

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 :

N° de Série :

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat 3ème cycle LMD
Option : Biotechnologies microbiennes, Génomes et Environnement

Préparée par

CHENTLI Amira

Thème

**Valorisation nutritionnelle d'*Opuntia* et *Acacia spp.*
dans l'alimentation des ruminants. Effets de hautes
teneurs en tannins et oxalates sur l'activité du
microbiote ruminal**

Soutenue le 16/06/2015

Devant le Jury :

Présidente :	MERAIHI Z.	Prof. Université des Frères Mentouri Constantine. Algérie
Directeur de thèse :	BOUSSEBOUA H.	Prof. ENSB, Constantine. Algérie
Examineurs :	MECHAKRA A.	Prof. Université des Frères Mentouri Constantine. Algérie
	GHOUL M.	Prof. Université Sétif 1. Algérie
Invitée :	GILLMANN L.	MCA. Université Angers. France

Année Universitaire 2014-2015

Remerciements

Le thème de cette thèse a été proposé par le Pr. BOUSSEBOUA H. Directeur de l'école nationale supérieure de biotechnologie de Constantine. Les travaux de cette thèse ont été réalisés au niveau du laboratoire de Génie microbiologique et Application de l'Université des Frères Mentouri Constantine et au sein du laboratoire S.O.N.A.S IUT, Université d'Angers, France.

Préalablement à la présentation du travail effectué, je tiens à témoigner ma profonde gratitude à mon directeur de thèse, le professeur BOUSSEBOUA H, pour toute la confiance qu'il m'a accordée pour la réalisation de ce travail. Je tiens à le remercier pour sa grande rigueur scientifique, sa disponibilité, son soutien professionnel et sa compétence.

J'adresse également mes vifs remerciements à Mme Gillmann L (Directrice du laboratoire SONAS, IUT, Université Angers, France) pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et supervisé durant les stages que j'ai effectués sous son égide et sa grande bonté, pour tous ses encouragements, mais surtout pour son soutien moral qui m'a poussée à persévérer pour enfin arriver à mes fins tant attendues. Merci pour ses efforts et d'avoir bien accepté d'assister et de juger ce travail.

J'adresse aussi mes vifs remerciements à Mme MERAIHI Z. Professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine pour l'honneur qu'elle me fait en daignant présider ce jury.

Je remercie également Mme MECHAKRA A. Professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine pour l'intérêt apporté à mon travail en ayant accepté de l'examiner.

Je témoigne aussi ma reconnaissance à Mr. GHOUL M. Professeur à l'Université de Setif 1 qui a accepté de se déplacer à Constantine pour examiner mon travail. Je lui exprime mes sentiments les plus respectueux.

Mes vifs remerciements s'adressent à Aniss LIMAMI, (Directeur de l'institut de Recherche en Horticulture et Semences UMR, Angers, France), pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, ce qui m'a permis de réaliser une partie de mes expériences de biologie moléculaire. Une profonde et agréable pensée à Maric LEPAVEN, pour son dévouement et sa gentillesse. Votre générosité et votre simplicité a rendu mon séjour à Angers plus agréable.

Remerciements

Je tiens également à adresser mes remerciements à toute l'équipe de Génie microbiologique et Application de l'université des Frères Mentouri Constantine. Un merci particulier s'adresse à Besma pour sa gentillesse et son amitié. Sans oublier Dr. Bouazza Lyas, pour son aide précieuse durant ma dernière année de thèse.

Un Merci particulier à ma très chère Myou pour m'avoir boosté et m'avoir encouragé, mêmes dans les moments les plus difficiles.

Sans oublier mes superbes amies : Asma, kawtar, Hind, Zineb et Imene pour leur amitié si précieuse et pour tous les instants de délires et de folies qu'on a passé ensemble durant toutes ces années de préparation de thèse.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de cette thèse.

Du fait qu'une thèse ne peut être accomplie ni finalisée que par un 'simple' travail, celle-ci doit toute sa réussite au dévouement, aux sacrifices et encouragements des parents et famille ; MERCI encore et toujours.

Dédicaces

Ma dédicace va à l'endroit de tous ceux qui ont contribué à la réussite de mon travail et qui ont exhorté mon ambition d'aller vers l'avant.

À mon très cher papa à qui je dois la plus étonnante et la plus affectuonnée des dédicaces, mon professeur de toujours.

À la femme la plus affectueuse et la plus douce au monde, l'ange le plus tendre qui a été toujours pour moi une source d'amour, de pitié et d'espoir, ma très chère mère.

À ma tendre grande sœur Mounia et son mari Sofiane.

À mon très cher frère Rebaï.

À mon cher frère Abdeljalil et sa femme Rachida.

À mes petits neveux et nièce adorés.

À tous mes proches et amis et tous ceux qui sont présents dans mon coeur et dont je n'ai pas cité les noms.

Au bonheur de mes deux familles CHENTLI ET DALICHAUCHE.

Ces êtres chers méritent bien de moissonner la récolte qu'ils ont semé.

A tous je dis merci et je dédie le fruit de toutes ces années d'études.

Publications

CHENTLI A., GILLMANN L., BOUAZZA L., MEDJEKAL S., LIMAMI A.M., LE PAVEN M-C. M. & BOUSSEBOUA H. 2014. Effects of secondary compounds from cactus and acacias trees on rumen microbial profile changes performed by real-time PCR. *International Journal of Advanced Research*, **2** (2) : 660-671. www.journalijar.com

CHENTLI A., BOUAZZA., MEDJEKAL S., GILLMANN. L &BOUSSEBOUA.H. 2014. Evaluation de la valeur nutritionnelle des raquettes d'*Opuntia ficus indica* d'une région aride de l'Algérie par la technique de production de gaz. In : Lopez-Francos A.; Bengoumi M; Gabina D. (Eds.), Technology creation and transfer in small ruminants : roles of research, development services and farmerassociation. *Options Méditerranéennes Serie A*, **108** : 155-161. <http://om.ciheam.org/option.php?IDOM=1015>

Communications

CHENTLI A., ZITOUNI H., ARHAB R., Amokrane S.and Bousseboua H. Etude *in vitro* des effets associatifs du cactus avec un substrat conventionnel par l'évaluation de l'activité métabolique ruminale. *17èmes Journées Nationales de Microbiologie, Sétif, le 20 et 21 Novembre 2011.*

ZITOUNI H., **CHENTLI A., ARHAB R., Amokrane S.and Bousseboua H.** Evaluation *in vitro* de la fermentation ruminale d'une Algue verte enteromorpha sp et de sa mixture avec un substrat conventionnel. *17èmes Journées Nationales de Microbiologie, Sétif, le 20 et 21 Novembre 2011.*

AMOKRANE S., ARHAB R., ZITOUNI H., **CHENTLI A.** and BOUSSEBOUA H « 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 microbiologie. Hammamet (Tunisie), 25-27 Novembre 2011.*

CHENTLI A., MEDJEKAL S., GILLMANN L and BOUSSEBOUA H. Nutritional valorisation of a non-conventional feed resource in livestock feeding by *in vitro* assessment of gas production and rumen fermentation. *Les Journées Internationales de Biotechnologie 2012. Mahdia (Tunisie), 19-22 Décembre 2012.*

CHENTLI A., GILLMANN L., BOUAZZA ., MEDJEKAL S., and BOUSSEBOUA H. Evaluation de la contribution d'*Opuntia ficus indica* à la production de méthane par le microbiote ruminal d'ovins en système batch. *Les Journées Internationales de Biotechnologie 2013. Hammamet (Tunisie), 21-24 Décembre 2013.*

BOUAZZA L., BOUFENERA S., **CHENTLI A.**, BODAS R., BOUSSEBOUA H and Lopez S.. 2013. The feeding value of deseeded pods from *Acacia nilotica* and *Albizia julibrissin* as evaluated by chemical analyses and *in vitro* gas production. FAO-CIHEAM Network on sheep and goats sud Network on Production Systems 8th International Seminar Technology creation and transfer in small ruminants: roles of reaserch, development services and farmer associations. Tangier, Marroco, *11 to 13 june 2013*.

CHENTLI A., BOUAZZA. MEDJEKAL S., GILLMANN. L &BOUSSEBOUA.H. 2014. Evaluation de la valeur nutritionnelle des raquettes d'*opuntia ficus indica* d'une région aride de l'Algérie par la technique de production de gaz. FAO-CIHEAM Network on sheep and goats sud Network on Production Systems 8th International Seminar Technology creation and transfer in small ruminants: roles of reaserch, development services and farmer associations. Tangier, Marroco, *11-13 June 2013*.

CHENTLI A., GILLMANN L and BOUSSEBOUA H. Etude de la digestibilité *in vitro* de substrats locaux par la microflore ruminale d'ovins. *II éme Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio- Ressources. Hammamet (Tunisie), 18-20 Mars 2014*.

RIRA M., **CHENTLI A.**, BOUFENNARA S and BOUSSEBOUA H. Effects of plants containing secondary metabolites on ruminal methanogenesis of sheep *in vitro*. The 15th Conference Series of Technologies and Materials for Renewable Energy, Environment and Sustainability (TMREES). Beirut (Lebanon), *15th -20th April 2015*.

Table des matières	i
Liste des figures	iv
Liste des tableaux	v
Liste des abréviations	vi
Introduction générale	1
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Alimentation animale en Algérie	4
1.1. Le secteur de l'élevage en Algérie	4
1.2. Les ressources fourragères en Algérie	4
2. Situation des arbustes fourragers en parcours pastoraux	7
2.1. Caractéristiques nutritionnelles des arbustes fourragers	8
2.2. Caractéristiques anti-nutritionnelles des arbustes fourragers.....	10
2.2.1. Les tannins.....	10
2.2.2. Les oxalates.....	19
3. Dynamique des aliments et du microbiote dans le rumen	21
3.1. Anatomie du rumen.....	21
3.2. L'Ecosystème Rumen.....	22
3.2.1. Paramètres abiotiques.....	25
3.2.2. Le microbiote ruminal.....	26
3.2.3. Facteurs de variation du microbiote ruminal.....	37
3.3. Biotransformation des constituants des aliments dans le rumen.....	40
3.3.1. Les glucides du rumen.....	40
3.3.2. Digestion des glucides.....	44
3.3.3. Le métabolisme azoté.....	47
3.3.4. Le métabolisme lipidique.....	49
3.3.5. La méthanogenèse.....	50
4. Méthodes d'étude de la communauté microbienne du rumen	51
4.1. Choix du gène cible.....	51
4.2. Techniques moléculaires.....	52
4.2.1. La PCR quantitative, en temps réel (qPCR).....	53
4.2.2. Intérêt de la caractérisation moléculaire du microbiote ruminal	54
DEUXIÈME PARTIE : MATÉRIEL ET MÉTHODES	
1. Matériel végétal	56
2. Protocole expérimental	57
2.1. Analyse chimique des substrats.....	57
2.1.1. Détermination de la matière sèche.....	57
2.1.2. Détermination des matières minérale et organique.....	57
2.1.3. Détermination des matières grasses.....	57
2.1.4. Détermination de la matière azotée totale.....	58
2.1.5. Détermination des composés de la paroi végétale	58

2.1.6. Détermination des NFC (NON Fibre Carbohydrates).....	60
2.2. Analyse phytochimique des composés secondaires.....	61
2.2.1. Analyse quantitative des composés phénoliques.....	61
2.2.2. Teneur en oxalates totaux.....	63
2.3. Fermentation <i>in vitro</i> des fourrages par le microbiote ruminal	63
2.3.1. Technique de production de gaz <i>in vitro</i>	63
2.3.2. Etude qualitative et quantitative des gaz produits.....	66
2.3.3. Détermination de la digestibilité apparente.....	67
2.3.4. Mesure de pH et analyse des produits fermentaires	67
2.3.5. Estimation de l'activité spécifique de la carboxyméthylcellulase (CMCase)..	70
2.3.6. Dénombrement des protozoaires digestifs.....	71
2.3.7. Analyse moléculaire des populations microbiennes du rumen.....	72
2.4. Analyse statistique.....	75

TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Analyse chimique des substrats étudiés	76
1.1. Constituants cellulaires.....	76
1.1.1. Teneurs en matière sèche (MS).....	76
1.1.2. Teneurs en matières minérales.....	78
1.1.3. Teneurs en protéines brutes (PB).....	78
1.1.4. Teneurs en matières grasses (MG).....	80
1.1.5. Teneurs en hydrates de carbones non fibreux (NFC).....	81
1.2. Teneurs en composants pariétaux.....	82
1.3. Teneurs en métabolites secondaires.....	85
1.3.1. Teneurs en polyphénols.....	85
1.3.2. Teneurs en oxalates totaux.....	89
2. Aspects nutritionnels et digestibilité	90
2.1. Fermentation <i>in vitro</i> des substrats et de leur mixture par le microbiote ruminal.....	90
2.1.1. Production de gaz <i>in vitro</i>	90
2.1.2. Etude des effets associatifs des mixtures « Arbuste-foin » sur la production de gaz cumulative.....	94
2.1.3. Cinétique de la production de gaz <i>in vitro</i>	100
2.1.4. Ajustement de la cinétique de production de gaz <i>in vitro</i> par le modèle d'Orskov.....	102
2.1.5. Corrélation entre les constituants nutritifs, les métabolites secondaires, la production de gaz.....	104
2.2. Profil fermentaire des substrats et des mixtures.....	107
2.2.1. pH	107
2.2.2. Production d'azote ammoniacal (N-NH ₃).....	107
2.2.3. Production d'acides gras volatiles (AGV).....	110
2.3. Etude de la digestibilité des substrats et de leurs mixtures.....	112
2.3.1. Digestibilité apparente de la matière sèche	112
2.3.2. Estimation de la digestibilité de la matière organique et de l'énergie métabolisable.....	112
2.3.3. Corrélations entre les constituants nutritifs, les métabolites secondaires, et la digestibilité <i>in vitro</i>	117
3. Analyse qualitative et quantitative de la phase gazeuse (production de méthane)	120
4. Corrélations entre composant des substrats, méthanogenèse et profil des AGV.....	126

5. Estimation de l'activité carboxyméthycellulase des substrats et des mixtures.....	129
6. Analyse du profil microbien du rumen	131
6.1. Protozoaires.....	133
6.2. <i>Archaea</i> méthanogènes.....	137
6.3. Champignons anaérobies.....	139
6.4. Bactéries cellulolytiques.....	140
6.5. Effets des populations microbiennes cellulolytiques sur l'activité enzymatique et la fermentation ruminale.....	141
6.6. Effets des hautes teneurs du cactus en oxalates sur le profil microbien du rumen ...	143
Discussion générale.....	145
Conclusion et perspectives.....	156
Références bibliographiques.....	159
Annexes	

Numéro	Intitulé	Page
Figure 1.	Tube digestif des ruminants	22
Figure 2.	Des cellules végétales aux microfibrilles de cellulose (Chambon, 2011)	42
Figure 3.	Résumé des principales voies des fermentations ruminales des polymères glucidiques	44
Figure 4.	Schéma des fermentations des glucides dans le rumen et des voies d'utilisation de l'hydrogène (Morgavi <i>et al.</i> , 2010)	46
Figure 5.	Principe de la qPCR par SYBR Green (A) et par Taqman (B)	54
Figure 6.	Principe de dosage de l'azote ammoniacal (N-NH ₃) selon Weatherburn (1967)	68
Figure 7.	Extraction de l'ADN total microbien	74
Figure 8.	Effets associatifs des mixtures (significatifs à 24h) sur la production de gaz in vitro, à différents temps d'incubations	99
Figure 9.	Cinétique modélisée de la production de gaz des substrats et des mixtures.	101
Figure 10.	Caractérisation qualitative de la production de gaz due à la fermentation des substrats et de leurs mixtures	122
Figure 11.	Relation entre la production du CO ₂ et les Tanins condensés	125
Figure 12.	Relation entre la production de CH ₄ et les Tanins condensés	126
Figure 13.	Relation entre la proportion molaire du propionate et la production de CH ₄	128
Figure 14.	Comparaison des différents groupements majeurs présents au sein de la communauté des protozoaires ruminal chez le bovin entre les différents régimes alimentaires testés	135
Figure 15.	Relation positive entre le nombre de protozoaires total et la production d'N-NH ₃	137

Numéro	Intitulé	Page
Tableau 1.	Evolution du cheptel (milliers de têtes)	4
Tableau 2.	Ressources fourragères en Algérie	5
Tableau 3.	Valeur nutritive de quelques espèces arbustives des zones arides et semi-aride	9
Tableau 4.	Effets des TCs sur la nutrition des petits ruminants en fonction de leur teneur dans la ration. (Brunet, 2008)	15
Tableau 5.	Substrats et produits des principales espèces bactériennes du rumen.	26
Tableau 6.	Principales équations stoechiométriques simplifiées des fermentations dans le rumen	45
Tableau 7.	Préparation de la salive artificielle selon Menke et Steingass (1988)	64
Tableau 8.	Composition de la salive artificielle (Menke and Steingass, 1988)	65
Tableau 9.	Séquences des amorces utilisées dans la qPCR.	75
Tableau 10.	Teneur en matière sèche et composition chimique (g/kg MS) des plantes fourragères collectées	77
Tableau 11.	Teneurs facteurs antinutritionnels (g/kg MS) des plantes fourragères collectées	86
Tableau 12.	Production de gaz <i>in vitro</i> (ml/200mgMS) des substrats singuliers et des mélanges	92
Tableau 13.	Effets associatifs entre les plantes contenues dans les mixtures (Différence dans les valeurs observées par rapport aux valeurs théoriques, en pourcentage des valeurs théoriques) sur la production de gaz total <i>in vitro</i> , après 24h de fermentation	95
Tableau 14.	Paramètres cinétiques du modèle exponentiel des substrats singuliers et des mélanges	103
Tableau 15.	Coefficient de Corrélations (r) entre les composants nutritifs, composés secondaires, et production de gaz <i>in vitro</i> des substrats examinés	106
Tableau 16.	Profil fermentaire (pH, concentrations en azote ammoniacal, AGVt et proportions des différents AGV) des substrats et des mixtures	109
Tableau 17.	Coefficient de digestibilité apparente (CD% de MS), digestibilité de la matière organique et énergie métabolisable estimées des substrats et des mixtures	113
Tableau 18.	Coefficient de Corrélations (r) entre les composants nutritifs, composés secondaires et la digestibilité <i>in vitro</i> des substrats examinés.	118
Tableau 19.	Coefficient de Corrélations (r) entre les paramètres de digestibilité et la production de gaz <i>in vitro</i> des substrats examinés	119
Tableau 20.	Analyse qualitative du pool gazeux des substrats et des mixtures (ml/200mg MS) après 24h de fermentation	121
Tableau 21.	Coefficient de Corrélations (r) entre les composants chimiques, méthanogenèse et le profil des acides gras volatils des substrats examinés	128
Tableau 22.	Activité spécifique de la carboxyméthylcellulase (CMCase) des substrats singuliers et des mixtures, après 24h de fermentation	130
Tableau 23.	Effets des substrats et des mélanges sur le profil microbien du rumen, déterminés par la PCR en temps réel et la quantification des protozoaires du rumen par comptage direct, après 24 h contre 0h (contrôle) d'incubation	132
Tableau 24.	Coefficient de Corrélations (r) et le niveau de signification (p) entre le nombre total en protozoaires totaux, le profil des acides gras volatils des substrats examinés	137

a :	Production de gaz à partir de la fraction soluble.
ADF :	Acid Detergent Fiber
ADL :	Acid Detergent Lignin
ADN	Acide Désoxyribonucleique
AGV :	Acides gras Volatils
AO	Acide oxalique
ARN	Acide ribonucléique
b :	Production de gaz à partir de la fraction insoluble
BSA	Sérum albumine bovine
c :	Vitesse de dégradation du substrat
C₂ :	Acide acétique
C₂/ C₃ :	Ratio acétate/propionate
C₃ :	Acide propionique
C₄ :	Acide butyrique
Ca	Calcium
CDA%	Coefficient de Digestibilité apparent en pourcentage
CH₄ :	Méthane
CMC :	Carboxyméthyl Cellulose
CMCase :	Carboxyméthylcellulase
CO₂ :	Dioxyde de carbone
CT	Threshold cycle
DMO :	Digestibilité de la matière organique
DMS :	Digestibilité apparente de la matière sèche <i>in vitro</i>
DNS	Acide Dinitrosalicylique
EM :	Energie métabolisable
GT :	Gaz total
GV :	la production net de gaz total en ml /200mg de MS de substrat après 24h d'incubation.
MFS:	Methyl green-Formalin-Saline
MG :	Matière grasse
MM :	Matière minérale
MO :	Matière organique
MS :	Matière sèche
MSP :	Métabolites Secondaires des plantes supérieures
N	Azote
NDF :	Neutral Detergent Fiber
NFC :	Non Fiber Carbohydrates
N-NH₃ :	Ammoniaque
OXT :	Oxalates totaux
PB :	Protéines brutes
PGT :	Production de gaz total
PT :	Phénols Totaux
PVPP :	Polyvinylpyrrolidone
qPCR	PCR en temps réel
TCI :	Tannins Condensés liés
TCL :	Tannins Condensés Libres
TCs :	Tannins Condensés
TCT :	Tannins Condensés Totaux
THT :	Tannins Hydrolysables Totaux
TT :	Tannins Totaux
Y :	Production totale de gaz

INTRODUCTION

Les pays d'Afrique du Nord, de par leur position sous un climat caractérisé par une grande irrégularité spatio-temporelle (faible pluviométrie, amplitudes thermiques, sécheresses persistantes...) sont très vulnérables aux impacts des changements climatiques (Nefzaoui, 1997). La sécheresse est l'un des impacts les plus importants de ces variabilités climatiques, elle constitue également un facteur aggravant à long terme de la désertification. Un phénomène qui se traduit par une diminution du couvert végétal, des potentialités des systèmes écologiques et une détérioration des sols et des ressources hydriques (Nedjraoui and Bédrani, 2008). La steppe algérienne constitue une vaste région qui s'étend sur une superficie de 36 millions d'hectares, dont environ 20 millions d'hectares de parcours (Mohammedi *et al.*, 2006). Ces zones, situées principalement dans la gamme des isohyètes de 100-600 mm, concernent 38% de la population du pays et 48% de son cheptel ovin (Saïdi and Gintzburger, 2013). Ce cheptel contribue à près de la moitié de la production animale du pays (Nefzaoui and El Mourid, 2008). Cependant, actuellement les parcours steppiques sont soumis à un processus de dégradation de plus en plus accentué, du principalement à un phénomène de pression anthropique croissant (Nefzaoui, 2002). Le surpâturage, en particulier lorsqu'il est combiné avec de fréquentes sécheresses, conduit aussi à la diminution des espèces pérennes (Nedjraoui, 2004). Tous ces phénomènes sont exacerbés par les changements dans les systèmes pastoraux (Nefzaoui and El Mourid, 2008). La dégradation croissante des parcours dans les zones steppiques conduit inéluctablement à l'intensification du processus de désertification et au déséquilibre écologique, en particulier à l'érosion de la biodiversité (Nefzaoui and El Mourid, 2008). Cette situation engendre aussi une forte baisse de l'approvisionnement en aliments pour les ruminants, du fait de la faible production locale de la biomasse (Le Houerou, 1992). Ainsi et durant la majeure partie de l'année, l'élevage dans les régions arides, semi-arides et tropicales doit survivre dans une pénurie récurrente de ressources alimentaires à valeur nutritionnelle adéquate (Robles *et al.*, 2008).

L'utilisation d'arbres et d'arbustes fourragers représente un moyen potentiel pour augmenter la qualité et la disponibilité des ressources alimentaires pour le bétail, surtout pendant la saison sèche. Les espèces ligneuses indigènes fournissent du fourrage vert pour les animaux durant des périodes de l'année où l'herbe et les espèces herbacées ont de faibles valeurs nutritives (Aregawi *et al.*, 2008). Les arbustes indigènes ont également un potentiel pour prévenir la désertification atténuant ainsi les effets de la sécheresse et permettant la fixation des sols, l'amélioration de la restauration de la végétation et la récupération des terres de parcours (Robles *et al.*, 2008). Les espèces arbustives ont bénéficié ces dernières années

d'un intérêt accru comme fourrage de bétail et comme espèces de revégétalisation précieuse des terres altérées, en particulier dans les régions arides. Leur potentiel est toujours en cours d'évaluation dans de nombreuses régions de par le monde. Mais la gestion et l'intégration des arbustes fourragers dans l'alimentation des ruminants nécessitent beaucoup plus d'informations que celles déjà disponibles. *Acacia cyanophylla*, *Acacia nilotica* et *Opuntia ficus indica f.inermis* (cactus inerme) sont des plantes présentes dans de vastes zones des régions arides et semi-arides de l'Algérie et elles sont généralement considérées comme de précieux fourrages de réserve et d'alternative en période de sécheresse. Ces espèces sont généralement riches en protéines brutes, en énergie et en minéraux et beaucoup d'entre elles sont très digestibles. Elles sont aussi aisément acceptées par le bétail, et leur relative disponibilité peut couvrir une bonne part des besoins des ruminants pendant une longue période de l'année (Mlambo *et al.*, 2009).

Cependant, la présence de composés secondaires anti-nutritionnels, en particulier les tanins et les oxalates, qui ont des effets potentiellement négatifs sur les fermentations microbiennes du rumen ; sur la digestibilité des aliments et les performances des animaux, pourrait restreindre la valorisation nutritionnelles des composants des espèces arbustives par le microbiote du rumen (Mueller-Harvey, 2006; Kim *et al.*, 2015). En effet, les composés secondaires des plantes dont les composés phénoliques sont les principaux composants actifs (Burt, 2004), exercent des effets antagonistes sur toutes les composantes du microbiote ruminal : bactéries, archées, protozoaires et champignons. Leur action, microbicide ou microstatique résulte essentiellement du potentiel des ces métabolites secondaires à s'incruster dans la membrane cellulaire provoquant ainsi la désintégration des structures et des fonctions membranaires microbiennes (Bodas *et al.*, 2012).

L'objectif principal assigné à ce travail est d'évaluer la valeur nutritive d'arbustes fourragers collectés à partir de parcours de régions arides et semi-arides de notre pays. Dans le cadre de cette démarche, plusieurs volets ont été étudiés :

- La composition chimique et la fermentescibilité *in vitro* de 03 arbustes fourragers communs des zones arides : *Opuntia ficus indica*, *Acacia nilotica* et *A. cyanophylla*. L'étude de ces substrats est menée comparativement à un substrat de référence, le foin de vesce-avoine, usuel en ce domaine. La possibilité d'incorporation de ces plantes arbustives en divers mélanges dans l'alimentation des ruminants est également testée, afin de diluer ou d'éliminer les effets délétères de leurs composés secondaires.

- Dans un second volet, des investigations sur l'influence de la haute teneur en métabolites secondaires de ces plantes sur la réduction de la méthanogenèse ruminale sont réalisées, en vue de réduire les pertes énergétiques et, par ricochet, minimiser les effets néfastes des émanations de méthane sur l'environnement.

- Enfin, et pour tenter de préciser la relation régime alimentaire-variations des écosystèmes microbiens chez les ruminants, les fluctuations quantitatives du consortium microbien du rumen sont également étudiées par une approche de biologie moléculaire, la PCR en temps réel (qPCR). Dans ce cadre, les effets des hautes teneurs en métabolites secondaires de ces plantes sur les changements potentiels induits dans le profil microbien du rumen sont plus spécifiquement visés.

PREMIÈRE PARTIE :
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Alimentation animale en Algérie

1.1. Le secteur de l'élevage en Algérie

En Algérie, la production animale joue un rôle important dans l'économie nationale en pourvoyant en produits d'origine animale la consommation locale et l'exportation (Mayouf and Arbouche, 2014). L'Élevage concerne les ovins, les caprins, les bovins et les camelins. Les effectifs recensés durant les vingt dernières années sont représentés dans le tableau 1. La structure des élevages varie selon les zones agro-écologiques, elle est dominée par l'élevage bovin (72%) dans la zone du Tell littoral, par l'association ovins/bovins dans les zones céréalières et sub-littorales, les ovins en zones steppiques (75%) et les camelins en zones sahariennes (56%). Les besoins alimentaires de ce cheptel sont estimés pour l'année 2001 à 10,5 milliards d'unités fourragères (Adem and Ferrah, 2002).

Tableau 1. Evolution du cheptel (milliers de têtes)

Années	1990	1995	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2010
Bovins	1 393	1 267	1 580	1 595	1 613	1 572	1 561	1 614	1 586	1 650
Ovins	17 697	17 302	17 989	17 616	17 299	17 588	17 503	18 293	18 909	20 000
Caprins	2 472	2 780	3 062	3 027	3 129	3 281	3 325	3 451	3 590	3 800
Camelins	123	126	220	235	246	245	250	273	269	290
Total	21 685	21 475	22 851	22 473	22 287	22 686	22 639	23 631	24 354	25 740

Source : FAO database February 2012 Sources statistiques agricoles

1.2. Les ressources fourragères en Algérie

En Algérie la production des fourrages est marginalisée, tant du point de vue des surfaces qu'elle occupe que dans sa diversité et sa productivité (tableau 2). Ce potentiel fourrager est structuré autour de quatre ensembles d'inégale importance (Adem and Ferrah, 2002). Les terres consacrées à la production fourragère s'étendent sur environ 33 millions d'hectares répartis entre les prairies naturelles (0,1 %), les cultures fourragères (1,6 %, 1 000 UF/ha en moyenne), la jachère (10,6 %, 100 à 250 UF/ha) et les pacages et parcours (87,7 %, 100 UF/ha en moyenne) (Ciheam, 2010; FAO/FIDA, 1993; MADR, 2003).

Tableau 2. Ressources fourragères en Algérie (Ziani, 2002).

