426	
Algue	0,5042	83,6	15,32	64,60	50	17,54	4,051	0,02	0,312	21,223	

9. Caractérisation du profil microbien après fermentation *in vitro*

Le rumen est un écosystème dense et complexe dont le microbiote (bactéries, archées, protozoaires et champignons) permet de dégrader et fermenter les aliments ingérés par l'animal. Le microbiote ruminal possède un large spectre d'activités enzymatiques qui permet de dégrader les fibres, l'amidon (hydrolyses, fermentations, hydrogénations) et les protéines (protéolyse) des rations alimentaires. La dégradation fermentaire par le microbiote conduit à la formation de produits utilisables par l'animal ou le microbiote lui-même (AGV, ammoniac etc.) et qui conditionnent en partie le pH du rumen.

Cet écosystème est en constante associations et toute variation des substrats dans le milieu ruminal peut l'impacter. Chez le ruminant, cet écosystème semble s'implanter très rapidement dès les premières 48heures après la naissance par contamination liée à l'environnement extérieur à l'animal (contact ou non avec la mère, alimentation, autres animaux, air etc.). L'implantation des microorganismes du rumen est fortement dépendante de l'environnement et de l'alimentation de l'animal. Pour qualifier cela, les travaux ont permis de montrer l'impact de la ration ou d'additifs alimentaires sur les paramètres physico-chimiques, fermentaires et le microbiote du rumen (bactéries et des protozoaires surtout) par des méthodes culturales.

Dans cette partie, nous nous intéressons à l'impact de l'algue verte et de ses mixtures sur la composition qualitative et quantitative du microbiote ruminal (protozoaires ; par comptage direct, bactéries totales, principales bactéries cellulolytiques et champignons anaérobies totaux par PCR en temps réel). Cette partie est consolidée par la détermination de l'activité cellulasique du même microbiote ruminal.

9.1. Impact de l'algue verte et de ses mixtures sur la population microbienne du Rumen

9.1.1. Caractérisation de la faune ruminale (protozoaires)

Les résultats du dénombrement des protozoaires après 24h de fermentation *in vitro* des substrats singuliers et de leurs mixtures sont exposés dans le tableau 22 et la figure 30. Il ressort une différence significative ($P < 0,0001$) entre l'algue verte et le fourrage de référence. Ce dernier enregistre une valeur plus élevée ($11,4 \times 10^4$ cell/ml) que l'algue avec ($7,7 \times 10^4$ cell/ml).

Concernant les mixtures, une augmentation significative dans le nombre des protozoaires est constatée proportionnellement avec l'augmentation de la concentration de l'algue. Le nombre le plus élevé est obtenu avec la mixture M5 contenant (80% algue et 20% fourrage) ($10,4 \times 10^4$ cell/ml) et le plus faible avec M1 (5% algue+95% foin) ($5,3 \times 10^4$ cell/ml).

Cette situation peut être expliquée par la nature du substrat et la composition de la mixture incubée qui conditionnent le développement des protozoaires. D'après Jouany and Ushida. (1998) le type de la ration alimentaire conditionne fortement les populations des protozoaires. Effectivement, les entodiniomorphes digèrent les parois cellulaires et les chloroplastes, des enzymes cellulolytiques étant retrouvées chez tous les protozoaires de cet ordre. Néanmoins, la présence de cellulases d'origine bactérienne ne permet pas d'apporter la preuve sans ambiguïté d'une origine ciliée plutôt que bactérienne (Williams *et al.*, 2003t). Les plus gros protozoaires peuvent dégrader également l'hémicellulose. D'autre part, les protozoaires jouent un rôle important dans l'hydrolyse de l'amidon, en ingérant les granules d'amidon et les sucres solubles, et en diminuant de ce fait l'accessibilité de ses substrats aux bactéries amylolytiques.

Par ailleurs, l'effet dépressif des métabolites secondaires sur le nombre de protozoaires est signalé dans la littérature (Getachew *et al.*, 2000). En effet, il est rapporté que la présence des protozoaires dans la panse peut réduire la cadence à laquelle les bactéries colonisent et décomposent les particules fourragères ingérées. En outre, des études menées sur des ovins recevant une ration à base de paille ont révélés que la digestibilité apparente de matière sèche augmentait de 18% après élimination des protozoaires de la panse (Lang, 1996). Cette constatation est confirmée dans notre étude puisque la digestibilité apparente de la matière sèche est plus élevée avec les mixtures contenant moins de protozoaires après fermentation *in vitro*.

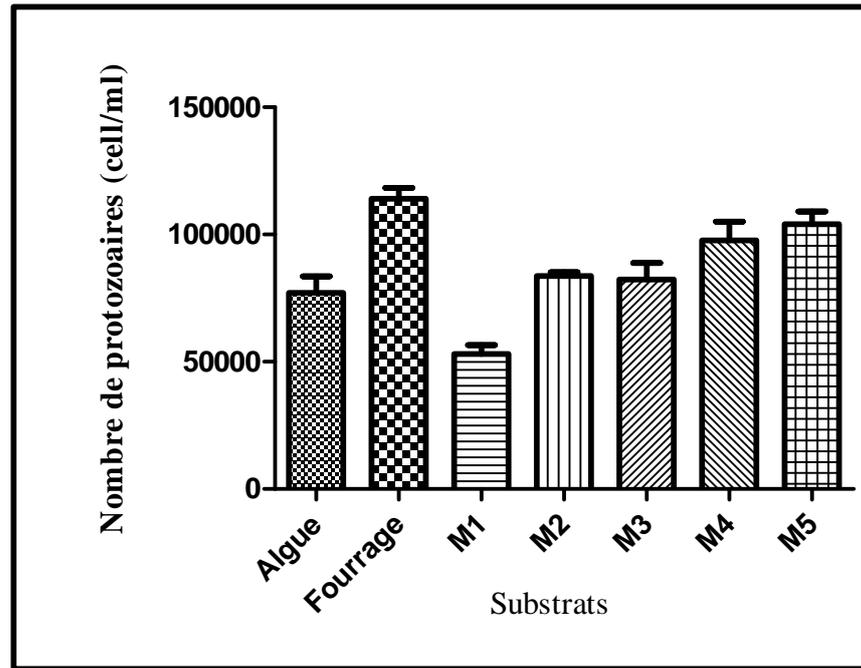


Figure 30 : Caractérisation de la faune ruminale évaluée par le nombre de protozoaires en fonction du substrat incubé

Les résultats obtenus dans notre étude sont corroborés avec les résultats du méthane produit après fermentation ($r=0,273$, $P=0,553$) (Figure 31). Ce qui est en accord avec la littérature où une forte corrélation positive a été trouvée entre le nombre des protozoaires et la quantité de méthane produit. Ceci s'explique par la présence de l'hydrogène (H_2), un élément clé qui conditionne la production de méthane dans le rumen. Les protozoaires sont parmi les microorganismes producteurs de H_2 , ils occupent une place prépondérante les rendant une cible concrète pour réduire ces émissions de gaz à effet de serre. Cette position est renforcée par leur association physique étroite avec les méthanogènes, une symbiose qui favorise le transfert de l' H_2 d'une espèce microbienne à l'autre. En effet, dans le rumen, les méthanogènes occupent une niche fonctionnelle importante bien qu'ils ne constituent qu'une petite partie de la biomasse et de la diversité microbienne ils ont l'aptitude d'utiliser l' H_2 pour réduire le dioxyde de carbone en méthane, assurant ainsi la dégradation optimale des aliments. Toutefois, aujourd'hui, l'absence de lien entre la production de méthane et le nombre des méthanogènes est bien établie. Ainsi, bien que les Archaea méthanogènes soient les seuls producteurs de méthane, d'autres membres du microbiote ruminal peuvent influencer cette production dans le rumen. En particulier, la structure et/ou l'activité de la communauté microbienne fermentaire (bactéries et protozoaires) détermine la quantité et partiellement l'utilisation de l' H_2 , substrat limitant de la méthanogénèse.

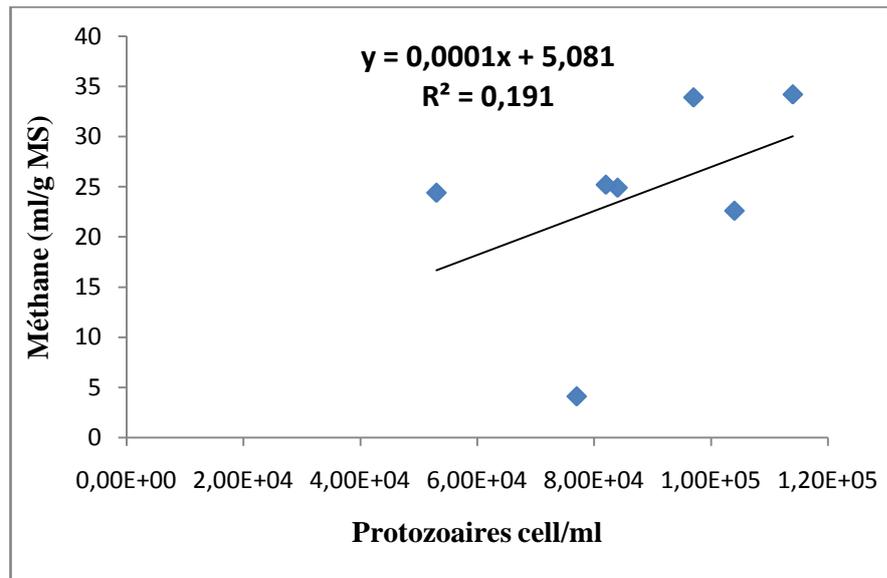


Figure 31: Relation entre la prolifération de la faune ruminale et la production de méthane (ml/gMS) lors de la fermentation de l'algue verte et de ses mixtures

De même, d'après nos résultats, les protozoaires ont un effet positif sur la production des AGVt, ce qui concorde avec la littérature, où il est rapporté que l'addition de protozoaires à un rumen défauné a fréquemment un effet positif sur la production d'AGV. La composition molaire est modifiée dans le sens d'une production accrue de butyrate au dépens de l'acétate ou du propionate (Jouany *et al.*, 1988).

D'autre part, d'après nos résultats, une corrélation positive non significative ($r=0,123$, $P>0,05$) a été identifiée entre l'azote ammoniacal ($N-NH_3$) et les protozoaires (Figure 32). D'après la littérature, on peut expliquer ceci par une augmentation de la protéosynthèse. Effectivement, les ciliés sont 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.

Les interactions avec d'autres microorganismes sont nombreuses: les protozoaires ingèrent les bactéries endogènes et exogènes comme source de protéines pour leur synthèse cellulaire. La prédation augmente la concentration en ammoniac et de phosphate et aussi la concentration bactérienne et son efficacité car il y a plus de nutriments utilisables.

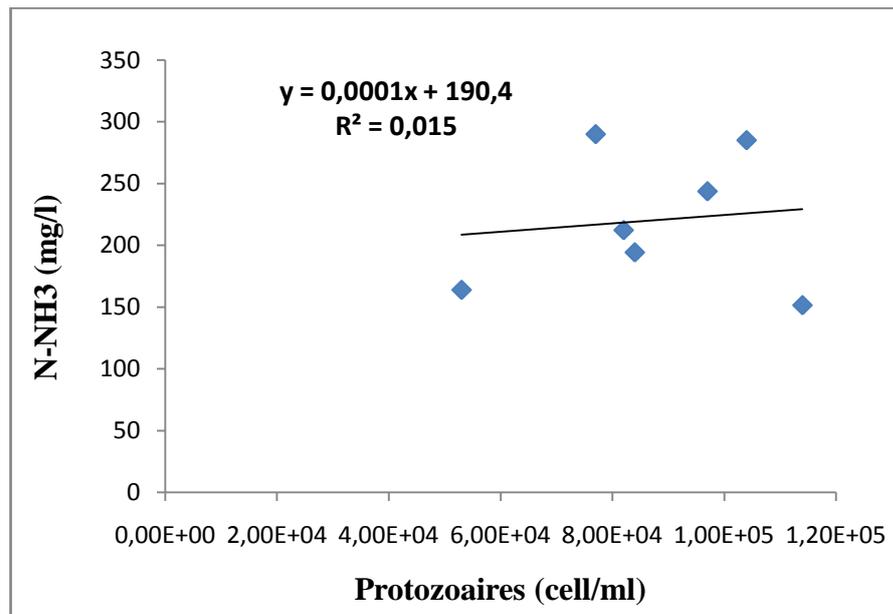


Figure 32 : Régression linéaire entre le nombre de protozoaires et la concentration en N-NH₃

9.1.2. Caractérisation de la flore cellulolytique

Deux types de quantifications sont réalisables en PCR quantitative. La quantification absolue, exprimée en nombres de copies, consiste à mesurer la quantité de copies cible par rapport à des étalons dont le nombre de copies est connue. L'autre méthode appelée quantification relative consiste à mettre en relation le nombre de copie de la cible mesurée par PCR quantitative avec le nombre de copie d'un autre gène utilisé comme calibrateur. Etant donné que les deux méthodes de quantification relative et absolue donnent des résultats non significativement différents (Denman and Mc Sweeney., 2006). Le test relatif de quantification est utilisé dans des applications dans lesquelles il y'a poursuite de plusieurs cibles à l'intérieur de plusieurs échantillons (cas de notre étude).

D'après plusieurs chercheurs, la PCR en temps réel peut être utilisée sur des échantillons extraits de contenu ruminal afin de surveiller les changement dus au régime alimentaire (Tajima *et al.*, 2001). Stahlet *al.* (1988) ont étudié les niveaux variations des espèces du rumen en utilisant l'hybridation avec des sondes oligonucléotidiques. Koike and Kabayashi. (2001) ont développé la PCR compétitive pour l'énumération des bactéries cellulolytiques.

Tajima *et al.* (2001) ont développé des amorces spécifiques pour l'énumération des espèces bactériennes du rumen et leurs réponses aux changements alimentaires par PCR en temps réel. Denman and McSweeney. (2006) ont travaillé sur des populations de champignons de *F. succinogenes* et *R.albus* chez des bovins en utilisant la PCR en temps réel.

Dans notre étude, la quantification relative nous a permis de calculer à partir d'une formule mathématique l'abondance relative de trois principales bactéries cellulolytiques (*F.succinogenes*, *R.flavefaciens*, *R.albus*) et le nombre des champignons anaérobies totaux dans les échantillons avant fermentation et après 24h de fermentation. Elle consiste, après coamplification du gène cible avec un gène endogène de référence à comparer les (Ct) calculés à partir de l'échantillon analysé et du calibrant.

Le calibrant est dans notre cas l'échantillon de liquide ruminal au temps (T=0h) avant fermentation *in vitro*. Nous avons donc utilisé le nombre de molécules de gène initialement présent dans l'échantillon analysé, normalisé par rapport au gène de référence (gène endogène) dans notre cas les bactéries totales et relatif au calibrant. Il est à souligner que nos résultats reposent sur l'hypothèse que les échantillons et le calibrant ont des efficacités d'amplification égales.

9.1.2.1. Influence des substrats sur les trois bactéries: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*

Les résultats de la quantification relative des bactéries totales et des trois principales bactéries cellulolytiques du rumen à savoir: *F.succinogenes*, *R.flavefaciens*, *R.albus* sont exposés dans le tableau 22.

D'après les résultats, il est constaté une augmentation remarquable de l'ADN bactérien après 24h de fermentation. En effet, les résultats de l'abondance relative des trois principales bactéries cellulolytiques, indiquent des valeurs maximales: (10,30 fois), (1,93 fois) et (0,46 fois) plus élevées que le calibrant avec *F.succinogenes*, *R.flavefaciens* et *R.albus* respectivement.

Par ailleurs, il est constaté que l'espèce *Fibrobacter succinogenes* prédomine les deux espèces cellulolytiques *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus* à la fois avec les substrats singuliers et les mixtures. Effectivement, cette dernière représente 69% des bactéries cellulolytiques après 24h d'incubation avec le substrat algue et 82 % avec le substrat fourrage.

Il en va de même pour les mixtures où *F.succinogenes* domine entre 77% et 84% des bactéries cellulolytiques.