Sources fourragères	Superficie (ha)	Productivité (UF/ha)	Observations
Parcours steppiques	15 à 10 millions	100	Plus au moins dégradées
Les forêts	Plus de 3 millions	150	-
Chaumes de céréales	Moins de 3 millions	300	Nécessité d'amélioration de la qualité des chaumes
Jachères pâturées	Moins de 2 millions	250	Nécessité d'orienter la végétation
Fourrages cultivées	Moins de 500 000	1000 à 1200	Orge, avoine, luzerne, trèfle, le sorgho et vesce-avoine
Prairies permanentes	Moins de 300 000	-	Nécessité d'une prise en charge.

L'Algérie disposait en 2001 de 8 milliards d'UF, issues principalement des zones céréalières (52 %) et des parcours steppiques (44 %). Les chaumes et les pailles contribuent pour 37 % dans l'offre fourragère globale. Ces données témoignent, du caractère extensif de la production fourragère en Algérie (Adem and Ferrah, 2002). Il est attesté par une prépondérance de la vesce avoine utilisée majoritairement comme foin dans l'alimentation du bétail.

Les fourrages cultivés sont essentiellement constitués par les fourrages secs (2/3 environ des surfaces fourragères). Tandis que la part des fourrages verts est faible (1/3), elle est constituée surtout de céréales. Les légumineuses occupent uniquement 4,5% de la surface fourragère en vert. La consommation des fourrages cultivés en vert fournit 43 millions d'unités fourragères lait (UFL), alors que leur consommation en sec fournit 577 millions d'UFL pour des brebis (à l'entretien allaitant un agneau par an) (Nedjraoui, 2002).

Les fourrages naturels sont constitués par de la jachère pâturée (90%), alors que les prairies naturelles occupent une surface faible (10%) et sont situées surtout dans l'Est de l'Algérie. Leur apport fourrager est de 1443 d'UFL. Les jachères fauchées présentant un apport fourrager de 73 millions d'UFL.

En matière de superficie, les fourrages cultivés n'occupent seulement 8,4% de la surface agricole utile. Les fourrages secs représentent 78,1% des fourrages cultivés et la jachère pâturée occupe 76,5% de la surface totale des fourrages naturels.

L'alimentation constitue incontestablement l'une des contraintes majeures à l'essor de l'élevage en Algérie, qui accuse un déficit de production important (viandes et lait). Une analyse de la balance fourragère pour l'année 2001 a permis de mettre en exergue la persistance d'un déficit fourrager estimé à 22 %. Mais cette moyenne recèle 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 pour des taux respectifs de 58 %, 32 % et 29 %. 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 (Adem and Ferrah, 2002). Toutefois les systèmes d'élevage sont mixtes et la part de la production annuelle de chaque type de produit (lait, viande) dépend de la pluviométrie qui conditionne les disponibilités fourragères mais aussi leur qualité (Madani *et al.*, 2004). Par ailleurs, le déficit fourrager reste encore très accentué, malgré les efforts récents dans l'argumentation de la surface irrigués à environ 600 000 ha (Kazi Tani, 2014). Les importations des aliments du bétail par l'Algérie semblaient être un moyen palliatif pour endiguer ce problème mais les prix mondiaux de ces intrants alimentaires ont augmenté au cours de ces dernières années ; les experts de l'aliment du bétail prédisent même des insuffisances pour les exportations du tourteau de soja et du maïs pour les années à venir, en raison de certains effets conjoncturels, entre autre le développement des biocarburants. Les quantités des matières importées, ainsi que les sommes versées par l'Etat ont considérablement augmenté en valeur de 2000 à 2007, passant de 2×10^9 kg en 2000 à 3×10^9 kg en 2007 pour 328 millions de USD en 2000, puis 750,6 millions de USD en 2007 (CNIS 2008 ; Kali *et al.*, 2011).

En vue de développement du secteur agro-alimentaire et la recherche des éleveurs d'un coût alimentaire réduit, le recours à la valorisation de ressources fourragères marginalisées et la recherche de sources alternatives susceptibles de combler ce déficit semblent être l'une des priorités du secteur.

2. Situation des arbustes fourragers en parcours pastoraux

L'amélioration pastorale par l'utilisation d'espèces arbustive représente un avantage certain par rapport à d'autres systèmes agro-zootechniques marginaux; De part le monde, les plantations d'arbustes fourragers constituent indéniablement un élément de stabilité dans l'alimentation des ruminants, grâce à leur grande résistance à l'aridité et à leur capacité à produire de la biomasse sur pied, régulière tout au long de l'année et utilisable dans des conditions marginales (Nefzaoui and Chermiti, 1991; Mulas and Mulas, 2009 ; Khan *et al.*, 2014). Par ailleurs, étant donné les prix élevés des matières premières et des aliments concentrés, les arbustes fourragers représentent une richesse renouvelable et un investissement à moyen et à long terme (Rahim *et al.*, 2013).

La présence d'implantations d'arbustes fourragers permet de laisser au repos le pâturage naturel durant les périodes critiques et d'assurer au bétail un fourrage de maintien. Par conséquent, la fonction des arbustes fourragers n'est pas liée à l'augmentation de la production de lait, de viande ou de laine, durant la saison productive ; ce rôle étant exercé par les espèces herbacées, mais à la production de fourrage vert, riche en protéines, durant la saison sèche, de manière à limiter le déficit alimentaire et la diminution du poids des animaux (Mulas and Mulas, 2009).

Ces espèces peuvent aussi être associées à des cultures céréalières dans les systèmes extensifs. Elles permettent le maintien d'un équilibre écologique, l'amélioration des conditions d'existence de la population des régions arides et elles peuvent également fournir des sous-produits utiles, comme le bois à brûler et favoriser le gibier (Salem *et al.*, 2004). D'autre part, les arbustes assurent une protection permanente du sol en maximalisant les effets antiérosifs, par leurs racines bien développées et en mesure d'utiliser les réserves hydriques profondes ou les pluies éphémères. Elles contribuent ainsi à augmenter la fertilité moyenne du sol occupé. Ces fonctions sont indispensables pour assurer la continuité et l'amélioration de la production agricole (FAO,1992 ; Mulas and Mulas, 2009).

Les Arbres et les arbustes fourragers constituent une composante importante du régime alimentaire des animaux d'élevage dans les zones arides (25 -200 mm) et semi-arides (200-800 mm) de nombreuses contrées : Afrique, Inde, Australie, Amérique du Sud. Les espèces dominantes sont les *Atriplex*, les *Acacia*, le cactus, le *Prosopis*, l'*Albizia* et l'*Artemisia*, avec beaucoup d'autres espèces ayant une importance locale particulière en tant que sources d'aliments fourragers (Speedy and Pugliese, 1992; Otsyina *et al.*, 1999 ; Shedbalkar *et al.*,

2010). Les espèces du genre *Opuntia*, en particulier *O. ficus-indica*, et du genre *Atriplex*, avec *A. nummularia*, *A. halimus* et *A. canescens*, semblent posséder les caractéristiques d'efficacité contre la désertification, tout en maintenant un niveau productif minimum d'aliments pour le bétail et parfois en permettant des revenus supérieurs aux systèmes fourragers traditionnels (Le Houérou *et al.*, 2000).

Dans les régions de Afrique du Nord et d'Asie Occidentale, on consacre des milliers d'hectares à la culture d'arbustes fourragers associés aux techniques de conservation de l'eau (Boulanouar *et al.*, 2000 ; Nefzaoui *et al.*, 2000; Redjel *et al.*, 2000). Des actions d'envergure avec le concours de diverses organisations internationales ont été entreprises en Algérie, dès les années 90 et ceci en vue d'installer des plantations fourragères arbustives et d'utiliser les cactacées, en zones arides et semi-arides, où la disponibilité et la qualité des fourrages sont souvent limitées en raison de la faible pluviométrie et de la sécheresse (El Mourid *et al.*, 2001; Mayouf and Arbouche, 2014). Toutefois, l'intégration de ces arbustes dans le système d'affouragement courant reste très limitée. Seule une exploitation partielle est opérée durant les fortes sécheresses. La cause essentielle de cette situation est liée, entre autres, à une méconnaissance par les utilisateurs des modes d'exploitation de ces arbustes et de leur valeur nutritionnelle effective.

2.1. Caractéristiques nutritionnelles des arbustes fourragers

Comme toutes les espèces végétales destinées à l'alimentation animale, la quantité d'éléments nutritifs (énergie, protéines, vitamines, minéraux ...) fixés par l'animal dépend de plusieurs facteurs :

- La composition chimique de l'arbuste, elle-même influencée par l'espèce, le stade de développement, les conditions agronomiques et le climat;
- La digestibilité qui dépend directement de la nature chimique de l'arbuste, de la quantité ingérée et de la ration complémentaire;
- L'utilisation métabolique des éléments digérés qui est surtout fonction de l'animal et de son stade physiologique (Nefzaoui and Chermiti, 1991; Aufrere *et al.*, 2012).

La valeur nutritive de tout fourrage en général, et des arbustes en particulier dépend essentiellement de leur teneur en matières azotées totales, en fibres et en minéraux (Otsyina *et al.*, 1999). Durant la saison sèche, les feuilles et fruits arbustifs sont souvent plus riches en protéines, en minéraux et en NDF que les plantes herbacées disponibles. Ils fournissent des compléments importants pour les ruminants durant cette période de l'année (Oppong *et al.*,

2008). Cependant, ils contiennent généralement moins d'ADF, leurs parois cellulaires sont plus fortement lignifiées et ils sont souvent de plus faible digestibilité que les espèces herbacées (Le Houérou, 1980; D'Mello and Devendra). Il existe également des différences entre les espèces dans la lignification de la paroi cellulaire. Comparées aux graminées, les concentrations en éléments nutritifs et la digestibilité des arbres/arbustes fourragers diminuent légèrement au cours de la saison de croissance. Par ailleurs, le début de la saison de croissance des espèces ligneuses se produit à la fin de la saison de dormance des graminées (Bergström, 1992), fournissant ainsi un supplément précoce au pâturage. La valeur nutritive de quelques espèces arbustives des zones arides et semi arides est présentée dans le tableau 3. Lorsque la teneur en macro-éléments des arbustes fourragers est comparée avec les besoins recommandés pour les ruminants, le calcium et le magnésium sont généralement en excès et la teneur en phosphore souvent marginale (<1,2 g / kg MS) et à l'exception des halophytes (*Atriplex spp.*), le sodium est souvent faible (<0,8 g / kg MS). Il existe très peu de données sur les concentrations en éléments traces mais les arbustes fourragers semblent contenir des proportions adéquates en oligo-éléments (Cu, Co, Mn, Zn). Les déficits en macro et micro-éléments sont peu susceptibles d'impacter spécifiquement la consommation d'arbres/arbustes fourragers car ces derniers constituent seulement une faible proportion de la ration (Otsyina *et al.*, 1999).

Tableau 3. Valeur nutritive de quelques espèces arbustives des zones aride et semi-aride

Espèces	Partie de la plante	PB (g/Kg MS)	FB (g/Kg MS)	Digestibilité <i>In vivo</i> MS (g/Kg MS)
<i>Acacia</i>				
<i>A. Aneura</i>	Phyllode	92-203	238-366	0,44-0,63
<i>A. cyanophylla</i>	Feuille	112-212	192-241	0,51-0,53
<i>A. nilotica</i>	Feuille	112-167	104 ±29	0,69 ±0,05
<i>A. Senegal</i>	Nacelle	111-204	112-292	-
<i>Atriplex</i>				
<i>A. halimus</i>	Feuille	187,7	118,9	0,7-0,85
<i>A. nummularia</i>	Feuille	204,0	105,8	-
<i>Opuntia ficus indica</i>	Raquette	31,1-61,8	94,0 -109,8	0,5-0,7
<i>Albizia lebbek</i>	Feuille	181-240	265-377	0,43-0,64
<i>Leucaena leucocephala</i>	Feuille	203-268	183	0,51-0,68

Sources: (Le Houérou, 1980; Nefzaoui and Chermiti, 1991; Speedy and Pugliese, 1992; Carter, 1994; D'Mello and Devendra, 1995). PB : protéines brutes, FB :fibres brutes, MS :matière sèche

La composition chimique des arbustes varie considérablement au cours de l'année. Les teneurs en matières minérales des *Atriplex* sont maximales durant la saison estivale et minimale en hiver et au printemps. Le cactus inerme voit sa composition chimique varier selon l'âge de la raquette. C'est ainsi que la teneur en MAT, bien qu'étant faible pour les jeunes raquettes, l'est d'avantage pour celles de 2 et 3 ans. Parallèlement, la teneur en MS augmente sensiblement avec l'âge de la raquette. La teneur en protéines brutes, toujours faible et oscillant autour de 10% de la MS, varie très peu selon l'âge. Il est évident que ces changements se traduisent par des variations considérables de la valeur nutritionnelle des arbustes. De plus, les époques d'exploitation qu'autorise la biologie du végétal ne correspondent pas toujours aux périodes où la valeur nutritive est maximale (Nefzaoui and Chermiti, 1991).

2.2. Caractéristiques anti-nutritionnelles des arbustes fourragers

La plupart des plantes arbustives contiennent des métabolites secondaires (terpènes, alcaloïdes, oxalates, saponines, tannins), ceux-ci peuvent réduire la valeur alimentaire de ces ressources fourragères et pourraient aussi affecter directement la santé des animaux (Paterson *et al.*, 1998 ; Salem *et al.*, 2004 ; Khan *et al.*, 2014).

Dans cette section nous allons uniquement nous intéresser aux tanins et aux oxalates, principaux composés secondaires présents dans les plantes étudiées dans ce travail.

2.2.1. Les tannins

➤ Définition et Généralités

Le terme " tanin " (ou tannin) qualifie toute substance d'origine végétale ou minérale ayant la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible, comme c'est le cas du cuir. Cette propriété est liée à la création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène de la peau (Bruneton, 2009). D'un point de vue biochimique, les tannins sont définis comme des substances phénoliques hydrosolubles, de masse moléculaire allant jusqu'à 20 000 Da (Hagerman, 2002). Ils ont la propriété de former des complexes réversibles ou irréversibles avec les protéines (principalement), les polysaccharides (cellulose, hémicellulose et pectine), les acides nucléiques, les stéroïdes, alcaloïdes, et les saponines (Haslam, 1989 ; ChaichiSemsari *et al.*, 2011). Les tannins font partie des métabolites secondaires des plantes supérieures (MSP). A la différence des métabolites primaires

intervenant directement dans la nutrition et la croissance (acides aminés et nucléiques, lipides et sucres), les MSP participent à la vie de relation de la plante. La synthèse des tanins est ainsi un des mécanismes de défense contre les agressions des germes phytopathogènes (bactéries, champignons, virus) et des organismes prédateurs (insectes, mammifères herbivores) (Hagerman and Butler, 1981 ; Hassanpour *et al.*, 2011).

➤ **Classification biochimique des tannins**

Selon leur structure, ils sont généralement classés en deux groupes : les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Athanasiadou *et al.*, 2001; Hassanpour *et al.*, 2011). Quelque soit leur groupe, THs ou TCs, la structure biochimique des tannins comprend au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupements phénoliques.

- **Les tannins hydrolysables (THs)** : Ce sont des oligo- ou poly-esters d'un sucre, en général le glucose, et de molécules d'acide-phénol (Mueller-Harvey, 2006). Selon la nature de l'acide-phénol, ils sont subdivisés en gallotannins qui ont un acide gallique, ou en ellagitannins présentant un acide hexahydroxyphénique (Min and Hart, 2003). Les THs sont en général présents en plus faible concentration que les TCs dans les plantes. Ils sont hydrolysés par les enzymes (tanninase) qui interviennent dans l'hydrolyse de la liaison ester (Hassanpour *et al.*, 2011a). Ils sont notamment hydrolysés dans le tractus digestif des ruminants et leurs produits de dégradation peuvent être absorbés. Ils peuvent alors provoquer des intoxications graves, lors d'ingestion trop massive en générant des lésions hépatiques et rénales (Zhu *et al.*, 1992; Plumlee *et al.*, 1998).

- **Les tanins condensés (TCs) ou proanthocyanes** : Ce sont des polyphénols de la famille des flavonoïdes, leur structure chimique repose sur un système d'hétérocycles (Mueller-Harvey, 2006; Manolaraki, 2011). Ils ont en général un poids moléculaire plus élevé que les THs (Caygill *et al.*, 1999). Ce sont des oligomères (2-10 monomères) ou des polymères (>10 monomères) de flavonoïdes (flavan-3-ols), reliés majoritairement par des liaisons de type Carbone-Carbone insensibles à la dégradation enzymatique en anaérobie (Waghorn, 2008). Différentes combinaisons des groupes OH et H des unités de monomères conduisent à différentes classes de polymères : ProCyanidines (PC) et ProDelphynidines (PD). Ces derniers se différencient par un groupement OH supplémentaire en position R3 et ont en conséquence une capacité accrue de fixation aux

protéines (Aufrere *et al.*, 2012). Les TCs sont les types de tannins les plus présents dans les légumineuses, arbustes et tiges fourragers. (Barry and McNabb, 1999).

➤ **Activité biologique des tannins**

Les tannins se fixent à la quasi-totalité des protéines formant ainsi des complexes insolubles dans des conditions de pH physiologique (pH = 7 à 7,4) (Zimmer and Cordesse, 1996). L'activité biologique, ou astringence, représente la capacité des TCs à se lier aux protéines. Chez le ruminant, les TCs d'un fourrage vont se lier avec la rubisco, principale protéine des fourrages verts ou avec des protéines de la salive, des protéines microbiennes, des enzymes et des protéines endogènes (Aufrere *et al.*, 2012). Néanmoins, la formation du complexe tannins-protéines est spécifique et le degré d'affinité entre les deux types de molécules impliquées, réside dans leurs caractéristiques chimiques (Poncet-Legrand *et al.*, 2006; Theodoridou, 2010).

Les tannins à PM trop important, avec un encombrement stérique associé, ne peuvent se fixer aux protéines (Mueller-Harvey and McAllan, 1992 ; Jean-Blain, 1998). La nature chimique (composition) des tannins influence également leur liaison aux protéines (Bennick, 2002). Les protéines qui montrent une forte affinité pour les tannins sont hydrophobiques, de PM supérieur à 20kDa, elles ont une conformation ouverte, flexible et sont riches en proline (Mueller Harvey and McAllan, 1992; Frutos *et al.*, 2004). Enfin, la formation des complexes tannins-protéines dépend aussi étroitement des conditions environnementales, tels : le pH, la température, la force ionique ou la présence de molécules compétitrices. La précipitation des protéines est notamment favorisée par un environnement proche de leur pH isoélectrique (Mueller Harvey and McAllan, 1992; Zimmer and Cordesse, 1996). L'une des conséquences directes de la capacité des tannins à complexer les protéines est l'inactivation des enzymes, soit directement par fixation aux sites actifs, soit indirectement par l'encombrement stérique créé par la fixation des molécules de tannins sur l'enzyme ou par interférence avec le substrat potentiel de nature protéique (Zimmer and Cordesse, 1996).

➤ **Sources de tannins, localisation, rôle et variation de la teneur dans la plante**

Les tanins sont présents de manière extrêmement courante dans le règne végétal, en particulier dans les arbres, les arbustes et les plantes légumineuses herbacées (Perevolotsky, 1994), les TCs étant en général plus répandus et plus abondants dans ces végétaux que les THs. En effet et à la différence de ces derniers, les TCs se rencontrent non seulement chez les

Angiospermes (et plus communément chez les Dicotylédones) mais également chez les Gymnospermes. Parmi les légumineuse riches en TCs, on retrouve le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), le sulla (*Hedysarium coronarium*) et les lotiers pédonculés et corniculés (*Lotus pedunculatus* et *L. corniculatus*) (Waghorn, 2008). Certaines espèces du genre *Acacia* (e.g. *saligna*, *mearnsii*, *decurrens*, *dealbata*, *pyonantha*) contiennent aussi de fortes teneurs en TCs (Athanasiadou *et al.*, 2001; Waghorn, 2008; Max, 2010; Hassanpour *et al.*, 2011; Sadaghian *et al.*, 2011).

Chez les végétaux, bien que tous les organes puissent contenir des tannins, leur localisation diffère selon l'organe en question. Ainsi, les plus fortes concentrations sont mesurées en général dans les fruits, les fleurs, les feuilles et dérisoirement dans les tiges. Au niveau cellulaire, les THs sont majoritairement présents dans les parois et les espaces intracellulaires, alors que les TCs sont surtout stockés sous forme libre dans les vacuoles (70-80%) et, en proportion variable, sous forme liée aux fibres (lignine) des parois ou aux protéines cellulaires (Terrill *et al.*, 1992; Frutos *et al.*, 2002).

La teneur et la nature des tanins d'une plante vont également varier en fonction de l'espèce, de la variété et du stade végétal (en général lors de la maturation des feuilles et du mûrissement des fruits, la teneur en tanins diminue et le degré de polymérisation augmente), ainsi que des conditions environnementales (la synthèse est généralement augmentée au niveau de la zone menacée en réponse à n'importe quel stress : hydrique, de prédation...).

Dans les zones tempérées, ce sont principalement les tannins des tiges et des feuilles qui jouent un rôle dans la nutrition du ruminant. Etant des métabolites secondaires, ils ne participent pas directement au développement de la plante. Ils ont un rôle de protection contre les rayons ultra-violet et la sécheresse. Leur rôle écologique est de protéger les plantes contre les organismes phytopathogènes (bactéries, champignons, nématodes) (Collingborn *et al.*, 2000) ou contre des prédateurs naturels (insectes, herbivores) (Waghorn, 2008). Mais ils semblent assez inefficaces dans ce rôle, puisque les chèvres et les moutons sélectionnent de préférence les feuilles plus riches en TCs que les tiges (Aufreere *et al.*, 2012).

➤ Effets des tannins sur les ruminants

La consommation de plantes riches en tannins induit des effets contradictoires chez les ruminants. Il importe de distinguer les effets produits par les THs de ceux dus aux TCs mais aussi de prendre en compte les variations liées aux concentrations des tannins présents dans la

ration des herbivores. Les THs peuvent être responsables d'intoxications sévères, voire mortelles. A l'inverse, les TCs sont en général considérés comme étant moins toxiques, rarement responsables de cas létaux, en particulier chez les ruminants.

- **Effets des tanins hydrolysables :** Les intoxications sévères de diverses espèces animales, après ingestion excessive de plantes riches en THs, sont attribuées surtout à la présence de gallotannins (Makkar, 2003). Chez les ruminants, les THs hydrolysés par des bactéries ruminales provoquent la libération d'acides galliques qui sont ensuite décarboxylés en pyrogallol, convertis ensuite en résorcinol (Singh *et al.*, 2001; Min *et al.*, 2003). Ces produits de dégradation sont ensuite rapidement absorbés et passent dans la circulation sanguine. Or ces métabolites, en plus d'être à l'origine d'ulcérations et de nécroses de l'épithélium digestif, sont hépato- et néphro-toxiques et peuvent être ainsi responsables d'intoxications sévères allant parfois jusqu'à la mort des animaux ingérant des quantités massives de plantes riches en tannins (Mueller-Harvey, 2006). Toutefois, il a été montré que la toxicité des THs dépend de la qualité (structure chimique, PM) et de la quantité des THs ingérés (Zhu *et al.*, 1992; Frutos *et al.*, 2004).

- **Effets des tanins condensés :** Le concept « la dose fait le poison », communément utilisée en toxicologie (Robin, 2011), s'applique également aux TCs, puisqu'un apport faible à modéré produit des effets positifs alors que leur ingestion massive aboutit à des effets néfastes sur les paramètres zootechniques, la physiologie digestive et la santé des animaux. À la différence des THs, les TCs sont toutefois rarement associés à une toxicité aiguë chez les ruminants. Il est courant de distinguer différents types de conséquences en fonction de la teneur en TCs (Ramirez-Restrepo and Barry, 2005; Avijit and Narayan, 2014) (voir tableau 4).

➤ **Effets bénéfiques des tannins condensés**

- **Effets sur l'ingestion et la digestion des aliments :** La consommation d'aliments contenant des TCs en quantité faible à modérée (<4 à 5% de la MS) par les ruminants est peu modifiée (Terrill *et al.*, 1992) et provoque par ailleurs des effets plutôt favorables sur les processus physiologiques post-ingestifs.

Au pH ruminal (6-7), les complexes insolubles TCs/protéines végétales sont stables, ce qui protège ces dernières des fermentations bactériennes (Mueller-Harvey, 2006). L'une des premières conséquences de ces phénomènes est de limiter la production et l'excrétion de

méthane et d'ammoniaque (Hess *et al.*, 2006; Animut *et al.*, 2008). Leur dissociation ultérieure induit par le pH acide de la caillette permet ainsi une absorption et une digestion plus élevée d'acides aminés au niveau de l'intestin grêle : c'est le phénomène d'échappement ou by-pass ruminal (Makkar, 2003; Saminathan *et al.*, 2014).

Tableau 4. Effets des TCs sur la nutrition des petits ruminants en fonction de leur teneur dans la ration (Brunet, 2008).

Teneur en TC (% MS)	Conséquences	Effets observés
< 2	Nulles ou faibles	Aucun effet sur l'ingestion volontaire
3-6	Bénéfiques	<ul style="list-style-type: none"> ↗ absorption nutriments ↗ taux ovulation ↗ production et qualité du lait ↗ production laine ↗ taux de croissance et gain de poids
> 7	Néfastes	<ul style="list-style-type: none"> ↘ niveau d'ingestion ↘ absorption nutriments ↘ production lait ↘ production laine ↘ taux de croissance et gain de poids

En revanche, consommés en excès les TCs peuvent réduire l'activité enzymatique du microbiote ruminale et interagir avec les protéines membranaires des cellules intestinales, entraînant ainsi une perturbation de la physiologie digestive. De ce fait, les équilibres de complexation-dissociation des TCs avec les protéines conditionnent largement leurs effets bénéfiques ou néfastes sur la physiologie digestive.

- **Effets sur la méthanogenèse :** L'ingestion de plantes fourragères riches en tannins par les ruminants conduit à une diminution de la production de méthane (Waghorn, 2008). L'activité anti-méthanogène des tannins extraits de différentes plantes a été largement démontré dans des études *in vitro* et *in vivo* (Hess *et al.*, 2006; Goel and Makkar, 2012). Néanmoins, cet effet dépend de la dose, du type et de la source des tannins, ainsi que du type de régimes alimentaires ingéré (Patra and Saxena, 2010; Pellikaan *et al.*, 2011). A titre d'exemple, les extraits de Quebracho (avec des doses de 5 et 25% des substrats) ont diminué linéairement, de 13 et 54% respectivement, la production de méthane (Bhatta *et al.*,

2009). Cependant, quelques études ont montré que de faibles doses de tannins n'ont aucun effet sur la diminution de la production de méthane (Śliwiński *et al.*, 2002). Ainsi l'utilisation de la dose adéquate de tannins est très importante ; une diminution significative de la méthanogénèse peut ne pas être associée à une réduction significative de la digestibilité et de la concentration en acides gras volatiles (Carulla *et al.*, 2005; Hariadi and Santoso, 2010).

L'activité anti-méthanogène des tannins peut s'expliquer par un effet direct sur l'activité des *Archae* méthanogènes, probablement due aux tannins-protéines/enzymes microbiens, et/ou à un effet indirect en diminuant la digestion des parois végétales. Les tannins peuvent également affecter indirectement les *Archéa* méthanogènes associées aux protozoaires, en inhibant ces derniers (Tavendale *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2011).

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

- Effets sur l'amélioration des productions : La consommation de plantes contenant des TCs en quantité modérée influe positivement sur la croissance d'agneaux (Rochfort *et al.*, 2008) ou de veaux (Moore *et al.*, 2003). L'ingestion à faible niveau de TCs influence aussi le niveau de production et la qualité du lait. Ainsi, la consommation de lotier corniculé (*L. corniculatus*) ou de sulla (*H. coronarium*) a été associée à une augmentation de production laitière chez les bovins et chez les ovins (Leto *et al.*, 2002; Min *et al.*, 2003). Par ailleurs, il a été rapporté une augmentation du taux protéique de 10% chez des vaches et de 12% chez des brebis ingérant des TCs. De même qu'a été noté une augmentation du taux de lactose (14% chez les brebis), par rapport aux animaux témoins (Aerts *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2003). Enfin, un apport modéré de TCs, (de 2 à 4% de la ration) a été associé à une augmentation de la production de laine (de 11% de la production chez des ovins), qui serait liée à une absorption accrue d'acides aminés, en particulier de cystéine indispensable à la synthèse de la laine (Luque *et al.*, 2000).

- Effets sur la santé des animaux : Chez les ruminants, la météorisation spumeuse résulte d'une accumulation de gaz issus de fermentations ruminales exacerbées et séquestrées dans une mousse stable formée à partir des protéines solubles de la ration (Rochfort *et al.*, 2008). La consommation modérée de plantes riches en TCs (de l'ordre

de 5 % MS) a été associée à une prévention des risques de météorisation spumeuse (Min *et al.*, 2003; Rochfort *et al.*, 2008). Ceci s'expliquerait par la formation de complexes tanins-protéines alimentaires qui réduisent les fermentations ruminales. La consommation de fourrages riches en TCs contribue à éviter les épisodes diarrhéiques, ainsi que les risques de myases cutanées chez les ovins (Waghorn and McNabb, 2003). Par ailleurs, les TCs sont efficaces dans la lutte contre le parasitisme gastro-intestinal chez les ruminants (Hoste *et al.*, 2006).

➤ **Effets néfastes des tannins condensés**

- **Réduction de l'ingestion volontaire des aliments :** La consommation excessive de plantes à teneur élevée en TCs (>10% TCs de la MS) conduit à la réduction de l'ingestion volontaire (Harborne and Williams, 2000). Ainsi, l'incorporation de quebracho, à la dose de 1,5g/jour à la ration de petits ruminants, a été associée à une réduction de prise alimentaire (Clauss *et al.*, 2003). Cette réduction de l'ingestion est due à divers phénomènes. Le premier est l'astringence, c'est à dire la sensation d'assèchement de la cavité buccale, résultant de la complexation des TCs avec les protéines salivaires, notamment avec les protéines riches en proline (Haslam, 2007; Rochfort *et al.*, 2008) . Le deuxième processus résulte d'une sensation de malaise post-ingestif. L'ingestion émise de TCs perturbe également le système hormonal contrôlant la prise volontaire d'aliment (Zimmer and Cordesse, 1996).