Cette constatation a déjà été rapportée par d'autres auteurs. En effet, Koike and Kobayashi. (2001) ont rapporté une population plus élevée (10^6 - 10^7) par ml de liquide ruminal de mouton pour *F.succinogenes* comparativement à *R. flavefaciens*. Pareillement, Michalet-Doreau *et al.*(2001) ont souligné une abondance relative plus élevée pour *F.succinogenes* chez des moutons recevant du foin de luzerne.

D'autre part, Chen *et al.* (2007) ont souligné l'abondance relative plus élevée (100 fois plus) que *R. flavefaciens* à la fois au niveau de la phase liquide et solide du rumen. Martin *et al.* (2001) ont par contre rapporté que *Ruminococcus* est la bactérie cellulolytique dominante.

Martin *et al.*(2001) ont par contre rapporté que *R.albus* et la bactérie cellulolytique dominante en utilisant la technique d'hybridation dot- plot.

Par ailleurs, il ressort aussi une augmentation relative significative ($P < 0,0001$) entre les bactéries cellulolytiques avec les deux substrats singuliers étudiés: *F.succinogenes* est (5,91 fois) plus élevée et l'algue (2,09 fois). Il en va de même avec la quantité relative de *R.flavefaciens* avec (1,19 fois) pour le fourrage et (0,86 fois) pour l'algue.

Cette différence remarquée peut se justifier par leur composition chimique différente et en particulier la teneur et la nature de la fraction pariétale. D'après le tableau 10, l'algue renferme (228,4 g/Kg MS) en fraction NDF, une teneur nettement plus faible que le fourrage qui enregistre pratiquement la teneur double (547,8 g/Kg MS).

Chen *et al.* (2010) ont confirmé dans leur étude que les microorganismes associés à la phase solide prédominent et que ces derniers contribuent principalement à la dégradation des fibres. De même, Craig *et al.* (1987) ont indiqué que dans des conditions ordinaires d'alimentation, les bactéries associées aux particules alimentaires sont numériquement prédominantes et occupent (70-80%) de la population microbienne totale du rumen d'une vache.

Silva *et al.*(1987) ont rapporté que le taux de fermentation des fibres dépend de l'environnement ruminal qui permet ou non à la population microbienne cellulolytique adhérente de se développer. De plus, l'attachement des microorganismes aux fibres est très rapide, cependant plusieurs facteurs comme l'accessibilité microbienne au substrat et la nature chimique

et physique des fibres, affectent la vitesse et l'ampleur de la digestion des fractions pariétales (Chen *et al.*, 2010).

Certains régimes alimentaires procurent une plus grande fraction pour l'attaque avec des enzymes et des microorganismes et peuvent ne pas favoriser le développement de *F. succinogenes*, et il existe plusieurs hypothèses pour expliquer les différences observées entre ces trois bactéries principalement impliquées dans la cellulolyse (cas de notre étude).

En premier, il est très probable qu'il y'ait une compétition entre *F.succinogenes* et les deux autres bactéries (*R.flavefaciens* et *R.albus*). Les interactions compétitives et coopératives entre les microorganismes cellulolytiques peuvent affecter la dégradation des fibres et donc l'énergie procurée à l'animal. Odenyo *et al.*(1994) ont trouvé que *R. flavefaciens* FD-1 rentre en compétition avec *F. succinogenes* S85 lorsque la cellulose est fournie comme seule source de carbone, tandis que, les proportions relatives de ces deux bactéries étaient remarquablement similaires jusqu'à épuisement du substrat dans une culture de paille de blé traitée avec du peroxyde d'hydrogène. Dans leur étude, Mosoni *et al.* (1997) *R.flavefaciens* (FD-1) et *F.succinogenes* (S85) ont montré une compétition lorsqu'elles sont rajoutées simultanément à la cellulose.

En second, plusieurs bactéries ont des spécificités différentes pour les substrats et leurs sites d'adhésion comme indiqué par Bhat *et al.* (1990) qui ont remarqué que *F.succinogenes* et *R. flavefaciens* ont des sites d'adhésion différents et spécifiques sur de la paille d'orge.

Tableau 22: Effet des substrats sur l'abondance relative des principales bactéries cellulolytiques et des champignons anaérobies totaux par PCR en temps réel et sur le nombre des protozoaires après 24h de fermentation comparativement au calibrant (contrôle t=0h)

	Protozoaires ($\times 10^4$ cell/ml)	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>Ruminococcus albus</i>	Champignons totaux
Calibrant	2,35 ^f	1,00 ^g	1,00 ^c	1,00 ^a	1,00 ^e
Algue	7,70 ^d	2,09 ^g	0,86 ^c	0,08 ^e	0,62 ^e
Fourrage	11,4 ^a	5,91 ^e	1,19 ^{bc}	0,11 ^d	1,40 ^{de}
M1	5,30 ^e	7,45 ^d	1,25 ^{bc}	0,16 ^c	2,76 ^{abc}
M2	8,40 ^c	7,97 ^c	1,32 ^{bc}	0,27 ^c	2,57 ^{bc}
M3	8,20 ^c	8,23 ^b	1,93 ^a	0,46 ^b	3,57 ^a
M4	9,70 ^b	10,30 ^a	1,57 ^{ab}	0,26 ^c	3,31 ^{ab}
M5	10,4 ^{ab}	3,97 ^f	1,07 ^{bc}	0,12 ^d	1,95 ^{cd}
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S.E.M	0,11	0,52	0,07	0,06	0,21

^{a,b,c,d,e,f,g} moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes ($p < 0,05$) ; P: probabilité; S.E.M: erreur standard des moyennes; M1 (5% algue verte + 95% foin); M2 (10% algue verte + 90% foin); M3 (20% algue verte + 80 % foin); M4 (40% algue verte + 60% foin); M5 (80% algue verte + 20% foin).

Concernant les mixtures, une différence significative ($P < 0,0001$) est constatée pour les trois espèces cellulolytiques.

L'ADN bactérien augmente proportionnellement à l'augmentation de la proportion de l'algue. Ceci indique très clairement de bonnes conditions fermentaires, une dégradation des substrats, et une bonne croissance bactérienne. Par ailleurs, d'après le tableau 22, jusqu'à 40% d'incorporation de l'algue, l'abondance relative des bactéries cellulolytiques avec les mixtures est plus élevée que celle du fourrage témoin.

Pour l'espèce cellulolytique prédominante, la mixture M4 enregistre une valeur (10 fois) plus élevée que le calibrant. Tandis que le fourrage enregistre une valeur (5 fois) plus élevée. Ceci indique qu'avec l'augmentation de la proportion de l'algue les conditions deviennent plus optimales à la croissance des populations cellulolytiques. Par conséquent, la digestibilité du fourrage de référence est améliorée.

Cette constatation est appuyée par les travaux de certains auteurs qui ont montré une amélioration marquée de la valorisation des fourrages de médiocre valeur nutritive, notamment en zone tropicale et sub-tropicale par l'addition de certains minéraux (Meshy, 2010). Par ailleurs, Denman and Mc Sweeney. (2007) ont confirmé par des méthodes de biologie moléculaire *in vitro* et *in vivo* la stimulation de la croissance bactérienne et fongique par l'addition de certains minéraux, ainsi qu'une augmentation de l'activité fibrolytique et protéosynthétique de ces micropopulations.

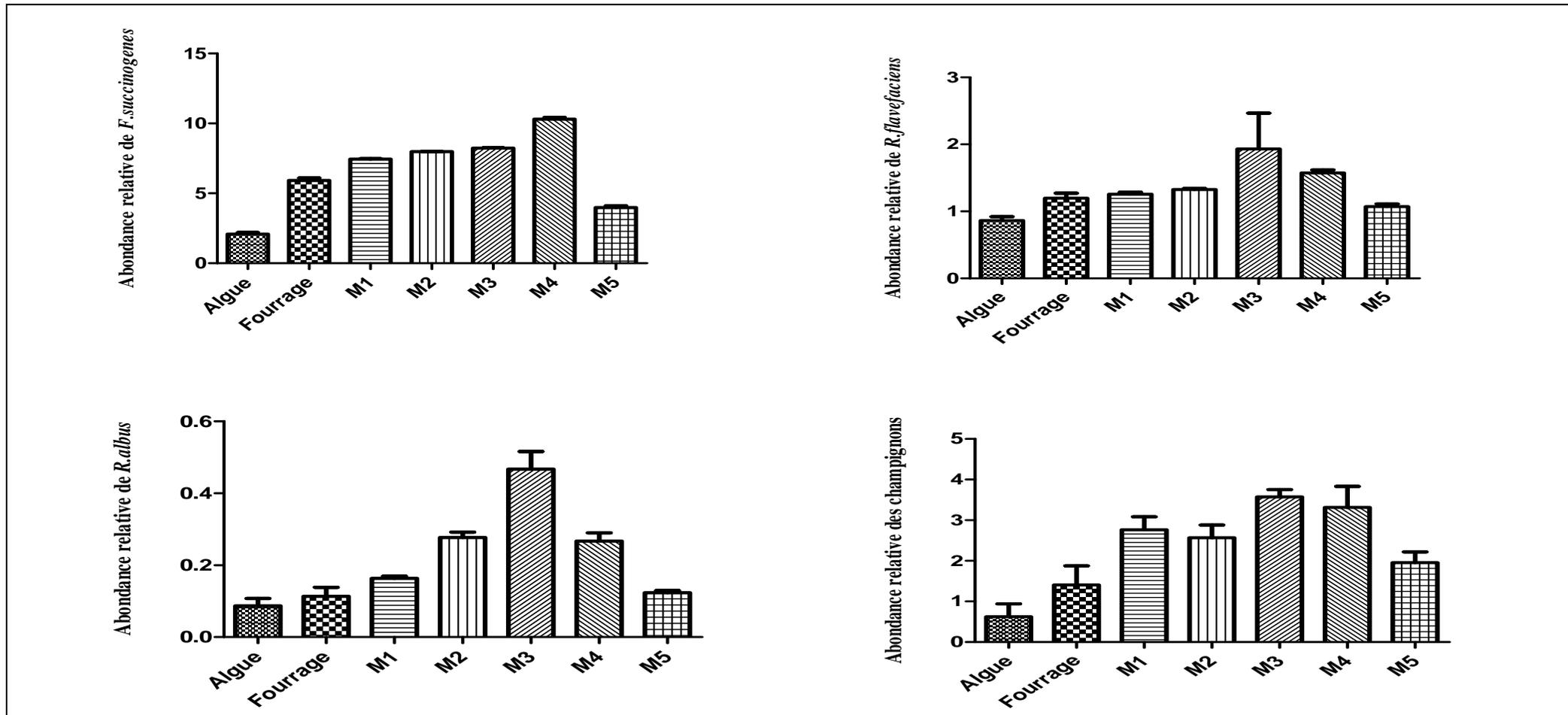


Figure 33: Abondance relative des principaux microorganismes cellulolytiques après 24h de fermentation *in vitro*

9.1.2.2. Influence des substrats sur la population des champignons anaérobies totaux

Les champignons anaérobies sont capables de coloniser des fragments de plantes en pénétrant à la fois la cuticule et la membrane cellulaire des tissus lignifiés dans le rumen de bovins et d'ovins recevant des substrats fibreux et peuvent avoir une activité cellulolytique (Bauchop, 1981). Il est notamment rapporté que les champignons peuvent avoir un rôle synergique important dans la digestion ruminale des fibres par destruction physique des tissus lignifiés, ce qui permet un accès facile aux autres microbes du rumen à la portion digestible des plantes (Chen *et al.*, 2008).

Joblin *et al.*(1989) ont rapporté que la dégradation des fibres par les champignons peut être plus prononcée que celle des bactéries cellulolytiques durant les premières heures après incubation au niveau du rumen. En effet, la colonisation des fibres par les champignons se fait 15 à 20 min après leur entrée dans le rumen. Par conséquent, les valeurs plus faibles enregistrées dans notre étude sont probablement dues à ceci. La concentration d'ADN fongique étant largement plus faible que l'ADN bactérien après 24h de fermentation confirme cette constatation.

Les résultats de la quantification relative après 24h de fermentation *in vitro* des champignons anaérobies totaux relativement au calibrant au temps (t=0h) et en référence aux bactéries totales sont exposés au niveau du tableau 22.

D'après les résultats, il ressort une différence significative ($P < 0,0001$) dans l'abondance relative des champignons entre l'algue et le fourrage. Néanmoins, avec les deux substrats, l'ADN fongique est augmenté. Le fourrage enregistre une valeur (1,40 fois) plus élevée et l'algue (0,62 fois) plus élevée.

De plus, l'abondance relative des champignons est significativement différente ($P < 0,0001$) entre les mixtures. Ceci dit, tout comme pour les substrats incubés individuellement, une prolifération des champignons apparaît. La mixture M3 se démarque avec la valeur maximale (3,57 fois) plus élevée.

Par ailleurs, il est constaté que toutes les mixtures enregistrent des valeurs supérieures au fourrage de référence et comme pour les bactéries cellulolytiques l'abondance relative des champignons augmente proportionnellement à l'augmentation de l'algue.

Toutefois, une différence apparaît puisque les champignons prolifèrent plus même avec (80%) d'incorporation de l'algue.

Des auteurs ont rapporté que le régime alimentaire pouvait avoir un effet significatif sur la population des champignons en favorisant une plus large population avec les substrats riches en fibres comparativement aux concentrés (Bauchop, 1979). D'après nos résultats, jusqu'à 40% d'incorporation la teneur en fibres diminue tandis que celle des populations cellulolytiques augmente. Nous suggérons donc une amélioration de la digestion des fibres et un accroissement des microorganismes cellulolytiques en raison de l'optimisation des conditions de croissance.

10. Etude du profil enzymatique: activité spécifique de la carboxymethylcellulase(CMCase) après fermentation *in vitro*

Les résultats de la détermination de l'activité spécifique de l'enzyme polysaccharidasique (CMCase) après 24h de fermentation *in vitro* sont représentés au niveau de la figure (34). Il ressort que les deux substrats singuliers algue et fourrage témoin enregistrent des valeurs très significativement différentes ($P < 0,0001$) avec respectivement (335,73 U/mg P) et (99,01 U/mg P). Ce résultat n'est pas surprenant étant donné que le fourrage témoin est nettement plus riche (263g/Kg MS) en cellulose (substrat des cellulases).

Concernant les mixtures, une différence significative est également enregistrée ($P < 0,0001$). Globalement, l'incorporation de l'algue influence positivement l'activité de la (CMCase). La mixture (M4) se démarque avec (578,46 U/mg P), la mixture (M5) enregistre par contre la plus faible valeur (79,21 U/mg P). D'après la figure (34), à 20% et 40% d'incorporation de l'algue, l'activité spécifique de la (CMCase) est plus élevée que le fourrage de référence. Ce résultat suggère une amélioration de la dégradation des fibres et plus particulièrement une optimisation de la cellulolyse.

Silva *et al.* (1987) ont constaté une forte corrélation entre la (CMCase) et la dégradation des fibres. De nombreuses études ont démontré une amélioration de la digestibilité de la matière sèche (MS) et la digestibilité des fibres *in situ* et *in vitro* (Nakashima *et al.*, 1988; Feng *et al.*, 1996; Hristov *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1999; Colombatto, 2000; Colombatto *et al.*, 2002c), Ou *in vivo* (Feng *et al.*, 1996; Krause *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1999; Beauchemin *et al.*, 2000; Kung *et al.*, 2000) suite à l'addition d'enzymes fibrolytiques exogènes.