- **Effets sur la physiologie digestive :** Bien que les TCs peuvent augmenter la digestibilité intestinale de la matière organique chez les ruminants, ils peuvent aussi avoir des effets négatifs sur l'absorption des nutriments dans l'intestin grêle (Mueller-Harvey, 2006; McSweeney *et al.*, 2008), lorsqu'ils sont ingérés en excès. Ceci est du à la persistance dans l'intestin de complexes tannins-protéines qui n'ont pas réussi à se dissocier dans la caillette, à la formation de complexes tannins-enzymes digestifs ou de nouveaux complexes tannins-protéines alimentaires, ou à des changements dans l'absorption intestinale résultant de l'interaction des tanins avec la muqueuse intestinale (Frutos *et al.*, 2002). La consommation de TCs affecterait ainsi la production d'acides gras volatiles et leur absorption (McSweeney *et al.*, 2008). Par ailleurs, ingérés en grande quantité, les TCs affectent l'intégrité structurelle des muqueuses digestives. Des pertes de cellules épithéliales et des signes de dégénérescences et d'ulcérations ont été observés chez des ovins ingérant de fortes doses de quebracho (16% de la ration) (Hervás *et al.*, 2003). Chez les caprins, des

concentrations excessives de TCs dans la ration ont également été associées à une kératinisation des épithéliums digestifs (Mbatha *et al.*, 2002).

- **Effets sur la fermentation ruminale :** Les tannins exercent des actions antimicrobiennes dans le rumen, y compris sur les protozoaires, les bactéries et les champignons cellulolytiques (Patra and Saxena, 2009), conduisant à des effets adverses sur la fermentation ruminale et sur les produits finaux de dégradation, notamment l'ammoniaque et les AGV dans le rumen (Grainger *et al.*, 2009; Bodas *et al.*, 2012).

Les tannins réduisent généralement la concentration en azote ammoniacal produite dans le rumen, ce qui améliore l'assimilation de l'azote des acides aminés alimentaires par les ruminants (Frutos *et al.*, 2004; Patra and Saxena, 2009). Les Effets sur les concentrations d'ammoniaque dans le rumen sont probablement liés à une réduction du nombre de protozoaires (Newbold *et al.*, 1997), qui jouent un rôle important dans la dégradation des protéines alimentaires du rumen (Jouany, 1994). L'altération du métabolisme des protéines dans le rumen peut être due à deux autres mécanismes : le premier est la réduction de la dégradation des protéines en peptides (Busquet *et al.*, 2005) et le deuxième mécanisme est l'inhibition spécifique de micro-organismes tels que les "bactéries hyper-productrices d'ammoniaque" et leur activité déaminase (Newbold *et al.*, 2004). Par ailleurs, la baisse de l'activité microbienne et de la dégradation du substrat dans le rumen par les TCs sont généralement liées à une réduction de la production des AGV (Castro-Montoya *et al.*, 2011; Ghasemi *et al.*, 2012).

- **Effets négatifs sur les paramètres zootechniques :** Une ingestion importante de TCs (>9% de la MS) est associée à des effets négatifs sur la production de laine et sur la production de lait (Maasdorp *et al.*, 1999; Ramirez-Restrepo and Barry, 2005). Par ailleurs, chez des chèvres élevées dans un environnement de plantes arbustives riches en TCs, l'administration d'un inhibiteur de tannins (le polyéthylène glycol, PEG) conduit à une augmentation significative de la production de lait (Decandia *et al.*, 2000).

➤ **Inactivation des tanins condensés**

Pour palier aux effets nocifs des TCs, des phénomènes adaptatifs ont été observés chez les petits ruminants : les brouteurs consommant essentiellement des plantes herbacées pauvres en TCs développent des stratégies comportementales d'évitement des plantes riches en tanins, suite à des expériences individuelles ou des interactions sociales d'apprentissage au sein du

groupe. À l'inverse, les cueilleurs consomment en proportion beaucoup plus de plantes ligneuses riches en TCs et présentent des adaptations physiologiques (sécrétion de protéines salivaires hautement affines pour les tanins) et anatomiques (glandes salivaires plus développées) (Palo and Robbins, 1991). Par ailleurs, des procédés d'inactivation des tanins ont été mis au point à titre expérimental, soit par l'administration de polyéthylène glycol (PEG) ou de polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) (puissants inhibiteurs des tanins) aux animaux, soit par des traitements chimiques des plantes (hydroxyde de calcium et acide chlorhydrique) (Mueller-Harvey, 2006).

2.2.2. Les oxalates

➤ Nature, mécanisme d'action, et effets biologiques

L'acide oxalique de formule HOOC-COOH est un diacide organique dont la structure ne présente que deux atomes de carbone. Il est présent à l'état libre et surtout sous forme de sels dans beaucoup de végétaux consommés par les ruminants, en particulier dans les terres salines ou dans les régions arides et semi-arides (El Shaer, 2010; Belenguer *et al.*, 2013).

La répartition de l'acide oxalique chez les végétaux varie d'une famille à une autre (Sefa-Dedeh and Agyir-Sackey, 2004), avec une plus grande concentration dans les tissus foliaires des plantes (Fournier and Ruel, 2002; Rahman *et al.*, 2006). La teneur en oxalates des plantes fourragères dépend également de l'âge, du stade de développement de la plante, ainsi que des variations saisonnières (Patel *et al.*, 2013; Rahman *et al.*, 2009).

La plus grande partie de l'acide oxalique contenu dans les plantes s'y trouve sous forme d'oxalates de sodium et de potassium solubles. 10 à 20 % seulement apparaissent comme oxalate insoluble, surtout dans les membranes cellulaires (Rahman *et al.*, 2008; Rahman and Kawamura, 2011).

Les oxalates ont plusieurs fonctions dans les plantes, dont la régulation du calcium, l'équilibre ionique, la protection des végétaux et la désintoxication des métaux lourds (Libert and Franceschi, 1987; Rahman and Kawamura, 2011). Toutefois, ils peuvent être nocifs, en limitant notamment l'utilisation biologique du calcium, des protéines et en entraînant la formation de calculs rénaux chez les animaux (Knight and Walter, 2001).

Les interactions protéines oxalates se forment par l'intermédiaire d'ions divalents, à l'instar des ions calcium. La présence de deux fonctions acide carboxylique confère à l'acide

oxalique la possibilité de se lier aux ions calcium. En effet, lorsque les conditions le permettent, l'acide oxalique se charge négativement, attirant électro-statiquement les ions calcium (Ca^{++}) qui portent des charges positives. On aboutit ainsi à la formation du complexe oxalate-calcium. L'acide oxalique en solution peut réagir directement avec les protéines et empêcher ainsi leur hydrolyse par les enzymes peptidiques (Sefa-Dedeh and Agyir-Sackey, 2004).

➤ **Effets des oxalates sur les ruminants**

Bien que la plupart des plantes à oxalates contiennent de faibles concentrations de ces composés secondaires (environ 10 à 20 g / kg de matière sèche) (Libert and Franceschi, 1987; Rahman and Kawamura, 2011), Certaines d'entre elles, peuvent accumuler les oxalates à des concentrations potentiellement toxiques (jusqu'à 300 g / kg MS) (Cheeke, 1995; Ben Salem et al., 2010). Dans de tels cas, la consommation brutale d'une quantité suffisante de ces plantes peut causer un empoisonnement du bétail, avec principalement une hypocalcémie et une toxicité rénale (James, 1972; Cheeke, 1995).

En général, les ruminants tolèrent beaucoup plus les oxalates dans leur alimentation que d'autres animaux grâce à la capacité du microbiote ruminal à métaboliser ces composés dans le rumen, empêchant ainsi l'absorption des oxalates solubles (Rahman *et al.*, 2013).

Lorsque de faibles quantités d'oxalates sont consommées, la plupart des oxalates est soit détruite par les bactéries du rumen, soit combinée avec le calcium libre au niveau du rumen et excrétée dans les fèces. En revanche si une grande quantité d'oxalates est ingérée, une partie est absorbée dans la circulation sanguine et affecte les tissus et le calcium sérique (Fournier and Ruel, 2002).

L'oxalate, en se combinant au calcium (Ca) ou au magnésium (Mg) du sang, forme des cristaux d'oxalates de Ca ou de Mg insolubles, donc non ionisés, indisponibles et physiologiquement non actifs. Ce qui peut occasionner une carence en Ca et une insuffisance rénale. Par ailleurs, les oxalates absorbés peuvent agir sur le métabolisme énergétique causant souvent la mort subite de l'animal. (Knight and Walter, 2001; Rahman *et al.*, 2013).

Les facteurs qui prédisposent un animal à une intoxication à oxalates sont principalement la quantité et la vitesse à laquelle la plante contenant les oxalates est consommée et à la quantité des autres nutriments qui diluent les oxalates dans le rumen

(Knight and Walter, 2001). Par ailleurs, il ya une faculté d'adaptation de l'organisme au toxique. Ainsi, la tolérance augmente avec l'exposition, si les ruminants sont peu à peu exposés à une alimentation riche en oxalate, la population de bactéries dégradant les oxalates dans le rumen augmente suffisamment pour prévenir les intoxications à oxalates. Cependant, si des quantités importantes de plantes à oxalates sont ingérées sur une courte période de temps, le microbiote ruminal est incapable de métaboliser les oxalates, engendrant ainsi un empoisonnement du ruminant (James,1972; Rahman *et al.*, 2013). Les ruminants pouvant brouter de faibles quantités de plantes riches en oxalates peuvent augmenter leur tolérance pour l'oxalate de 30% ou plus en quelques jours (Allison *et al.*, 1985; Knight and Walter, 2001). Une fois adapté à l'oxalate, les ovins et les bovins peuvent utiliser efficacement une variété de fourrages riches en oxalates qui autrement auraient été toxique (Knight and Walter, 2001).

Une concentration dans la ration alimentaire en oxalates soluble <2,0% est préconisée pour éviter toute intoxication à oxalates chez les ruminants, bien que la teneur en Ca dans le sang puisse diminuer (Rahman *et al.*, 2013). Par ailleurs, les plantes à oxalates doivent également être complétées par d'autres fourrages dans l'alimentation des ruminants, afin de réduire la consommation globale de plantes riche en oxalates.

3. Dynamique des aliments et du microbiote dans le rumen

3.1. Anatomie du rumen

Les ruminants ont la particularité de posséder un système digestif antérieur à l'estomac vrai (appelé caillette ou abomasum) très développé. Ce système digestif est très complexe et composé de plusieurs compartiments, appelés pré-estomacs qui sont le réticulum (réseau ou bonnet), le rumen (panse) et le feuillet (omasum) (figure 1).

Parmi ces compartiments, le rumen est le plus volumineux : son volume varie entre 120 et 200 litres chez un bovin adulte, celui du réseau entre 7 et 12 litres, celui de l'omasum entre 9 et 16 litres et celui de l'abomasum entre 12 et 20 litres (Fonty and Chaucheyras-Durand, 2007). Le rumen est divisé en 2 parties : le sac ventral contenant une partie solide avec de grosses particules alimentaires (des fibres par exemple) surmonté par une phase liquide contenant de petites particules alimentaires et le sac dorsal rempli par les gaz issus des fermentations microbiennes.

L'ensemble réticulo-rumen est le siège d'un véritable écosystème où une grande part des aliments ingérés par l'animal est valorisée. Les aliments qui sont ingérés, après une mastication rapide dans la bouche, rejoignent directement le rumen. Le bol alimentaire subit alors des dégradations mécaniques (mastication au cours de la rumination) et enzymatiques (via les microorganismes du rumen), avant d'arriver dans l'omasum. Cette dégradation permet de fournir l'énergie et les métabolites nécessaires aux ruminants (pour leur entretien, la croissance, la production laitière...) mais aussi aux microorganismes du système digestif.

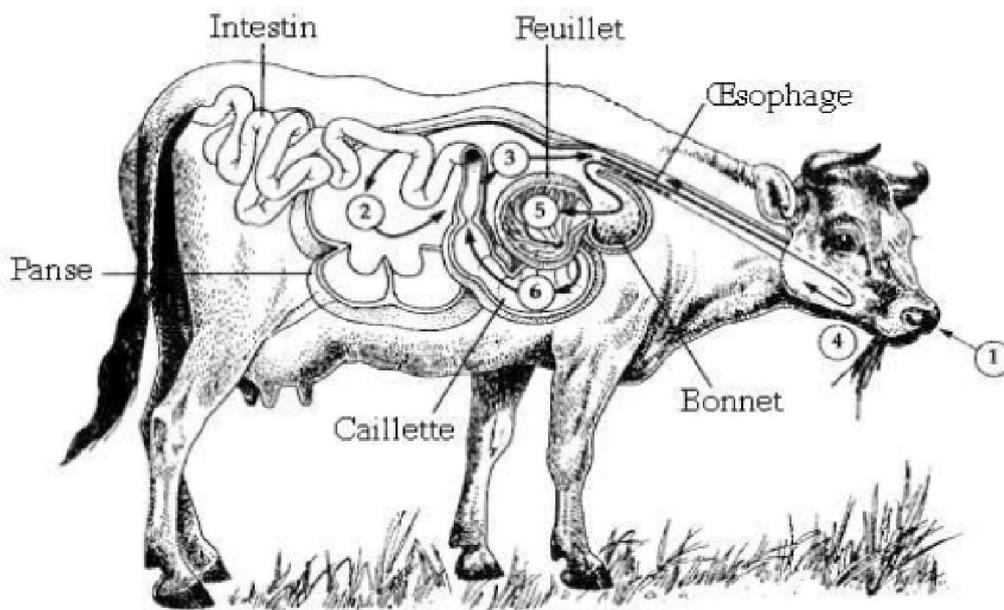


Figure 1. Tube digestif des ruminants

3.2. L'Ecosystème Rumen

L'écosystème ruminal est composé par un microbiote complexe (faune et flore) et dense et un environnement (paramètres physico-chimiques et paramètres fermentaires) qui sont intimement liés entre eux.

3.2.1. Paramètres abiotiques

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

➤ 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. Ce pH est la résultante d'un équilibre entre des acides faibles et des bases faibles. Le pH du rumen peut varier sans qu'il y ait de troubles, la cause de variation la plus importante est constituée par les apports de substrats alimentaires induisant notamment d'importantes variations nyctémérales.

Les éléments responsables des fluctuations de pH du rumen sont, pour les acides : les AGV et l'acide lactique produits lors des fermentations, et pour les bases, les bicarbonates et les phosphates. Ainsi que, le cas échéant, l'ammoniac venant de la protéolyse de l'uréolyse. Le pouvoir tampon est assuré essentiellement par les bicarbonates et les phosphates apportés par les glandes salivaires (un bovin adulte sécrète chaque jour environ 100 litres de salive), dont la sécrétion dépend en grande partie de l'alimentation (Remond *et al.*, 1995).

La vitesse d'absorption des AGV à travers la paroi ruminale est différente selon les AGV (Nozière *et al.*, 2010) ainsi que la sortie des *digesta* qui sont également à prendre en compte dans la détermination du pH. Après un repas, les AGV produits par le microbiote vont abaisser le pH. Puis ce dernier remonte car les AGV sont absorbés par la muqueuse ruminale et la rumination qui induit l'arrivée de salive (Dragomir *et al.*, 2008). Une chute importante et prolongée du pH ruminal avec des valeurs pouvant être inférieures à 5,0 (seuil d'irréversibilité si l'animal continue à ingérer des glucides rapidement fermentescibles) correspond à une acidose aiguë, grave, parfois mortelle pour l'animal (Martin *et al.*, 2006). Inversement, un animal peut être en état d'alcalose (libération excessive de NH_3) quand les valeurs de pH ruminal sont supérieures à 7,5 (Remond *et al.*, 1995).

➤ **Température**

La température ruminale est sensiblement supérieure à la température corporelle, elle est comprise entre 39°C et 40°C. Elle peut atteindre 41°C lorsque les fermentations sont très intenses mais aussi chuter de plusieurs degrés après l'ingestion de grandes quantités d'eau froide (Church, 1975). Néanmoins, les conséquences de cette chute de température sont très faibles (Dehority, 2003).

➤ **Anaérobiose et potentiel d'oxydoréduction**

Le milieu ruminal est caractérisé par des conditions d'anaérobiose vraie. Néanmoins, de très faibles quantités d'oxygène peuvent entrer dans le milieu via l'alimentation, l'ingestion d'eau ou par diffusion à partir du sang (Marounek *et al.*, 1981). D'autre part, des souches de

bactéries aérobies facultatives peuvent éliminer ces apport en oxygène dans le rumen et maintenir le caractère hautement réducteur du milieu (Remond *et al.*, 1995; Dehority, 2003).

Le potentiel d'oxydoréduction d'un rumen sain et en fonctionnement est fortement négatif et varie de -150 mV à -260 mV lorsqu'il est mesuré par rapport à l'électrode standard à hydrogène (Marden *et al.*, 2005). Le potentiel redox augmente après le repas (suite à l'entrée d'oxygène pendant le repas et la rumination) et diminue ensuite (Andrade *et al.*, 2002; Marden *et al.*, 2005). En effet, en conditions physiologiques, le potentiel redox est rapidement corrigé par les microorganismes du rumen qui utilisent alors préférentiellement le peu d'oxygène disponible pour leurs activités fermentaires (Baldwin and Emery, 1960). Le potentiel redox est généralement lié négativement au pH ruminal, néanmoins cette relation n'est pas toujours significative (Julien *et al.*, 2010).

➤ **Humidité et pression osmotique**

L'humidité du contenu ruminal est en moyenne de 85%, néanmoins cette valeur n'est pas homogène dans l'ensemble du rumen. Les apports hydriques sont assurés par l'eau ingérée, par une intense salivation et dans une moindre mesure par l'alimentation. 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 (Brugere, 1983). La pression osmotique du liquide ruminal est comparable à celle du sang, elle est comprise entre 200 et 400 mosm/l chez l'animal sain. Ce qui favorise les échanges d'eau et de molécules à travers la paroi du rumen. La pression osmotique varie avec l'ingestion et l'abreuvement (Giger-Reverdin *et al.*, 1997).

➤ **Métabolites majeurs**

Le métabolisme microbien conduit à la production de gaz, d'acides organiques (AGV, acide lactique) et d'ammoniac (NH_3).

Les gaz présents dans le rumen sont constitués de CO_2 (65 %), de CH_4 (entre 25 et 30 %), d'azote (5%) et d'hydrogène (<1 %) (Jarrige *et al.*, 1995). Des traces d'oxygène sont également présentes. Ces proportions varient après un repas et en fonction de la nature et du niveau des apports alimentaires. La concentration en CO_2 augmente après un repas (1h après le repas) puis diminue. La production de CO_2 est à relier avec l'intensité des fermentations dans le rumen et certainement à la forte neutralisation des acides produits par le bicarbonate.

L'évolution est inverse pour la concentration en CH₄. La diminution de la concentration en CH₄ en début de cinétique postprandiale est due non pas à une réduction de la production de CH₄ mais à une production en proportion plus importante de CO₂. D'autre part, la production de CH₄ plus tardive est reliée à la dégradation des fibres contenues dans la ration (Getachew *et al.*, 2005). Les gaz sont éliminés par éructation.

Les proportions des différents AGV produits sont principalement fonction de la nature du régime. Les rations riches en fourrages favorisent ainsi la production d'acétate au détriment du propionate, tandis que les rations riches en amidon diminuent la synthèse de l'acétate et favorisent celle du propionate. La production d'acide butyrique est, quant à elle, augmentée lors de régimes contenant des ingrédients riches en sucres solubles, tels que les betteraves (saccharose) ou le lactosérum (lactose) (Cuvelier *et al.*, 2005). Chez les bovins, les proportions des AGV produits dans le rumen sont en moyenne de 66 % pour l'acétate, 19 % pour le propionate, 11 % pour le butyrate et 4 % pour AGV mineurs (isobutyrate, valérate, isovalérate) pour des animaux nourris avec des rations riches en fourrages de qualité moyenne (Sauvant *et al.*, 2011). Le rapport acétate / propionate (C₂/C₃) de ce profil est d'environ 3,5. La vitesse de production de ces AGV varie entre 0,7 et 6 mmol d'AGV produits / minute, en fonction du type d'AGV et du niveau d'alimentation des animaux (Martin *et al.*, 1999). Les AGV produits sont soit absorbés au niveau de la paroi du rumen, soit ils sortent du réticulo-rumen par l'orifice réticulo-omasal au sein de la phase liquide (Dijkstra *et al.*, 1993). Leurs concentrations dans le rumen correspondent au bilan entre leur production et leur évacuation du rumen. Après un repas, leur concentration augmente pour ensuite diminuer lentement.

Le NH₃ peut être absorbé au niveau de la paroi du rumen pour être ensuite transformé en urée au niveau du foie. Il est majoritairement prélevé par les microorganismes du rumen comme substrat à leur croissance.

3.2.2. Le microbiote ruminal

Le rumen accueille un microbiote anaérobie, complexe et très diversifié : plus de 200 espèces de bactéries (10¹⁰ à 10¹¹ bactéries par mL), des archaeobactéries (10⁷ à 10⁹ par ml), des protozoaires (de 10⁴ à 10⁶ par ml), des champignons (entre 10³ et 10⁵ zoospores par ml) et 10⁷ à 10⁹ particules de virus bactériophages par ml (Klieve and Swain, 1993; Mackie *et al.*, 2000). Ces microorganismes jouent des rôles différents et complémentaires dans la digestion des aliments et agissent en synergie pour fermenter les glucides et les protéines végétales

structurelles et non structurelles dans le rumen (Chaucheyras-Durand and Ossa, 2014), en vue de synthétiser leur propre produits et de transformer les hydrates de carbone en Acides Gras volatiles (AGV). L'animal hôte absorbe ainsi et valorise à son avantage la biomasse microbienne et les AGV qui représentent respectivement ses sources majeures en protéines et en énergie.

➤ **Les bactéries**

Les bactéries constituent environ 50% de la biomasse microbienne du rumen (Fonty and Chaucheyras-Durand, 2007). Cette population est de loin la plus active dans le rumen et elle se caractérise par son extrême diversité (Koike *et al.*, 2010), plus de 200 espèces ont été isolées. La classification des bactéries a évolué en fonction de l'avancée des techniques. Elles sont généralement classées selon des critères physiologiques (voies métaboliques, types de substrats dégradé ou fermentés, etc.). Cette classification conduit aux groupes fonctionnels suivants : bactéries cellulolytiques, hémicellulolytiques, pectinolytiques, amylolytiques, protéolytiques, lypolytiques, bactéries utilisatrices de lactate, etc. (Dehority, 2003; Hungate, 1966). Les fonctions de plusieurs espèces se recoupent largement, ce qui contribue à la stabilité de l'écosystème (Edwards *et al.*, 2008), néanmoins les fonctions d'une espèce donnée peuvent être limitées ou au contraire très larges (tableau 5).

Tableau 5. Substrats et produits des principales espèces bactériennes du rumen (Dehority, 2003).

Espèce	Hydrolyse		Substrat de fermentation							Produit de fermentation									
	Cellulose	Hémicellulose	Cellulose	Maltose	Saccharose	Glucose	Galactose	Fructose	Pentose	Acides aminés	Lactate	Formate	Acétate	Propionate	Butyrate	Ethanol	Lactate	Dihydrogène	Dioxyde de carbone
<i>F. succinogenens</i>	+	+	+	+								+	+						
<i>R. albus</i>	+	+	+							+		+	+			+	+	+	+
<i>R. flavofaciens</i>	+	+	+							+		+	+			+	+	+	+
<i>B. fibrisolvans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+		+	+	+	+	+
<i>P. ruminicola</i>		+	+	+	+						+	+	+						
<i>S. bovis</i>			+	+	+				+	+		+						+	
<i>R. amylophilus</i>				+	+							+	+			+			
<i>S. amylolytica</i>					+		+						+	+					
<i>S. ruminantium</i>					+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	

Mais depuis l'apparition des techniques de biologie moléculaire, la classification des bactéries est organisée autour de leur filiation taxonomique, par homologie et différences entre les génomes bactériens. Dans les fermenteurs digestifs, 3 phyla majoritaires sont présents : les Firmicutes, les Bacteroidetes et les *Proteobacteria*. L'analyse de banques de séquences d'ADNr16S issues de contenus de rumen montre que les Firmicutes sont généralement majoritaires (50 à 80% de la communauté), ils sont suivis des Bacteroidetes (10 à 40% de la communauté). Les *Proteobacteria* sont également présentes (3 à 5 % de la communauté) mais elles ne sont jamais dominantes chez les individus sains (Seksik *et al.*, 2003).

Traditionnellement, la population bactérienne du rumen comprend trois sous-populations en fonction de l'environnement occupé : bactéries planctoniques (libres dans la phase liquide), bactéries associées à des particules alimentaires solides, bactéries attachées à la surface des protozoaires ou encore associées à l'épithélium ruminal (Edwards *et al.*, 2008). Les bactéries associées aux particules alimentaires représentent jusqu'à 75 % de la population microbienne totale (Koike *et al.*, 2003), elles sont responsables de la majorité des activités enzymatiques dans le rumen (Minato *et al.*, 1993) : 88 à 91 % pour les endoglucanases et xylanases, 70 % pour les amylases et 75 % pour les protéases (Miron *et al.*, 2001). De nombreux facteurs peuvent affecter l'adhésion bactérienne en étant : liés aux bactéries (âge, condition du glycocalyx, compétition bactérienne), liés au substrat (surface, hydratation, charge ionique...), liés à l'environnement (pH, température, oxygénation, ...) (Miron *et al.*, 2001). Par ailleurs, la structure des populations bactériennes du contenu ruminal est également spécifique de l'animal hôte (Welkie *et al.*, 2010).

Les bactéries du rumen sont constamment éliminées par prédation des protozoaires ruminiaux ou évacuées vers le feuillet et l'aval du tube digestif. Néanmoins, ces pertes sont compensées par une croissance régulière de la population bactérienne.

➤ **Bactéries fibrolytiques (bactéries dégradant les glucides pariétaux)**

Les principales espèces fibrolytiques présentes dans le rumen sont *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* et *Butyvirbio fibrisolvans* (Krause *et al.*, 1999). Ces bactéries adhèrent aux particules fibreuses et synthétisent des enzymes actives sur les glucides pariétaux (cellulose, hémicelluloses et pectine). Cette population se développe mieux avec un pH supérieur ou égal à 6,5 et elle produit principalement de l'acide acétique et de l'acide butyrique.

➤ **Bactéries cellulolytiques** : Deux types de bactéries cellulolytiques sont présents dans le rumen : des bacilles (parmi lesquelles sont majoritairement isolées *Fibrobacter succinogenes* et *Butyrivibrio fibrisolvens*) et des coques (représentés par *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus*) (Vérité *et al.*, 1987). *F. succinogenes*, *R. albus* et *R. flavefaciens* sont connues pour être les principales espèces cellulolytiques dans le rumen (Flint *et al.*, 2008; Koike *et al.*, 2009).

La population cellulolytique représente 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). Cependant, des approches de culture-indépendantes indiquent que les trois principales espèces de bactéries cellulolytiques ne représentent approximativement que 2% de l'ARNr 16S bactérien du rumen (Stevenson and Weimer, 2007). Par conséquent, il apparaît que de nombreuses variétés de microorganismes du rumen restent non cultivables (An *et al.*, 2005). Au cours des dernières années, des études de métagénomique du rumen ont révélé la grande diversité d'enzymes fibrolytiques, de domaines protéiques multiples et la complexité de la composition microbienne dans l'écosystème (Ferrer *et al.*, 2005; Brulc *et al.*, 2009). Il est donc vraisemblable que l'ensemble de la population microbienne est nécessaire pour la mise en œuvre d'un processus fibrolytique efficace dans le rumen, y compris les espèces non cultivables (Cai *et al.*, 2010). D'autre part, l'utilisation d'outils de biologie moléculaire donne également des indications permettant de déterminer la composition quantitative de la composante cellulolytique. Ainsi, selon Martin *et al.* (2001), la population des *Ruminococci* issus de rumen de vaches laitières était plus importante que celle de *F. succinogenes*, alors que, chez le mouton, *F. succinogenes* est l'espèce cellulolytique majoritaire, ou tout au moins présente en quantité équivalente aux *Ruminococci* (Michalet-Doreau *et al.*, 2001). *F. succinogenes* est une espèce majeure du rumen, elle représente 5 à 6% de la communauté procaryotique (Mackie *et al.*, 1997). C'est des bactéries à Gram négatif, principalement en forme de bâtonnets, avec un diamètre compris entre 0,8 et 1,6 μm . *F. succinogenes* dégrade principalement la cellulose et elle produit majoritairement de l'acide acétique, mais aussi de l'acide succinique et de l'acide formique. Cependant, ces bactéries sont très sensibles aux phénols des végétaux (Chesson *et al.*, 1982).

L'autre bacille cellulolytique souvent présent dans le rumen est *B. fibrisolvens*. Il s'agit de bactéries à Gram négatif, possédant un unique flagelle polaire et classiquement mobiles

(Hungate, 1966). Bien que son activité cellulolytique soit plus faible que celle des *Ruminococcus* et de *F.succinogenes* (environ 5 fois moins) (Bryant and Burkey, 1953), *B. fibrisolvens* est susceptible d'exercer une grande variété de fonctions (hydrolyses glucidique et protéique, fermentations) selon la souche. Ces bactéries produisent principalement de l'acide butyrique, du dioxyde de carbone, de l'acide formique, du lactate, de l'éthanol et de faibles quantités d'acétate.

Les *Ruminococcus* font partie des espèces cellulolytiques les plus actives dans le rumen (Lin and Stahl, 1995). Ils se caractérisent par un Gram négatif, une morphologie coccoïde et un diamètre de 0,8 à 1 µm. Pour adhérer aux fibres végétales, ces bactéries forment une épaisse couche de polyholosides (Roger *et al.*, 1990). Elles sont très sensibles au pH acide provoqué par une alimentation riche en amidon. Certaines souches de *R. albus* produisent des métabolites secondaires qui inhibent *R. flavefaciens* (Odenyo *et al.*, 1994).

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) sont présentes chez certaines souches. *R.albus* présente une activité cellulolytique rapide, elle 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) (Hungate, 1966). Ces espèces (*R. flavefaciens* et *R. albus*) produisent essentiellement de l'acétate mais également de manière variable du dihydrogène, de l'éthanol, de l'acide formique, de l'acide lactique et de l'acide succinique.

➤ Bactéries hémicellulolytiques

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 xylanasiq est également attribuée à *R. albus*, à *R. flavefaciens* chez qui 4 gènes codant pour des xylanases ont été mis en évidence, *B. fibrisolvens* est considéré comme présentant une très importante activité de dégradation du xylane et *P. ruminicola* (Krause *et al.*, 2003).

➤ Bactéries pectinolytiques

Lachnospira multiparus est la principale espèce pectinolytique du rumen. Elle est présente chez les animaux recevant une alimentation riche en pectine (Stewart and Bryant, 1988). D'autres bactéries assurent également la digestion de la pectine, parmi lesquelles : *B. fibrisolvans*, *P. ruminicola*, *Succinivibrio dextrinosolvans*, *Treponema bryantii* et *Streptococcus bovis* (Tiret, 2001). Les enzymes pectinolytiques sont divisées 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.

➤ Les bactéries dégradant les glucides cytoplasmiques et le lactate

Certaines bactéries fibrolytiques sont également amylolytiques : c'est le cas de quelques souches de *B. fibrisolvans*. D'autres bactéries non cellulolytiques sont plus spécialisées : *S. bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Succinomonas amylolytica*, *Selenomonas ruminantium* et *P. ruminicola*. Elles produisent des quantités de propionate plus élevées et prolifèrent à des pH inférieurs à 6.

S. bovis est une espèce amylolytique majoritaire chez les ruminants recevant une alimentation riche en céréales, elle dégrade également de nombreux sucres solubles. La croissance de cette espèce est très rapide (à un pH de 4,5 à 6,7.) et son activité génère de grandes quantités d'acide lactique. Par conséquent, *S. bovis* est l'agent souvent responsable des phénomènes d'acidose lactique chez les ruminants (Stewart and Bryant, 1988; Ghali *et al.*, 2004).

R. amylophilus dégrade l'amidon ainsi que le maltose. Elle produit de l'acide formique, de l'acétate, de l'acide succinique et de faibles quantités d'éthanol. *S. amylolytica* transforme l'amidon, le maltose et le galactose en acide succinique et en de faibles quantités d'acétate et de propionate. *S. ruminantium* a un pH de croissance de 4,3 à 4,4 et utilise l'amidon ainsi que les sucres pour les transformer en acide lactique, en acétate et en propionate. Certaines souches peuvent également utiliser le lactate. *P. ruminicola* inclue des souches dégradant l'amidon et d'autres inactif vis-à-vis de ce substrat. Les principaux produits de fermentation sont le succinate, l'acétate et le formate (Hungate, 1966).

Concernant les sucres solubles, de nombreuses bactéries fibrolytiques et amylolytiques peuvent les fermenter. (par exemple *S. ruminantium*, *S. bovis*, *B. fibrisolvens*, certaines souches de *Succinivibrio dextrinosolvens* et de Ruminocoques).

Les bactéries amylolytiques peuvent vite proliférer avec des rations riches en glucides rapidement fermentescibles (sucres et amidon) et produire des AGV en grande quantité et notamment du propionate. On assiste alors à une baisse du pH. Cela provoque une sélection de certaines bactéries dont les lactobacilles (principalement *Lactobacillus ruminis*, et *Lactobacillus vitulinus*) et donc une augmentation de la production en lactate, entraînant de ce fait une plus forte diminution du pH et probablement une acidose lactique chez le ruminant (Nagaraja and Titgemeyer, 2007). Les bactéries utilisant le lactate ont alors un rôle clé afin de rééquilibrer le pH ruminal : c'est le cas de *Veillonella alcalescens*, *Megasphera elsdenii* et de certaines souches de *S. ruminantium*.

➤ Les bactéries protéolytiques

Il n'existe pas de bactérie protéolytique stricte : ce sont en grande partie les bactéries amylolytiques (et certaines bactéries fibrolytiques) qui exercent cette fonction. Près de la moitié des souches bactériennes du rumen possèdent ainsi une activité protéolytique (Jarrige *et al.*, 1995). Cette activité concerne la majeure partie des protéines solubles ainsi qu'une part non négligeable des protéines insolubles (Wallace, 1991).

Les espèces ayant une activité protéolytique intense sont *R. amylophilus*, *P. ruminicola*, *B. fibrisolvens* et *S. ruminantium* (Dehority, 2003). Les peptides produits par la protéolyse sont rapidement dégradés dans le rumen. Les acides aminés sont ensuite en grande partie désaminés pour aboutir au NH₃ par *P. ruminicola*, *S. ruminantium* et *M. elsdenii*. La grande variété d'enzymes impliquées dans la dégradation des protéines est une illustration de l'activité synergique entre les différentes espèces du microbiote (Wallace, 1991).

➤ Les bactéries uréolytiques

L'urée entrant dans le rumen est transformée en ammoniac (qui a un rôle important dans le métabolisme de l'azote chez le ruminant) par les bactéries uréolytiques attachées à la paroi du rumen. Ces bactéries contrôlent la régulation du débit d'urée qui traverse la paroi ruminale. Parmi ces bactéries : *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Selenomonas* sp., *P. ruminicola*, *Ruminococcus bromii*, *Butyrivibrio* sp. et *Treponema* sp (Tiret, 2001).

Le mécanisme enzymatique de dégradation de l'urée est une hydrolyse par l'uréase. Le pH optimum de l'uréase est de 7 à 8,5 et sa température optimale est de 40°C. Les pH élevés du rumen favoriseraient donc la dégradation de l'urée et l'alcalose ruminale rencontrée lors d'intoxication ammoniacale, stimulant ainsi l'entretien du processus pathologique en stimulant la dégradation de l'urée.

➤ Les bactéries lypolytiques

Les lipides sont soumis à deux types de réaction qui s'enchaînent : la lipolyse des esters d'acides gras (AG), suivie par la biohydrogénation des acides gras insaturés (AGI) en acides gras saturés (AGS).

La lipolyse des triglycérides est principalement réalisée par *Anaerovibrio lipolytica*. En effet cette dernière possède une lipase (Brugere, 1983) capable d'hydrolyser les triglycérides en AG libres et en glycérol. Cependant, cette enzyme n'est pas efficace sur les galactolipides et les phospholipides. Leurs hydrolyses peuvent néanmoins être réalisées par une estérase, synthétisée par certaines bactéries appartenant au genre *Butyvirio*.

La biohydrogénation des AG (notamment à 18 carbones) est complexe, elle se divise en plusieurs étapes successives d'isomérisations et de réductions et nécessite l'intervention de plusieurs enzymes synthétisées par des bactéries différentes (*B. fibrisolvens*, *B. hungatei* et *B. proteoclasticus*) (Chen and Wolin, 1979).

➤ Les Archaeobactéries

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 et présent donc dans le rumen, pour synthétiser et produire du méthane (Wolin *et al.*, 1997). Il s'agit de microorganismes anaérobies strictes, autrefois assimilés aux bactéries, représentant environ 4% du microbiote ruminal (Yanagita *et al.*, 2000). Elles peuvent être aisément distinguées des autres organismes car, dans le rumen, elles produisent toutes du méthane comme principal produit de fermentation. En raison du rôle du méthane dans l'effet de serre et le réchauffement de la planète et dans la perte d'énergie chez les ruminants (estimée de 6% à 12% de l'énergie ingérée), un intérêt important est porté aux archées méthanogènes.

Les méthanogènes sont des membres du domaine des *Archaea*, 2 phyla sont retrouvés dans le rumen avec majoritairement le phylum *Euryarchaeota* et rarement le phylum *Crenarchaeota* (Shin *et al.*, 2004). 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 (Jarvis *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 2008). Des études basées sur l'ADNr 18S, se sont intéressées à la phylogénie des archées et révèlent l'existence de nouveaux groupes d'archées appartenant au phylum *Euryarchaeota* (Whitford *et al.*, 2001; Pei *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2014). Cependant, le statut taxonomique des méthanogènes ruminal nécessite encore des analyses au niveau moléculaire afin de le clarifier.

Methanobrevibacter (Mbb.) spp. est considérée comme la principale espèce de méthanogènes ruminants, que ce soit par des méthodes de culture (Stewart and Bryant, 1988), ou par des analyses génomiques (Hook *et al.*, 2010). Ses principaux substrats sont le dihydrogène et le dioxyde de carbone mais le formate peut également être utilisé lorsqu'il est présent en grande concentration dans le rumen. *Mbb. Ruminantium* est la souche type et elle est caractérisée par une exigence en coenzyme M, spécifique aux méthanogènes (Stewart and Bryant, 1988), il joue un rôle de porteur de groupements méthyles. D'autres souches de *Methanobrevibacter* spp. sont présentes dans le rumen (*Mbb. smithii* et *Mbb. thaueri*) (L. C. Skillman *et al.*, 2006). Parmi les espèces méthanogènes, on note également la place importante de *Methanomicrobium mobile*, qui représente près de 54% des méthanogènes ruminants chez les ovins (Yanagita *et al.*, 2000).

Les archées méthanogènes dans le rumen sont attachées aux particules du rumen, 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 : respectivement 3.10^8 , 2.10^9 et 9.10^9 copies de gène de l'ADNr 18S pour les phases liquides, solides et de l'épithélium du rumen (Pei *et al.*, 2010). Cette étude montre également la prédominance du genre *Methanobrevibacter* au sein des 3 phases du rumen avec respectivement 84, 78 et 77% d'abondance pour les phases liquides, solides et l'épithélium du rumen. Elle révèle également un nombre plus ou moins important de *taxa* non identifiés au sein de chaque phase, avec des abondances de 12, 24 et 25%, respectivement pour les phases liquide, solide et l'épithélium du rumen (Pei *et al.*, 2010). Les communautés méthanogènes vivant en liberté ou associées aux protozoaires sont composées des trois genres : le groupe C (aussi appelé RCC «Rumen Cluster C» apparenté de loin aux *Thermoplasma*), les

Methanobrevibacter et les *Methanomicrobium* (Janssen and Kirs, 2008; Tymensen *et al.*, 2012). Tymensen *et al.* (2012) ont d'autre part 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*. 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).

Les enzymes impliquées dans la méthanogenèse sont codées par des gènes, pour certains exclusivement présents chez les *Archaea* méthanogènes. Seuls les méthanogènes possèdent la quasi-totalité des protéines impliquées dans la méthanogenèse et la synthèse de ses coenzymes. Chez les procaryotes en général, les protéines impliquées dans la synthèse des coenzymes sont plus largement distribuées que celles réalisant la méthanogenèse (duplications/pertes et/ou transferts mais pas entre méthanogènes) (Baptiste *et al.*, 2005). Certaines espèces possèdent même plusieurs enzymes catalysant une seule étape de cette voie métabolique ; ces isoenzymes sont probablement conservées au cours de l'évolution car elles confèrent un avantage métabolique aux méthanogènes (Reeve *et al.*, 1997). Un gène particulier, le *mcrA*, a reçu beaucoup d'attention ces dernières années, étant identifié en tant que marqueur moléculaire de la communauté méthanogène au même niveau que le *rrs* (gène qui code pour l'ARN 16S de la petite sous-unité ribosomale) (Popova, 2011).

➤ Les Protozoaires

Les protozoaires ruminiaux sont des organismes eucaryotes unicellulaires microscopiques. Ils sont anaérobies stricts, de taille variable : 20 à 150µm (Jarrige *et al.*, 1995). Ils sont ainsi 20 à 100 fois plus grands que les bactéries mais 10^4 fois moins nombreux (Jouany, 1994), ils représentent entre 20 et 50% de la biomasse microbienne (Fonty and Chaucheyras-Durand, 2007). La plupart des protozoaires sécrètent des enzymes (protéolytiques, cellulolytiques, amylolytiques) participant à la digestion des particules ingérées (Jouany, 1994).

Les protozoaires sont mobiles grâce à des organites spécialisés : des flagelles ou des cils, permettant de distinguer les flagellés des ciliés. Dans le rumen, La concentration des protozoaires flagellés peut être importante (jusqu'à 104/ml) mais leur contribution aux activités microbiennes est considérée comme négligeable (Jarrige, 1995). La diversité et

l'activité des flagellés ne sont pas encore bien connues. Les ciliés constituent un groupe remarquable dont la concentration peu atteindre 10⁵ à 10⁶ cellules/ml de liquide ruminal (Hungate, 1966). Les ciliés sont soit fixés sur des particules alimentaires, soit dans la phase liquide (Jarrige, 1995). Ils sont composés de deux grands groupes : les Entodiniomorphes et les Holotriches (Jouany, 1996). Les genres d'entodiniomorphes les plus fréquemment retrouvés dans le rumen, sont : Entodinium, Diplodinium, Eudiplodinium, Metadinium, Polyplastron et Epidinium. Les holotriches sont majoritairement représentés dans le rumen par la famille Isotrichidaea avec deux genres prépondérants : Isotricha et Dasytricha (Karnati et al., 2003). Au sein de la phase liquide du rumen, deux genres sont identifiés Entodinium (69,6% des clones) et Epidinium (31,4% des clones), un certain nombre de séquences du gène codant l'ARNr 18S n'étaient pas identifiables (30,4%) (Shin et al., 2004). 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., 2004).

Les Entodiniomorphes ont de fortes capacités à ingérer des particules solides en suspension (grains d'amidon, chloroplastes, fibres celluloses) à l'aide de leurs cils. Ces particules sont alors transportées à travers le vestibule jusqu'au cystotome. Les holotriches sont plutôt spécialisés dans l'absorption de composés solubles tels que les sucres solubles, excepté le mannose et la glucosamine (Jouany and Ushida, 1999). Ainsi, certains protozoaires (notamment les holotriches) dégradent rapidement l'amidon et les sucres solubles. Une partie des produits de cette dégradation est stockée sous forme de glucides de structure intermédiaire entre le glycogène et l'amylopectine. *Isotricha* possède une forte activité amylolytique (Gouet et al., 1986) et la dégradation de l'amidon conduit à la formation d'acide butyrique, H₂, et CO₂ majoritairement et de faibles concentrations d'acides propionique et lactique. Par ailleurs, certains Entodiniomorphes sont particulièrement efficaces pour digérer la cellulose : les fibres sont acheminées dans des vacuoles dans lesquelles sont sécrétées des enzymes cellulolytiques (Jouany, 1994).

Les ciliés du rumen ont une activité protéolytique moins efficace que les bactéries mais contrairement à ces dernières ils dégradent en majorité des protéines insolubles. Ils ont également une activité de désamination importante (Jouany, 1994)

Les protozoaires peuvent éliminer les bactéries et récupérer les acides aminés, les peptides et les acides nucléiques bactériens pour les incorporer dans leur propre organisme (Belanche *et al.*, 2012; Jouany, 1994).

➤ **Les Champignons**

Les champignons du rumen sont anaérobies stricts, ce qui est très rare pour ce groupe de microorganismes (McAllister and Cheng, 1996). Leur densité est de 10^3 et 10^4 champignons / ml de contenu ruminal, mesurée par des méthodes de cultures (McAllister and Cheng, 1996). Des densités similaires ont été observées via des techniques de biologie moléculaire (Lwin *et al.*, 2011).

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 ; Kittelmann *et al.*, 2012; Orpin, 1977). Une étude récente a montré que chez les ruminants que Piromyces et Neocallimastix spp. sont les champignons les plus abondants et un nouveau groupe appelé SK, dont le groupe SK3, est retrouvé chez tous les ruminants (Kittelmann *et al.*, 2012).

Les champignons du rumen sont souvent attachés aux fibres composant la phase solide, ils représentent environ 8% de la biomasse microbienne totale du rumen (Kemp *et al.*, 1984). Par ailleurs, les champignons représentent 59 à 78% de l'ARNr eucaryotique chez les ovins et bovins (McDonald *et al.*, 2010).

Les zoospores se fixent sur des tissus végétaux, ils sont alors au stade végétatif. Un système rhizoïdal se développe dans les tissus végétaux tandis que le sporange se développe à l'extérieur et peut ainsi libérer de nouvelles zoospores qui iront coloniser d'autres tissus. La colonisation des tissus végétaux débute peu après l'ingestion d'aliments par les animaux : 15-30min. Les champignons du rumen 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. Cependant, Ils ont une faible activité protéolytique. 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 (Jouany, 1994).

Le rumen se présente comme un fermenteur fonctionnant en continu et présentant des conditions physico-chimiques particulières qui permettent la multiplication d'un microbiote anaérobie. Il permet ainsi aux ruminants de tirer parti des fibres végétales.

3.2.3. Facteurs de variation du microbiote ruminal

➤ Variabilité entre espèces microbiennes et hôtes

Des études basées sur les techniques microbiologiques classiques montrent que les différentes espèces de ruminants ont des similitudes dans leur microbiote (Nelson *et al.*, 2003). Les études moléculaires démontrent que certaines divisions bactériennes sont dans les mêmes proportions dans le rumen de différentes espèces de ruminants domestiques, tandis que pour d'autres divisions les proportions diffèrent (Gruninger *et al.*, 2014). Par exemple, chez les ovins, la communauté bactérienne du rumen est composée de 42 à 73% de *Firmicutes*, de 25 à 54% de *Bacteroidetes*, de 0 à 19% de *Spirochaetes* et de 0 à 3% de *Proteobacteria*. Chez les bovins, bien que les proportions de *Firmicutes* et de *Bacteroidetes* soient à peu près similaires, les *Proteobacteria* sont plus présentes que les *Spirochaetes*. Sultan *et al.* (2006) ont montré que la densité bactérienne dans le rumen est plus élevée chez les caprins que chez les ovins.

Il existe aussi au niveau du microbiote ruminal une variabilité entre les individus de la même espèce (Edwards *et al.*, 2005; Brulc *et al.*, 2009; Hernandez-Sanabria *et al.*, 2010). L'utilisation de la microscopie électronique démontre que le nombre de bactéries attachées à la paroi du rumen des bovins varie d'un animal à l'autre (McCowan *et al.*, 1980). Les profils DGGE peuvent varier de 40% entre individus d'une même espèce étudiée (Larue *et al.*, 2005). En revanche, cette variabilité entre individus n'a pas été observée chez certaines espèces (Scupham, 2007). Des différences inter-individuelles existent mais sont finalement de faible ampleur puisque la population bactérienne dominante est stable d'un individu à l'autre (Zoetendal *et al.*, 1998). Etant donné que les communautés bactériennes des fermenteurs digestifs abritent plusieurs centaines d'espèces, il est probable que les espèces présentes et leurs abondances respectives diffèrent, au moins relativement, d'un individu à l'autre chez une même espèce de mammifère herbivore. En outre, bien que les taxons bactériens puissent varier considérablement entre les rumens d'une même espèce de bovins, ils semblent être phylogénétiquement proches. Ceci suggère que l'exigence fonctionnelle imposée par la niche écologique du rumen sélectionne des taxons qui partagent potentiellement des caractéristiques

génétiques similaires (Jami and Mizrahi, 2012). Très peu d'informations sont disponibles par contre quant au rôle éventuel des facteurs génétiques de l'hôte sur la composition et la stabilité de la flore digestive. Chez le ruminant, une seule étude (Skillman *et al.*, 2004) montre que chez les agneaux jumeaux, la composition de la population méthanogène est similaire.

➤ Variabilité spatiale

Dans le rumen, les micro-organismes ne sont pas distribués de façon homogène et uniforme ; la répartition spatiale des communautés microbiennes entre la phase solide et la phase liquide du rumen est différente. Des études réalisées sur la vache (Tajima *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2006) et le mouton (Larue *et al.*, 2005) montrent que quel que soit le régime alimentaire, les communautés bactériennes de la phase solide contiennent plus de *Firmicutes* et de *Proteobacteria*. Une différence a été également notée entre les communautés microbiennes de la lumière du rumen (phase solide et liquide) et celles de la paroi ruminale, composée de 6 à 12 fois plus de *Firmicutes* et de 0,3 à 8 fois moins de *Bacteroidetes* que les communautés bactériennes lumineuses (Cho *et al.*, 2006; Sadet *et al.*, 2007).

➤ Variabilité liée à l'alimentation

L'aliment (nature, forme de présentation, quantité ingérée, fréquence de distribution) consommé par l'hôte conditionne l'apport nutritionnel et énergétique pour les micro-organismes du rumen. Au cours de sa biodégradation, il agit sur les paramètres physicochimiques du milieu (pH, potentiel redox, concentration des métabolites...) qui conditionnent à leur tour l'équilibre des communautés microbiennes présentes (Hernandez-Sanabria *et al.*, 2010). Les techniques moléculaires, telles que la DGGE, ont démontré que des changements dans le régime alimentaire affectent la communauté microbienne et l'expression des gènes dans le rumen (Callaway *et al.*, 2010; Taniguchi *et al.*, 2010; Jami and Mizrahi, 2012). En effet, la ration alimentaire apporte les substrats et la prédominance de certains substrats peut privilégier certaines bactéries.

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 (*Steprococcus 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).

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.

Des études plus récentes utilisant des techniques utilisant l'ADN 16S, ont montré des variations des communautés bactériennes du rumen chez les ruminants avec des changements de rations allant de rations riches en fibres vers des rations riches en concentrés (Zened *et al.*, 2013). Les bovins alimentés avec une ration riche en fibres possèdent une population bactérienne ruminale majoritairement composée par le phylum *Fibrobacteres* alors que le phylum *Bacteroidetes* est majoritaire chez des animaux recevant une ration riche en concentrés (Fernando *et al.*, 2010). De même, une autre étude montre, avec une analyse des populations bactériennes du rumen par pyroséquençage, que le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* diminue quand les rations des animaux sont de plus en plus riches en concentrés, en même temps qu'une augmentation du genre *Bacteroides* et une diminution du genre *Succinivibrio* et une majorité de *Prevotella* chez les animaux avec la rations la plus riche en concentrés (Callaway *et al.*, 2010).

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.

➤ **Adaptation à des composés toxiques**

L'une des caractéristiques des ruminants réside dans leur capacité à acquérir une tolérance à des concentrations croissantes de substances toxiques dans la ration. Dans certains cas, l'acquisition de cette tolérance peut être imputée à des changements dans la population microbienne ruminale, qui conduit à améliorer le rendement de la dégradation des toxines (Dawson and Alison, 1988). Ces variations de population peuvent être considérées comme des moyens d'adaptation aux changements environnementaux.

Cette adaptation à des composés toxiques est multiple. C'est le cas, entre autres, des oxalates. Les ruminants nourris avec des quantités augmentant progressivement d'oxalate développent une tolérance à des quantités plus importantes d'oxalate, grâce à l'amélioration du rendement de dégradation de l'oxalate (Dawson and Alison, 1988). La capacité d'utilisation de l'oxalate comme source d'énergie est rare parmi les microorganismes anaérobies ruminants. Cette niche écologique semble n'être occupée que par une unique bactérie, *Oxalobacter formigenes* (Dawson *et al.*, 1980). L'augmentation progressive des quantités apportées à l'animal favorise la sélection de cette bactérie, expliquant ainsi la capacité des ruminants à s'adapter et finalement à tolérer des régimes contenant des quantités d'oxalate qui seraient létales pour des animaux non adaptés (Belenguer *et al.*, 2013).

3.3. Biotransformation des constituants des aliments dans le rumen

3.3.1. Les glucides du rumen

Les glucides présents dans le rumen sont d'origine alimentaire. Ils forment les composants majoritaires des aliments d'origine végétale et sont généralement classés en deux catégories : les glucides pariétaux et les glucides cytoplasmiques, dont on distingue aussi les glucides de réserves.

➤ **Les glucides pariétaux**

La paroi des cellules végétales est composée de polymères souvent complexes, d'autant plus nombreux en proportion que la cellule est âgée. Ils sont responsables de la rigidité des végétaux, ils ne sont pas hydrolysables par les enzymes digestives des êtres vivants supérieurs mais sont dégradés par les microorganismes cellulolytiques (Nocek and Tamminga, 1991). Ils se trouvent en grande proportion dans les tiges des fourrages et des enveloppes des graines.

- **La cellulose** est le polysaccharide le plus abondant et le plus largement répandu dans la nature. Elle joue un rôle de soutien et représente le constituant principal des parois des plantes fourragères. La cellulose est un polymère linéaire constitué d'unités de glucose reliées entre elles par des liaisons β 1-4 glycosidiques. Ces liaisons osidiques confèrent à la cellulose une structure tridimensionnelle très résistante par le biais d'un réseau de liaisons hydrogène intramoléculaires et intermoléculaires qui ne peuvent être rompues, que par des enzymes bactériennes : les cellulases, caractéristiques du microbiote des ruminants. Par sa nature, la cellulose possède une structure partiellement cristalline, rigide peu réactive et de plus insoluble dans de nombreux solvants conventionnels. La cellulose possède aussi des régions cristallines organisées en microfibrilles (Figure 2) ainsi que des zones dites amorphes, beaucoup plus réactives (Jarrige *et al.*, 1995; Chambon, 2011).

- **Les hémicelluloses** sont systématiquement liées et enchevêtrées à la cellulose pour constituer la base de la paroi végétale. Elles sont moins résistantes à l'hydrolyse que la cellulose et elles ont une composition beaucoup plus variée. Leur hydrolyse peut libérer un pentose (principalement arabinose et xylose) ou un hexose (glucose, mannose et galactose). Les hémicelluloses se différencient de la cellulose par la présence simultanée de liaisons β 1-4, β 1-3 et α 1-6 (Jean-Blain, 2002; Himmel, 2009).

- **La lignine** est une structure polyphénolique. Elle peut incruster l'ensemble cellulose – hémicellulose de façon variable dans la paroi végétale. La lignine est liée aux hémicelluloses; par des liaisons qui ne sont pas connues avec précision. L'organisation s'effectue autour des micros fibrilles de cellulose, et aboutit à un treillis dense et mécaniquement résistant. La lignine sert donc de ciment entre la cellulose et l'hémicellulose, conférant une plus grande résistance aux parois végétales (Chambon, 2011). La teneur en lignine est un facteur limitant à la dégradation des parois végétales car elle n'est pas digestible. Sa teneur augmente avec l'âge de la plante et son développement. En plus de

leur faible digestibilité, les parois lignifiées résistent longtemps à la dégradation microbienne et à la mastication. L'ensemble cellulose - hémicellulose - lignine constitue les fibres dites insolubles (Jarrige *et al.*, 1995).

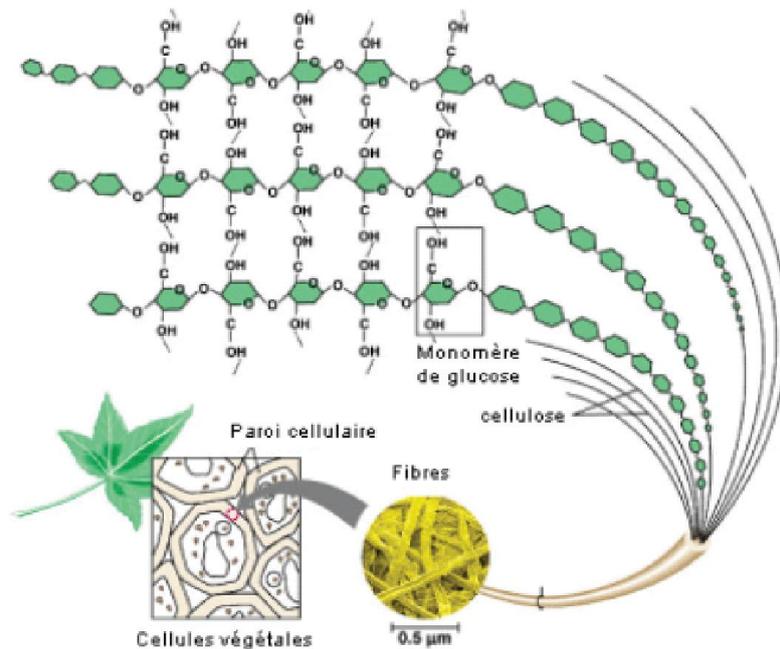


Figure 2. Des cellules végétales aux microfibrilles de cellulose (Chambon, 2011)

- **Les substances pectiques**, ou pectines, forment l'ensemble des fibres dites solubles. Ce sont des polymères d'acides uroniques et d'oses, principalement sous formes de polymères d'acide α -galacturoniques et de rhamnose liés par des liaisons α -1-4. Leur hydrolyse est donc rapide et ils sont facilement dégradables par la microflore ruminale (Grenet and Besle, 1991).

Les glucides pariétaux ne peuvent pas être hydrolysés par les enzymes glycolytiques sécrétées par le tube digestif des mammifères. En effet, elles ont une action α -glycosidase mais non β -glycosidase. Cependant, ils peuvent être dégradés par les enzymes sécrétées par le microbiote ruminal, capable de produire des β -glycosidases.

➤ **Les glucides cytoplasmiques**

Ils comprennent les glucides hydrosolubles et les polyholosides de réserve (amidon). Ces glucides peuvent être hydrolysés par les enzymes sécrétées par le tube digestif de

l'animal. Ils se trouvent en grande quantité dans la plupart des aliments dits « concentrés énergétiques » et un peu dans les fourrages jeunes.

- **Les glucides hydrosolubles** : comprennent les oses et les diholosides. Ils contribuent directement au métabolisme de la cellule végétale et sont très rapidement fermentés. Ils représentent moins de 10% des rations et sont présents dans les feuilles et les tiges jeunes. Pour les oses, on peut retrouver des pentoses (dont le fructose) ou des hexoses (dont le glucose) dans les vacuoles de la cellule végétale. Ces glucides sont des intermédiaires du métabolisme de la cellule végétale (Jarrige *et al.*, 1995). Concernant les diholosides, le saccharose est un constituant important de la sève élaborée : il est une forme de transport du carbone et de l'énergie (Jarrige *et al.*, 1995).