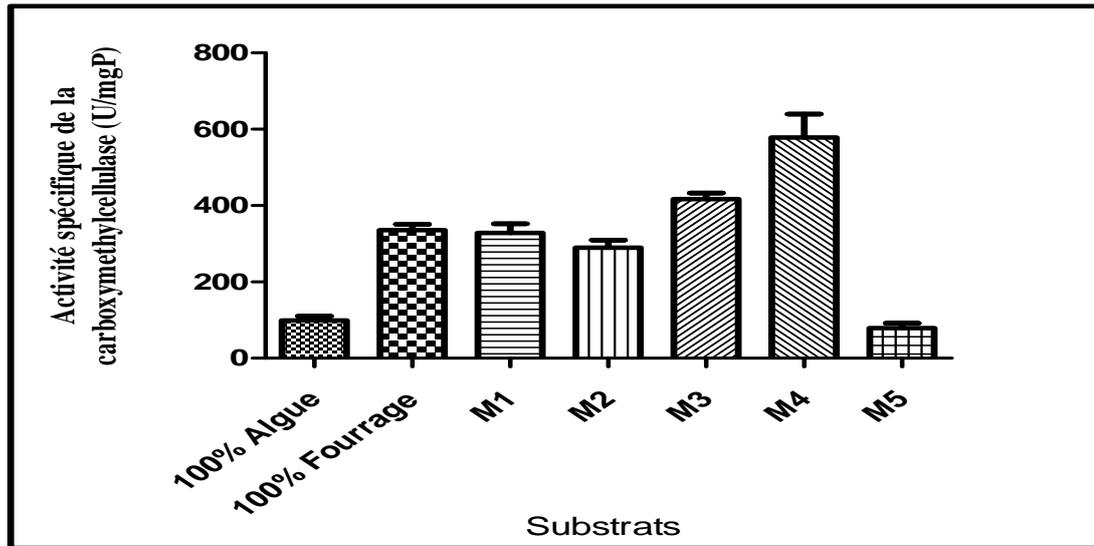


Figure 34: Activité enzymatique spécifique des substrats singuliers et de leurs mixtures

Par ailleurs, certains auteurs ont rapporté que l'utilisation d'enzymes fibrolytiques exogènes est un moyen prometteur pour améliorer l'utilisation des fourrages et pour augmenter la productivité. En outre, d'après certains chercheurs, il existe une corrélation positive significative entre l'activité carboxy-méthylcellulasique et la production de gaz *in vitro* (Wallace *et al.*, 2001).

Nos résultats sont en accord avec cette constatation, en effet, une corrélation positive significative ($r=0,708$, $P=0,044$) entre la production cumulative de gaz après 24h de fermentation et l'activité (CMCase) est enregistrée. Il est aussi rapporté, qu'une densité faible des populations microbiennes qui dégradent les fibres (bactéries cellulolytiques et champignons) peut être responsable de l'inhibition des enzymes responsables de la dégradation des fibres (Singh *et al.*, 2011).

En se basant sur nos résultats, nous expliquons l'augmentation de l'activité spécifique de l'enzyme polysaccharidasique (CMCase) avec les fortes proportions en algues, par la stimulation des cellulases en particulier les endoglucanases (CMCase), et par l'accroissement de l'abondance relative des microorganismes cellulolytiques. Ce qui est soutenu par le travail de Chen *et al.* (2007), qui ont rapporté que l'augmentation de l'activité des enzymes fibrolytiques est concordante avec l'augmentation de la population microbienne du rumen.

Tableau 23: Corrélations entre les protozoaires, les bactéries cellulolytiques, les champignons et l'activité carboxy-méthylcellulase

	Protozoaires	<i>F.succinogenes</i>	<i>R.flavefaciens</i>	<i>R.albus</i>	Champignons	AC
Protozoaires	1					
<i>F.succinogenes</i>	0,846	1				
<i>R.flavefaciens</i>	0,745	0,986	1			
<i>R.albus</i>	0,988	0,917	0,837	1		
Champignons	0,987	0,919	0,840	0,999*	1	
AC	-0,971	-0,697	-0,568	-0,925	-0,923	1

AC: Activité carboxy-méthylcellulase

L'étude des corrélations existantes entre l'activité spécifique de la CMCCase et les populations microbiennes étudiées a révélé des corrélations négatives mais, cependant, dans tous les cas non significatives ($P < 0,05$) (tableau 23). Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres auteurs qui n'ont rapporté aucune corrélation ($P < 0,05$) entre l'activité (CMCCase) et l'abondance relative des trois principales bactéries cellulolytiques, des champignons et des protozoaires (Higuero, 2012).

QUATRIÈME PARTIE
CONCLUSIONS GÉNÉRALES
ET PERSPECTIVES

Le présent travail s'oriente vers une voie de valorisation jusque-là jamais entreprise en Algérie dans l'alimentation des ruminants. Il a pour objectif principal l'étude de nouveaux substrats alimentaires non conventionnels d'origine marine, dans le but de les incorporer dans les rations alimentaires des ruminants. Il s'agit de deux algues largement disponibles sur le littoral algérien (*Ulva lactuca* et *Halopteris scoparia*). Dans ce cadre, ce travail a consisté à étudier plusieurs aspects relatifs à ces substrats:

- La caractérisation des éléments nutritifs et des métabolites secondaires d'une algue verte *Ulva lactuca* et d'une algue brune *Halopteris scoparia*.
- Le suivi de leur métabolisation *in vitro* en présence de microbiote ruminal.
- La détermination du profil fermentaire de l'algue verte incorporée individuellement et simultanément en mixture à différentes proportions avec un fourrage de référence.
- La caractérisation du profil microbien associé après fermentation *in vitro*.
- L'étude de l'activité spécifique de la carboxy-méthylcellulase (CMCase).

Les analyses chimiques des algues étudiées révèlent des teneurs très élevées en matières minérales, ainsi, leur utilisation comme supplément peut améliorer les rations de base généralement distribuées aux ruminants par les éleveurs locaux. Comme, elles peuvent être utilisées pour combler les déficits en besoins minéraux dans certaines conditions physiologiques et assurer une bonne croissance du microbiote ruminal. De même, les algues étudiées se caractérisent par une teneur appréciable en matières azotées totales, particulièrement, l'algue verte dont la teneur (15,3%) est pratiquement le double de celle du fourrage de référence généralement distribué au cheptel local. De plus, tenant compte des données bibliographiques qui stipulent un niveau minimum de (7 à 8%MS) pour un bon fonctionnement du rumen et une alimentation convenable des ruminants (Van Soest, 1994), nous recommandons les algues étudiées comme un supplément additif en azote avec des fourrages et des sous-produits fibreux. Concernant les teneurs en constituants polysaccharidiques, les algues constituent des sources importantes de polysaccharides ayant des structures variées et originales différentes des fibres des végétaux terrestres. D'une manière générale, hormis la cellulose, les structures chimiques précises des polysaccharides insolubles restent très mal connues. Les algues étudiées renferment des fibres solubles et insolubles. Parmi les fibres insolubles, les deux algues se caractérisent par la prédominance des hémicelluloses. L'algue verte se démarque par la plus faible teneur en parois totales et contient une teneur modérée en lignine, comparativement à l'algue brune et au foin de vesce-avoine qui contient environ la teneur double en parois totales.

Le milieu marin et les organismes qui s'y trouvent constituent une source infinie de molécules actives à structure chimique originale. Ces composés sont synthétisés par des voies métaboliques différentes de celles observées en milieu terrestre et les algues qui sont le plus souvent fixées sur un substrat élaborent des défenses chimiques pour empêcher leur colonisation par d'autres espèces, y compris les microorganismes. Un intérêt a été porté à l'analyse de ces métabolites secondaires en se basant sur le fait que chez les ruminants, plusieurs types de phénols incluant les phénols simples et les polyphénols affectent la valeur nutritive des aliments. Leurs effets peuvent s'expliquer par divers aspects entre autres, la modification de la composition du microbiote ruminal, complexation ou inhibition d'enzymes microbiennes, complexations avec les protéines, les polysaccharides et les minéraux. Ainsi, les concentrations élevées en tanins dans certains substrats peuvent être considérées comme un facteur limitant à l'utilisation de ces substrats comme suppléments effectifs aux fourrages de base. D'après notre étude, l'analyse qualitative et quantitative révèle la présence de métabolites secondaires à savoir: les phénols totaux, les tanins totaux, les tanins condensés et les flavonoïdes. L'algue verte enregistre des teneurs largement plus faibles que l'algue brune, car, elle a tendance à coloniser les sites à l'hydrodynamisme important où les brouteurs y sont en quantités plus faibles, induisant des teneurs moindres en composés phénoliques. Aucune analyse n'a été entreprise de notre part pour évaluer les effets de ces composés sur l'activité du microbiote ruminal.

En outre, l'originalité des algues en matière de composés secondaires réside dans l'existence d'une classe de tanins spécifique aux algues marines, plus particulièrement, les algues brunes. Celle-ci est représentée par les phlorotanins. Aucune investigation n'a été entreprise dans notre étude sur ce type de composés, néanmoins, il est rapporté que ces molécules affectent les bactéries totales du rumen en réduisant la population des bactéries cellulolytiques et en favorisant la croissance d'autres bactéries. De plus, ils ont un effet marqué sur les produits fermentaires, notamment, la production de gaz, le profil des acides gras volatils, et l'accumulation de l'ammoniac (Wong *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2009). Il est aussi important de souligner que l'analyse des tanins doit être faite avec précaution car leur effet sur l'activité métabolique du microbiote ruminal dépend non seulement de leur concentration mais aussi de leurs propriétés structurales et réactionnelles. D'où l'importance de signaler que les méthodes d'analyses chimiques des tanins restent controversées et les résultats à considérer avec précautions.

L'évaluation de la fermentescibilité *in vitro* des substrats singuliers par le microbiote ruminal nous a permis dans un premier temps d'éliminer l'algue brune *Halopteris scoparia* qui

s'est avérée très peu satisfaisante. En effet, malgré un statut nutritionnel très intéressant, cette dernière s'est avérée très mal fermentée par le microbiote ruminal pour des causes qui restent inconnues. Par ailleurs, l'*Ulva lactuca* s'est avérée faiblement dégradée comparativement à la vesce-avoine aux différents temps d'incubation, néanmoins, au bout de 24h de fermentation, la production cumulative de gaz représente (89,9%) de la production de gaz globale, pas très loin de la vesce-avoine qui enregistre (87,2%). Cette différence notée est expliquée par leur composition chimique différente, notamment, une charge minérale très importante avoisinant les (40% MS), le contenu fibreux et les composés anti-nutritionnels qui inhibent les fonctions digestives. La faible production de gaz notée avec *Ulva lactuca* (51ml/g MO) en dépit d'une teneur élevée en MAT, confirme que leur contribution à la production de gaz ne constitue pas un facteur d'influence significatif. D'après nos résultats, à 24h de fermentation elles sont corrélées négativement et significativement à la production de gaz total ($r = -0.984$, $P < 0.0001$), d'où il est possible de tirer qu'elle ne participe pas à la production de gaz mais plutôt à la production de la biomasse microbienne.

L'évaluation de la fermentescibilité *in vitro* de mixtures d'algue verte et de fourrage indique une différence significative entre les différentes mixtures ($P < 0,0001$). Par ailleurs, l'incorporation de l'algue à 5% à 10% et à 20% n'a pas d'effet significatif sur la production cumulative de gaz comparativement au contrôle. En effet, une différence variant entre (0,1 et 5,8 ml/g MS) est notée pour ces concentrations. Au-delà de 20% d'incorporation, une diminution significative linéaire dans la production de gaz total est obtenue avec (25,7 et 85,4 ml/g MS) de gaz en moins respectivement avec 40% et 80% d'algue incorporée, probablement en raison des interactions digestives entre les différents composants des deux substrats. Par ailleurs, à tous les temps d'incubation sélectionnés, les productions de gaz observées sont distinctes par rapport aux productions théoriques, ce qui suggère une non additivité des valeurs potentielles des substrats et un effet associatif, plus spécifiquement, un effet synergique. Ceci est probablement causé par une synchronisation ou une asynchronisation dans la libération des protéines ou d'autres constituants alimentaires.

L'étude du profil fermentaire a démontré que l'algue, le fourrage, et les différentes mixtures enregistrent des concentrations en azote ammoniacal assez élevées, et largement supérieures à la concentration (80 mg/l) rapportée par Negadi *et al.*(2000) et préconisée pour assurer une activité métabolique maximale du microbiote ruminal *in vitro*.

L'*Ulva lactuca* produit une plus grande quantité en azote ammoniacal (N-NH₃), un résultat expliqué par une teneur largement plus élevée en protéines brutes, par ailleurs, une augmentation

significative linéaire de la concentration d'azote ammoniacal est constatée avec l'augmentation de la quantité de l'algue. Il est donc clair que l'algue contient plus de protéines dégradables par les bactéries protéolytiques et ainsi un plus grand potentiel à produire des protéines microbiennes. Cependant, tenant compte de la corrélation très forte qui existe entre le taux de fermentation des glucides et le taux de dégradation des protéines en (N-NH₃) pour la protéosynthèse microbienne. Il serait envisagé qu'il y'ait un effet de synchronisation entre le taux de libération du (N-NH₃) et la libération de l'énergie. La corrélation très élevée obtenue entre les matières azotées totales et l'azote ammoniacal (N-NH₃) dans le surnagent ($r=0,957$; $P=0,0007$) appuie l'hypothèse d'une bonne dégradabilité des matières azotées totales des substrats étudiés.

L'analyse des acides gras volatils a révélé que l'*Ulva lactuca* produit une quantité cinq fois moins élevée que le fourrage témoin (1,2 mmoles/gMS), par ailleurs, une différence significative est constatée entre les différentes mixtures avec une prédominance de la mixture contenant (40% algue). L'amélioration substantielle de la production des AGVt avec la mixture (M4) suggère une intensification de l'activité fermentaire et une production élevée de la masse des microorganismes expliquée par la présence d'une mixture riche en énergie et en protéines. Pour ce qui est de l'aspect qualitatif, une prédominance de la production de l'acétate apparait, ce qui est tout à fait concordant avec la composition chimique des substrats étudiés, car, la fermentation d'aliments riches en amidon tend à produire plus de propionate, tandis que, celle de substrats fibreux aboutit à la formation plus importante d'acétate.

De plus, le profil en AGV obtenu confirme la bonne fermentescibilité *in vitro* des substrats en se basant sur les constatations de certains auteurs qui stipulent que la production d'acétate est liée à la production de gaz engendrée par la dégradation des divers composants de l'aliment et que par contre, celle du propionate serait plutôt en relation avec les gaz libérés à partir du système tampon. D'autre part, les ratios acétate/propionate, de fait les deux acides gras majeurs, sont significativement différents entre les substrats. Ces ratios sont compris entre 2,54 et 4,47, ils sont comparables aux ratios rapportés dans la littérature et considérés comme appréciables. En outre, ceci indique une digestibilité NDF appréciable des substrats.

Un résultat appuyé par l'étude des corrélations qui ont démontré une corrélation positive significative entre la fraction NDF et le ratio acétate/ propionate ($r=0,700$, $P>0,05$). En outre, aucune corrélation directe n'est établie entre la production de gaz et la production d'acides gras volatils. Cependant, les productions de gaz pour les temps (6,12,24, 72h) sont corrélées

positivement et significativement au ratio acétate/propionate. Les phénols totaux ne montrent pas un effet corrélatif significatif sur le processus de production des AGV ($r=-0,700$; $P=0,079$). Les tanins totaux montrent par contre un effet corrélatif négatif sur la production des AGVt de même que sur les deux principaux AGV, acétate et propionate. Ce résultat confirme l'effet négatif des tanins sur la production des AGV.

L'étude de la digestibilité a révélé une différence significative dans les coefficients de digestibilité de la MS, une différence qui est principalement due à leur composition chimique différente, particulièrement, la proportion et la digestibilité des parois. En outre, la faible dégradabilité de l'algue peut être expliquée par une mauvaise dégradation des constituants pariétaux pour diverses raisons, entre autres, la présence d'une fraction lignine très polymérisée ou la formation de complexes entre les composés hémicellulosiques et la lignine. D'autre part, la faible digestibilité de la matière organique de l'algue est principalement expliquée par une charge minérale très importante et/ou à une faible dégradabilité de l'hémicellulose attachée aux protéines et principalement à la faible dégradabilité des carbohydrates non structuraux insolubles. En outre, jusqu'à 10% d'incorporation de l'algue, une différence non significative ($P>0,05$) est observée entre les mixtures et le fourrage témoin, au-delà, une chute significative est observée. Un résultat corroboré aux productions cumulatives de gaz.

L'étude de la dégradabilité enzymatique de l'azote a révélé une faible aptitude de cet aliment à fournir de l'azote utilisable par les microorganismes du rumen en se basant sur la méthode utilisée. Ce résultat ne constitue en aucun cas un handicap à leur valorisation dans ce sens, car ça pourrait être des protéines profitables à l'animal. Aucune analyse n'a cependant été entreprise dans cette étude pour évaluer leur dégradation au niveau de l'intestin. Nous soulignons par ailleurs, que la méthode utilisée dans cette étude n'a jamais été entreprise auparavant sur des échantillons tels que les algues, les résultats obtenus doivent donc être pris avec précaution.

L'analyse moléculaire de l'abondance relative des différentes populations microbiennes du rumen après 24h de fermentation contre 0h d'incubation (contrôle), révèle des changements importants dans le profil microbien du rumen. Il en ressort un déséquilibre notable parmi les groupements cellulolytiques. D'après nos résultats, la bactérie *Fibrobacter succinogenes* prédomine à chaque fois et représente entre 69% et 84% des bactéries cellulolytiques, ceci est probablement dû à un effet compétitif entre *F.succinogenes* et les deux autres bactéries *R.flavefaciens* et *R.albus*.

Globalement, les trois principales bactéries cellulolytiques et les champignons anaérobies totaux sont significativement augmentés après 24h de fermentation *in vitro*. Ce résultat suggère une bonne fermentescibilité des substrats et une bonne dégradabilité des fibres induisant une bonne croissance microbienne. Les discordances constatées entre l'algue et le fourrage s'expliquent par une nature chimique différente notamment une teneur en fibres différente et une dégradabilité distincte induisant une abondance relative amoindrie des populations cellulolytiques avec le substrat algue.

Ce qui a surtout soulevé notre intérêt, c'est l'effet des mixtures sur les populations cellulolytiques. Effectivement, nous avons constaté des fluctuations quantitatives importantes des populations cibles dans le profil microbien du rumen. Les deux mixtures (M3) et (M4) ressortent du lot en enregistrant des valeurs nettement plus élevées que le fourrage de référence à la fois avec les bactéries et les champignons, et globalement l'abondance de toutes les populations microbiennes analysées augmente proportionnellement à l'augmentation de la quantité de l'algue jusqu'à un certain seuil.

Ce phénomène est expliqué par une optimisation des conditions de croissance, permettant à la population cellulolytique adhérente de se développer et de croître. L'explication la plus plausible à ce phénomène est une optimisation de l'activité fermentaire de ces populations suite à un apport intéressant en minéraux. Nous appuyons de ce fait les constatations de certains auteurs qui ont montré une amélioration marquée de la valorisation des fourrages de valeur nutritive limitée, notamment par l'addition de certains minéraux.

Les résultats sont confirmés en démontrant une amélioration marquée de l'activité fibrolytique. En effet, la détermination de l'activité spécifique polysaccharidasique (CMCase) indique des résultats bien concordants avec ceux du profil microbien cellulolytique. L'incorporation de l'algue influence positivement l'activité CMCase jusqu'à un certain seuil. Ce résultat suggère une amélioration de la dégradation des fibres et plus particulièrement une optimisation de la cellulolyse.

➤ De ce qui précède, il ressort que les algues étudiées se caractérisent par leur contenu intéressant en éléments minéraux et en matières azotées totales. En outre, leur contenu en parois végétales est marqué par la prédominance des hémicelluloses. De ce fait, leur usage dans l'alimentation animale pourrait être envisagé comme supplément dans certains blocs nutritionnels comme substituts aux compléments multivitaminés (CMV) et aux traitements à l'ammoniac.

Par ailleurs, il ressort que les substrats étudiés favorisent majoritairement la prolifération et la production d'une biomasse microbienne intense (flore cellulolytique), marquée par une activité enzymatique importante. Ceci a amélioré la dégradation *in vitro* du substrat de référence.

Les recherches entreprises posent la problématique d'évaluation nutritionnelle des végétaux marins pour leur éventuelle utilisation en nutrition animale.

Fallait-il se baser sur les méthodes habituelles utilisées pour les aliments conventionnels (fourrages et concentrés) ou utiliser simultanément celles basées sur les techniques chimiques, biologiques et moléculaires?

De nouvelles pistes de recherche scientifique peuvent être envisagées à ce niveau. Pour cela, quelques suggestions sont avancées:

- Il serait intéressant de développer des recherches qui contribueraient à une meilleure connaissance des macroalgues marines, de travailler sur d'autres sites avec un nombre plus élevé d'espèces, permettant de connaître leur développement, leur physiologie, leur composition chimique et leur reproduction. Ces recherches seraient d'autant plus profitables dans le cadre d'une culture et d'une éventuelle utilisation en nutrition animale.
- Des études *in vivo* devraient être envisagées en vue de mieux connaître la réaction de l'animal et de ses performances; ainsi que la qualité des produits.
- Il est nécessaire aussi de connaître la qualité de l'azote des végétaux marins, entre autres, la fraction de l'azote liée à la paroi (N-NDF) et de connaître la qualité des protéines de *Ulva lactuca* en se basant sur d'autres méthodes, pour déterminer si ce sont des protéines qui se prêtent à une décomposition ou dégradation rapide dans le rumen et qui servent de source alimentaire aux bactéries pour la fabrication de leurs propres protéines microbiennes. Ou bien, si il s'agit de protéines by-pass, non absorbables au niveau du rumen mais plutôt décomposées par les enzymes de l'intestin. Ou finalement, des protéines non digestibles qui se retrouvent dans les fèces.
- En outre, il est recommandé de mieux connaître la composition minérale des végétaux marins en vue d'une optimisation de la cellulolyse.
- L'étude des composés secondaires, particulièrement les phlorotanins et les huiles essentielles et la détermination de leurs effets sur l'activité du microbiote ruminal et la méthanogénèse pourrait être d'un grand intérêt.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- Ahn, J.H., Robertson, B.M., Elliot, R., Gutteridge, R.C., Ford, C.W., 1989. Quality assesment of tropical browse legumes: tannins content and protein degradation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 27, 147-156.
- Aidoud, A., Nedjraoui, D., 1992. The steppes of alfa (*Stipa tenacissima* L) and their utilisation by sheeps. In *Plant animal interactions in mediterrean-type ecosystems.MEDECOS VI*, Grèce. 62-67.
- Ammar, H., Lopez, S., Gonzalez, J.S., Ranilla, M.J., 2004a. Chemical composition and *in vitro* digestibility of some Spanish browse plant species. *J. Sci. Food Agric.* 84, 197-204.
- Andersen, J.B., Sehested, J., Invartsen, K.L., 1999. Effect of dry cow feeding strategy on rumen pH, concentration of volatile fatty acids and rumen epithelium development. *Acta Agriculturae Scandinavica.* 49,149-155.
- AOAC., 1990. Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 15th ed. Arlington, VA. ed. USA.
- Aposi, S.O., Castro F.B., Shand W.J., Orskov E.R., 1998. Chemical composition, in sacco degradation and *in vitro* gas production of some Ghanaian browse plants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 76, 129-137.
- Arbouche, H.S., Arbouche, Y., Arbouche, F., Arbouche, R., 2008. Valeur nutritive de quelques variétés d'orge algériennes pour l'alimentation des ruminants. *Recherche Agronomique.* 22, 67-72.
- Archimed, H., Poncet, C., Boval, M., Nipeau, F., Philibert, L., Xande, A., Aumont, G., 1999. Comparison of fresh and dried *Digitaria decumbens* grass intake and digestion by black belly rams. *Journal of Agricultural Science, Cambridge,* 133, 235-240.
- Aregheore, E.M., 2000. Chemical composition and nutritive value of some tropical by-product feedstuffs for small ruminant in vivo and in vitro digestibility. *Anim. Feed Sci. Technol.* 85, 99-109.
- Arhab, R., 2006. Etude de la fermentescibilité *in vitro* et de la digestibilité *in vivo* de végétauxdes zones arides et de sous produits de l'agronomie saharienne par l'estimation de l'activité métabolique du microbiote ruminale d'ovins. Thèse de doctorat. Université Mentouri de Constantine.
- Arhab, R., Laadjimi, K., Driss D, Djabri, B.,Bousseboua, H.,2010. Evaluation of feed mixture interactions by using *in vitro* gas production method. *Livestock Research for Rural Development* 22 (11).
- Arieli, A., Sklan, D. and Kissil, G., 1993. A note on the nutritive value of *Ulva lactuca* for ruminants. *Anim. Prod.* 57, 329-331.
- Aufreere, J., Cartailleur, D.,1988. Mise au point d'une méthode de laboratoire de prévision de la dégradabilité des protéines alimentaires des aliments concentrés dans le rumen. *Ann. Zootech.* 37, 255-270.
- Barone, R., 1997. Anatomie compare des mammifères domestiques. Tome 3: Splanchnologie 1.Appareil digestif.Appareil respiratoire.3^{ème} ed. Paris: Vigot, 853p.

- Barry, T.N., Manley, T.R., Duncan S.J., 1986. The role of condensed tannins in the nutritional value of lotus pedunculatus for sheep: Sites of carbohydrates and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. *British J.of Nutrition*. 55, 123-137.
- Barry, T.N., McNabb, W.C., 1999. The implication of condensed tannins on nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition*, 81, 263-272.
- Bauchop, T.,1979. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. *Appl. Environ.Microbiol.* 38,148-158.
- Bauchop, T., Mountfort, D.O., 1981. Cellulose Fermentation by a Rumen Anaerobic Fungus in Both the Absence and the Presence of Rumen Methanogens. *Appl.Env. Microbiol.* 42, 1103-1110.
- Bauchop, T.,1981. The anaerobic fungi in rumen fibre digestion. *Agric. Environ.* 6, 339–348.
- Baumont, R., Aufrère J., Niderkorn V., Andueza D., Surault R., Peccatte J.R., Delaby L., Pelletier, P., 2008.Fourrages, 194, 189-206.
- Beauchemin, K., Rode, A., Sewalt, L.M.,1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. *Can. J. Anim. Sci.* 75,641–644.
- Benchabane, O., 1988. Les algues brunes: source d’additifs alimentaires. *Ann.Inst.Nat.Agro. El-Harrach* ,12, 628-633.
- Benchabane, O., 1989. Etude de la fraction lipidique de *Cystoseira sedoides*: Algue brune endémique des cotes d’Algérie. *Ann.Inst. Nat.Agro.El Harrach.* 13,659,655.
- Bhat, S., Wallace, R.J., Ørskov, E.R., 1990. Adhesion of cellulolytic ruminal bacteria to barley straw. *Appl. Environ.Microbiol.* 56, 2698–2703.
- Blümmel, M., Aiple, K.P., Steingass, H., Becker, K., 1999. A note on the stoichiometrical and voluntary intake of hay fed to sheep: Comparison between using fibre components, in animals. 7(3), 207-225.
- Blümmel, M., Orskov, E.R.,1993. Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 40, 109-119.
- Boettcher, A.A.,Targett, N.M.,1993. Role of polyphenolic molecular-size in reduction of assimilation efficiency in *Xiphister mucosus*. *Ecology* 74, 891-903.
- Brugère, H., 1983. Biochimie du rumen-Aspects physiologiques. *Bull.GTV.* 3,5-22.
- Bryant, M.P., Burkey, L.A., 1953. Number and some predominate groups of bacteria in the rumens of cows fed different diets. *J. Dairy Sci.* 36, 218-224.
- Burtin, P., 2003. Nutritional value of seaweeds. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* 2. 4., 498-503.
- Cappelozza, Bruno., 2013. Protein Nutrition for Cattle. *Beef Cattle Sciences. Beef Cattle - Library.* Oregon State University.

- Cardinale, B.J., Palmer, M.A., Collins, S.L., 2002. Species diversity enhances ecosystem functioning through interspecific facilitation. *Nature*. 415, 426-429.
- Casas, M., H., Hernández, A., Marín, R.N., Águila, R.N., Carrillo, S., 2003. Use of *Sargassum* spp. algae as supplement for goats cattle. XIII. Congreso Latino americano de Nutrición. Acapulco, Guerrero, Mexico. p63.
- Cheeke, P.R., Palo, R.T., 1995. Plant toxins and mammalian herbivores: Co-evolutionary relationships and anti-nutritional effects. In: *Recent Developments in the Nutrition of Herbivores*. Journet M., Grenet E., Farce M.H., Thériez M. and Demarquilly C. (Eds.), INRA Editions, Paris, France, pp. 437-456.
- Chen, X.L., Wang J, K., Wu, Y.M., Liu, J.X., 2007. Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics, fibrolytic enzyme activities and populations of liquid- and solid-associated ruminal microbes *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141: 1-14.
- Chermiti, A., Mahouachi, M., Ksouri, J., Mensi, F., El Abed, A., 2003. Nutritional characteristics of marine plants and possibilities of their utilization in animal nutrition. The 3rd Tunisia-Japan symposium on science and technology. INSAT. Tunis. 22-24 May. Tunisia
- Chesson, A., Forsberg, C.W., 1988. Polysaccharide Degradation by Rumen Microorganisms. In: Hobson PN, editors. *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Science Publisher, 251-277. 527p.
- Chopin, T., 1997. Marine biodiversity monitoring. Protocol for monitoring of seaweeds. Environment Canada, Ecological monitoring and Assessment Network. Ottawa, 40p.
- Chouikhi, A., 2013. Les applications potentielles des macroalgues marines et les activités pharmacologiques de leurs métabolites : Revue. USTHB-FBS-4th International Congress of the Populations & Animal Communities "Dynamics & Biodiversity of the terrestrial & aquatic Ecosystems" CIPCA4 TAGHIT (Bechar) – Algeria.
- Cohen, I., Neori, A., 1991. *Ulva lactuca* biofilters for marine fishpond effluents I. Ammonia uptake Kinetics and nitrogen content. *Bot. Mar.* 34, 475-482.
- Coleman, G.S., 1975. The interrelationship between rumen ciliate protozoa and bacteria. In: McDonald W., Warner A.C.I. (Eds.). *Digestion and metabolism in the ruminant*. The university of New England publ, Armidale, USA, pp. 149-164.
- Colombatto, D., 2000. Use of enzymes to improve fibre utilization in ruminants. A biochemical and *in vitro* rumen degradation assessment. Ph.D. Diss., Univ. of Reading, U.K.
- Colombatto, D., Mould, F.L., Bhat, M., Owen, K., 2002c. The effect of fibrolytic enzyme application on rate and extent of alfalfa stem fermentation, assessed *in vitro*. P 209 in Proc. Br. Soc. Anim. Sci. Annu. Mtg. Penicuik, U.K.
- Craig, W.M., Broderick, G.A., Ricker, D.B., 1987. Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. *J. Nutr.* 117, 56-62.
- Czerkawski, F.M., Cheng, K.J., 1988. Compartmentation in the rumen. In: Hobson PN, Ed. *The rumen microbial ecosystem*, Elsevier Science Publishing, New York, 361-385. 527 p.
- Darcy-Vrillon, B., 1993. Nutritional aspects of the developing use of marine macroalgae for the human food industry. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* 44, 23-35.