- **Les glucides de réserve** : Le principal glucide de réserve dans les plantes alimentaires est l'amidon : il est stocké dans des organes de réserve tels que les grains, les tubercules caulinaires et les racines. L'amidon est constitué essentiellement d'une fraction glucidique (99%), c'est un polyholoside constitué de fractions variables d'amylose et d'amylopectine reliées entre elles par des liaisons hydrogènes. L'amylose résulte de la polymérisation de molécules de glucose (entre 500 et 20 000) liées par des liaisons de type α 1-4. En moyenne, l'amylose représente de 20 à 30% du poids total de l'amidon. L'amylopectine est un polymère ramifié en grappe dont la structure est proche de celle du glycogène, c'est-à-dire un polymère de glucose formé par des liaisons de type α 1-4 et α 1-6. Elle représente en moyenne 70 à 80% du poids de l'amidon.

L'amidon est stocké dans les cellules sous forme d'amyloplastés : ceux-ci sont constitués de différentes couches concentriques d'amidon autour d'un hile. L'accumulation des couches successives d'amidon donne un grain intracellulaire, d'aspect souvent zoné et de forme caractéristique de chaque espèce végétale. Les plastés sont des organites des cellules végétales et à ce titre possèdent une enveloppe externe composée de lipides et de protéines. Ces protéines sont plus ou moins dégradables. Il est ainsi possible de parler d'amidon lent (sorgho, maïs) ou rapide (orge, blé, triticales) en fonction de sa vitesse de dégradation. Les amyloplastés se retrouvent dans les cellules des organes de réserve de la plante.

3.3.3. Digestion des glucides

La dégradation microbienne des glucides dans le rumen s'effectue en deux phases : l'hydrolyse, puis la fermentation (Figure 3).

➤ Adhésion et digestion extracellulaire des glucides alimentaires

Les bactéries se fixent initialement aux fibres alimentaires. Les tissus facilement dégradables, à l'exemple du parenchyme, sont rapidement colonisés par les bactéries tandis que les tissus peu dégradables, tel le sclérenchyme, le sont moins. Certains protozoaires font de même, cependant, en général, ils ingèrent de petites particules alimentaires en suspension. Les champignons utilisent leur rhizoïde pour pénétrer en profondeur les fragments végétaux (Jouany, 1994), ils coloniseraient préférentiellement les tissus lignifiés (Grenet and Besle, 1991).

Ces microorganismes ruminiaux hydrolysent dans un premier temps les glucides végétaux en sécrétant des polysaccharidases (cellulases, hemicellulases, pectinases, amylases) et oligosaccharidases (α -D ou α - β -D-glucosidases, β -D-xylosidases, β -D-galactosidases, β -D-cellobiosidases). Les liaisons entre les oses simples qui composent les polyholosides sont ainsi rompues, libérant alors des unités de glucides simples ou oses (Jouany, 1994), qui vont pouvoir être absorbés et fermentés par les microorganismes du rumen.

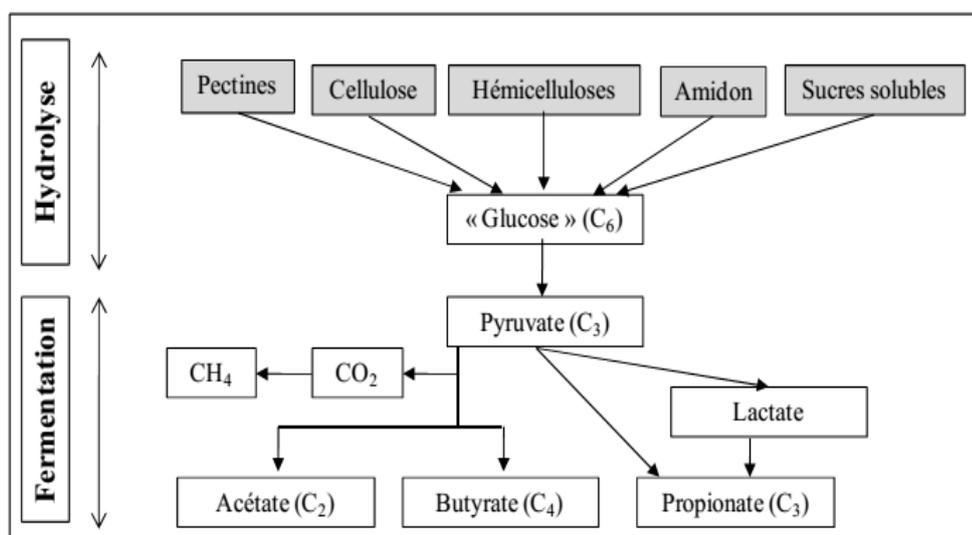


Figure 3. Résumé des principales voies des fermentations ruminales des polymères glucidiques.

➤ Fermentations

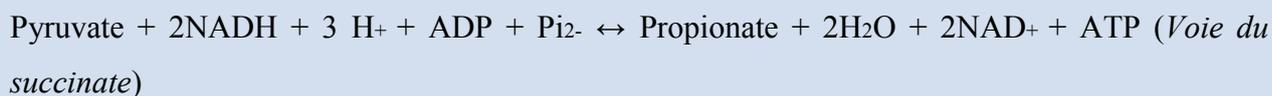
Les sucres libérés par hydrolyse sont absorbés, puis fermentés en pyruvate par les voies d'Emden-Meyerhof et des pentoses phosphates. A partir de l'acide pyruvique, plusieurs voies métaboliques sont alors possibles, aboutissant à la formation des AGV (Andersen *et al.*, 1999), principalement les acides : acétique (C₂), propionique (C₃), butyrique (C₄), valérique (C₅) et caproïque (C₆) et leurs isomères, avec dans certains cas de l'acide lactique et des gaz (dioxyde de carbone, dihydrogène et méthane). L'énergie, libérée sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), permet l'entretien et la croissance microbienne (Grenet and Besle, 1991). Les principales équations de ces différentes voies sont résumées dans le Tableau 6. Ces voies fonctionnent simultanément et dans des proportions variables, en fonction du type de régime.

Tableau 6. Principales équations stoechiométriques simplifiées des fermentations dans le rumen (Offner et al., 2006).

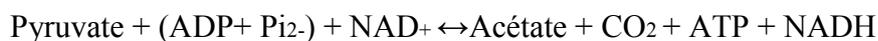
Pyruvate (glycolyse) :



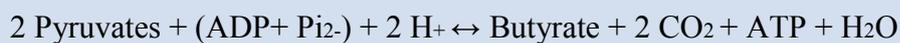
Propionate :



Acétate :



Butyrate :



Valérate :



Par ailleurs, l'hydrogène produit lors de la dégradation des glucides est utilisé dans différentes voies métaboliques résumées dans la figure 4 (Demeyer *et al.*, 2000). *In vitro*, 48 % de l'hydrogène moléculaire serait impliqué dans l'élaboration du CH₄, 33 % dans la synthèse des AGV impairs, 12 % dans les synthèses microbiennes et 2 % dans la saturation des acides gras (Czerkawski *et al.*, 1986).

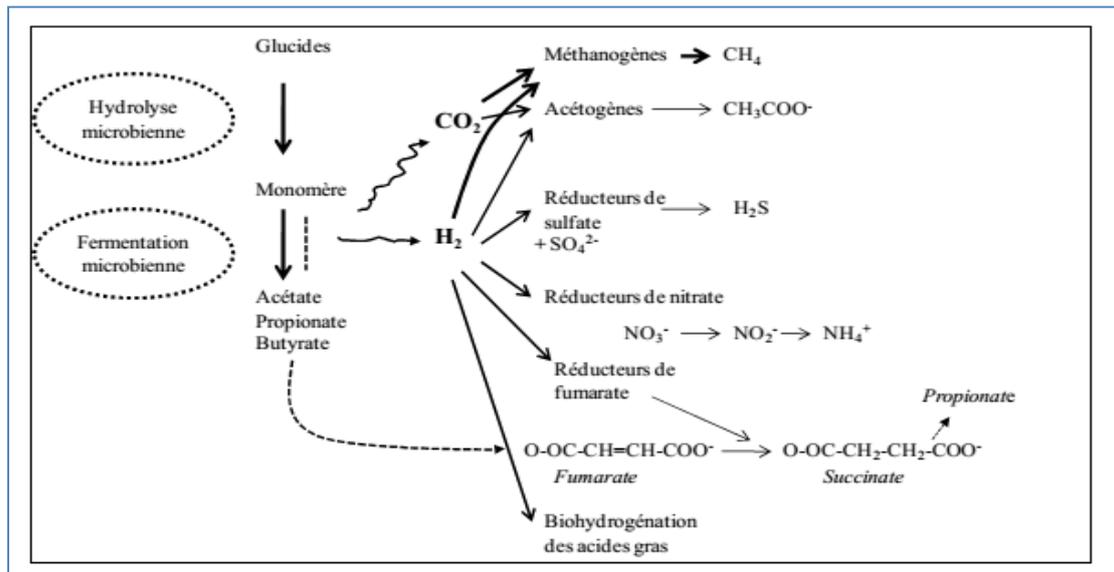


Figure 4. Schéma des fermentations des glucides dans le rumen et des voies d'utilisation de l'hydrogène (Morgavi *et al.*, 2010).

➤ Produits terminaux et principaux facteurs de variation

Avec des rations équilibrées, le C₂ représente entre 60 et 65 % des AGV ruminiaux, le C₃ de 18 à 20 %, le C₄ de 10 à 15 % et les AGV mineurs de 2 à 5% (Andersen *et al.*, 1999).

Les proportions respectives en AGV dépendent de la nature de la ration et de la vitesse de dégradation du substrat. Une augmentation des teneurs en fibres provoque une augmentation de la proportion de C₂ ruminal car les bactéries fibrolytiques utilisent plutôt la voie du C₂. Une forte teneur en amidon, par exemple avec une forte proportion de céréales dans la ration, favorise la production de C₃ au détriment du C₂. La présence de glucides solubles (saccharose, lactose, inuline), contenus dans des aliments tels que les betteraves ou le lactosérum, augmente la proportion de C₄ (Grenet and Besle, 1991). De fortes proportions d'amidon (plus rapidement digéré que les fibres) dans la ration entraînent une forte production d'AGV ruminiaux. Cela peut créer une baisse rapide du pH ruminal, avec le risque de provoquer une acidose ruminale (Jean-Blain, 2002).

Le pH ruminal a également un effet sur les proportions d'AGV, sachant que les bactéries fibrolytiques se développent mieux à un pH supérieur à 6,5 et que les bactéries amylolytiques qui préfèrent un pH inférieur à 6. Un pH bas engendre des proportions de C₃ plus élevées, tandis qu'un pH élevé provoque de plus grandes proportions de C₂ (Jean-Blain, 2002). Le méthane représente environ 15% d'énergie perdue lors des fermentations ruminales. Il est produit en plus grande quantité, parallèlement à la voie du C₂ (Jouany, 1994).

➤ Absorption des AGV

Chez les ruminants, les AGV contribuent à environ 70% des besoins en énergie des animaux (Jouany, 1994). Ils sont principalement absorbés par l'épithélium des papilles ruminales mais également à travers les parois du feuillet et du réseau. Le C₃ est dirigé vers le foie où il constitue le principal substrat de la néoglucogenèse (Bobe *et al.*, 2004). Tandis que le C₂ et le β-hydroxybutyrate (issu de l'oxydation du C₄ dans l'épithélium ruminal), sont moins métabolisés dans le foie que le propionate. Ils sont des précurseurs de la synthèse *de novo* des AG du lait ou du tissu adipeux et constituent, par ailleurs, des substrats préférentiels dans les tissus en substitution du glucose (Nozière *et al.*, 2010).

3.3.3. Le métabolisme azoté

➤ Nature des constituants azotés

Les matières azotées alimentaires peuvent être séparées en deux catégories : les protéines, solubles ou non, et l'azote non protéinique (ANP). L'ANP regroupe des amides et des acides aminés libres (50% environ), ainsi que des bases azotées, des amines, du NH₃, de l'urée et des nitrates.

Les aliments d'origine végétale les plus riches en azote sont les graines oléagineuses et protéagineuses (jusqu'à 35% de la MS). Sous forme de tourteaux, la teneur en matières azotées total (MAT) peut atteindre 50% de la MS. Dans ces aliments, l'azote est en quasi-totalité sous forme de protéines. Les céréales sont plus pauvres en azote (environ 10% de MAT/MS), excepté sous forme de coproduits (drèches ou sons) qui concentrent l'azote de l'assise protéique et de l'albumen du grain par élimination de l'amidon (Jean-Blain, 2002).

La teneur en azote des plantes fourragères dépend tout d'abord du stade de végétation : en début de croissance, les graminées fourragères feuillues contiennent environ 20 % de MAT

dans la MS. Cette teneur diminue à 3 % dans les pailles de céréales et l'herbe sèche sur pied. Cette teneur dépend également de la nature botanique : le maïs fourrager est plus pauvre en azote que les légumineuses (Jarrige *et al.*, 1995).

Dans les plantes fourragères, 75 à 85% de l'azote est sous forme de protéines, 15 à 25% sous forme d'ANP. Les protéines se concentrent dans les feuilles et correspondent à 65 à 80 % de l'azote des feuilles : 55 à 65 % de celles-ci se retrouvent dans les chloroplastes, 20 à 35% dans le cytosol des cellules, le reste est réparti entre les mitochondries, le noyau et les parois. L'ANP est surtout présent dans les tiges où il représente 20 à 30 % de l'azote : on le retrouve notamment dans les vacuoles (Jarrige *et al.*, 1995). Il diffuse très vite dans le rumen, où il est rapidement dégradé en ammoniac et n'est utilisable par les ruminants qu'une fois transformé en protéines microbiennes (Jouany, 1994).

➤ Digestion de l'azote

Les protéines ingérées par l'animal sont dégradées par le microbiote ruminal et plus particulièrement par les bactéries et les protozoaires. Les bactéries ruminales ont une forte activité protéolytique par rapport aux protozoaires car cette activité est présente au niveau de leur paroi cellulaire, à l'inverse des protozoaires dont l'activité protéolytique est intracellulaire (Coleman, 1983).

La première étape du métabolisme azoté dans le rumen est la protéolyse. 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 (Ushida *et al.*, 1986; Wallace *et al.*, 1997). Les acides aminés présents dans le rumen sont désaminés majoritairement par les protozoaires pour former l'ammoniac (NH₃) et des squelettes carbonés dont des AGV ramifiés, en particulier isobutyrate et isovalérate (Jouany, 1994). L'activité uréolytique de certaines bactéries participe aussi à la production de NH₃, 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 préférentiellement). Ces protéines microbiennes sont ensuite digérées dans l'intestin grêle (Jouany, 1996). Les protéines microbiennes assurent 60 à 70 % de l'apport protéique des ruminants (Demeyer *et al.*, 2000).

L'urée produite dans le foie à partir du NH_3 ruminal peut être recyclée par la salive ou à travers la paroi du rumen, ou lorsque ces processus sont saturés, l'urée peut être éliminée par la voie du lait ou par l'urine. Ce processus de recyclage est essentiel dans le cas des rations pauvres en protéines ou en N dégradable. Une relation linéaire entre le NH_3 ruminal et l'urée du lait ou du sang a été déterminée (Sauvant *et al.*, 2001).

3.3.4. Le métabolisme lipidique

➤ Nature des constituants lipidique

En général, la ration des ruminants ne contient que 3 à 6% de lipides dans la matière sèche ingérée et, très exceptionnellement, plus de 10 %. Malgré leur faible quantité dans la ration, ils sont importants car ce sont des sources très intéressantes d'énergie, d'acides gras essentiels, de vitamines liposolubles et de pigments, ce qui leur confère un rôle nutritionnel important. En outre, ils ont une influence majeure sur la qualité organoleptique des produits animaux et aussi sur leur qualité diététique (teneurs en matière grasse, en cholestérol, en acides gras saturés et en acides gras polyinsaturés (AGPI) des deux familles n-3 et n-6 (Morand-Fehr and Tran, 2001).

Les lipides sont des biomolécules organiques insolubles dans l'eau, mais solubles dans les solvants organiques (éther, chloroforme, hexane, etc.) (Jean-Blain, 2002). Chez les végétaux, les lipides se localisent au niveau du chloroplaste des cellules. Les triglycérides se trouvent principalement dans les graines de céréales, les semences d'oléagineux et les graisses animales. Tandis que les glycolipides se trouvent principalement dans les fourrages (graminées et légumineuses).

Les acides gras des lipides végétaux possèdent de 14 à 18 carbones. Selon leur degré d'insaturation, on trouve les acides gras saturés qui sont les plus courants dans la matière grasse alimentaire : l'acide palmitique en C_{16} , l'acide stéarique en C_{18} , et pour les insaturés on trouve dans les triglycérides, les mono insaturés : l'acide oléique $\text{C}_{18:1}$ et parmi les poly insaturés : l'acide linoléique et l'acide linoléique. Les lipides des plantes contiennent de 70 à 80% d'acides gras insaturés et ils ont tendance à rester sous forme liquide (huiles).

Chez le ruminant, les lipides ne sont pas digérés dans le rumen, mais ils y sont hydrolysés et saturés. L'excès de lipides dans la ration a un effet négatif sur la digestion des

fibres et l'intensité de cette interférence dépend du degré de saturation des acides gras (Wattiaux, 1995).

➤ Digestion 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 (Vossenbergh 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. En effet, il a été montré chez l'homme que les AGS (acides laurique, myristique et palmitique) ont un rôle procarcinogène et pro-athérogène, alors que les insaturés (acides oléique, polyinsaturés oméga 3) ont un rôle anti-carcinogène et anti-athérogène (Williams, 2000).

3.3.5. La méthanogenèse

Les nombreuses voies fermentaires ruminales conduisent à la formation de gaz (CO_2 , N_2 , H_2 , H_2S : figure 4) qui sont principalement éliminés par respiration et/ou éructation régulières. Une partie de ces gaz se dissout dans le liquide ruminal (Popova *et al.*, 2011).

Les Archées du rumen utilisent comme substrats les formes dissoutes de l'acétate, du méthanol, de l' H_2/CO_2 , du formate et des méthylamines pour produire du méthane (CH_4) (Demeyer and Fievez, 2000)). Les voies métaboliques de la méthanogenèse utilisées par les archées du rumen sont au nombre de trois : la voie hydrogénotrophe (via le CO_2/H_2), la voie méthylotrophe (via le méthanol et ses dérivés) et la voie acétoclaste (via l'acétate et ses dérivés) (Liu and Whitman, 2008; Popova *et al.*, 2011). Dans le rumen, il est considéré que la voie hydrogénotrophe est la voie principale.

Bien que le CH_4 soit un produit naturel des fermentations ruminales, sa production représente une perte énergétique de l'ordre de 2 à 12% de l'énergie ingérée par l'animal (Popova, 2011). Il est rejeté dans l'atmosphère essentiellement par voie orale (95%) au cours

d'éruclations régulières ou par les poumons, après passage dans le sang. A l'échelle de la ferme, la contribution du CH₄ aux émissions de gaz à effet de serre est comprise entre 40 et 60%, où le CH₄ d'origine entérique représente 80% et les 20% restants proviennent des effluents d'élevage (Gill *et al.*, 2010).

4. Méthodes d'étude de la communauté microbienne du rumen

Pendant longtemps, l'écosystème ruminal était étudié à l'aide des méthodes classiques et jusque là seules disponibles des cultures microbiennes. Méthodes lourdes à mettre en œuvre et présentant l'inconvénient majeur de ne mettre en évidence que les populations cultivables qui ne représenteraient que 20 à 40% de la totalité des espèces présentes (Suau *et al.*, 1999). Au cours des dernières années, sont apparus des outils d'analyses moléculaires et ils se sont considérablement développés.

L'analyse des séquences des ARN ribosomiaux (ARNr) 16S permet d'améliorer la description de la diversité génétique et des relations phylogénétiques (Case *et al.*, 2007). Le développement de la métagénomique offre des perspectives pour, par exemple, identifier de nouveaux gènes codant pour des enzymes ou avoir accès à des bactéries, jusqu'alors insoupçonnées car impossibles à cultiver (Singh *et al.*, 2008).

4.1. Choix du gène cible

La connaissance des espèces composant un microbiote consiste à mettre en évidence le polymorphisme d'un gène entre les espèces microbiennes. Le gène de la petite sous-unité de l'ARN ribosomique (*rrs*) (16S pour les procaryotes et 18S pour les eucaryotes) est la cible la plus couramment utilisée pour caractériser la diversité microbienne du rumen (Case *et al.*, 2007). Pour les archées méthanogènes, le gène codant la méthyle coenzyme M réductase (*mcrA*) de la voie de la méthanogenèse s'est imposé également comme un marqueur phylogénétique majeur (Luton *et al.*, 2002), le plus souvent utilisé dans les études du microbiote ruminal (Denman *et al.*, 2007). Récemment, la diversité des archées méthanogènes du rumen a été étudiée par l'utilisation du gène codant les protéines chaperonnes de type II (Chaban and Hill, 2011). Des gènes moins universellement distribués, indicatifs de certaines fonctions, ont également été utilisés pour étudier certaines parties de la communauté microbienne. Par exemple, les gènes codant la formyl tétrahydrofolate synthétase (*fhs*) et l'acyl-CoA synthétase (*acsB*) ont été utilisés pour identifier des espèces potentiellement homo-acétogènes dans le rumen (Gagen *et al.*, 2010; Henderson *et al.*, 2010).

La quantification d'espèces microbiennes spécifiques par l'amplification en PCR du rrs génère des informations sur la présence et la densité des microorganismes cibles dans le rumen. Les variations temporelles et spatiales dans le nombre des copies rrs induites par des conditions différentes peuvent ensuite être associées à des paramètres biochimiques et fonctionnels de l'écosystème. Cette approche peut fournir des informations utiles à l'évaluation de l'effet des traitements alimentaires sur le microbiome du rumen, par exemple, les changements liés à des régimes acidogènes chez les vaches laitières (Khafipour et al., 2009). Cependant, les espèces pour lesquelles des amorces de PCR spécifiques sont disponibles sont généralement celles qui peuvent être cultivées et il ne s'agit pas nécessairement des plus abondantes. En effet, il a été démontré que la plupart des espèces bactériennes du rumen auparavant jugées importantes ne représentent qu'une faible proportion de la communauté bactérienne totale (Stevenson and Weimer, 2007), le même constat s'applique probablement aussi aux archées. De plus, il n'existe aucune preuve du lien entre la capacité de cultiver une espèce microbienne donnée et son importance fonctionnelle dans l'écosystème. Les exigences de croissance des microorganismes et leur capacité à s'adapter aux conditions de culture en laboratoire sont les caractéristiques intrinsèques qui définissent la possibilité de l'isolement in vitro. Récemment, l'application de méthodes simples a permis de cultiver des microorganismes du rumen qui n'avaient pas été isolés auparavant (Koike et al., 2010; Kenters et al., 2011), laissant ainsi penser que l'approche de la culture pure est toujours utile pour comprendre les propriétés des taxons individuels. En particulier, les expérimentations contrôlées visant à tester les hypothèses concernant la fonction des gènes et la réponse microbienne à des stimuli est largement simplifiée lorsque les cultures sont disponibles. Il reste que globalement les recherches basées sur la culture sont toujours valides et peuvent être complémentaires des approches de biologie moléculaire permettant d'étudier la structure et la fonction des communautés complexes.

4.2. Techniques moléculaires

Un certain nombre de techniques moléculaires ont été mises au point dans le but d'obtenir, de manière rapide, une image de la diversité microbienne d'un écosystème. Parmi celles-ci, on peut distinguer celles basées sur d'hybridation de sondes nucléiques, d'autres ont pour support l'analyse de fragments d'ADN et sont appelées méthodes d'empreintes moléculaires ou une estimation à partir de séquençage aléatoire, et la métagénomique (analyse de séquences obtenues à partir d'un échantillon comprenant plusieurs espèces microbiennes ; Morgavi *et al.*, 2013).

L'utilisation des techniques d'empreintes moléculaires, dont les plus communément utilisées pour le rumen sont le polymorphisme de conformation des simples brins (SSCP) (Michelland *et al* 2009), l'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE) (Popova *et al.*, 2011), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) et sa variante terminal-RFLP (t-RFLP) (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2010), ainsi que l'analyse automatique de l'espace intergénique ribosomal (ARISA) (Welkie *et al.*, 2010) peuvent fournir de plus amples informations sur la structure du microbiome du rumen. Ces méthodes utilisent une approche non ciblée et sont capables de relever les différences et les similitudes dans la communauté de divers groupes microbiens présents dans le rumen, associés à l'espèce ruminante hôte, au régime alimentaire et à la conversion alimentaire (Sadet *et al.*, 2007; Suen *et al.*, 2011), mais elles ne fournissent pas d'informations de séquence.

4.2.1. La PCR quantitative, en temps réel (qPCR)

La quantification des microorganismes de l'environnement par usage de la qPCR est devenue aujourd'hui une procédure standard, grâce à sa sensibilité et sa répétitivité. Cette technique est appliquée avec succès également sur des échantillons du rumen pour quantifier les bactéries (Denman and McSweeney, 2006; Mosoni *et al.*, 2011), les archées méthanogènes (Denman *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009) ou encore les protozoaires et les champignons (Denman and McSweeney, 2006). Cette popularité est reflétée par le nombre prodigieux de publications présentant des résultats qPCR (Popova, 2011).

La qPCR est une 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 (Poitras and Houde, 2002). Deux types de techniques existent pour ce faire : 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 5A). La technique de la TaqMan fait intervenir lors de la PCR une sonde Taqman (composée d'oligonucléotides uniques doublement marqués avec des fluorochromes en 5' par le reporter et en 3' par le quencher), en plus des deux amorces (Figure 5B). 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.

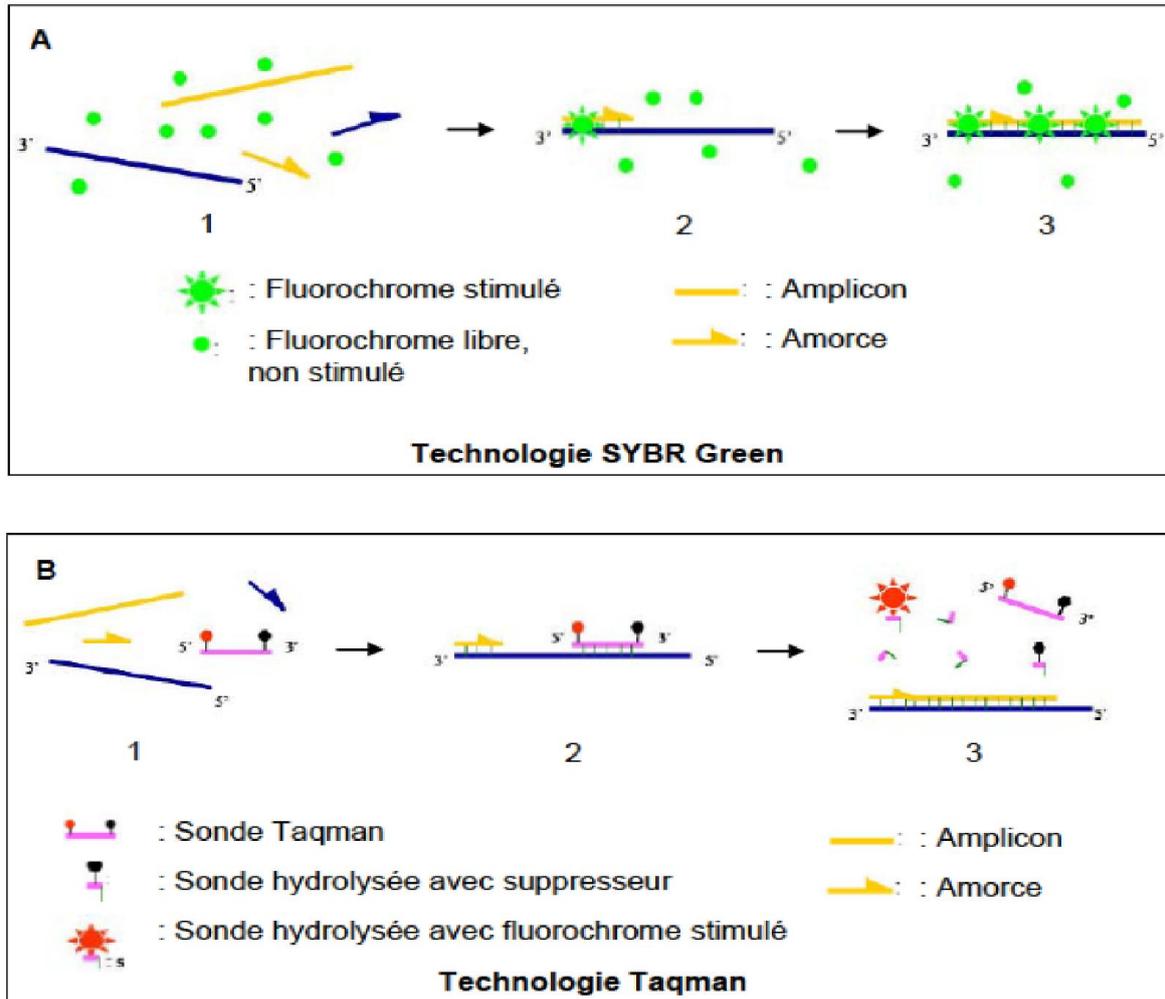


Figure 5 A et B. Principe de la qPCR par SYBR Green (A) et par Taqman (B). Les phases de la PCR quantitative sont : 1) Phase de dénaturation de l'ADN cible et mise en présence des séquences à amplifier avec le SYBR GREEN ou la sonde TaqMAN en fonction de la technique, les dNTP et la polymérase, 2) Phase d'hybridation ou d'appariement des amorces, 3) Phase d'élongation. Ce cycle est répété plusieurs fois (Michelland, 2009)

4.3. Intérêt de la caractérisation moléculaire du microbiote ruminal

Il existe peu d'études alliant la microbiologie du rumen à des recherches sur la nutrition des ruminants. Il est vrai que la connaissance des microorganismes du rumen n'est pas strictement nécessaire pour alimenter ou élever des ruminants. Cependant, une compréhension approfondie des fonctions du microbiome gastro-intestinal et de son interaction avec l'animal hôte pourrait optimiser la production de viande et de lait de façon plus durable et économiquement et écologiquement acceptable. La richesse d'informations sans précédent

que l'on peut obtenir en utilisant des méthodes « omiques » (technologies de séquençage génomique et métagénomique de deuxième génération, métatranscriptomique et métabolomique) pour caractériser l'écosystème microbien digestif, associée aux génomes séquencés des bovins et des ovins, permet de considérer ce « super-organisme » qu'est le microbiote des ruminants comme un système intégral. Ceci devrait permettre de nouvelles avancées sur des questions importantes liées à la production animale, telles que l'efficacité de la digestion des fourrages et les émissions de méthane des ruminants (Morgavi *et al.*, 2013).