- Dawczynski, C., Schubert, R., Jahreis, G., 2007. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chem.* 103, 891- 899.
- De Oliveira, M.N., Ponte Freitas, A.L., Urano Carvalho, A.F., Tavares Sampaio, T.M., Farias, D.F., Alves Teixeira, D.I., Gouveia, S.T., Gomes Pereira, J. and De Castro Catanho de Sena. M.M., 2009. Nutritive and non-nutritive attributes of washed-up seaweeds from the coast of Ceará, Brazil. *Food Chem.* 115, 254-259.
- Deghrouche, K., 2011. Etude de certains paramètres zootechniques et du métabolisme énergétique de la brebis dans les régions arides (biskra). thèse de doctorat en sciences. 234p.
- Dehority, B.A., Tirabasso, P.A., 2001. Effect of feeding frequency on bacterial and fungal concentrations, pH, and other parameters in the rumen. *J. Anim. Sci.* 79, 2908-2912.
- Demeyer, D., Fievez, V., 2000. Ruminants et environnement: la méthanogénèse. *Ann. Zootech.* 49, 95-112.
- Demeyer, D.I., 1990. Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. *Indian Summer Course on Rumen Metabolism and Ruminant Digestion*, Vol. 2, INRA, Clermont Ferrand.
- Denman, S.E., McSweeney, C.S., 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58, 572-582.
- Djellouli, Y., 1990. Flores et climats en Algérie septentrionale. Déterminismes climatiques de la répartition des plantes. Thèse de Doctorat en sciences, Université des sciences et technique Houari Boumediene Alger. 210p.
- Doreau, M., Ferlay, A., 1994. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 45, 379-396.
- Durand, M., Stevani J. and Komisarezuk S., 1987. Effect of some major minerals on rumen microbial metabolism in a semi-continuous fermentor (Rusitec). *Med. Fac. Land. bouw. Rijks univ. Gent.* 52, 1655-1663.
- Edwards, J.E., Mc Ewan, N.R., Travis, A.J., Wallace, R.J., 2004. 16S rDNA library-based Effects of chestnut tannins and coconut oil on growth performance, methane emission, ruminal fermentation, and microbial populations in sheep. *J. Dairy Sci.* 94, 6069-6077.
- El Hattab- Bouzidi, D., 2003. Détermination des stérols de l'algue rouge *Asparagopsis armata* par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier en employant l'extraction en phase solide : Etude comparative avec la chromatographie liquide à haute performance. Mémoire de magistère. Département de chimie industrielle, Univ Saad Dehleb blida 87p.
- EL-waziry, A., AL-haidary, A., Okab, A., Samara, E., Abdoun, K., 2015. Effect of dietary seaweed (*Ulva lactuca*) supplementation on growth performance of sheep and on *in vitro* gas production kinetics. *Turk J Vet Anim Sci.* 39, 81-86.
- Elyse, P., 2002. La PCR en temps réel : principes et applications. *Biology and Biotechnology.* 2-11.

- Fadel El-Seed A.M.A., Anim A.E., Abdel Ati K., Sekine A., Hishinuma J., Hamana K., 2000. Nutritive evaluation of some fodder tree species during dry season in central Sudan Asian Australian J. of Anim. Sci. 1, 844-850.
- FAO, 2010. www.FAO.org/docREP/013/i1820e.01.
- Feng, P., Hunt, C.W., Pritchard, G.T, Julien,W.E., 1996. Effect of enzyme preparations on in situ and in vitro degradation and in vivo digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. J. Anim. Sci. 74, 1349–1357.
- Fleurence, J., 1999. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. Trends Food Sci Tech. 10, 25-28.
- Fonseca, A.J.M., Dia-da-Silva, A.A and Orskov, E.R., 1998. In sacco degradation characteristics as predictors of digestibility and voluntary intake of roughages by mature ewes. Anim. Feed Sci. Technol. 72, 205-219.
- Fonty, G., Durand,C., 2007. Les ecosystèmes digestifs, ed. E.T. Doc: Lavoisier. 170 p.
- Fonty, G., Jouany, J.P., Forano, E., Gouet, P., 1995. L'écosystème microbien du réticulo-rumen. Nutr. Rumin. Domest. INRA. Paris Fr. 29, 9–347.
- Forsberg, C.W., Cheng, K.J., White, B.A.,1997. Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. In : , RI Mackie and BA White (Eds.), Gastrointestinal Microbiology,Chapman and Hall, New York, pp. 319-379.
- France, J., Siddons,R.C., 1993. Volatile fatty acid production, p. 107-121. In J.M. Forbes J. France (eds.). Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. CAB International, Wallingford, Oxford, England.
- Frutos, P., Hervas, G., Giraldez, F.J., Mantecon, A.R., 2004. An in vitro study on the ability of polyethylene glycol to inhibit the effect of quebracho tannins and tannic acid on rumen fermentation in sheep, goats, cows and deers. Australian J. Agri. Research. 55(11), 1125-1132.
- Frutos, P., Hervas, G., Ramos, G., Giraldez, F.J., Mantecon, A.R., 2002. Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. Anim. Feed Sci. Technol. 95, 215–226.
- Gael, R., 2005. Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges.Thèse de Doctorat. Université de Limoges.
- Garon-Lardiere, S., 2004. Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales). Université De Bretagne Occidentale.
- Getachew, G., Crovetto, G.M., Fondevella, M., Krishnamoorthy,U., Singh, B., Spanghero M., Steignass H., Robinson P.H., Kailas M.M., 2002. Laboratory variation of 24 h in vitro gas production and estimated metabolisable energy values of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Technol. 92, 51-57.
- Getachew, G., Makkar, H.P.S., Becker K., 1998b. The in vitro gas coupled with ammonia nitrogen measurement for evaluation of nitrogen degradability in low quality roughages using incubation medium of different buffering capacity. J. food Sci. and Agri. 77, 87-95.

- Getachew, G., Makkar, H.P.S., Becker K., 2000. Tannins in tropical browse: effects on *in vitro* microbial fermentation and microbial protein synthesis in media containing different amounts of nitrogen. *J. Agri. and Food chemistry*. 148, 3581-3588.
- Getachew, G., Pittroff, W., Putnam, D.H., Dandekar, A., Goyal, S., DePeters, E.J., 2008. The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on *in vitro* rumen fermentation and microbial protein synthesis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 140, 444–461.
- Getachew, G., Robinson, P.H., DePeters, E.J., Taylor, S.J., 2004. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 111, 57-71.
- Ghasemi, S., Naserian, A.A., Valizadeh, R., Tahmasebi, A.M., Vakili, A.R., 2012. Inclusion of pistachio hulls as a replacement for alfalfa hay in the diet of sheep causes a shift in the rumen cellulolytic bacterial population.
- Giger-Reverdin, S., Abijaoudé, J.A., Prado, I.N., Tessier, J., Morand-Fehr, P., 1997. Effect of diet composition on the kinetics of osmotic pressure in the rumen of dairy goats. *Options Méditerranéennes Sér. A* 34, 143–147.
- Glombitza, K.W., Stoffelen, L., Murawski, U., Bielaczek, J., EGGE, H., 1974. Antibiotics from algae Bromophenols from *Rhodomelaecea*, *Planta Medica*, 25, 105-114.
- Goad, D.W., Goad, C.L., Nagaraja, T.G., 1998. Ruminant microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *J. Anim. Sci.* 76, 234-241.
- Groot, J.C.J., Cone, J.W., Williams, B.A., Debersaques, F.M.A. and Lantinga, E.A., 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds *Anim. Feed. Sci. Technol.* 64, 77 -89.
- Guetachew, G., Blümmel, M., Makkar, H.P.S., Becker, K., 1998a. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72, 261-281.
- Guist, G.G ; Humm, J.J., 1976 .Effect of sewage effluent on growth of *Ulva lactuca* Florida Sci., 39, 267-271.
- Hadjigeorgio, I.E., Gordon, I.I., Milne, J.A., 2003. Comparative preference by sheep and goats for Gramineae forages varying in chemical composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 49, 147-156.
- Hagerman, A.E., 2002. Tannin chemistry. www.users.muohio.edu/tanni.pdf
- Hansen, H.R., Hector, B.L., Feldmann, J., 2003. A qualitative and quantitative evaluation of the seaweed diet of North Ronaldsay sheep. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 105, 21-28.
- Haslam, E., 1998. Practical polyphenolics from structure to molecular recognition and - physiological action. Cambridge University press, Cambridge, UK.
- Haslam, E., 1975. Natural proanthocyanidins. In *The Flavonoids*; Harborne, J. B., Mabry, T. J., Mabry, H. Ed. Chapman and Hall: London. pp 505-560.

- Haslam, E., 1989. Plant polyphenols. In: Haslam E (ed) Vegetable tannins. Cambridge University press. pp.15-89.
- Hervas, G., Frutos, P., Giraldez, F.J., Mantecon, A.R., Alvarez Del Pino, M.C., 2003. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology*, 109, 65-78.
- Hino, T., Russel, J.B., 1985. Effect of reducing-equivalent disposal and NADH/NAD on deamination of amino acids by intact rumen micro-organisms and their cell extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 1368-1374.
- Higuera, C.S., 2012. Structure of ruminal microbial communities of sheep fed different diets. Thèse de Doctorat. Universidad de León.
- Hoover, W.H., 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. of Dairy Sci.* 69, 65-78.
- Horikawa, M., Noro, T., Kamei, Y., 1999. In vitro antimethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity found in extracts of marine algae indigenous to the coastline of Japan. *J. Antibiot.* 52, 186-189.
- Hristov, A. N., Rode, L.M., Beauchemin, K.A, Wuerfel, R.L., 1996. Effect of a commercial enzyme preparation on barley silage in vitro and in sacco dry matter degradability. PP 282-284 in Proc. Western Section, Am. Soc. Anim. Sci.
- Hungate, R.E., 1966. The rumen bacteria. In : Hungate (ed.) *The rumen and its microbes.* Academic press, 8-90. 533 p.
- Hwang, H., Chen, T., Nines, R.G., Shin, H.C., Stoner, G.D., 2006. Photochemo prevention of UVB-induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by brown algae polyphenols. *Int. J. Cancer* 119, 2742-2749.
- Jahn, W., Steinbeiss, J., Zetsche, K., 1984. Light intensity adaptation of phycobiliprotein content of the red alga *Porphyridium*. *Planta.* 161, 536-539.
- Jarvis, G.N., Strompl, C.D., Burgess, M., Skillman, C.L., Moore, E.R B., Joblin, K.N., 2000. Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. *Current. Microbiol.* 40, 327-332.
- Joblin, K. N., Campbell, G.P., Richardson, A.J., Stewart, C.S., 1989. Fermentation of barley straw by anaerobic rumen bacteria and fungi in axenic culture and in co-culture with methanogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 9(5), 195-197.
- Jouany, J.P., 1994. Les fermentations dans le rumen et leur optimization. INRA. Productions.
- Jouany, J.P., Broudicou, L., Prins, R.A., Komisarczuk-Bony S., 1994. Métabolisme et nutrition de la population microbienne du rumen. In : *Nutrition des ruminants domestiques.* Jouany J.P. (Eds.), INRA, Paris. pp, 350-381.
- Jouany, J.P., Ushida, K., 1998. The role of protozoa in feed digestion. *Asian-Australian Journal of Animal Science.* 12, 113-128.

- Jouany J.P., Demeyer D.I., Grain J. Effect of defaunating the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 1988, 21, 229-265.
- Jouany, J.P., 1988. Effect of diet on populations of rumen protozoa in relation to fibre digestion. In : Nolan J.V., Leng R.A., Demeyer D.I. The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion. Penambul Books, Armidale, NSW.59-74.
- Jouany, J.P., 1994. Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA Prod. Anim.* 7,207-225.
- Jouany, J.P., Ushida,K., 1998. The role of protozoa in feed digestion. *Asian-Aus. J.anim.sci.* 12,113-128.
- Jung, H.G., Deetz, D.A., 1993. Cell wall lignifications and degradability.p 315-346, in H.G. Jung., Bruxton. R.D., 1993. Hatfield and J. Ralph, eds. Forage cell wall structure and digestibility. ASA-CSSA, Madison, WI, USA.
- Kadari-Méziane.Y., 1994. Contribution à l'étude de l'impact de la pollution sur la distribution - spatio-temporelle des peuplements phytobenthiques dans la Baie de Bou Ismail. Thèse de magister. ENS Alger 226p.
- Kaehler, S., Kennish, R., 1996. Summer and winter comparisons in the nutritional value of marine macroalgae from Hong Kong. *Bot. Mar.* 39,11-17.
- Kaimoussi, A., Mouzdahir, A., Saih, A., 2004. Variations saisonnières des teneurs en métaux (Cd, Cu, Fe, Mn et Zn) chez l'algue *Ulva lactuca* prélevée au niveau du littoral de la ville d'El Jadida (Maroc). *Comptes Rendus Biologies.* 327, 361–369.
- Kamalak, A., Gurbuz, y, Finlayson, H., 2004. Comparison of in vitro dry matter degradation of four maize silages using the Menke gas production method - Recherche Google. *Turk J Vet Anim Sci* 26, 1003–1008.
- Karnati, S.K., Yu, Z., Sylvester,J.T., Dehority,B.A., Morrison,M ., Firkins,J.L., 2003. Technical note : Specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. *J. Ani. Sci.* 81, 812-815.
- Khanal, R.C. and Subba D.B., 2001. Nutritional evaluation of leaves from some major fodder trees cultivated in the hills of Nepal. *Anim. Feed Sci. Technol.* 92, 161-165.
- Khazaal K., Dentinho M.T., Riberio J.M., Orskov E.R., 1993a. A comparison of gas production during incubation with rumen contents in vitro and nylon bag degradability as predictors of the apparent digestibility in vivo and the voluntary intake of hays. *Anim. Production.* 57, 105-112.
- Khazaal, K., Dentinho, M.T., Ribeiro, J.M., Ørskov, E.R., 1995. Prediction of apparent digestibility and voluntary intake of hays fed to sheep: comparison between using fibre components, in vitro digestibility or characteristics of gas production or nylon bag degradation. *Anim. Sci.* 61, 527-538.
- Kim,D.H.,1970. Economically important seaweeds in Chile-I/Gracilaia. *Bot.Mar.*13,140-162.

- Kittelmann, S, G.E., Naylor, J.P., Koolaard.,Janssen,p.h., 2012. A Proposed Taxonomy of Anaerobic Fungi (Class Neocallimastigomycetes) Suitable for Large-Scale Sequence Based Community Structure Analysis. PloS One 7, e36866.
- Klieve, A.V., Swain, R.A., 1993. Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pulsed-field gel electrophoresis and laser densitometry. Appl. Environ. Microbiol. 59, 2299–2303.
- Koike, S., Kobayashi, Y., 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefacies*. FEMS Microbiol. Lett. 204,361–366.
- Kotarski, S.F., Waniska, R.D., Thurn, K.K., 1992. Starch hydrolysis by the ruminal microflora. J. Nut. 122, 178-190.
- Krause, D.O., Denman, S.E., Mackie, R.I., Morrison, M., Rae, A.L., Attwood, G.T., McSweeney, C.S., 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. FEMS Microbiol. Rev. 27, 663–693.
- Kumar, R., Vaithyanathan, S., 1990. Occurrence nutritional significance and effect animal productivity of tannins in tree leaves. Anim. Feed Sci. Technol. 30, 21-38.
- Kung, L., Jr., R. J. Treacher, G. A., Nauman, A. M., Smagala, K. M. Endres., ACohen. M. 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. J. Dairy Sci. 83,115–122.
- Lahaye, M., 1991. Marine algae as source of fibers: determination of soluble and insoluble dietary fibre content in some “sea-vegetables”. Journal Sciences Food Agricol. 54,587-94.
- Larbi, A., Smith, J.W., Kurdi, I.O., Adekunle, I.O., Raji, A.M., Ladipo, D.O., 1998. Chemical composition, rumen degradation and gas production characteristics of some multipurpose fodder trees and shrubs during wet and dry seasons in the humids tropics. Anim. Feed Sci. Technol. 72, 81-96.
- Larrahondo, J. E., 1985. Productos naturales: pruebas químicas iniciales en una planta. Guía de estudio del Departamento de Química, Universidad del Valle, pp. 10.
- Leinmüller, E., Steingass, H., Menke, K.H., 1991. Tannins in ruminant feedstuffs. Animal Research and Development, 33, 9-53.
- Leng, R.A.,1996. L’application de la biotechnologie à l’alimentation animale dans les pays en développement. Etude FAO production et santé animale pp 30.
- Liu, Y., Whitman,W.B., 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1125,171-189.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. methods 25, 402–408.
- Long, R.J., Apori, S.O., Castro, F.B., Orskov, E.R., 1993. Feed value of native forages of the Tibetan Plateau of China. Anim. Feed Sci. Technol. 80, 101-113.

- Longuo, H., Ouled Belkher, A., 1989. Quelques Aspects botaniques et nutritionnels des pâturages du dromadaire en Algérie. Presented at the Séminaire sur la Digestion, la Nutrition et l'Alimentation du Dromadaire, CIHEAM, Cahiers Options Méditerranéennes, pp. 47–53.
- Lopez, S., Gonzalez, J.S., Ranilla, M.J., 2004a. Chemical composition and *in vitro* digestibility of some Spanish browse plant species. *J. Sci. Food Agric.* 84, 197–204.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr A.R., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lwin K.O., Hayakawa, Ban-Tokuda., Matsui, H., 2011. Real-Time PCR Assays for Monitoring Anaerobic Fungal Biomass and Population Size in the Rumen. *Curr. Microbiol.* 62, 1147–1151.
- Mabeau, S., Fleurence, J., 1993. Seaweed in food products: Biochemical and nutritional aspects. *Trends Food Sci Tech.* 4, 103-107.
- Mac Artain, P., Gill, C.I.R., Brooks, M., Campbell, R., Rowland, I.R., 2007. Nutritional Value of Edible Seaweeds. 535–543.
- Mackie, R.I., White, B.A., 1990. Symposium : Rumen microbial ecology and nutrition. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output. *J. Dairy Sci.* 73, 2971-2995.
- Mackie, R., Aminov, R., White, B., McSweeney, C., 2000. Molecular ecology and diversity in gut microbial ecosystems, in: *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth, and Reproduction*. CABI, pp. 61–77.
- Makir, L.R., Foster, E.M., 1957. Effect of roughage in the bovine ration on types of bacteria in the rumen. *J. Dairy Sci.* 40, 905-913.
- Makkar H.P.S. 2003a. Quantification of Tannins: a laboratory Manual, 2nd edition, International Center for Agricultural Research in the dry areas, Aleppo, Syria.
- Makkar H.P.S., Becker, K. 1993. Behavior of tannic acid from various commercial sources towards some chemical and protein precipitation assays. *J. Sci. of Food and Agri.* 62, 295-299.
- Makkar, H.P.S., Blummel M., Becker K., 1998. Application of an *in vitro* gas method to understand the effect of natural plant products on availability and partitioning of nutrients. In: *In vitro Techniques for measuring nutrient supply to ruminants*. British society Anim. Sci. 22, 147-150.
- Makkar H.P.S., Blümmel M., Borowy N. K. and Becker K. 1993b. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61, 161-165.
- Makkar, H.P.S., Blummel, M., Becker, K., 1995. Formation of complexes between poly vinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and their implication in gas production and true digestibility *in vitro* techniques. *British J. Nutri.* 73, 897-913.

- Márcia de Pádua, Paulo Sérgio Growoski Fontoura and Alvaro Luiz Mathias.,2004. Chemical Composition of *Ulvaria oxysperma* (Kützinger) Bliding, *Ulva lactuca* (Linnaeus) and *Ulva fasciata* (Delile). Brazilian Archives Of Biology And Technology. Vol. 47, n.1. pp. 49-55.
- Marfaing, H., 2004. Les algues dans notre alimentation : Intérêt nutritionnel et utilisations. Revue de nutrition pratique. Dietecom Bretagne.CEVA. 1-9.
- Marín, A., Casas-Valdez, M., Carrillo,S., Hernández, H., Alberto Monroy, A., Sanginés, L.and Pérez-Gil,F.,2009. The marine algae *Sargassum* spp. (Sargassaceae) as feed for sheep in tropical and subtropical regions. Int. J. Trop. Biol. 57, 1271-1281.
- Marsham,, S., Scott, G.W., Tobin, M.L., 2007. Comparison of nutritive chemistry of a range of temperate seaweeds. Food. Chem. 100, 1331-1336.
- Martin, C., Millet,. L, Fonty, G., Michalet-Doreau, B., 2001. Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial community with rumen solid digesta. Reprod. Nutr. Dev. 41, 413-424.
- Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M., 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. Animal.4, 351–365.
- Martin, S., 2002. Gastro intestinal Microbiology in Animals. Research Signpost, Trivandrum, India.
- Martin,C., D. Morgavi, M. Doreau, J-P. Jouany (2006), « Comment réduire la production de méthane par les ruminants ? », Fourrages, Vol.187, p.283-300.
- Mc Allister., T.A. Okine, E.K ., Mathison, G.W., Cheng, K. J., 1996. Dietary environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. Canadian Journal of Animal Science. 76,231-243.
- Mc Allister T.A., Bae H.D., Jones G.A. and Cheng K.J. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. Journal of Animal Science, 72, 3004-3018.
- Mc Candless, E.L., 1978. The importance of cell wall constituents in algal taxonomy. In: Irvine, D.E.G., Price, J.H. (Eds), Modern approaches to the taxonomy of red and brown algae, Academic Press, London. 63-85.
- Mc Donald, P., Greenhalgh, J.F.D., Edwards, R.A., Morgan, C.A., 1995. Animal nutrition.
- Mc Leod, M.N., 1974. Plant tannins—their role in forage quality. Nutr. Abs. Rev. 44, 803 -814.
- Mc Neil M., Darvill A.G., Fry S.C. and Albersheim P. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. Ann. Rev.Biochem., 53: 625-663.
- McAllister, T.A Cheng,K.J., 1996. Microbial strategies in the ruminal digestion of cereal grains. Anim. Feed Sci. Technol. 62, 29-36.
- McClintock, J.B., Baker B.J., 2001. Marine Chemical Ecology.CRC Press: Florida, USA.
- Meenakshi. S., Gnanambigai,D.M., 2009. Global Journal of Pharmacology. 3,59-63.

- Mehrez, A.Z., Orskov, E.R., 1977. The use of a Dacron bag technique to determine rate of degradation of protein and energy in the rumen. *Journal of Science Agriculture Cambridge*, 88: 645-650.
- Mellenberger, R.W., Satter, L.D., Millett, M.A. and Baker, A.J. (1970). An *in vitro* technique for estimating digestibility of treated and untreated wood. *J. Anim. Sci.* 30 (6): 1005-1011.
- 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 feedingstuffs 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. *Anim Res Dev* 28, 7–55.
- Michalet-Doreau, B., Fernandez, I., Peyron, C., Millet, L., 2001. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reprod. Nutr. Dev.* 41, 187–194
- Michelland, R.J., 2009. Caractérisation moléculaire des procaryotes et facteurs de variation des écosystèmes digestifs chez deux mammifères herbivores: approche comparée vache/lapin. Université de Toulouse, France.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determining reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428.
- Minato, H., Endo, A., Ootomo, Y., Uemura, T., 1966. Ecological treatise of the rumen fermentation. II. The amylolytic and cellulolytic activities of the fractionated bacterial attached to the rumen solids. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 12, 53-69.
- Miyashita, K., Nana Mikami, N., Hosokawa, M., 2013. Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: A review. *J. funct. foods.* 5, 1507-1517.
- Mora Castro, N., Casas Valdez, M., Marín Álvarez, A., Águila Ramírez, R N., Sánchez Rodríguez, I., Hernández Contreras, H. and Sanginés García, L., 2009. The kelp *Macrocystis pyrifera* as nutritional supplement for goats. *Revista Científica.* XIX, 63-70.
- Mosoni, P., Fonty, G., Gouet, P., 1997. Competition between ruminal cellulolytic bacteria for adhesion to cellulose. *Curr. Microbiol.* 35, 44–47.
- Mould, F.L., 2003. Predicting feed quality-chemical analysis and *in vitro* evaluation. *Field Crops Research.* 84, 31-44.
- Mueller-Harvey, I., McAllan, A.B., 1992. Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *Adv. Plant Cell Biochem. Biotechnol.* 1, 151–217.
- Nagayama, K., Iwamura, Y., Shibata, T., Hirayama, I., Nakamura, T., 2002. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 889–893.
- Nakamura, T., Nagayama, K., Uchida, K., Tanaka, R., 1996. Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*. *Fisheries Sci.* 62, 923–926.

- Nakashima, Y., Orskov, E.R., Hotten, P.M., Ambo, K., Takase, Y., 1988. Rumen degradation of straw. 6. Effect of polysaccharidase enzymes on degradation characteristics of rice straw. *Anim. Prod.* 47,421–427.
- Nasser, M.E.A., Sallam, S.M.A., Araujo, R.C., Abdalla, A., Vitti, D.M.S., 2014. Effect of phosphorus supplementation on gas production, rumen fermentation and produced amylase and carboxymethyl cellulase activity, *in vitro*. (lucrări științifice - Seria zootehnie.53, 97-104.
- Negadi, S., Herrero M., Jessop N.S., 2000. The effect of fermentable nitrogen availability on *in vitro* gas production and degradability of NDF. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87, 241–251.
- Nherera, F.V., Ndlovu, L.R., Dzowela, B.H., 1999. Relationships between *in vitro* gas production characteristics, chemical composition and *in vitro* quality measures in goat fed tree fodder supplements. *Small Ruminant Research.* 31, 117-126
- Niderkorn, V., Baumont, R., Le Morvan, A., Macheboeuf, D., 2014. Occurrence of associative effects between grasses and legumes in binary mixtures on *in vitro* rumen fermentation characteristics. *Journal of animal science.* 89,1138-1145.
- Njidda, A.A., Nasiru, A., 2010. *In vitro* gas production and dry matter digestibility of tannin-containing forages of semi-arid region of north-eastern Nigeria. *Pak. J. Nutr.* 9, 60–66.
- Nocek, J.E., 1997a. Bovine acidosis: Implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80, 1005–1028.
- Norton, B.W., 2003. The nutritive value of tree legumes. Available in: <http://www.FAO.org/agp/AGP/AGPC/doc/Publicat/Gutt-shel/x5556eoj.htm>.
- Noziah, M.H., Ching, Ch.Y., 2000. Nutritional composition of edible seaweed. *Gracilaria changgi*. *Food Chemistry.* 68,69-76.
- NRC., 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. Committee on Nutrient Requirements of Small Ruminants. National Research Council, The National Academies Press, Washington, DC.
- Nshala, I.V., Siaw, D.E.K.A., Osuji, P.O., 1994. The Relationship between gas production and chemical composition of 23 browses of the genus *Sesbania*. *J. Sci. Food and Agri.* 65, 13-20.
- Odenyo, A.A., Mackie, R.I., Stahl, D.A., White, B.A., 1994. The use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to study competition between ruminal fibrolytic bacteria: pure-culture studies with cellulose and alkaline peroxide-treated wheat straw. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3697–3703.
- Ogimoto, K., Imai, S., 1981. Atlas of Rumen Microbiology. Japan Scientific Society Press. Tokyo. Japan.
- Ohene-Adjei, S., Teather, R.M., Ivan, M and R.J. Forster, R.J., 2007. Post inoculation protozoan establishment and association patterns of methanogenic archaea in the ovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 73,4609–4618.
- Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., 1993. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry.* 32, 507-521.

- Orpin, C.G., Joblin, K.N., 1997. pp. 140–195. In: Hobson P.N. and Stewart C.S. (eds) *The Rumen Microbial Ecosystem*, Chapman & Hall, London.
- Ortiz, J., Romero, N., Robert, P., Araya, J., Lopez-Hernandez, J., Bozzo, C., Navarrete, E., Osorio, A. and Rios, A., 2006. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea Antarctica*. *Food Chem.* 99, 98-104.
- Ould Ahmed., 1994. Etude des espèces phytobenthiques, au voisinage de la centrale thermique de Mersa El Hedjadj (Golf d'Arzew) ouest algérien, mention particulière sur une espèce remarquable, caulerpal : *Caulerpa prolifera* (Forsskal) LAMARROUX. Thèse de magistère ENSSMAL. Alger 181p.
- Pascual, J.J., Fernandez, C., Diaz, J.R., Garces, C., Rubert-Aleman, J., 2000. Voluntary intake and *in vitro* digestibility of different date-palm fractions by Murciano-Granadina (Capra Hirsus). *J. Arid Environments.* 45, 183-189.
- Paterson J., Cohran R. and Klopfenstein T. 1996. Degradable and undegradable protein response of cattle consuming forage-based diets. Proceedings of the third grazing livestock nutrition conference. Iudkins M.B., Mc Collum III F.T (Eds.), proc. West.Sec. Am. Soc. Anim. Sci. 47 (Suppl.1), 94-103.
- Patra, A.K., Kamra, D.N., Agrawal, N., 2006. Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology.* 128, 276–291.
- Pavia, H., Brock, E., 2000. Extrinsic factors influencing phlorotannin production in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Progress Series* 193, 285-294.
- Pavia, H., Toth, G., 2000. Inducible chemical resistance to herbivory in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Ecology* 81, 3212–3225.
- Pei, C.-X., Mao, S.-Y., Cheng, Y.-F., Zhu, W.-Y., 2010. Diversity, abundance and novel 16S rRNA gene sequences of methanogens in rumen liquid, solid and epithelium fractions of Jinnan cattle. *animal* 4, 20–29.
- Pelmont, J., 2005. Hydrogène - Acétate –Méthane. In : *Biodégradations et métabolismes*, collection Grenoble Sciences. 197-244.
- Pèrez, R., 1997. Ces algues qui nous entourent, Conception actuelle, Rôle dans la biosphère, utilisations, culture, aquaculture. Ifremer. 266p.
- Perret Boudouresque, M., Séridi., 1989. Inventaire des algues marines benthiques d'Algérie. *Gis posidonie publ*, Marseille France .1-117.
- Plumlee, k.h., Johnson, b., Galey, f.d., 1998. Disease in cattle dosed orally with oak or tannic acid. in: *toxic plants and other natural toxicants*, (garland t. and barr a.c., eds.), cab international, wallingford, uk, pp. 549-553.
- Popova, M., 2011. Structure et activité de la communauté des Archaea méthanogènes du rumen en relation avec la production de méthane par les ruminants. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.

- Praud,A.,1994. Isolement, caractérisation structurale et analyse de nouveaux métabolites d'algues méditerranéennes appartenant aux genres *Cystoseira* et *Lyngbiya*. Thèse. Doc. Sien.Spectro. physico-Chimie Structurale.Univ.Aix-Marseille 1, France, 186p.
- Raab , L., Cafantaris, B., Jilg T., Menke, K.H., 1983. Rumen protein degradation and biosynthesis. 1 - A new method for determination of protein degradation in rumen fluid *in vitro*. *Br. J.Nutr.*, 50, 569-582.
- Radmer, R.J., Parker, B.C.,1994. Commercial application of algae: opportunities and constraints. *J. Phycol.* 6, 93-98.
- Ragan, M.A., Glombitza, K.W.,1986. Phlorotannins, brown algal polyphenols. In *Progress in Physiological Research*, Round FE and Chapman DJ (ed). Biopress Ltd: Bristol. 129-241.
- Ragan, M.A., 1976. Physodes and phenolic compounds of brown algae. Composition and significance of physodes *in vivo* . *Bot Mar.* 19, 145-154.
- Ramade, A., 2009. *Eléments d'écologie appliquée*, 4^{ème} édition, Edition Dunod, 689 p.
- Raskin, L., Poulsen, L.K., Noguera, D.R., Rittmann, B.E., Stahl, D.A., 1994. Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1241– 1248
- Reed, J.D., 1986. Relationship among phenolics, insoluble proanthocyanidins and fibre in East African browse species. *Journal of range Management*, 39, 5-7.
- Reviers, B., 2002. *Biologie et phylogénie des algues*. Belin. 1, 351p.
- Rey,M., 2012. Implantation du microbiote et mise en place des fonctions du rumen chez le veau de race laitière et effet de la supplémentation en levures vivantes. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse.
- Rjiba Ktita, S., Chermiti, A. and Mahouachi, M., 2010. The use of seaweeds (*Ruppia maritime* and *Chaetomorpha linum* for lamb fattening during drought periods. *Small. Ruminant. Res.* 91,116 -119.
- Robinson, P. H., Getachew., Cone, G. J W., 2009. Evaluation of the extent of associative effects of two groups of four feeds using an *in vitro* gas production procedure. *Anim Feed Sci and Technol.* 150, 9-17.
- Roque, J.L., 1991. Anomalies de la digestion microbienne ruminale. Aspects pathologiques. Thèse Med. Vet., Toulouse. 99 p.
- Rorrer, G..L.,Cheney, D.P., 2004. Bioprocess engineering of cell and tissue cultures for marine seaweeds. *Aquacultural Engineering.*32,11-41.
- Rosales, M.,Gill M., 1998. Tree mixtures within integrated farming systems. *Livestock Research for Rural Development* 9, 415-424. <http://www.lrrd.org/lrrd9/4/mauro941.htm>.
- Rosales, M., Galindo, W., Murgueitio, E., Larrahondo, J., 1989. Sustancias antinutricionales en las hojas de árboles forrajeros. *Livestock Research and Rural Development*, 1 (1), 79–91.