DEUXIÈME PARTIE :
MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

Les substrats retenus pour cette étude sont récoltés d'une région semi-aride de Constantine, située dans le nord-est algérien à 36,17 de latitude nord, 6,37 de longitude Est et à une altitude moyenne de 693 m. Le climat de la région est semi-aride, avec des précipitations irrégulières qui atteignent en moyenne 350-700 mm par an. Les températures moyennes oscillent entre -0,3°C en hiver et 37,3 °C en été.

Trois plantes sont utilisées dans cette étude : le cactus inerme (*Opuntia ficus indica* f. *inermis*), *Acacia nilotica* (L.) Willd. ex Delile et *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. f. (formerly *Acacia cyanophylla* Lindl.). Le choix de ces espèces arbustives est basé sur leur grande disponibilité, leur grande résistance à la sécheresse et leur capacité de produire une biomasse des espèces utilisées dans des conditions de marginalité absolue des sols, constituant ainsi une ressource alimentaire pour le bétail. L'étude est menée comparativement à un substrat témoin de référence, le foin de vesce avoine, largement utilisé à cette fin dans des études comparables.

La collecte des plantes est effectuée en plein hiver pour l'*Opuntia* et en début d'automne pour les deux espèces d'*Acacia*. Entre six et huit échantillons sont prélevés de différents spécimens d'arbres ou d'arbustes des espèces sélectionnées, afin d'avoir un échantillon représentatif de la biomasse végétale totale. Les prélèvements de la partie aérienne (raquettes et feuilles) des plantes fourragères sont réalisés d'une manière aléatoire. Les raquettes de cactus inerme sont coupées à l'aide d'une machette, en petits cubes d'une taille approximative de 50 mm x 30 mm. Les feuilles des Acacias sont coupées aux ciseaux. Le foin de vesce avoine est fourni par l'institut technique des grandes cultures (I.T.G.C. de Constantine). Il est récolté au stade vitreux pour l'avoine et au stade de formation de gousses pour la vesce. Les échantillons d'une même espèce sont conservés dans des sachets et transportés de cette manière au laboratoire.

Les échantillons sont séchés à 50°C dans une étuve ventilée afin d'arrêter toute activité biologique pouvant altérer la nature des substrats (Makkar, 2003). Les échantillons sont ensuite moulus et calibrés à travers un tamis de 1 mm. Les fourrages sont conservés à température ambiante dans des récipients clos jusqu'à leur utilisation.

2. Protocole expérimental

2.1. Analyse chimique des substrats

Tous les dosages sont effectués en triple et les résultats sont rapportés par rapport à 100g de matière sèche (% MS).

2.1.1. Détermination de la matière sèche

La matière sèche est déterminée après dessiccation d'1g de chaque échantillon dans une étuve ventilée à 105°C jusqu'à poids constant. La différence de poids correspond à la perte d'humidité et le résidu représente donc la teneur en matière sèche (AOAC, 1990).

2.1.2. Détermination des matières minérale et organique

Un gramme d'échantillon, préalablement séché est placé dans un creuset en porcelaine taré, puis incinéré dans un four à moufle à 550°C pendant 6 heures. La perte de poids observée lors de la calcination correspond à la matière organique et le résidu aux cendres (AOAC, 1990).

2.1.3. Détermination des matières grasses

Les matières grasses (MG) des substrats sont obtenues par extraction épuisante directe dans un appareil de type Soxhlet, au moyen d'un solvant, puis élimination du solvant par distillation et dessiccation et finalement pesée du résidu (AOAC, 1990).

3 à 5 g de l'échantillon à analysé sont introduits dans l'extracteur Soxhlet , ce dernier est ensuite placé sur un ballon sec préalablement pesé puis rempli d'une quantité suffisante du solvant d'extraction (hexane). Un réfrigérant est adapté au-dessus de l'extracteur.

A l'aide d'un chauffe ballon, le solvant est porté à ébullition, la vapeur de ce dernier passe par la partie intermédiaire où elle se condense grâce au réfrigérant. Le liquide obtenu tombe dans le corps de l'extracteur et solubilise la substance à extraire. Lorsque l'extracteur est suffisamment rempli de solvant, le siphonage s'amorce, ce qui provoque le retour du liquide dans le ballon, accompagné de l'huile extraite. Le solvant continue alors de s'évaporer, alors que les substances extraites restent piégées dans le ballon, leur température d'ébullition étant nécessairement nettement supérieure à celle du solvant extracteur. L'extraction se fait

pendant 6 à 8 heures. Le ballon contenant le résidu est ensuite placé dans l'étuve à 102°C pendant 3 heures, puis refroidi dans le dessiccateur et enfin pesé.

La teneur en MG est obtenue par l'équation suivante :

$$\%MG = (x - y)/z * 100$$

x: Poids du ballon + résidu après 3 heures à l'étuve(g).

y: Poids du ballon vide (g).

z: Poids de la prise d'essai (g).

2.1.4. Détermination de la matière azotée totale

L'azote total contenu dans les fourrages est dosé par la méthode de Kjeldahl (AOAC, 2000). Pour cela, un auto-analyseur est utilisé. Cette méthode de dosage comporte deux étapes (minéralisation et distillation), elles sont suivies d'un dosage par titrimétrie.

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

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

$$N = \text{Vol (Hcl) (ml)} * 14 * 0,1 / \text{Prise d'essai} * MS(\%)$$

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

2.1.5. Détermination des composés de la paroi végétale

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

➤ **Dosage de la fraction NDF (Neutral Detergent Fibre)**

La fraction NDF correspond aux polysaccharides complexes à fermentation lente, provenant des parois cellulaires des fourrages (cellulose, hémicellulose et lignine).

Cette méthode au détergent neutre repose sur la solubilisation à pH neutre des protéines par le lauryl-sulfate de sodium et des substances pectiques par l'EDTA. L'appareil utilisé est un appareil de digestion automatique du type Fiber analysis (marque ANKOM Technology Corporation, USA). Le traitement avec la solution NDS permet de solubiliser les polymères de glucose non cellulosique.

- Préparation de la solution au détergent neutre (NDS)

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 ; 10,0 ml tri éthylène glycol sont dissoutes dans 1000 ml d'eau distillée. La solution est chauffée afin de faciliter la dissolution puis le pH est ajusté (solution NaOH 1N) entre 6,9 à 7,1.

- Préparation de l'échantillon

Dans des sacs Daisy, libellées, sont introduits 500mg du substrat préalablement séché. Les sacs sont scellés par une thermoscelleuse (ANKOM 220 v 50/60 HZ Heat Sealer ; ANKOM Technology Corp, 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 vidangée de la solution NDS. Les sacs sont alors rincés 3 fois avec de l'eau distillée à 80°C environ pendant 10 minutes. Les sacs sont ensuite lavés à l'acétone et mis à sécher jusqu'à poids constant dans une étuve réglée à 105°C.

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

L'ADF est principalement composé de cellulose, de lignine et de protéines endommagées par la chaleur. Elle est reliée à la digestibilité des fourrages et elle est le facteur majeur des calculs du contenu énergétique des aliments. La solution ADS permet d'hydrolyser à chaud les constituants cytoplasmiques, les hémicelluloses et les protéines. Le détergent cationique, bromure de cetyl trimethyl ammonium, permet la séparation des protéines du résidu fibreux.

- Préparation de la solution ADS (Acid Detergent Solution)

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

- Préparation de l'échantillon

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

➤ Dosage de la fraction ADL (Acid Detergent Lignin)

La lignine représente la fraction des NDF complètement indigestes. Sa détermination comporte un traitement avec de l'acide sulfurique concentré. Le résidu correspond, en plus des cendres, à la lignine brute. Les sacs récupérés, après analyse ADF, sont traités par l'acide sulfurique concentré à 72% pendant trois heures. Les sacs sont rincés trois fois avec de l'eau distillée chaude pendant 10 minutes. Ils sont ensuite lavés à l'acétone et mis à sécher jusqu'à poids constant dans une étuve réglée à 105°C.

➤ Estimation des hémicelluloses et cellulose

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

2.1.6. Détermination des NFC (Non Fibre Carbohydrates)

Les carbohydrates non fibreux représentent les glucides alimentaires hautement digestibles, y compris l'amidon, la pectine et les sucres. Ils sont le plus rapidement dégradables dans le rumen par rapport aux glucides de la paroi cellulaire mesurée comme NDF. Le Contenu NFC n'est pas mesuré directement mais il est calculé par la différence suivante (Mertens, 1997) :

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

2.2. Analyse phytochimique des composés secondaires

2.2.1. Analyse quantitative des composés phénoliques

➤ Procédé d'extraction

L'extraction est réalisée selon le procédé décrit par Makkar (2003). 200 mg d'échantillon sec sont délipidés avec 10ml d'une solution aqueuse d'acétone (70%). Le mélange est soumis à un traitement aux ultrasons pendant 20min à température ambiante. Le contenu est ensuite transféré dans des tubes puis il est centrifugé durant 10min à 3000g et à 4°C. Le surnageant est récupéré et maintenu dans de la glace, tandis qu'une deuxième extraction identique au précédente est effectuée sur le culot à fin d'extraire les polyphénols résiduels et a fin un dosage plus exhaustif.

➤ Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits des plantes est déterminée par le procédé de Makkar *et al.* (1993), en utilisant le réactif de Folin–Ciocalteu. Une aliquote de 0,1 ml de l'extrait est mélangée avec 0,5 ml d'eau distillée ; 0,25ml de Folin Ciocalteu (1N) et 1,25 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3 , 20%). Le mélange est ensuite agité dans un vortex. L'absorbance est mesurée à 725 nm et les résultats sont rapportés à une courbe étalon standard et exprimés en équivalent d'acide tannique/Kg de MS.

➤ Dosage des tannins totaux

Cette méthode se base sur la quantification des tanins totaux par leur précipitation, grâce à l'utilisation d'un chélateur chimique : le polyvinylpyrrolidone (PVPP) (Makkar *et al.*, 1993). 100 mg de PVPP sont introduits dans des tubes à essai et sont additionnés de 1ml d'eau distillé et 1ml d'extrait de l'échantillon. La solution, agitée au vortex, est maintenue à 4°C pendant 15min. Elle est agitée une seconde fois puis centrifugée à 3000g pendant 10min. Après centrifugation, le surnageant, qui en résulte, est utilisé pour la détermination des tanins totaux qui correspondent à la différence entre les phénols totaux (mesurés comme précédemment) avant et après traitement avec le PVPP. Elle est exprimée en équivalents g d'acide tannique/kg MS.

➤ **Extraction de tannins condensés libres**

La technique d'extraction est déterminée selon le procédé d'Ammar *et al.* (2009). Dans des tubes à essais, 200mg du résidu sec sont pesés avec 15 ml d'une solution d'acétone 70%. Les tubes sont dégazés avec le gaz N₂ inerte et agités. Ensuite, les tubes sont laissés dans un bain d'eau glacé à 4°C. Les tubes sont agités pendant 15min puis ils sont fermés et portés dans un bain à ultrasons à 4°C pendant 20 min. Ensuite, les tubes sont agités vigoureusement avec le vortex et centrifugés à 3000g pendant 10min à 4°C. Le surnageant est repris avec des pipettes Pasteur (sans altération du résidu) dans des tubes à essais. Il constitue alors l'extrait original (EXT) qui contient les tanins extractibles ou tanins libres. Le surnageant repris dans le tube à essai est conservé à 4°C. Les tubes sont recouverts de feuilles d'aluminium pour éviter leur exposition à la lumière. Le résidu restant dans le tube de centrifugation (RES) est séché à 50°C pendant toute une nuit. Il est ensuite stocké à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation pour la détermination des tanins condensés attachés.

➤ **Dosage des tannins condensés (Proanthocyanidines)**

Cette analyse est réalisée selon la technique de Porter *et al.* (1985) avec les modifications de Makkar (2003), avec aussi l'utilisation des tanins condensés du quebracho comme standard.

- **Analyse des tanins condensés libre** : Dans des tubes libellés et pourvus de bouchon, 250 µl de l'extrait EXT récupéré pour 250 µl du solvant acétone (70% v/v) sont additionnés de 3 ml d'une solution de n- butanol-HCl (95%) et 0,1 ml d'une solution ferrique (2% de sulfate ferrique d'ammonium en HCl (2N)). Les tubes sont ensuite scellés et agités vigoureusement. Ils sont ensuite portés à ébullition dans un bain marie à 100°C pendant 60 min. Après refroidissement des tubes à l'abri de la lumière, les absorbances de ces solutions sont déterminées à 550 nm.

- **Analyse des tanins condensés attachés** : 15 ml de butanol-HCl et 0,5 ml de solution de Fer sont ajoutés directement sur le résidu sec (RES). Le mélange est ensuite agité vigoureusement puis porté à ébullition dans un bain marie (100°C) pendant 90 min. Après refroidissement des tubes à température ambiante, ils sont centrifugés à 3000g pendant 15 min. Le surnageant est pipeté dans des cuves en plastique et la densité optique est lue à 550 nm.

2.2.2. Teneur en oxalates totaux

Les oxalates totaux sont extraits dans un mélange eau distillée-acide chlorhydrique (6N) (1/ 19 : v/v) pendant 1h dans un bain marie bouillant. Les oxalates extraits sont dosés après oxydation par le permanganate de potassium (0,09N) en milieu acide sulfurique 1N à chaud (AOAC, 1990) (Annexe 01).

2.3. Fermentation *in vitro* des fourrages par le microbiote ruminal

La technique de fermentation *in vitro* utilisée dans ce travail est celle décrite par Menke *et al.* (1979).

2.3.1. Technique de production de gaz *in vitro*

Cette technique 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 et Steingass (1988). C'est une méthode rapide, simple, fiable et peu coûteuse, elle se base sur la mesure de la production des gaz (méthane et gaz carbonique) qui sont les produits fermentaire essentiels, résultants de la dégradation microbienne et induits par la production des acides gras volatiles (Blümmel et Orskov, 1993; Mould, 2003). Cette technique est préconisée comme un outil fiable pour la prédiction des performances métaboliques du microbiote ruminal par la détermination de la digestibilité et de la dégradation des fourrages et elle est aussi adaptée au suivi de la cinétique de leur fermentation. Elle permet parallèlement d'étudier l'activité biologique de substances anti-nutritionnelles qui affectent la biodisponibilité des nutriments dans les plantes fourragères (Getachew *et al.*, 2002).

➤ Description du système de fermentation de Menke

La fermentation est réalisée dans des seringues en verre de 100ml de capacité (Fortuna, Poulten and Graf GmbH, Wertheim, Germany) équipées d'embouts « Luer-Lock » (Fortuna Optima) pour éviter la perte des gaz produits pendant la fermentation. Les pistons des seringues sont lubrifiés avec de la vaseline ou de la graisse de silicone pour faciliter leur mouvement et prévenir l'échappement de gaz. Le niveau de la fermentation des substrats est suivi par l'enregistrement cinétique du volume de gaz produit, indiqué par le déplacement du piston.

➤ Inoculum

Le liquide ruminal utilisé comme inoculum est prélevé sous vide avant la distribution de la ration du matin sur deux vaches (race Holstein) équipées d'une canule ruminale, établie conformément aux normes européennes de la protection et de l'alimentation des animaux. Les animaux sont nourris avec un régime de fourrage-concentré (70-30 p/p), avec 7KgMS/jour (composition /kg de MS sèche: 98 g CP), deux fois à 8.00h et à 16h30 par jour avec accès libre à l'eau, aux minéraux et aux vitamines. Le jus de rumen (phase solide plus phase liquide) est acheminé du lieu d'élevage (Centre Expérimental Agroeolution-Euronutrition à Saint Symphorien, France) au laboratoire dans des bouteilles thermos préalablement chauffées à 39°C et saturées en CO₂. Au laboratoire, le liquide ruminal des bovins est bien mélangé, puis filtré à travers quatre couches de mousseline et barboté avec du CO₂ à 39°C. Toute la manipulation est réalisée sous un flux constant de CO₂.

Tableau7. Préparation de la salive artificielle selon Menke et Steingass (1988)

Solution	Elément	Quantité
Oligo-éléments (solution des microminéraux)	CaCl ₂ .2H ₂ O	13,2 g
	MnCl ₂ .4H ₂ O	10,0 g
	CoCl ₂ .6H ₂ O	1 g
	FeCl ₂ .6H ₂ O	0,8 g
	Eau distillée	100 ml
Tampon	NaHCO ₃	35,0 g
	NH ₄ HCO ₃	4,0 g
	Eau distillée	1000 ml
Eléments minéraux (solution des macrominéraux)	Na ₂ HPO ₄	5,7 g
	KH ₂ PO ₄	6,2 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6 g
	Eau distillée	1000 ml
Indicateur d'oxydo-réduction (Résazurine)	C ₁₂ H ₆ NO ₄	100 mg
	Eau distillée	100 ml
Solution réductrice	Na ₂ S.7H ₂ O	285 mg
	NaOH (1N)	2 ml
	Eau distillée	47,5 ml

➤ **Eléments constitutifs du milieu de culture**

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 (tableaux 7 et 8). 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.* (1979). Enfin, un barbotage en surface est maintenu pendant 10min de manière à maintenir une atmosphère totalement anaérobie.

Tableau 8. Composition de la salive artificielle (Menke and Steingass, 1988)

Solution	Volume (ml)
Eau distillée	474,0
Solution micro minérale	0,12
Solution tampon	237,0
Solution macro minérale	237,0
Solution de résazurine	1,22
Solution réductrice	50,0
Eau distillée Q.s.p.	1000

➤ **Inoculation et incubation**

200 mg de substrat (substrat individuel ou de mixtures) sont introduits dans chaque seringue et mis à fermenter avec 30ml de milieu de culture (10ml de jus de rumen filtré plus 20ml de salive artificielle) préalablement prélevé à l'aide d'une pompe péristaltique puis inséré dans les seringues par la vanne Luer-Lock. Pour chaque série d'incubation et pour chaque substrat, trois répétitions sont réalisées. Dans les mêmes conditions, des seringues ne contenant pas de substrat (uniquement le milieu de culture), sont utilisés comme témoins (blanc). Les seringues sont ensuite incubées dans une étuve à agitation rotatoire (type GFL 3039) à 39°C et à 9 rpm pendant 96 heures.

2.3.2. Etude qualitative et quantitative des gaz produits

Le suivi de la cinétique de fermentation est effectué par la mesure volumétrique de la production de gaz total. Il est indiqué par le déplacement du piston sous la pression des gaz libérés à différents intervalles de temps : 2, 4, 6, 9, 12, 24, 48 et 96 heures. La production réelle de gaz dans chaque seringue correspond au rapport entre la production de gaz après 96 heures soustraite du volume de gaz enregistré à t_0 et celui du volume de gaz moyen produit par le blanc soit :

$$\text{PGT (ml)} = \text{V96} - \text{V0} - \text{Vb}$$

PGT : Production de gaz total

V96 : Volume enregistré à 96 h de fermentation

V0 : Volume initial

Vb : Volume de gaz produit par le blanc

Le volume des gaz produits (CH_4 et CO_2), est déterminé par un traitement à la soude (NaOH 10N) (Jouany, 1994). Les gaz produits à chaque intervalle de temps sont transférés dans une autre seringue de 50 ml en verre. Cette dernière est injectée de manière étanche par la soude qui réagit avec le CO_2 par absorption, entraînant le déplacement du piston d'un volume correspondant au volume de CO_2 absorbé. Le volume de CO_2 est déterminé par soustraction du volume net de CH_4 enregistré, par rapport au volume de gaz total produit.

Les paramètres caractéristiques modélisés de la fermentation des substrats sont déduits du modèle exponentiel proposé, par Ørskov et McDonald (1979) et modélisé à la production de gaz par Blümmel et Ørskov (1993) :

$$Y = a + b (1 - e^{-c \cdot t})$$

y : Production totale de gaz

a : Production de gaz à partir de la fraction soluble.

b : Production de gaz à partir de la fraction insoluble.

a+b : production potentielle de gaz.

c : Vitesse de fermentation des substrats.

La teneur en énergie métabolisable (EM) et la digestibilité de la matière organique (DMO) des substrats sont estimées par les équations globales, développées par Menke *et al.* (1979), comme suit :

$$\text{EM (MJ/Kg DM)} = 2.20 + 0.136 \cdot \text{Gv} + 0.057 \cdot \text{PB}$$

$$\text{DMO (\%)} = 14.88 + 0.889 \cdot \text{Gv} + 0.45 \cdot \text{PB}$$

Où, PB : protéines brutes en pourcentage ; et Gv, la production net de gaz total en ml /200mg de MS de substrat après 24h d'incubation.

2.3.3. Détermination de la digestibilité apparente de la MS

Après fermentation, le contenu de chaque seringue est vidé et transféré dans des tubes Falcon préalablement tarés. Il est centrifugé à 12000 tours/min pendant 20min et à 4°C. Le surnageant est récupéré, alors que le culot est complété avec les particules collées dans le batch après son rinçage par 10ml d'eau distillée. Une seconde centrifugation est effectuée à 12000 tours/min pendant 20min. Le surnageant est jeté et le culot est récupéré et séché dans des creusets en porcelaine (préalablement tarés) à 105°C pendant 72 heures. Le coefficient de digestibilité apparente de la MS (CDA%) des substrats est calculé comme suit (Mellenberger *et al.*, 1970) :

$$\text{CDA\%} = [\text{msi} - (\text{msrs} - \text{msrb}) / \text{msi}] * 100$$

msi : matière sèche initiale (introduite).

msrs : matière sèche résiduelle du substrat incubé.

msrb : moyenne de la matière sèche résiduelle des seringues témoins (blanc).

2.3.4. Mesure du pH et analyse des produits fermentaires

➤ Mesure du pH

Après 24h de fermentation, le pH des jus de rumen des contenus de chaque seringue est vérifié pour son pH, à l'aide d'un pH mètre muni d'une électrode combinée.

➤ Dosage de l'azote ammoniacal

L'ammoniaque est dosée par technique colorimétrique, selon la méthode de Weatherburn (1967), basée sur la réaction de Berthelot. L'ion ammonium (NH₃) se fixe sur une molécule de phénol en présence du chlore en milieu alcalin. La réaction est catalysée par le nitropussiate de sodium. Il se forme alors un complexe de type indophénol qui donne une coloration bleue, mesurée par spectrophotométrie à 660 nm (figure 6)

- **Échantillonnage** : Après 24 h d'incubation, l'activité des échantillons (le contenu de chaque seringue) est bloquée par une solution d'acide orthophosphorique 5% (H₃PO₄) à raison de 0,5ml pour 5 ml de contenu de chaque seringue,

puis ils sont conservés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Avant analyse, les échantillons sont décongelés et centrifugés à $12,000\times g$ pendant 20min.

- **Préparation des solutions :** Solution A : Dans 500 ml d'eau distillée, 5g de phénol et 25mg de Nitroprusside de sodium sont dissoutes.

Solution B : Dans 500ml d'eau distillée, 2,5g d'Hydroxyde de sodium, et 5ml d'Hypochlorite de sodium (eau de javel à 35°) sont dissoutes.

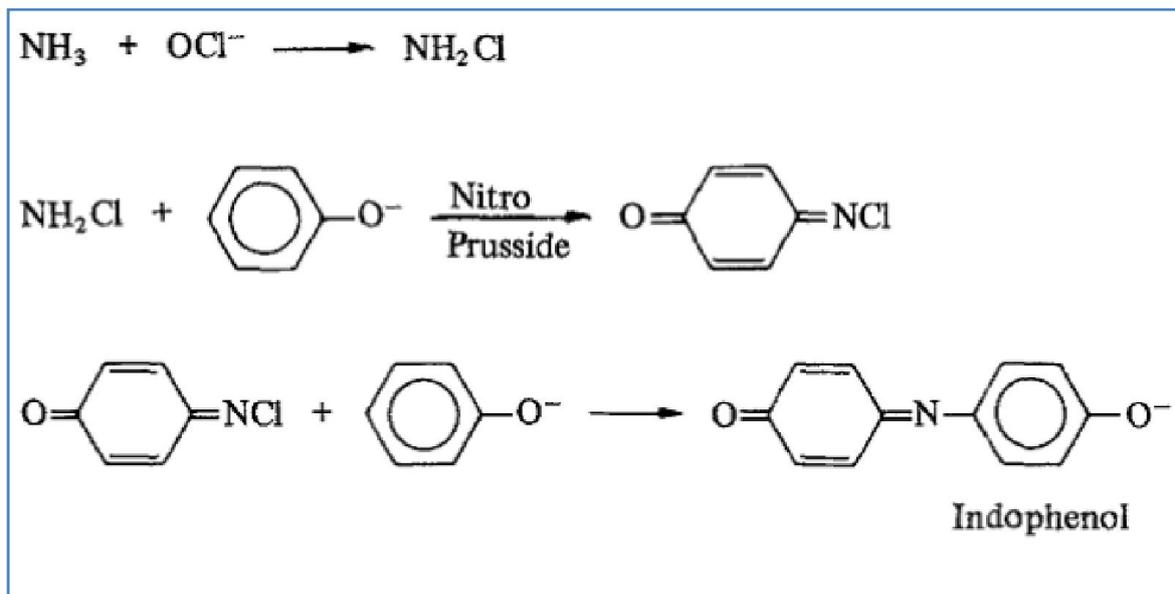


Figure 6. Principe de dosage de l'azote ammoniacal (N-NH_3) selon (Weatherburn, 1967).

- **Dosage :** 5ml de chaque solution de dosage (A et B) sont additionnés à $20\mu\text{l}$ de surnageant. Après agitation, les tubes à essais sont incubés à 37°C pendant 20min. Leur densité optique est lue à 625nm . La concentration en ammoniacque est déduite à partir d'une courbe étalon standard.

➤ Analyse qualitative et quantitative des acides gras volatils (AGV)

La composition et les concentrations des acides gras volatiles, présents dans le jus de rumen fermenté, sont déterminées par chromatographie en phase gazeuse de type gaz-liquide munie d'un injecteur automatique (AutoSystem XL ; PerkinElmer GC) et équipée d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), selon la méthode de Jouany (1982), avec les modifications de Scheppach *et al.* (1987). Les AGV sont séparés selon leur coefficient de partage entre la phase mobile et la phase stationnaire. Les solutés, détectés par ionisation de flamme, sortent par ordre croissant de leur poids moléculaire. Un intégrateur relié au détecteur

du chromatographe calcule les surfaces des pics qui sont proportionnelles à la quantité des composés. Une même quantité, connue d'un étalon interne (4-hydroxy-4-méthyl-2-pentanone) est rajoutée aux échantillons : l'intégrateur calcule les concentrations des composés analysés en prenant la surface de pic et la concentration de l'étalon interne comme base.

- **Préparation des échantillons :** Après 24h de fermentation, le contenu de chaque seringue est mélangé avec une solution d'hydroxyde de sodium 10% (conservateur), dans des proportions 10/1 (v/v). Les échantillons sont ensuite centrifugés à 5000g pendant 10 min et à 4°C. Le surnageant est récupéré et conservé à -20°C jusqu'à l'analyse chromatographique.

- **Protocole d'analyse :** 1ml d'échantillon, préalablement centrifugé est mélangé avec deux gouttes d'acide métaphosphorique (à 50%, p/v), afin de réaliser une déprotéinisation. Après centrifugation du mélange à 2000g pendant 15min, 1ml du surnageant est prélevé et additionné de 0,1ml de la solution d'étalon interne (4-hydroxy-4-méthyl-2-pentanone). Les flacons préalablement libellés sont ensuite sertis avec des septums butyl et des bouchons d'aluminium. Après homogénéisation, ils sont soumis à l'analyse chromatographique ; ils sont disposés sur le plateau du passeur et un volume fixe d'échantillon (0,25 à 0,50 μ l) est injecté en tête de colonne et élué dans les conditions de température et de pression définies ci dessous.

- **Conditions chromatographiques :** L'analyse des échantillons se fait en isothermes pendant 1min. La température initial de la colonne (four) est maintenu à 135°C pendant 6min, puis elle est montée à 180°C par palier de 25°C/min (durée du palier : 1min), elle est ensuite encore augmentée à 230°C avec une pente de 25°C/min, pour finalement être maintenue à 230°C, avec 1min de délai avant l'injection suivante. Les températures de l'injecteur et du détecteur FID sont 280°C et 240°C, respectivement. Le débit du gaz vecteur, H₂ est de 1,5ml/min. L'hydrogène et l'air sont utilisés comme gaz d'appoint avec un débit de 40 et 400 ml / min, respectivement.

La colonne choisie, est une colonne capillaire qui a une longueur de 30m et un diamètre intérieur de 0,53 mm. Elle est remplie d'une phase stationnaire de type BP21.

- **Calcul :** Les différents AGV sont identifiés selon le temps de rétention des différents pics d'éluion. En sortie de colonne, les pics, détectés lors de

l'étalonnage, permettent de connaître la surface des pics de l'étalon et de calculer la concentration molaire de chacun des composés de l'échantillon par rapport à celle de l'étalon interne selon la formule :

$$C_a = S_a / S_e \times K_a$$

Où : **C_a** est la concentration du composé **a** dans l'échantillon, **S_a** est la surface du pic correspondant au composé **a**, **S_e** est la surface du pic correspondant à l'étalon interne, et **k_a** le facteur de réponse du composé **a**.

Les concentrations en acétate (C₂), en propionate (C₃) et en butyrate (C₄) sont exprimées en mmol/L.

2.3.5. Estimation de l'activité spécifique de la caboxyméthylcellulase (CMCase)

Le dosage de l'activité de la caboxyméthylcellulase est effectué selon la méthode de Miller (1959), les sucres réducteurs libérés à partir de la carboxyméthyl cellulose (CMC) par l'action de la CMCase sont dosés par colorimétrie contre un témoin.

➤ Extraction de l'enzyme

Au terme de 24 heures de fermentation, le contenu de chaque seringue est vidé dans des flacons et soumis à une surgélation immédiate à -40°C pendant 48 heures (Hristov *et al.*, 1999). Les échantillons sont par la suite décongelés dans un bain marie à 39°C. Pour chaque échantillon, 10ml de jus de rumen sont additionnés de 30ml de tampon phosphate, le mélange est soumis à une sonification à 50 mV pendant 6min avec 30s de pulsations et 30s d'intermittence par min. Durant la sonification, les échantillons sont maintenus dans un bac à glace. Ils sont ensuite centrifugés à 17000 x g, à 4°C pendant 30min. Le surnageant est récupéré et utilisé pour la détermination de l'activité enzymatique (Nozière and Michalet-Doreau, 1994; Singh et al., 2011).

➤ Méthode de dosage

Le mélange réactionnel contient 1ml de tampon phosphate (0,1M), 0,5ml de CMC 1% et 0,5ml de l'extrait enzymatique. Les tubes, préalablement agités, sont incubés dans un bain marie à 39°C pendant 20min. 3ml de DNS (acide dinitrosalicylique) sont ajoutés au mélange pour stopper la réaction. Le mélange réactionnel du témoin est le même sauf que le DNS est rajouté avant la CMC.

L'ensemble des tubes (test + témoin) est porté à ébullition pendant 10min et par la suite, 1ml de sels de rochelle à 40% est ajouté dans chaque tube. L'absorbance est mesurée à 575 nm après refroidissement des tubes à température ambiante.

➤ **Calcul et expression des résultats**

La quantité de glucose (μg) libérée pendant l'incubation est déterminée à partir d'une courbe étalon standard, en lisant les ΔA ($A = \text{Absorbance du test} - \text{Absorbance du témoin}$).

Une unité de l'activité enzymatique correspond à la quantité de glucose (μmol) libérée par heure, elle est exprimée en unité internationale $\mu\text{mol glucose/ml/h}$

$$\text{L'activité enzymatique (Unités)} = (\mu\text{g glucose}) / \text{TxSx180}$$

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

Pour le calcul de l'activité spécifique de l'enzyme, les concentrations de protéines des extraits sont quantifiées selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) par usage de la BSA comme protéine étalon.

2.3.6. Dénombrement des protozoaires digestifs

Après 24h de fermentation, le contenu de chaque seringue est mélangé avec la solution MFS (methyl green-formalin-saline) à raison de 50/50 (V/V) ; les cellules sont fixées par le formaldéhyde à 35% et les noyaux sont colorés par le vert de méthyle.

Ce mélange, bien homogénéisé, est conservé à l'obscurité pour l'énumération des protozoaires selon la méthode d'Ogimoto et Imai (1981). Les protozoaires ciblés sont les protozoaires ciliés : les Entodinium de taille inférieure à $100\mu\text{m}$ et les Entodinium de taille supérieure à $100\mu\text{m}$ et les holotriches (*Dasytricha* et *Isotricha*). Un profil générique de ces protozoaires est déterminé sous microscope optique à l'objectif $\times 40$, en utilisant une cellule de comptage -Agasse Lafont $10\mu\text{l}$ (Preciss, France).

La concentration totale des échantillons en protozoaires ruminiaux est calculée du profil générique obtenu. Chaque échantillon est compté deux fois et si la différence entre les deux résultats est supérieure à 10%, un troisième dénombrement est refait.

2.3.7. Analyse moléculaire des populations microbiennes du rumen

➤ Préparation des échantillons

Pour la quantification des populations microbiennes, une aliquote (1,8ml) du liquide ruminal de chaque seringue est prélevé à 0h et à 24h d'incubation, elle est ensuite conservée immédiatement à -20°C. Les échantillons sont centrifugés à 6000g à 4°C pendant 10min, le culot récupéré est ensuite utilisé pour l'extraction de l'ADN.

➤ Extraction de l'ADN total

L'ADN total de chaque échantillon de contenu ruminal est extrait en utilisant le kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN France S.A.S), selon le protocole défini par le fabricant (figure 7) (**annexe 2**). Les échantillons sont homogénéisés dans le tampon ASL et incubés à 95 °C pendant 5min afin de lyser les cellules microbiennes. Après l'élimination des inhibiteurs potentiels par l'incubation avec les tablettes InhibitEx, les lysats sont traités avec la protéinase K et le tampon AL à 70 °C pendant 10min pour éliminer les protéines et les polysaccharides. Après précipitation avec de l'éthanol, les lysats sont déposés dans une colonne QIAamp spin contenant un gel de silice sur lequel l'ADN va se lier. Une fois l'ADN fixé sur la colonne, celle-ci est lavée à l'aide de deux tampons AW1 et AW2. Cette opération permet d'éliminer la totalité des éventuels contaminants, sans affecter la liaison de l'ADN au gel. L'échantillon d'ADN obtenu est élué dans le tampon AE et conservé à -20°C.

La pureté et la quantité d'ADN extrait dans chaque échantillon sont ensuite déterminées à A260nm et A280nm, en utilisant le NanoDrop ND-1000 (NanoDropTechnologies, Wilmington, DE, USA). La concentration en ADN extrait dans les échantillons varie entre 18,3 et 105,7 ng / µl de contenu ruminal.

➤ PCR en temps réel (real time PCR)

La quantification relative des différents groupements microbiens présents dans le rumen est réalisée par la PCR en temps réel (qPCR). Cette technique repose sur le suivi de la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR (PCR classique). A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits.

Les marqueurs moléculaire choisis dans cette étude sont : le gène ribosomal 16S pour les bactéries totales et les bactéries cellulolytiques (*Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*), le gène *mcrA* pour les Archaeobactéries méthanogènes et les gènes 18S et ITS1 pour les champignons anaérobiques totaux.

Les amorces spécifiques ciblant les différents groupements microbiens, utilisées dans cette études sont indiquées dans le tableau 9. Ces amorces sont choisies à partir de séquences publiées ayant démontré une amplification spécifique des espèces cibles.

Les analyses de qPCR sont effectuées avec le Rotorgene-6000 Thermocycler (Corbett Research, Sydney, Australia), avec l'utilisation de la technologie SYBR Green. L'ADN microbien extrait est dilué à 5,3ng/μl, préalablement à son utilisation comme matrice dans la qPCR, afin de réduire les inhibitions potentielles en cours d'analyse. Le mélange réactionnel contient l'ADN matrice (2,5μL d'ADN de l'échantillon extrait), un couple d'amorces spécifiques (le sens et l'antisens) à 200nM de chacune et 2 X de Power SYBR Green PCR Master Mix (Life technologies). Le volume final de la réaction est de 12,5μL. Le programme de la PCR se compose d'une dénaturation de 15s à 95°C, suivie de 45 cycles de 60s chacun à 60°C pour la renaturation et une extension à 72°C. La détection de fluorescence est effectuée à la fin de chacune des deux étapes de dénaturation et d'extension.

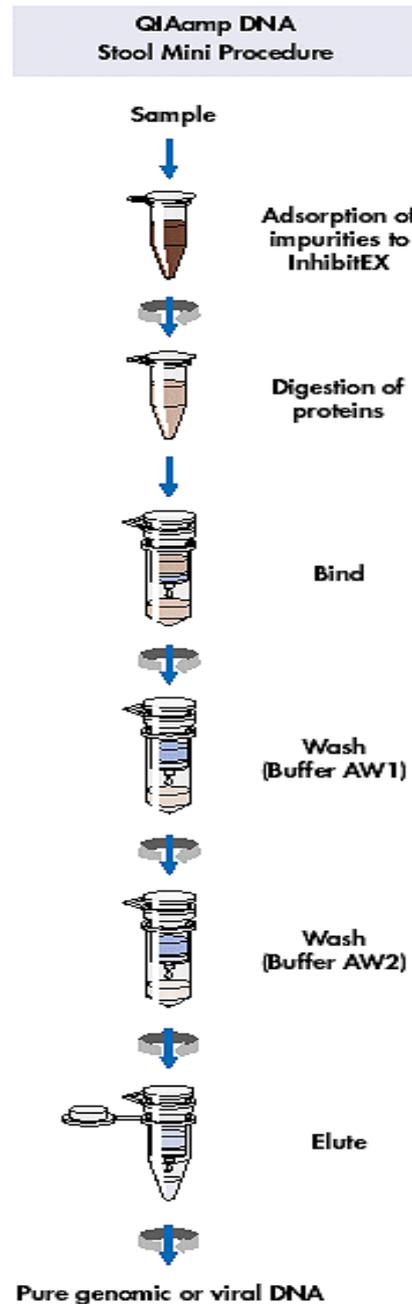


Figure 7. Extraction de l'ADN total microbien

Une courbe de dissociation est ajoutée au dosage SYBR Green pour vérifier la spécificité de l'amplification. Puis, les résultats sont comparés avec une courbe d'ADN standard pour obtenir le nombre de copies dans l'échantillon. Les résultats de qPCR sont analysés à l'aide du logiciel SDS version 2.3 (Applied Biosystems, Saint-Aubin, France). Chaque échantillon est analysé en double pour le dosage en qPCR et ré-analysé à la fois pur et dilué en cas de valeurs aberrantes.

Tableau 9. Séquences des amorces utilisées dans la qPCR.

Espèces cible /gènes		F primer/R primer Séquence (5' to 3')	Références
Bactéries général	16S rRNA	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	(Nadkarni et al., 2002)
Champignons anaérobies	*MAF(18S & ITS1)	GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT	
<i>F.succinogenes</i>	16S rRNA	GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA CGCCTGCCCTGAACTATC	(Denman and McSweeney, 2006)
<i>R. flavefaciens</i>	16S rRNA	CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC	
Méthanogènes	<i>mcrA</i>	TTCGGTGGATCDCARAGRGC GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC	(Vinh et al., 2011)

*MAF (18S & ITS1): Multiple alignments of fungal 18S ribosomal and ITS1 gene sequences
F et R primer correspondent au couple d'amorces sens et anti-sens (ou forward et reverse).

➤ Calculs et expression des résultats

L'abondance relative des différents groupements microbiens est calculée selon la méthode de quantification relative ΔCT (Livak and Schmittgen, 2001). Les résultats sont exprimés en changement dans la population microbienne relativement au control (0h), qui est estimé à 1.

2.4. Analyses statistiques

Une analyse de la variance à un seul facteur est réalisée sur les données de la production de gaz *in vitro*, la digestibilité, les paramètres fermentaires, l'activité de la CMC_{case} et les quantifications microbiennes, en prenant en compte : l'espèce fourragère comme source de variation (effet fixe) et la source d'inoculum (effet aléatoire) comme facteur de blocage. 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 ($P < 0,05$). Les erreurs standard de moyennes correspondent aux écarts types déduits de l'analyse de la variance. Des coefficients de corrélation linéaires de Pearson sont déterminés par paires entre les variables étudiées. Le test de student est utilisé pour la comparaison deux à deux des résultats. Des analyses de la variance et des matrices de corrélation sont réalisées respectivement par les programmes MIXED, CORR et FACTOR, avec le logiciel SAS (SAS Institute, 2000).

TROISIÈME PARTIE :
RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Composition chimique des substrats étudiés

1.1. Constituants cellulaires

La composition chimique des trois plantes arbustives ainsi que celle du foin de vesce-avoine (substrat standard) est résumée dans le tableau 10.

1.1.1. Teneurs en matières sèches (MS)

Les substrats étudiés renferment un taux élevé de matière sèche (MS). La valeur la plus élevée est enregistrée pour *Opuntia ficus indica* (961,18 g/Kg) et la plus faible pour *A. cyanophylla* (913,36g/Kg) et *A. nilotica* (900g/Kg). Les faibles taux d'humidité sont essentiellement dus à l'origine aride des fourrages, ils suggèrent une potentielle utilisation (source importante de MS) comme fourrage de base dans les rations du cheptel local.

Cependant, l'analyse des raquettes de cactus fraîches révèle qu'elles renferment des teneurs élevées en eau (917 g/Kg frais), comparativement au foin de vesce-avoine qui montre des teneurs plus faibles (120,18 g/Kg frais). Ce résultat pourrait s'expliquer en grande partie par le mucilage contenu dans les raquettes de cactus, soit un type de mucus hydrophile qui posséderait une forte capacité à retenir de l'eau à l'intérieur du cactus particulièrement, durant les longues périodes de sécheresse (Cárdenas *et al.*, 1997; Sáenz *et al.*, 2004). Le contenu hydrique élevé des cladodes est comparable à celui noté par d'autres auteurs (Mulas and Mulas, 2004; Gebremariam *et al.*, 2006), il suggère une incorporation possible (source importante d'eau) dans les rations du cheptel local, durant les périodes sèches où l'abreuvement devient problématique. Felkener (2001) a démontré que la vache qui consomme 40kg de cactus frais/jour, consommerait également 35 litres d'eau/jour simultanément. Par ailleurs, des expériences ont montré que des ovins gardés en enclos peuvent survivre plus de 500 jours sans approvisionnement en eau, si ils ont quotidiennement accès à des quantités suffisantes de cactus (Araba *et al.*, 2000).

Tableau 10. Teneurs en matière sèche et composition chimique (g/kg MS) des plantes fourragères collectées.

Espèce	Foin de vesce avoine	<i>Opuntia ficus indica</i>	<i>Acacia nilotica</i>	<i>Acacia cyanophylla</i>
MS	935,09	961,18	900,00	913,36
MO	941,85	703,58	920,47	899,00
MM	58,14	296,41	80,00	101,00
PB	108,3	77,84	243,00	157,00
NDF	585,19	325,25	290,00	447,00
ADF	316,82	119,60	198,00	255,13
ADL	45,208	19,11	126,41	148,00
Hémicellulose	268,36	205,65	92,00	192,00
Cellulose	271,61	100,49	71,00	108,00
MG	17,53	18,591	17,08	15,88
NFC	235,32	281,88	369,92	279,11
Carbohydrates totaux	764,68	718,12	630,08	720,90

MS : matière sèche, **MO** : matière organique, **MM** : matières minérales, **PB** : protéines brutes, **NDF** : neutral detergent fibre, **ADF** : acid detergent fibre, **ADL** : acid detergent lignin, **MG** : matières grasses, **NFC** : hydrates de carbones non fibreux.

1.1.2. Teneurs en matières minérales (MM)

Les plantes étudiées présentent des valeurs de matière minérale (MM) très variables. Le taux le plus élevé est observé chez le cactus, avec une valeur de 296,41g/kg MS, contrairement au foin de vesce avoine possédant la teneur la plus faible (58,14 g/Kg MS).

La teneur en MM du cactus inerme enregistrée dans cette étude est comparable à celle mentionnée dans la littérature (Shedbalkar *et al.*, 2010). Des valeurs qui varient de 23,11% à 33,70% ont été également rapportées par Nefzaoui and Salem (1996) et Nefzaoui and Ben Salem (2002). Ces mêmes auteurs expliquent cette richesse en éléments minéraux des raquettes de cactus à leur teneur élevée en calcium (Ca). Le déficit en eau et la concentration élevée en Ca dans les sols arides et semi-arides conduisent à l'accumulation de grandes quantités de solutés de Ca dans les raquettes de cactus. Ce processus permet à la plante d'extraire, par osmose, autant d'eau que possible du sol. En général, la teneur des raquettes de cactus en Ca dépasse les besoins des ruminants en cet élément minéral. Un excès de calcium n'est pas problématique en soi, mais un rapport déséquilibré Ca/P nécessite une correction (Nefzaoui and Ben Salem, 2002). Selon Spear (1994), la concentration des éléments minéraux dans les plantes varie fortement avec le type de sol, le climat, le stade de la maturité et la saison de récolte.

1.1.3. Teneurs en Protéines brutes (PB)

La teneur en protéines brutes (PB) est relativement élevée chez *A. nilotica* et *A. cyanophylla* (243 et 157 g/kg MS, respectivement), tandis que la valeur la plus faible est notée chez le cactus (77,84 g/kg MS), comparativement au foin de vesce avoine qui a une valeur intermédiaire de 108,3 g/Kg MS (tableau 10). Selon Cappelozza (2013), les fourrages dont les teneurs en matières azotées totales sont inférieures à 70mg/g ne peuvent pas fournir les minima d'azote nécessaires au microbiote ruminal pour assurer une activité métabolique maximale. D'autre part, Paterson *et al.* (1996) indiquent que ces types de fourrages exigent une supplémentation azotée pour améliorer leur ingestion par les ruminants. Selon les travaux de Van Soest (1994), le taux de PB requis pour le fonctionnement optimal du rumen doit dépasser les 7 à 8% de matière sèche.

Selon Mciteka (2008) la principale critique contre l'utilisation des raquettes de cactus dans l'alimentation animale est sa teneur trop faible en PB pour l'entretien des ruminants, suggérant que les régimes alimentaires contenant des raquettes d'*Opuntia* doivent être

complétés par une source azotée. Ceci est bien constaté dans la teneur en PB des échantillons d'*Opuntia ficus indica* examinés dans cette étude qui n'a atteint que 7,78% de MS et cette valeur est en accord avec celles rapportées par d'autres auteurs (Gebremariam *et al.*, 2006; Einkamerer, 2008; Abidi *et al.*, 2009a ; Andrade-Montemayor *et al.*, 2011). Cependant beaucoup d'autres travaux (Ben Salem *et al.*, 2002; Tegegne *et al.*, 2007; Abidi *et al.*, 2009b; Cordova-Torres *et al.*, 2009) ont rapporté des valeurs de PB beaucoup plus faibles dans les raquettes de cactus inerme (500, 506, 380 et 450 g/Kg MS, respectivement). Par ailleurs, les teneurs en PB d'*Opuntia ficus indica* peuvent varier de 3,0% (Tegegne *et al.*, 2007) jusqu'à 12,8 % (Misra *et al.*, 2006). Ces variations de la teneur en PB du cactus inerme seraient dues à la diversité de plusieurs facteurs comme : le type de sol, la fertilisation, les pratiques culturales et le climat (De Andrade Ferreira *et al.*, 2012). Par ailleurs, Abidi *et al.* (2009a) ont également observé une variation dans la teneur en PB du cactus en fonction de la saison, en effet les raquettes d'*Opuntia ficus indica* contenaient plus de PB en hiver qu'en été (58,5% vs 29,7% MS).

En revanche, les valeurs de PB chez *A. nilotica* et *A. cyanophylla* dans la présente étude, sont nettement plus élevées que le niveau minimum de 7-8% MS requis pour le fonctionnement optimal du rumen et l'ingestion alimentaire dans l'élevage des ruminants, recommandés par Van Soest (1994). Les feuilles de ces espèces d'*Acacia* pourraient donc être utilisées comme compléments appropriés aux pâturages naturels et aux fourrages de mauvaise qualité et à faible teneur en azote, en particulier pendant la saison sèche (Osuji and Odenyo, 1997; Osuga *et al.*, 2007). Les teneurs élevées en PB chez les Acacias de cette présente étude se situent dans un large éventail de données rapporté dans la littérature pour l'*Acacia* et d'autres espèces ligneuses (Balogun *et al.*, 1998; Larbi *et al.*, 1998; Bouazza *et al.*, 2012). Néanmoins, dans une étude sur des espèces d'*Acacia*, collectées de l'Arabie saoudite, Al-Soqeer, (2008) a trouvé des valeurs beaucoup plus faibles en PB. Le taux en PB d'*A. nilotica* noté dans notre étude (24,3%MS) est sept fois plus élevé que celui constaté par Abdulrazak *et al.* (2000) (17,2%MS) et il est supérieur jusqu'à dix fois plus que celui observé par Mlambo *et al.* (2009) (14,7%MS). Selon Abdalla *et al.* (2014), la teneur en PB des feuilles d'*A. nilotica* varient de 10-20% MS. Les feuilles d'*A. cyanophylla* recèlent un taux en PB (157g/KgMS), largement au dessus de la gamme de 105-132 g/kg trouvée dans d'autres travaux (Degen *et al.*, 1997; Ben Salem *et al.*, 1999; Krebs *et al.*, 2007). Cependant, la valeur de 161g/Kg MS observée par Allam *et al.*, (2012), est en accord avec le résultat trouvé dans notre étude. Ces discordances dans les teneurs de PB au sein des espèces pourraient être attribuées aux

différences constatées dans le stade de la croissance de la plante et à la proportion d'échantillons de feuilles collectées pour l'analyse (Al-Soqeer, 2008). En effet, une teneur plus élevée en PB dans les jeunes feuilles d'*Acacia*, en comparaison avec les feuilles matures de cette même plante (31,9 vs 21,9% de MS), a été rapportée par Topps (1997). De plus, Aganga *et al.*, (1998) ont trouvé des valeurs différentes de PB dans *A. nilotica* entre les saisons (humide vs sec), et entre les parties testées de la plante (feuilles vs gousses). Par ailleurs, ces variations peuvent être dues en grande partie à des facteurs génotypiques (Al-Soqeer, 2008).

1.1.4. Teneurs en matières grasses (MG)

Les résultats (tableau 10) montrent que toutes les plantes étudiées sont pauvres en matières grasses (MG). Le taux de MG des arbustes étudiés varie entre 1,58 et 1,85% de MS, ce qui se rapproche de la valeur obtenue pour le foin de vesce avoine (17,53% de MS). La teneur en MG des plantes analysées est similaire aux valeurs rapportées par Azim *et al.* (2011), pour des fourrages arbustifs de zones arides pakistanaïses.

Le résultat obtenu pour les raquettes de cactus (18,5g/Kg MS) est en accord avec le résultat de López-García *et al.* (2001). Ces derniers notent une variation dans la teneur en MG entre la plupart des espèces d'*Opuntia* ; allant de 5,7 à 20,6 g/Kg MS. Le taux en MG des raquettes de cactus inerme est également très similaire aux valeurs de 19 et 101g/Kg MS rapportées par Vieira *et al.* (2008) et Khamisabadi *et al.* (2011), respectivement. Mais il reste relativement plus élevé aux 141g/Kg de MS rapportés par Einkamerer (2008) pour l'*Opuntia ficus-indica* var. Algerian.

Les teneurs en MG des espèces d'*Acacia* varient de 1,7% à 4,96% (Aganga *et al.*, 1998; Azim *et al.*, 2011). Les résultats de ces derniers rejoignent ceux des Acacias de notre étude.

Wilson and Brigstocke (1981) ont indiqué que le taux de MG dans la ration alimentaire des ruminants ne doit pas dépasser 8% de MS. Autrement, la digestion des fibres serait altérée. Il est clair que les teneurs en MG des arbustes fourragers examinés dans cette étude sont trop faibles pour avoir des effets négatifs sur le métabolisme et la digestion ruminale.

1.1.5. Teneurs en hydrates de carbones non fibreux (NFC)

Les arbustes présentent des teneurs élevées en NFC (tableau 10), comparativement au foin de vesce avoine (235,32g/Kg MS). La teneur la plus élevée est notée pour *A. nilotica* avec une valeur de 369,92g/Kg MS, suivie de l'*Opuntia* avec 281,88 g/Kg MS et de l'*A.cyanophylla* (279,11g/Kg MS).

Le taux élevé en NFC des raquettes de cactus inerme est en accord avec les résultats de Khamisabadi *et al.* (2011). Cependant il est relativement plus faible que les valeurs obtenus par d'autres auteurs (Vieira *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2012). Ces différences peuvent être dues à la variété de la plante, l'âge des raquettes, la saison de récolte et les conditions agronomique (Nefzaoui and Ben Salem, 2002). Les teneurs en NFC de l'*Opuntia* et des Acacias sont inférieures aux valeurs citées par Dupchak (2005) pour l'orge (65%MS) et le maïs (75% MS). Par contre, les taux de NFC des plantes analysées sont relativement supérieurs à ceux de fourrages de bonne qualité, tel que l'ensilage de luzerne (18,4% de MS) et le foin de luzerne (24% de MS) (Dupchak, 2005; NRC, 2001). D'après ces valeurs, il ressort que les Acacias et le cactus étudiés peuvent être en général classés, en tant que source d'énergie intermédiaire, comprise entre les concentrés et les fourrages.

Il est à noter que chez tous les arbustes examinés dans ce travail, les contenus en NFC ne dépassent pas la limite recommandée par l'NRC (2001), pour maintenir des conditions normales dans le rumen. Il est important de souligner que les fourrages riches en NFC, tels que les raquettes de cactus, peuvent entraîner un certain nombre de troubles du rumen lorsqu'ils sont fournis séparément et en grandes quantités (De Andrade Ferreira *et al.*, 2012). En effet, selon Nocek (1997) et Reddy and Elanchezhian (2008), les régimes alimentaires avec un excès en NFC (au delà de 40% de MS) peuvent causer des troubles métaboliques du rumen, notamment l'acidose et d'autres problèmes de santé chez l'animal. Par ailleurs, De Andrade Ferreira *et al.* (2012), stipulent que l'incorporation de fourrages contenant des teneurs en NFC supérieures à 36-44% de MS ou des teneurs en NDF inférieures à 30%, dans l'alimentation de vaches laitières peuvent induire une diminution de la digestibilité des nutriments et de la teneur en MG du lait. Ainsi, toute modification dans la proportion des constituants alimentaires peut changer significativement la balance nutritionnelle du régime fourni aux animaux. Selon Nocek and Russell (1988), l'équilibre des glucides structuraux et non structuraux est important pour la santé et les performances des animaux.

1.2. Teneurs en composants pariétaux

La digestibilité des végétaux ligneux par les ruminants est en grande partie conditionnée par leur teneur en parois totales. Van Soest (1994) note que la richesse en parois cellulaires, notamment en lignocellulose, a une influence négative sur la digestibilité. D'une manière générale, on constate que les substrats étudiés présentent une composition pariétale différente (tableau 10). Il en ressort que les teneurs en parois totales (NDF) varient de façon significative en fonction de l'espèce, elles sont de l'ordre de 290 à 585 g /kg MS. Les teneurs les plus faibles sont notées chez *A. nilotica* et *l'O. ficus indica*, tandis que de fortes teneurs sont enregistrées dans le foin de vesce avoine. Ces valeurs sont en accord avec Schmeidek *et al.* (2000) et Cheema *et al.* (2011) qui ont rapporté des valeurs de 262 à 393 g/Kg de MS, pour des espèces d'arbres et d'arbustes, à usage multiples. Babayemi *et al.* (2004), en étudiant des espèces ligneuses rencontrées en zone tropicale, trouvent des teneurs similaires (221-469g/Kg MS). Belachew *et al.* (2013), en région tropicale d'Ethiopie, obtiennent des résultats comparables. En revanche, nos résultats sont inférieurs aux valeurs de la fraction pariétale rapportées par Selmi *et al.* (2013) pour des arbustes tunisiens collectés de zones arides (507g/Kg MS), et par Rahim *et al.* (2013) pour des fourrages autochtones des zones tropicales pakistanaises (490g/Kg MS- 640g/Kg MS).

Le contenu NDF d'un aliment est corrélé négativement avec la digestibilité et l'ingestion (Einkamerer, 2008). Selon Jolly and Wallace (2007), la concentration optimale en NDF d'une ration alimentaire est de 27 à 30% de MS. Par ailleurs, les arbres fourragers avec une faible concentration en NDF (20-35%) sont généralement d'une grande digestibilité (Norton, 1994). Le seuil de NDF au-delà duquel la consommation alimentaire des ruminants est affectée négativement est de 60% de MS (Meissner *et al.*, 1991). Toutes les plantes testées dans cette étude sont très au-dessous de ce seuil.

Les teneurs en lignocellulose (ADF) varient de façon très significative avec l'espèce. De faibles teneurs sont observées pour le cactus (119,60 g/Kg MS) et *A. nilotica* (198 g/Kg MS). Par contre, les valeurs les plus élevées se trouvent chez le foin de vesce avoine (316,82 g/Kg MS), suivi de *A. cyanophylla* (255,13g/Kg MS). Ces résultats corroborent ceux de la littérature pour des substrats de même nature (Rahim *et al.*, 2013; Selmi *et al.*, 2013; Mayouf and Arbouche, 2014).

Les feuillages d'*A. nilotica* et *A. cyanophylla* se révèlent être plus riches en lignine (ADL), avec de teneurs voisines de 148 et 126,41 g/Kg MS respectivement, comparativement au foin de vesce avoine (45,2 g/Kg MS). Par contre, la teneur la plus basse se rencontre chez

le cactus inerme avec une valeur de 19,11 g/Kg MS (tableau 10). Ces résultats sont similaires aux valeurs de la fraction ADL enregistrées par Papanastasis *et al.*, (2006), pour des arbustes fourragers en provenance de zones méditerranéennes.