- Rubanza, C.D.K., Shem, M.N., Otsyina, R., Bakengesa, S.S., Ichinohe, T., Fujihara, T., 2005. Polyphenolics and tannins effect on in vitro digestibility of selected Acacia species leaves. Anim. Feed Sci. Technol. 119, 129–142.
- Russell, J.B., Wilson, D.B., 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH. J. Dairy Sci. 79, 1503–1509.
- Saffo, M.B., 1987. New light on seaweeds. Bio Science. 37, 654-664.
- Salawu, M.B., Acamovic, T., Stewart., Hovell.C.S., Mc Kay.F.D.D., 1997. Assesment of the nutritive value of Calliandra calothyrsus: in sacco degradation and in vitro gas production in the presence of quebracho tannins with or without browse plus. Anim. Feed. Sci. Technol.69, 219,232.
- Salem A.Z.M. 2005. Impact of season of harvest on in vitro gas production and dry matter degradability of Acacia saligna leaves with inoculum from three ruminant species. Anim. Feed Sci. Technol. 123, 67-69.
- Sanchez-Machado, D.I., Lopez-Hernandez, P., Paseiro-Losada, P., Lopez-Cervantes, J., 2004b. An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds Biomedical Chromatography, 18, 183–190.
- Sanchez-Machado, D.I., López-Cervantes, J., López-Hernandez, J. and Paseiro-Losada, P., 2004. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. Food Chem. 85, 439- 444.
- Sandoval Castro C.A; Herrera P; Capetillo Leal C.M; Ayala Burgos A.J., 2003: *In vitro* gas production and digestibility of mucuna bean. tropical and Subtropical Agroecosystems. 1,77 – 80.
- Sandoval-Castro, C. Capetillo-Leal, R. Cetina-Góngora,,L. Ramirez-Avilés., 2002. A mixture simplex design to study associative effects with an in vitro gas production technique. Animal Feed Science and Technology.101,191–200.
- Sarojini,y., Lakshminarayana, K., Seshagiri,P., Rao., 2012.Variations in distribution of flavonoids in some seaweed of Visakhapatnam coast of India. Der Pharma Chemica. 4(4),1481-1484.
- SAS Institute, 2000. SAS/STAT® user’s guide Int Vol. 1, version 6, Fourth Edition, Cary, NC. ed. USA.
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., 2009. Les variations du bilan carbone des ruminants d’élevage. Renc Rech Rumin. 16.
- Sava. C., Sirbu,R., 2010. Ovidius University Annals of Chemistry. 21, 29-34.
- Seresinhi, T., Iben, C., 2003. *In vitro* quality assessment of two tropical shrub legumes in relation to their extractable tannins content. J. Anim. Physiology and Anim. Nutri. 87,109-115.
- Séridi, H., 1990. Etude des algues marines benthiques de la region d’Alger. Thèse de magister en sciences de la nature. ISN, USTHB, Alger. 235p.

- Séridi, H., 2007. Etude de la flore algale de l'Algérie. Etude phytosociologique des peuplements algaux photophyles de l'infralittoral superficiel de substrat dur, thèse de doctorat en sciences de la nature. USTHB .174p.
- Shin, E.C., Cho, K.M., Lim, W.J., Hong, Y.S., An, C.L., Kim, E.J., Kim, Y.K., Choi, B.R., An, J.M. Kang., Kim, Yun, H.D., 2004a. Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. *J. Applied. Microbiol.* 97, 378-383.
- Siddique, M.A.M., Khan, M.S.K. and Bhuiyan, M.K.A., 2013. Nutritional composition and amino acid profile of a sub-tropical red seaweed *Gelidium pusillum* collected from St. Martin's Island, Bangladesh. *International Food Research Journal.* 20(5), 2287-2292.
- Silva, A.T., Wallace, R.J., Ørskov, E.R., 1987. Use of particle-bound microbial enzyme activity to predict the rate and extent of fibre degradation in the rumen. *Br. J. Nutr.* 57, 407-415.
- Singh B., Saho 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.
- Singh, B., Chaudhary, L.C., Agarwal., Kamra, D.N., 2011. Effect of Feeding *Ficus infectoria* Leaves on Rumen Microbial Profile and Nutrient Utilization in Goats. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24(6), 810-817.
- Smit, A.J., 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products. *Journal of applied Psychology.* 16, 254-262.
- Stahlet, D.A., Flesher, B., Mansfield, H.R., Montgomery, L., 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1079-1084.
- Steinberg, P.D.S., Kjelleberg, S., 1997. Chemical defences of seaweeds against microbial colonization, *Biodegradation*, 8, 211-220.
- Stewart, C.S., Bryant, M.P., 1988. The rumen bacteria. In: Hobson PN, editors. *The rumen microbial ecosystem.* Elsevier Science Publisher, New York. Pp 21-75. 527 p.
- Stiger, V., Deslandes, E., Payri C.E., 2004. Phenolic contents of two brown algae, *Turbinaria ornata* and *Sargassum mangarevense* on Tahiti (French Polynesia): interspecific, ontogenic and spatio-temporal variations. *Botanica Marina* 47, 402-409.
- Stuart, E. Denman, C., McSweeney, S., 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *EMS Microbiol. Ecol.* 58, 572-582.
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Benno, Y., 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2766-2774.
- Targett, N.M., Arnold, T.M., 1998. Predicting the effects of brown algal phlorotannins on marine herbivores in tropical and temperate oceans. *J. Phycol.* 34, 195-205.

- Tebbal, A., 2011. Composition chimique et minérale de quatre algues benthiques de la région de Kouali (Tipaza). Mémoire de magister. Ecole nationale supérieure des sciences de la mer et de l'aménagement du littoral.
- Tiret, L., 2001. Physiologie de la digestion. Polycopié, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique de Physiologie et Thérapeutique. 69 p.
- Tymensen, L.D., Beauchemin, K., McAllister, T., 2012. Structures of free-living and protozoa-associated methanogen communities in the bovine rumen differ according to comparative analysis of 16S rRNA and mcrA genes. *Microbiology*.
- Ushida, K., Jouany, J.P., 1994. Fibre digesting capacities of 5 genera of rumen ciliates. *Proc. Nut. Physiol.* 3,168.
- Van Soest P.J., 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Van Soest, P.J., Robertson, J. B., Lewis, B. A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.
- Van Soest, P.J., 1982. *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2nd ed. Cornell University Press, New York, pp. 266, 301.
- Ventura., M.R., Castanon, J.I.R., 1998. The nutritive value of seaweed (*Ulva lactuca*) for goats., *Small Ruminant Res.*, 29, 325-327.
- Verité , R., Michalet-Doreau, B., Chapoutot, P., Peyraud, J.L., Poncet, C., 1987. Révision du système des protéines digestibles dans l'intestin (P.D.I.). *Bull. Techn. C.R.Z.V. Theix, INRA*, 70, 19-34.
- Vérité, R., Demarquilly, C., 1978. Qualités des matières azotées des aliments pour ruminants. In: *La Vache Laitière*, INRA, Versailles, France, pp. 143-147.
- Vitti, D.M., Abdaalla, S.S., Bueno, A.L., Silva Filho, I.C.S., Costa, J.C., Bueno, C. M.S., 2005. Do all tannins have similar nutritional effects. A comparison of three Brazilian fodder legumes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119, 345-361.
- Vossenber, J., Joblin, K.N., 2003. Biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids to stearic acid by a strain of *Butyrivibrio hungatei* from the bovine rumen. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 424–428.
- Waghorn, G.C., Shelton, I., McNabb, W., McCutchen S., 1994. Effects of condensed tannins in lotus *Pedunculatus* on its nutritive value for sheep. *J. Agric. Res.* 123, 109-119.
- Wallace, R.J., Broderick, G.A., Brammall, M.L., 1987. Protein degradation by rumen microorganisms from sheep fed dietary supplementation of urea, casein or albumin. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:751.
- Wallace, R. J., Wallace, S.J.A., McKain, N., Nsereko, V.L., Hartnell, G.F., 2001., Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms in vitro. *J. Anim. Sci.* 79, 1905–1916.

- Wallace, R., 1986. Ecology of Rumen Microorganisms : Protein Use. In: Dobson A, Dobson MJ (eds). Aspect of digestive physiology of ruminants. Ithaca, New York (USA): Comstock Publishing Associates. pp 99-116.
- Wallace, R.J., 1985. Synergism between different species of proteolytic rumen bacteria. *Curr. Microbiol.* 12, 6-59.
- Wang, Y., Trevor, Alexander, W., Tim, A., McAllister., 2009: *in vitro* effects of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on rumen bacterial populations and fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 89, 2252–2260.
- Wang, Y., Xu, Z., Bach, S.J., McAllister, T.A., 2008: Effects of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on in vitro ruminal digestion of mixed forage or barley grain. *Animal Feed Science and Technology.* 145, 375–395.
- Waterman, P.G., Mole, S., 1994. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. In: *Methods in Ecology.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Weatherburn, M.W., 1967. Phenol hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem.* 39, 971–974.
- Weimer, P.J., Waghorn, G.C., Odt CL, Mertens, D.R., 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating cows. *J. Dairy. Sci.* 82, 122-134.
- Whitford, M.F., Teather, R.M., Forster, R.J., 2001. Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiol.* 1,5.
- Williams, A.G., Coleman, G.S., 2003. The Rumen Protozoa. In: Hobson PN, Ed. *The rumen microbial ecosystem,* Elsevier Science Publishing, New York, 77-111. 527p .
- Williams, A.G., Coleman, G.S., 1997. The rumen protozoa. In : Hobson P.N., Stewart C.S. *The rumen microbial ecosystem.* Second edition, Chapman et Hall, London, 73-139.
- Wolin, M.J., 1975. Interaction between the bacterial species in the rumen. In: *Digestion and metabolism in the Ruminant.* Mc Donald J.W. and Warner A.C.I.(Eds.). pp, 134-148.
- Wolin, M.J., C.S., Stewart, S.C., and Miller, T.L., 1997. pp. 467–491. In : Hobson, P.N. and Stewart C.S. (eds) *The Rumen Microbial Ecosystem,* Chapman & Hall, London.
- Wolin, M.J., Stewart, C.S., Miller, T.L., 1997. pp. 467–491. In : Hobson, P.N. and Stewart Wong, K.H., Cheung, P.C.K., 2000. Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds Part I proximate composition, amino acid profiles and some physico-chemical properties. *Food Chem.* 71, 475- 482.
- Wong. Y., Alexander, T.W., McAllister, T.A., 2009. *In vitro* effects of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on rumen bacterial populations and fermentation. *Journal of the science of food agriculture.* 89, 2252-2260.
- Wozny, M.A., Bryant, M.P., Holdeman, L.V., Moore, W.E.C., 1977. Urease assay and urease producing species of anaerobes in the bovine rumen and human feces. *Appl. Environ. Microb.* 33, 1097-1104.

-Wright, A.D.G., Ma,X., Obispo,N.E., 2008. Methanobrevibacter phylotypes are the dominant methanogens in sheep from Venezuela. *Microb. Ecol.* 56,390–394.

-Yaich, H., Garna,H., Besbes,S., Paquot, M., Blecker, C. and Attia, H., 2011. Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chem.*128, 895-901.

-Yang, W., Beauchemin, Z., Rode, L.M., 1999. Effects of enzyme feed additives on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:391–403.

-Zeng, L.M., Chao-Jie,W., Jing-Yu, S., Du, L., Noel, O., Yang, L., Nan,L., Qi-Tai,Z., 2001. Flavonoids from the red alga *Acanthophora spicifera*. *Chinese J. Chem.* 19, 1097-1100.

-Zhu, J., Filippich, L.J., Alsalami,M.T., 1992. Tannic acid intoxication in sheep and mice. *Res. Vet. Sci.* 53,280-292.

Zitnan, R., Sommer, A., Gallo, J., Lauková, A., Bomba, A., Venglovský, J., 1994. Volatile fatty acid concentrations, enzyme activities and microflora in the rumen contents of heifers during transition to pasture. *Arch. Anim. Nutr.* 46, 51–60.

Zitnan, R., Voigt, J., Schonhusen, S., Wegner, J., Kokardova, M., Hagemeister, H., Levkut, M., Kuhla, S., Sommer, A., 1998. Influence of dietary concentrate to forage ratio on the development of rumen mucosa in calves. *Arch. Anim. Nutr.* 51, 279-291.

Sites internet

N°1: Figure 8: Vue générale du métabolisme protéique chez la vache laitière. <http://babcock.wisc.edu/node/144> (15/05/2012).

N° 2: FAO, 2010. www.FAO.org/docREP/013/i1820e.01.

ANNEXES

Annexe 1

➤ Composition des solutions utilisées pour l'estimation des fractions pariétales

1. Solution NDS (Neutral Detergent Solution)

Solution 1

- Peser 300 g de Lauryl Sulfate de Sodium dans un ballon de 10 L
- Ajouter 5L d'eau distillée
- Ajouter 100 ml d'éther monoéthylique de l'éthylène glycol (C₄H₁₀O₂)

Solution 2

- Peser 68.1 g de di-Sodium tétraborate décahydraté (Na₂B₄O₇·10H₂O) dans un bécher de 2L.
- Ajouter 186.1 g de Kestranal 2S (C₁₀H₁₄N₂O₈·2H₂O, disodium éthylène diamine tétraacétate ou EDTA).

Solution 3

- Peser 45.6 g de di-sodium hydrogénophosphate anhydre (Na₂HPO₄) dans un bécher de 2L
- Ajouter de l'eau distillée chaude et agiter jusqu'à l'obtention d'une solution transparente
- Mélanger les solutions 2 et 3 à la solution 1, agiter et porter au trait le lendemain avec de l'eau distillée. Le pH de la solution doit être compris entre 6.9 et 7.1.

2. Solution ADS (Acid Detergent Solution)

- Remplir une fiole de 5L d'eau distillée
- Peser 490.4 g de H₂SO₄ concentré à 100%
- Verser la quantité lentement par petites fractions dans une fiole préalablement placée dans un évier rempli d'eau froide (mélanger entre les ajouts avec risque d'échauffement)
- Ajouter 200 g de CTAB (Cetyl Triméthylammonium Bromide)
- Après refroidissement complet, porter au trait avec de l'eau distillée et agiter

Annexe 2

➤ **Mode opératoire de la détermination de la teneur en énergie brute dans un calorimètre**

1. Calibration

La procédure débute par une calibration qui consiste à calciner une quantité précise d'acide benzoïque dont la teneur en énergie brute est connue. Cette opération est réalisée une dizaine de fois avec chaque bombe de combustion. La moyenne obtenue pour chaque bombe est indiquée au contrôleur avant chaque série d'analyses.

2. Mesure

- Peser 0.5 à 1 g d'échantillon (PE) dans une capsule
- Couper une longueur de fil métallique de 10 cm et le peser (PI)
- Dans la bombe introduire 5 ml d'eau distillée
- Placer délicatement le montage dans la bombe et visser le couvercle
- Saturer la bombe en O₂ (pression= 30atm)
- Déposer le sceau dans la chambre du calorimètre
- Placer la bombe dans le sceau, contenant exactement 2 L d'eau désionisée et standardisée à la température de 25°C.
- Raccorder les électrodes à la bombe, fermer ensuite le couvercle de la chambre
- Indiquer au contrôleur le code (A ou B) de la bombe et du sceau
- En lieu et place de la prise d'essai de l'échantillon, indiquer au contrôleur 1g (cal vs cal/g)
- Démarrer ensuite la combustion
- Au signal sonore il faut noter le résultat affiché par le contrôleur (Energie)
- Récupérer les résidus de fil métallique et les peser (PR)
- Récupérer quantitativement le liquide dans un bécher (en rinçant le couvercle et la bombe)
- Ajouter 2 à 3 gouttes d'indicateur et titrer avec la solution Na₂CO₃ (v/ml)

Annexe 3

➤ **Protocol expérimental suivi pour l'extraction de l'ADN en utilisant le Kit (QIAamp DNA Stool Mini Kit)**

1. Dans un bead-beating tube de 2ml, ajouter 300 mg de (Glass beads, acid washed) + 10-15 fines billes de verre.
2. Ajouter 1400 µl de jus de rumen bien homogénéisé
3. Centrifuger les tubes à 13000 rpm pendant 5 min
4. Retirer le surnageant et garder le culot
5. Garder les culots au congélateur
6. Allumer le bain-marie et régler la température à 95°C
7. Ajouter 700 µl de tampon ASL (préalablement chauffé à 95°C, vortexer vigoureusement afin de remettre le tout en suspension
8. Chauffer la suspension 5min à 95°C
9. Passer les tubes au bead-beating pendant 3 min à 6M/s
10. Chauffer la suspension (toujours dans les tubes de bead-beating) 5 min à 75°C
11. Vortexer 15 sec et centrifuger 3 min à 13000rpm
12. Pipeter 600 µl (de chaque bead-beating tube) du surnageant et le transférer dans un nouveau tube Eppendorf (2ml) et jeter le culot
13. Ajouter ½ tablette de inhibitEX à chaque Eppendorf et vortexer 1 Min jusqu'à ce que la tablette soit complètement suspendue. Incuber 1 min à température ambiante.
14. Centrifuger pendant 6 min à 13000 rpm (sans couvercle)
15. Transférer un maximum de surnageant de l'Eppendorf dans un nouveau tube Eppendorf (1.5ml) et écarter les culots. Centrifuger 3 min à 13000 rpm.
16. Dans un nouveau tube, placer 15 µl de protéinase K, puis ajouter 200µl de surnageant.
17. Ajouter 200 µl de tampon AL (préalablement chauffé à 70°C) et vortexer 15 sec
18. Incuber 10 min à 70°C (sur portoir flottant)
19. Ajouter 200 µl d'éthanol 100% et vortexer
20. Placer la colonne QIAamp sur un tube collecteur de 2 ml et appliquer la totalité du lysat au travers de la colonne. Centrifuger 1 min à 13000 rpm (sans couvercle)
21. Remplacer le tube collecteur par un nouveau, ajouter 500 µl de tampon AW1 (ne pas oublier de rajouter de l'éthanol). Centrifuger 1 min à 13000 rpm et éliminer le tube collecteur et le remplacer
22. Ajouter 500 µl de tampon AW2 (ne pas oublier d'ajouter de l'éthanol), centrifuger 3 min à 13000 rpm et éliminer le tube collecteur
23. Placer la colonne dans un tube Eppendorf (1.5ml), ajouter 200 µl de tampon AE. Incuber 1 min 30 sec à température ambiante et centrifuger 1 min à 13000 rpm pour éluer le DNA.
24. Conserver les échantillons d'ADN à -20°C.

RÉSUMÉS

الملخص:

هذا العمل المقدم موجه نحو طريق تقييم جديد في تغذية الحيوانات المجترة لم يتم التطرق إليه مسبقا في الجزائر، هدفه الرئيسي دراسة مركبات غذائية غير تقليدية ومن أصل بحري من حيث عدة جوانب: تحديد تركيب العناصر الغذائية والمركبات الثانوية لطحلب أخضر (*Ulva lactua*) وطحلب بني (*Halopteris scoparia*)، تقييم الإمكانات الغذائية من خلال قياس التخمر المخبري عن طريق جراثيم الكرش البقري، تحديد البروفيل التخمرى للطحلب الأخضر المدمج على حدى، أو في نفس الوقت ممزوجا بنسب مختلفة مع علف مرجعي. كما تم تحديد تركيبة التشكيلة الميكروبية المرافقة بعد عملية التخمر المخبري بواسطة طريقة (PCR) وقت حقيقي وكذلك دراسة النشاط المخصص لإنزيم (CMC ase).

بناء على نتائج التحليل الكيميائي تتميز الطحالب بمحتوى معدني غني يسمح لنا إستخدامها كمكمل لمعالجة النقص في الإحتياجات المعدنية في بعض الظروف الفيسيولوجية وكذلك لضمان النمو السليم لجراثيم الكرش، وبالمثل فهي تتميز بمحتوى ملموس من البروتين الخام. لذلك ينصح بها كمكمل بروتيني في الحصص الفقيرة من البروتين.

تقييم التخمر المخبري للطحالب المدمجة على حدى من قبل جراثيم الكرش يدل على أن الطحلب البني ذات تخمر ضعيف، أما (*Ulva lactuca*) تحللت ولكن بنسبة ضعيفة مقارنة بالعلف (Vesse-avoine) ($P < 0,0001$). أظهرت نتائج الإدماج مع (Vese-avoine) تأثير مؤازر راجع إلى كمية المعادن والبروتينات المحتواة في الطحلب (*Ulva lactuca*). وكذلك فإن إدماج الطحلب يؤثر على الهضم المخبري والتخمر المخبري وذلك من خلال الإنتاج الإجمالي للـ (AGV) وتركيز الامونيا.

التحليل الجزيئية للوفرة النسبية لمختلف المجموعات الميكروبية للكرش بعد 24 ساعة من التخمر ضد 0 ساعة (المرجع) كشفت على تغيرات كبيرة في التشكيلة الميكروبية، حيث ظهر خلا كبيرا بين المجموعات السيليلوزية بما في ذلك البكتيريا السيليلوزية الرئيسية الثلاثة (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*) وبما في ذلك الفطريات اللاهوائية الإجمالية. وقد أظهرت النتائج أن البكتيريا *F. succinogenes* هي الغالبة كليا حيث أنها تمثل بين (84% و 69%) من البكتيريا المدروسة. ومع ذلك يبدو أن التغيرات الكمية الكبيرة في المجموعات الميكروبية المستهدفة مع زيادة نسبة الطحالب تصل إلى عتبة (40%) راجعة إلى ظروف النمو الأمثل السامحة للمجموعات السيليلوزية التطور والنمو، وهذه النتائج مترافقة مع زيادة النشاط السيليلوزي للإنزيم (CMCase).

مما سبق يظهر أن الطحلب الأخضر لديه إمكانات غذائية ملموسة تسمح له بأن يكون مكمل بروتيني ومعدني موسى به. وبالمثل إشتراكه مع علف (vesce-avoine) يسمح بتحسين عملية التخمر من خلال تحسين نمو الميكروبات السيليلوزية.

الكلمات المفتاحية: طحالب، جراثيم الكرش، تخمر مخبري، تقييم غذائي، الهضم، PCR وقت حقيقي، المجموعات السيللوزية.

RÉSUMÉ

Le présent travail s'oriente vers une voie de valorisation jusque-là jamais entreprise en Algérie dans l'alimentation des ruminants. Il a pour objectif principal l'étude de nouveaux substrats alimentaires non conventionnels d'origine marine afin de les incorporer dans les rations alimentaires des ruminants à travers plusieurs aspects: La caractérisation des éléments nutritifs et des métabolites secondaires d'une algue verte *Ulva lactuca* et d'une algue brune *Halopteris scoparia*, l'évaluation de leur potentiel nutritif par la mesure de leur fermentescibilité *in vitro* par le microbiote ruminal de bovins, la détermination du profil fermentaire de l'algue verte incorporée individuellement et simultanément en mixture à différentes proportions avec un fourrage de référence. La caractérisation du profil microbien associé après fermentation *in vitro* par PCR en temps réel et l'étude de l'activité spécifique de l'enzyme carboxyméthylcellulase (CMCase) ont été également établies.

Sur la base de l'analyse chimique, les algues présentent l'avantage d'être riches en minéraux, ainsi, leur utilisation comme supplément peut combler les déficits en besoins minéraux dans certaines conditions physiologiques et assurer une bonne croissance du microbiote ruminal. De même, elles se caractérisent par une teneur appréciable en matières azotées totales, elles sont donc recommandées comme un additif protéique dans les rations pauvres en azote.

L'évaluation de la fermentescibilité *in vitro* des substrats singuliers par le microbiote ruminal démontre que l'algue brune est peu fermentescible. En revanche, *Ulva lactuca* est dégradée mais faiblement comparativement à la vesce-avoine ($P < 0,0001$). L'usage d'*Ulva lactuca* en association avec la vesce-avoine est marqué par un effet synergique dû à l'apport protéique et minéral par l'algue verte. Cependant, l'incorporation de l'algue affecte la digestibilité *in vitro* et la fermentation microbienne en terme d'acides gras volatils et de la concentration en ammoniac.

L'analyse moléculaire de l'abondance relative des différentes populations microbiennes du rumen après 24h de fermentation contre 0h (contrôle), révèle des changements importants dans le profil microbien du rumen. Il ressort un déséquilibre notable parmi les groupements cellulolytiques, notamment, les trois principales bactéries cellulolytiques (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*) et les champignons anaérobies totaux. L'espèce *F.succinogenes* prédomine et représente entre (69 et 84%) des bactéries analysées. Par ailleurs, des fluctuations quantitatives importantes des populations cibles apparaissent avec l'augmentation de la proportion de l'algue jusqu'à un certain seuil (40%). Ceci est dû à une optimisation des conditions de croissance permettant à la population cellulolytique adhérente de se développer et de croître. Ce résultat est corroboré à l'augmentation de l'activité cellulolytique (CMCase).

De ce qui précède, il ressort que l'algue verte (*Ulva lactuca*) présente un potentiel nutritif appréciable qui lui permet d'être préconisée comme supplément protéique et minéral. De même, son association avec un substrat grossier (vesce-avoine) permet l'amélioration de la fermentescibilité par une meilleure prolifération de la flore cellulolytique.

Mots clés: Algues, microbiote ruminal, fermentescibilité *in vitro*, valeur nutritive, digestibilité, PCR en temps réel, groupements cellulolytiques.

ABSTRACT

The current work focuses on the valorization of non conventional vegetal resources in ruminant feeding so far ever undertaken in Algeria. Its main objective is to investigate on new unconventional marine food substrates in ruminant diets through several aspects: characterization of nutrients and secondary metabolites of a green seaweed *Ulva lactuca* and a brown seaweed *Halopteris scoparia*, assessing their nutritional potential by measuring *in vitro* ruminal fermentability by the microbiota of cow, determining the fermentation profile of the green seaweed individually or simultaneously incorporated in different proportions to a reference fodder. The characterization of the associated microbial profile fermented *in vitro* by real time PCR and study of the specific activity of carboxymethylcellulase (CMCase) enzyme were also performed.

According to their chemical composition, seaweeds are rich in minerals and then could be used as a food supplement to compensate the lack of minerals in certain physiological conditions and improve the growth of the ruminal microbiota. Similarly, they are characterized by an important content of crude protein and can therefore be recommended as a protein additive in diets with poor nitrogen content.

The evaluation of the *in vitro* ruminal fermentability of singular substrates by ruminal microbial flora showed that the brown seaweed is not fermentable. However, *Ulva lactuca* were weakly degraded compared to vetch oats ($P < 0.0001$). The use of *Ulva lactuca* in combination with vetch oats is marked by a synergistic effect due to the protein and mineral contents of the green seaweed. However, the incorporation of the green seaweed affects the *in vitro* digestibility and microbial fermentation in terms of volatile fatty acids and ammonia concentration.

Molecular analysis of the relative abundance of different rumen microbial populations after 24hours of fermentation against 0h (control), reveals significant changes in the microbial profile of the rumen. It appears a significant imbalance among cellulolytic groups, including the three major cellulolytic bacteria (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*) and total anaerobic fungi. The species *F.succinogenes* predominates and represents 69 to 84% of the analyzed bacteria. Furthermore, significant quantitative changes in target populations appear with the increase in the proportion of the seaweed up to the threshold of 40%. This is due to the optimization of growth conditions allowing the adherent cellulolytic population to grow and increase. This is corroborated by the increase in cellulase activity (CMCase).

Overall, it appears that the green seaweed *Ulva lactuca* has an appreciable nutritional potential that allows it to be recommended as a protein and mineral supplement. Similarly, its association with a coarse substrate (vetch-oats) improves the fermentability through a better proliferation of cellulolytic flora.

Keywords: seaweed, ruminal microbial flora, *in vitro* fermentability, nutritional value, digestibility, real time PCR, cellulolytic groups.

Université Des Frères Mentouri Constantine -Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Microbiologie	
Nom : ZITOUNI Prénom : Hind	Date de soutenance : 01/07/2015
Titre : Valorisation nutritionnelle d'algues marines du littoral Algérien chez le ruminant via des méthodes chimiques, biologiques et moléculaires	
Résumé	
<p>Le présent travail s'oriente vers une voie de valorisation jusque-là jamais entreprise en Algérie dans l'alimentation des ruminants. Il a pour objectif principal l'étude de nouveaux substrats alimentaires non conventionnels d'origine marine afin de les incorporer dans les rations alimentaires des ruminants à travers plusieurs aspects: La caractérisation des éléments nutritifs et des métabolites secondaires d'une algue verte <i>Ulva lactuca</i> et d'une algue brune <i>Halopteris scoparia</i>, l'évaluation de leur potentiel nutritif par la mesure de leur fermentescibilité <i>in vitro</i> par le microbiote ruminal de bovins, la détermination du profil fermentaire de l'algue verte incorporée individuellement et simultanément en mixture à différentes proportions avec un fourrage de référence. La caractérisation du profil microbien associé après fermentation <i>in vitro</i> par PCR en temps réel et l'étude de l'activité spécifique de l'enzyme carboxymethylcellulase (CMCase) ont été également établies.</p> <p>Sur la base de l'analyse chimique, les algues présentent l'avantage d'être riches en minéraux, ainsi, leur utilisation comme supplément peut combler les déficits en besoins minéraux dans certaines conditions physiologiques et assurer une bonne croissance du microbiote ruminal. De même, elles se caractérisent par une teneur appréciable en matières azotées totales, elles sont donc recommandées comme un additif protéique dans les rations pauvres en azote.</p> <p>L'évaluation de la fermentescibilité <i>in vitro</i> des substrats singuliers par le microbiote ruminal démontre que l'algue brune est peu fermentescible. En revanche, <i>Ulva lactuca</i> est dégradée mais faiblement comparativement à la vesce-avoine ($P < 0,0001$). L'usage d'<i>Ulva lactuca</i> en association avec la vesce-avoine est marqué par un effet synergique dû à l'apport protéique et minéral par l'algue verte. Cependant, l'incorporation de l'algue affecte la digestibilité <i>in vitro</i> et la fermentation microbienne en terme d'acides gras volatils et de la concentration en ammoniac.</p> <p>L'analyse moléculaire de l'abondance relative des différentes populations microbiennes du rumen après 24h de fermentation contre 0h (contrôle), révèle des changements importants dans le profil microbien du rumen. Il ressort un déséquilibre notable parmi les groupements cellulolytiques, notamment, les trois principales bactéries cellulolytiques (<i>Fibrobacter succinogenes</i>, <i>Ruminococcus flavefaciens</i>, <i>Ruminococcus albus</i>) et les champignons anaérobies totaux. L'espèce <i>F.succinogenes</i> prédomine et représente entre (69 et 84%) des bactéries analysées. Par ailleurs, des fluctuations quantitatives importantes des populations cibles apparaissent avec l'augmentation de la proportion de l'algue jusqu'à un certain seuil (40%). Ceci est dû à une optimisation des conditions de croissance permettant à la population cellulolytique adhérente de se développer et de croître. Ce résultat est corroboré à l'augmentation de l'activité cellulolytique (CMCase).</p> <p>De ce qui précède, il ressort que l'algue verte (<i>Ulva lactuca</i>) présente un potentiel nutritif appréciable qui lui permet d'être préconisée comme supplément protéique et minéral. De même, son association avec un substrat grossier (vesce-avoine) permet l'amélioration de la fermentescibilité par une meilleure prolifération de la flore cellulolytique.</p>	
Mots clés : Algues, microbiote ruminal, fermentescibilité <i>in vitro</i> , valeur nutritive, digestibilité, PCR en temps réel, groupements cellulolytiques.	
Laboratoires de recherche	
Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, Université Des Frères Mentouri Constantine Laboratoire de Zootechnie, Faculté Gembloux Agro Bio-Tech, Université de Liège /Belgique	