Dans cette étude, l'*O.ficus indica* se distingue des autres substrats par de faibles teneurs en fibres pariétales, en particulier la fraction ADF. Il est bien connu que des concentrations élevées de lignocellulose ou de la lignine sont responsables de la faible digestibilité des aliments (Schroeder, 2004). Selon Mc Donald *et al.* (1995), la fraction ADF est corrélée négativement à la digestibilité globale, réduisant ainsi la quantité d'énergie potentiellement disponible pour l'animal. En conséquence, les valeurs de la digestibilité et de l'énergie les plus élevées sont attendues pour les raquettes de cactus inerme, en comparaison avec les autres substrats étudiés. La valeur de la fraction NDF obtenue pour les raquettes de cactus inerme (32,52%) est relativement plus élevée que celles notées par Tegegne *et al.* (2007) (23,8% MS) et Misra *et al.* (2006) (25,6% MS), elle reste approximativement identique aux mesures de De Andrade Ferreira *et al.* (2012). Comparativement aux moyennes des contenus en NDF du foin de luzerne (55,6% de MS) et d'orge (45,15% MS), rapportées par Ben Salem *et al.* (1994) et Nefzaoui and Ben Salem (2002) respectivement, la valeur des NDF des raquettes de cactus inerme dans cette étude est relativement plus faible. Comme indiqué ci-dessus, le cactus a une teneur faible en NDF et des teneurs élevées en NFC. Ces valeurs doivent être prises en considération lors de l'utilisation du cactus dans l'alimentation des ruminants. L'utilisation abusive de cactus comme fourrage seul a été à l'origine de nombreux problèmes, y compris une diarrhée, une diminution de la teneur en matières grasses du lait, la réduction de la consommation de MS et la perte de poids, en particulier chez les vaches allaitantes (Santos *et al.*, 1990). Ben Salem *et al.* (2002b) soulignent la nécessité de combiner les raquettes de cactus à d'autres fourrages car ingérées seul, elles peuvent augmenter la vitesse de passage des aliments dans le système digestif et causer la diarrhée chez l'animal. La faible teneur en ADF des raquettes de cactus inerme (119,60 g/Kg MS) est proche des valeurs rapportées par Andrade-Montemayor *et al.* (2011). Selon Nefzaoui and Ben Salem (2001), la teneur en ADF des raquettes de cactus peut varier entre 112,9 et 189,8 g/Kg MS. Cependant Costa *et al.*, (2012) et Gebremariam *et al.*(2006) rapportent des valeurs relativement plus faible (217 et 263 g/Kg MS, respectivement) que les nôtres. Ces différences peuvent être dues à la variété de l'espèce, à l'âge des raquettes, à la saison et aux conditions agronomiques (type de sol, climat, conditions de croissance). Par ailleurs, la teneur en lignine enregistrée chez le

cactus (19,11 g/Kg MS) est relativement plus faible que celle obtenue par d'autres auteurs (28,9-50 g/Kg MS) (Gebremariam *et al.*, 2006; Nefzaoui and Ben Salem, 2001).

Les dissimilitudes en NDF, ADF et ADL pourraient être dues à des différences spécifiques. L'accumulation de fibres dans la cellule est sous le contrôle du génotype. Le stade de croissance est aussi un facteur à prendre en considération. Le contenu en fibres augmente avec la maturité avancée du feuillage, en raison de la lignification (Vieira *et al.*, 2008; Njidda *et al.*, 2013). Les teneurs en fibres obtenues dans cette étude sont comparables à celles rapportées par Reed (1986) et Topps (1997) chez d'autres espèces d'*Acacia*. De faibles teneurs en NDF, ADF contenues dans les feuilles d'*A.nilotica* sont comparables à celles rapportées par Cheema *et al.* (2011). Ces derniers auteurs rapportent des teneurs en NDF, ADF de 250, 160 g/Kg MS, respectivement. De même, Reed (1986) obtient des valeurs en NDF allant de 204 à 224 g/kg MS, 200 à 230 g/Kg de MS, et 452 à 473 g/Kg de MS pour *A.seyal*, *A.nilotica* et *A.drepanolobium*, respectivement. De faibles valeurs en NDF et ADF chez les espèces d'*Acacia* pourraient être associées à une haute digestibilité (Bakshi and Wadhwa, 2007). En revanche, le taux élevé en lignine dans les feuilles des Acacias pourrait être lié à une faible digestibilité. Rubanza *et al.* (2005) rapportent des teneurs en lignine comparables chez *A. polyacantha* (145g/Kg MS) et *A. drepanolobium* (101 g/Kg MS) récoltées dans des régions semi-arides de Tanzanie.

Dans la présente étude, *A. cyanophylla* présente des valeurs relativement plus élevées en fractions pariétales, comparativement à celles obtenues dans d'autres études pour la même espèce (Vieira *et al.*, 2008). Ce qui peut être attribué aux proportions des feuilles et des tiges dans les échantillons testés (Al-Soqeer, 2008). De plus, des valeurs plus élevées en fractions pariétales dans les fourrages ont été attribuées aux rameaux ligneux inclus lors de l'analyse (Topps, 1997).

Le calcul des fractions hémicellulosiques et celluloses montre des résultats très disparates. Globalement, le foin de vesce avoine se détache avec une valeur de 268,36 g/KgMS en hémicellulose et de 271,61 g/Kg MS en cellulose. Les valeurs les plus faibles sont notées pour *A.nilotica* (92 et 71 g/Kg MS pour l'hémicellulose et la cellulose, respectivement). Nos résultats sont comparables à ceux de nombreux auteurs (Gebremariam *et al.*, 2006; Nefzaoui and Ben Salem, 2002; Vieira *et al.*, 2008). Finalement, il semble que le facteur déterminant pour cette teneur est le stade de maturité (âge) et le génotype de la plante (Coen and Dehority, 1970).

1.3. Teneurs en métabolites secondaires

L'analyse quantitative des facteurs antinutritionnels présents dans les fourrages étudiés est présentée dans le tableau 11.

1.3.1. Teneurs en composés phénoliques

La concentration des composés phénoliques des plantes étudiées révèle des variations considérables entre les espèces. *A.nilotica* et *A.cyanophylla* montrent les plus fortes concentrations de phénols totaux (PT) avec des valeurs de 213,04 et 204,8g/Kg MS, respectivement. Les valeurs les plus basses sont enregistrées chez le foin de vesce avoine et le cactus avec des concentrations respectives de 5,06 et 8,59 g/Kg MS. Une tendance similaire est constatée pour les tannins extractibles totaux (TT) dont les concentrations les plus élevées sont enregistrées chez *A .nilotica* (205,5 g/Kg MS) et *A.cyanophylla* (197,7g/Kg MS) et les plus faibles teneurs pour le foin de vesce avoine (1,59g/Kg MS) et le cactus (1,98 g/Kg MS). Les tannins condensés totaux (TCT) sont très élevés chez *A.nilotica* avec une valeur de 726,3 g/kg MS, elle est suivie de l'*A.cyanophylla* (631,2 g/Kg MS), comparativement au foin de vesce avoine (57,99 g/Kg MS). Cependant, dans les raquettes de cactus, les TCT sont absents ou décelés seulement à l'état de traces. De plus, les TCT contenus dans les espèces étudiées sont constitués principalement de tannins condensées libres (TCL). Ces résultats permettent de classer les substrats étudiés en trois catégories, en fonction de leur concentration en TCT :

- 1/substrats contenant un taux élevé de tanins (le genre *Acacia*),
- 2/substrats contenant un taux modéré de tanins (foin de vesce avoine),
- 3/substrats contenant un faible taux de tanins (*O. ficus indica*).

Tableau 11. Teneurs en facteurs antinutritionnels (g/kg MS) des plantes fourragères collectées.

Espèce	PT	TT	TCL	TCl	TCT	OXT
Foin de vesce avoine	5,0602	1,5934	38,25	19,74	57,99	48,62
<i>Opuntia ficus indica</i>	8,5946	1,9853	Nd	Nd	Nd	148,27
<i>A.nilotica</i>	213,4	205,5	609	117,3	726,3	Nd
<i>A.cyanophylla</i>	204,8	197,7	451,3	179,9	631,2	Nd

PT : Phénols totaux, TCT : tannins condensés totaux, TT : tannins totaux, TCL : tannins condensés libres, TCl : tannins condensés lié, OXT : oxalates totaux.

Plusieurs types de phénols, incluant les phénols simples et les polyphénols, affectent la valeur nutritive des aliments (Frutos *et al.*, 2004; Lamy *et al.*, 2011). La Concentration des TCT supérieure à 5% de MS affecte négativement l'ingestion et la digestibilité du fourrage (Silanikove *et al.*, 1996). Cependant, certains auteurs rapportent que les ruminants sont capables de tolérer des plantes avec des teneur en TCT en dessous de 100 g /kg MS (Gasmis-Boubaker *et al.*, 2005), bien que le niveau de tolérance puisse varier entre les espèces animales (Onwuka, 1992). Il est maintenant bien établi que les tanins peuvent complexer et inhiber les enzymes microbiennes mais aussi former des complexes avec les protéines alimentaires, les polysaccharides et avec plusieurs minéraux (Makkar, 2003), ce qui les rend indisponibles à la fois pour le microbiote ruminal et pour l'animal hôte. Ils peuvent aussi diffuser leurs produits métaboliques dans les tissus et provoquer une toxicité (Cheeke, 1995). Par ailleurs, Kaitho *et al.* (1998) ont étudié un large éventail d'espèces d'arbustes et concluent que les espèces arbustives à haute teneur en tanins, tels que *Acacia saligna*, induisent un by-pass ruminal élevé et une faible digestibilité apparente de l'azote. De ce fait, les teneurs relativement très élevées en phénols et en tanins dans les espèces d'*Acacia* étudiées peuvent être considérées comme un facteur limitant à l'utilisation de ces substrats comme suppléments effectifs aux fourrages de base. De plus, il est important de mentionner qu'une forte proportion de TCT des Acacias est récupérée dans cette étude sous forme de TCL, qui pourraient être responsables d'éventuels effets néfastes sur la fermentation microbienne des aliments dans le rumen (Barry et McNabb, 1999). Cependant, chez les ruminants, il a été démontré que les TCT alimentaires < 4% MS peuvent avoir des effets bénéfiques car ils

réduisent la dégradation des protéines dans le rumen par la formation de complexes protéines-tanins (Brunet, 2008; Yang, 2002), conduisant ainsi à l'augmentation de l'absorption d'acides aminés dans l'intestin grêle (Njidda and Nasiru, 2010). De plus, les TCT en se complexant aux hydrates de carbones peuvent réduire la production de gaz dans le rumen et réduire les ballonnements chez l'animal (Aganga and Tshwenyane, 2003). Sur cette base, les tannins ont été proposés comme additifs dans l'alimentation animale pour améliorer la croissance et la productivité des animaux et par conséquent minimiser les effets néfastes sur l'environnement (Lamy *et al.*, 2011; Njidda *et al.*, 2012). Le foin de vesce avoine, d'après sa teneur modérée en TCT, peut présenter un avantage nutritionnel pour l'animal. D'autres recherches constatent que la teneur et la quantité des composés secondaires ne déterminent pas toujours l'effet souhaité mais que d'autres facteurs comme la réactivité, la structure, le poids moléculaire et l'interaction des différents composés secondaires peuvent intervenir et influencer l'ingestion (McSweeney *et al.*, 2001). Par conséquent, il peut être difficile de suggérer définitivement l'utilisation de ces fourrages comme constituant des rations alimentaires, en se basant essentiellement sur leur composition chimique.

La synthèse des composés secondaires présents dans les végétaux est liée aux facteurs génétiques (Okuda *et al.*, 1993) mais aussi à des facteurs environnementaux, en réponse à des agressions : températures élevées, stress hydrique, mécanismes de défense contre les parasites et les herbivores (Mangan, 1988). Il y a une variation considérable des concentrations en tannins entre les Acacias testées dans la présente étude et ceux de la littérature (Krebs *et al.*, 2007; Alam *et al.*, 2007). En effet, nos valeurs sont élevées comparativement à celles rapportées par Njidda *et al.* (2008) et Njidda *et al.* (2013) pour des fourrages semi-arides originaires du Nord Nigérien. Des teneurs relativement plus faibles à celles de cette présente étude sont également signalées par Cheema *et al.* (2011) pour des fourrages arides du Pakistan et par Soltan *et al.* (2012) pour des Acacias prélevées dans les régions arides du Nord de l'Égypte. Ces différences peuvent être dues en partie aux différents procédés d'extraction utilisés, les essais de quantification entrepris et les standards utilisés. De même que la variabilité dans la composition chimique des composés phénoliques peut aussi représenter un facteur majeur (Del Pino *et al.*, 2005). Ces discordances peuvent être aussi dues au stade de croissance des plantes étudiées et/ou à la saison de collecte, à la nature du site de prélèvement et/ou aux proportions de feuilles et de tiges dans les fourrages testés (Rubanza *et al.*, 2005).

Les variations saisonnières en polyphénols, d'une manière générale, suivent des modèles différents dans chaque espèce végétale (Hagerman, 1987). Rana *et al.*, (2006) notent une nette augmentation de la teneur en tanins des espèces d'*Acacia* en automne et en hiver. Selon Gomes (1990), les TCT sont synthétisés principalement en hiver et au début du printemps. Subba *et al.* (1996) ont également observé une plus forte teneur en tanins, pendant la saison de printemps, dans les arbres fourragers. La condensation des tannins, pendant la saison d'hiver est un processus adaptatif des cellules du mésophylle résistant au froid, de manière à éviter toute blessure dans des conditions tempérées défavorables (Salaj and Kormutak, 1995) et de protéger les feuilles émergentes contre les attaques des insectes herbivores.

Le stress hydrique induit des augmentations de teneur en TCT mais la répartition entre les tanins libres et liés ou non aux protéines dépend du stress subi durant la croissance de la plante (Iason *et al.*, 1995). Il existe aussi une relation positive entre l'intensité lumineuse et la quantité de polyphénols produits dans une plante (Mole and Waterman, 1986). Less *et al.*, (1994) observent une augmentation de la teneur en TC dans le lotier pédonculé Cav. (*Lotus uliginosus*) quand la température est de 30°C comparée à 20°C, alors qu'il n'en est pas de même pour le lotier corniculé. Des teneurs plus élevées en TCT ont été également observées sur des sols acides peu fertilisés alors qu'elles sont plus faibles sur des sols convenablement fertilisés (Aufreere *et al.*, 2012).

En plus, avec l'évolution du stade de développement, la proportion de feuilles dans la biomasse de la plante entière diminue. Cela laisse supposer, les feuilles étant plus riches en TCT que les tiges, que la teneur en TCT diminue comme l'ont observé Borreani *et al.* (2003), avec du Sainfoin et du Sulla. Les résultats obtenus avec le Sainfoin, variété Perly, récolté à des stades et des cycles différents par Theodoridou (2010) indiquent peu de variations de la teneur en TC. A l'inverse, Bell *et al.* (1992), avec des feuilles de coton et Theodoridou *et al.* (2011) avec 3 variétés de Sainfoin, observent une augmentation de la teneur en TC avec le stade de développement. Ces résultats, apparemment contradictoires avec ceux rapportés plus haut, peuvent néanmoins s'expliquer : pendant la période de croissance les plantes produisent une quantité importante de biomasse et la synthèse des composés phénoliques est faible, alors que pendant la floraison la croissance est ralentie et le carbone serait plus disponible pour la synthèse des TC (Iason *et al.*, 1993).

Les variations considérables entre les différents composés phénoliques peuvent être liées, non seulement aux espèces fourragères elles mêmes mais aussi à la méthode d'analyse (Ammar *et al.*, 2004). En raison de la grande variation de leur structure, la mesure de la teneur en TC est complexe. Les méthodes de dosage les plus couramment utilisées sont des méthodes colorimétriques : HCL-butanol (voir chapitre matériels et méthodes), méthode à la vanilline (Terrill *et al.*, 1992) ou basées sur la précipitation des protéines (méthode de diffusion radiale, Hagerman, 1987). Ces méthodes permettent de doser des entités différentes et restent imparfaites en raison notamment d'un manque de standards appropriés et de leur non spécificité. La méthode de diffusion radiale permet de déterminer l'activité biologique mais elle est mal adaptée pour mesurer la teneur en TCT. La comparaison des résultats des différents travaux de la littérature reste donc difficile (Schofield *et al.*, 2001). Ainsi, le concept selon lequel une teneur en TC dans la plante inférieure à 50 g/kg MS serait bénéfique pour la santé et la nutrition de l'animal (Barry and McNabb, 1999) semble obsolète et ne reste valable que lorsque le dosage a été réalisé par la méthode vaniline-HCl ou par la méthode HCl-butanol. De plus, les recommandations de Barry et McNaab (1999) proviennent d'expérimentations réalisées avec du lotier et ne sont pas applicables à d'autres fourrages contenant une concentration plus élevée en TCT, estimée par la même méthode d'analyse. Par exemple, le Sulla (teneur en TC = 72 g/kg MS) et le Sain-foin (teneur en TCT = 80 g/kg MS) ont une valeur nutritive élevée (Stienezen *et al.*, 1996). La teneur plus faible en TC du lotier corniculé par rapport à celle du lotier pédonculé n'est pas suffisante à elle seule pour expliquer leurs effets différents du point de vue nutritionnel (Aufrère *et al.*, 2012).

1.3.2. Teneurs en Oxalates totaux

Bien que les raquettes de cactus inerme soient relativement très pauvres en tanins, ils sont très riches en oxalates totaux (148,27 g/kg MS), comparativement au foin de vesce avoine (48,62 g/Kg MS). En revanche, chez les espèces d'*Acacia* étudiées, ces composés secondaires sont absents ou décelés seulement à l'état de traces (tableau 11).

La répartition de l'acide oxalique chez les végétaux varie d'une famille à une autre (Sefa-Dedeh and Agyir-Sackey, 2004), avec une plus grande concentration dans les tissus foliaires des plantes (Fournier and Ruel, 2002; Rahman *et al.*, 2006). La teneur en oxalates des plantes fourragères dépend également de l'âge, du stade de développement de la plante, ainsi que des variations saisonnières (Patel *et al.*, 2013; Rahman *et al.*, 2009). La plus grande partie de l'acide oxalique contenu dans les plantes s'y trouve sous forme d'oxalates de

sodium et de potassium solubles. Dix à vingt pourcent seulement apparaissent comme oxalate insoluble, surtout dans les membranes cellulaires (Rahman *et al.*, 2008; Rahman and Kawamura, 2011).

Les teneurs élevées en oxalates totaux obtenues chez les raquettes de cactus inerme recourent celles rapportées par d'autres auteurs (Abidi *et al.*, 2009a, 2009b; Ben Salem *et al.*, 2002a). Nefzaoui and Ben Salem (2001) ont rapporté que les raquettes de cactus ont une teneur élevée en oxalates d'environ 13% de la MS, dont 40% sous forme soluble et probablement liés au calcium, ce qui rendrait cet anion moins disponible pour les animaux. Ces mêmes auteurs associent l'effet laxatif induit par l'ingestion des raquettes de cactus chez l'animal aux teneurs élevées du cactus en oxalates. Par ailleurs, Ben Salem *et al.* (2002a) ont constaté que l'apport de l'*Opuntia* au régime alimentaire réduisait l'ingestion des feuilles d'*Acacia* par les ovins, ils ont attribué l'effet négatif du cactus sur l'ingestion alimentaire à sa haute teneur en oxalates (soit 131 g / kg MS). Par conséquent, la concentration élevée en oxalates de l'*Opuntia* dans notre étude pourrait être associée à une diminution de l'ingestion alimentaire chez l'animal.

2. Aspects nutritionnels et digestibilité

2.1. Fermentation *in vitro* des substrats et de leur mixture par le microbiote ruminal

2.1.1. Production de gaz *in vitro*

Les résultats de la production de gaz *in vitro* des substrats (Cactus, *Acacia nilotica*, *A.cyanophylla* et le foin de vesce avoine) et de leurs mélanges sont rapportés dans le tableau 12. La production de gaz *in vitro* est significativement différente entre les substrats et aux différents temps d'incubation ($P < 0,001$). Après 96 heures d'incubation, le foin de vesce-avoine engendre la plus grande quantité de gaz total (43,5ml/g MS). Les acacias sont faiblement fermentés par le microbiote ruminal (33 et 30,2 ml/g MS, pour respectivement *A.nilotica* et *A.cyanophylla*). Tandis que les raquettes de cactus ont un comportement intermédiaire, avec une production de gaz total évaluée à 35 ml/g MS.

La méthode production de gaz *in vitro* de Menke *et al.* (1979) est largement utilisée pour estimer la valeur nutritive de divers aliments pour les ruminants (Sallam, 2005; Vitti *et*

al., 2005; Bakhawain *et al.*, 2010; Allam *et al.*, 2012). Elle simule le processus de fermentation des aliments dans le rumen à partir duquel les gaz CO₂ et CH₄ sont produits.

Les résultats de production de gaz *in vitro* de cette étude sont similaires à ceux rapportés par Cerrillo and Juarez (2004), pour des arbres et arbustes tropicaux, par El-Waziry, (2007) pour des arbustes fourragers du genre *Acacia* et *Atriplex* originaires d’Egypte et par Osuga *et al.* (2006) pour des espèces fourragères du Kenya.

Selon Chikagwa-Malunga *et al.* (2009), la composition chimique, la fermentation et la digestibilité *in vitro* sont largement affectées par l’espèce végétale, la fraction morphologique, le stade de maturité et les facteurs environnementaux. Ces facteurs influent sur la quantité de la MO du substrat fermenté et sur les acides gras à courtes chaînes, produits lors de la fermentation (Njidda *et al.*, 2013). Par ailleurs, la production de gaz est essentiellement le résultat de la fermentation des hydrates de carbone en acétate, propionate et butyrate (Blümmel and Orskov, 1993). La production de gaz à partir de la fermentation des protéines est relativement faible par rapport aux hydrates de carbone, tandis que la contribution des MG à la production de gaz est négligeable (Al-Soqeer, 2008). La variation notée pour le volume total de gaz produit dans cette étude est probablement liée à la composition chimique différente des substrats étudiés (tableau 10 et 11).

Malgré la richesse des raquettes de cactus en glucides solubles et facilement fermentescibles, leur dégradation engendre une faible production de gaz, comparativement au foin de vesce avoine. Ceci pourrait s’expliquer par une teneur en MO relativement plus élevée chez le foin de vesce avoine. D’autre part, la présence des oxalates à des teneurs élevées dans les raquettes de cactus pourrait probablement inhiber l’activité microbienne du rumen, se traduisant ainsi par une plus faible production de gaz total (Ben Salem *et al.*, 2002a). La production de gaz est en revanche plus élevée pour le cactus comparativement à *A.nilotica* et *A.cyanophylla*. Ces résultats rejoignent ceux de Ben Salem *et al.* (2002a) qui notent une production de gaz *in vitro* plus élevée chez le cactus, relativement à l’*Acacia cyanophylla*, ils l’ont attribué à la différence du profil des hydrates de carbones des deux plantes.

Tableau 12. Production de gaz *in vitro* (ml/200mg MS) des substrats individuels et des mélanges

Niveau de substrat inclus/temps d'incubation	Association cactus -foin				Association <i>A.nilotica</i> -foin				Association <i>A.cyanophylla</i> -foin				S.E.M
	100%	60%	30%	0%	100%	60%	30%	0%	100%	60%	30%	0%	
2 h	8,00 ^a	7,50 ^c	7,90 ^b	7,00 ^d	3,90 ^f	2,90 ^j	3,50 ^h	7,00 ^d	3,00 ⁱ	3,70 ^g	6,60 ^e	7,00 ^d	0,38
6h	13,33 ^a	12,17 ^c	12,83 ^b	9,50 ^d	5,51 ^h	5,90 ^g	6,00 ^f	9,50 ^d	5,00 ⁱ	4,90 ^j	8,00 ^e	9,50 ^d	0,60
12h	18,33 ^b	18,17 ^c	19,50 ^a	15,67 ^d	11,2 ^h	11,50 ^g	12,30 ^f	15,67 ^d	10,10 ^j	11,00 ⁱ	13,00 ^e	15,67 ^d	0,62
24h	25,5 ^c	21,50 ^f	28,50 ^b	29,00 ^a	15 ^h	21,00 ^g	24,50 ^d	29,00 ^a	13,00 ⁱ	19,50 ^g	23,50 ^e	29,00 ^a	0,93
48h	29,01 ^g	33,01 ^d	36,00 ^a	35,41 ^b	26,5 ^h	29,50 ^f	31,00 ^e	35,41 ^b	23,90 ^j	24,90 ⁱ	30,50 ^c	35,41 ^b	0,72
72h	33,01 ^d	34,01 ^c	40,90 ^a	40,74 ^b	31 ^g	32,00 ^f	32,50 ^e	40,74 ^b	28,00 ⁱ	29,50 ^h	32,00 ^f	40,74 ^b	0,76
96h	35,00 ^d	36,50 ^c	43,90 ^a	43,50 ^b	33 ^g	34,00 ^e	35,00 ^d	43,5 ^b	30,20 ⁱ	31,50 ^h	33,50 ^f	43,50 ^b	0,81

a, b, c, d, e, f, g, h, i moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes (P < 0,05). S.E.M. : erreur standard des moyennes.

La faible production de gaz résultant de la dégradation des espèces d'*Acacia* a également été observée dans d'autres études (Ben Salem *et al.*, 2002; Bakhawain *et al.*, 2010; Allam *et al.*, 2012). Ces faibles valeurs pourraient être attribuées à leur structure très lignifiée et/ou à leur richesse en composés phénoliques, en particulier les tannins condensés. La présence de lignine protège les glucides de l'attaque des microorganismes du rumen, induisant une faible dégradabilité du substrat. Njidda *et al.*, (2013) associent également les faibles valeurs de production de gaz *in vitro* obtenues pour des arbustes fourragers collectés de régions semi-arides du Nigeria aux teneurs relativement élevées en ADL des plantes. Des observations similaires sont rapportées par Camacho *et al.* (2010). L'effet négatif des TCT sur la production de gaz *in vitro* a largement été démontré (Chiquette *et al.*, 1988; Edwards *et al.*, 2012; Min *et al.*, 2003; Mohammadabadi *et al.*, 2010). Frutos *et al.* (2002) ont observé une corrélation négative entre les TCT et la production de gaz *in vitro* chez les moutons, avec différentes légumineuses arbustives. Alam *et al.* (2007) ont observé une augmentation de la production de gaz, lorsque le PEG est ajouté aux cultures et ils concluent que les TCT ont inhibé la fermentation de toutes les plantes testées, en particulier celles des Acacias. Selon Osuga *et al.* (2005), l'effet des TCT sur la fermentation ruminale est seulement notable à des concentrations élevées. Les TC libres forment des complexes avec les molécules nutritives et les glucides, les rendant non dégradables, ils peuvent réduire l'adhésion des microorganismes du rumen aux particules alimentaires, inhiber la croissance microbienne et l'activité enzymatique ou l'activité bactérienne intestinale (Salem *et al.*, 2007). Tous ces processus conduisent à la diminution de la production de gaz (Evitayani *et al.*, 2004; Griffiths, 1986).

En revanche, dans notre étude le foin de vesce-avoine se montre très fermentescible. Ceci pourrait résulter de la nature hybride de ce fourrage, formé de l'association de deux plantes appartenant à deux familles botaniques différentes, la vesce (*vicia sativa*) qui est une légumineuse fourragère riche en glucides mais aussi en protéines et l'avoine (*Avena Sativa*) qui est une graminée riche en fibres (Barry and McNabb, 1999; Ammar *et al.*, 2004). Il faut également signaler que le foin est l'aliment le plus couramment donné aux ruminants, par conséquent le microbiote ruminal est adapté à sa dégradation. C'est d'ailleurs pour cette raison que nous l'avons choisi comme substrat de référence.

La classification des fourrages sur la base des résultats de la production de gaz après 96 heures d'incubation est ainsi la suivante : **foin de vesce-avoine > cactus > *A.nilotica* > *A. cyanophylla*.**

D'autre part, l'incorporation du cactus inerme, d'*A. nilotica* et d'*A. cyanophylla* au foin de vesce avoine induit en général une réduction dans la production de gaz total pour les différentes doses ($P < 0,001$), comparativement au foin mis à fermenter seul. Cette réduction est dépendante de la concentration dans le cas des Acacias. Ainsi et après 96h d'incubation, cette chute est de l'ordre de 22,9 et 27,58% pour les concentrations 30 et 60% d'*A. cyanophylla* ajoutée, respectivement et de 19,54 et 21,83% pour les concentrations 30 et 60% d'*A. nilotica*, respectivement. Pour le cactus, une même tendance est observée pour la dose 60 % incorporée mais elle est significativement plus faible ($P < 0,001$). Le taux de réduction enregistré est de 16,09%. Cependant, l'effet inhibiteur des oxalates sur l'activité du microbiote ruminal ne semble pas être observé pour la proportion 30% de cactus ajoutés, où au contraire une augmentation limitée mais perceptible (presque 1%) dans la production de gaz total est notée.

2.1.2. Etude des effets associatifs des mixtures « Arbuste-Foin » sur la production de gaz cumulative

Les combinaisons des différents arbustes et à différentes proportions au foin de vesce avoine induisent en général des effets associatifs différents sur la production de gaz *in vitro*, mesurée après 24h d'incubation (tableau 13). La production de gaz total pour le mélange contenant 30% cactus + 70% foin est significativement supérieure aux valeurs calculées (Jusqu'à + 2%, effet positif, $P < 0,05$). En revanche, la production de gaz total pour le mélange contenant 60% cactus + 40% foin est en dessous du zéro et est très significativement inférieure aux valeurs théoriques (jusqu'à -20,07 %, effet négatif, $P < 0,001$). Un effet associatif négatif vers une production de gaz en moins est observé pour la mixture *A. cyanophylla*-Foin (30 :70) (%/%) (Jusqu'à - 2,9%, $P < 0,05$). Cependant, un effet associatif très faible ou nul ($P > 0,05$) est observé lorsqu'*A. cyanophylla* est combinée au foin à raison de 60-40 (%/%). Par ailleurs, les mélanges à base d'*A. nilotica* n'ont aucun effet non additif ($P > 0,05$) sur la production de gaz total.

Tableau 13. Effets associatifs entre les plantes contenues dans les mixtures (Différence dans les valeurs observées par rapport aux valeurs théoriques, en pourcentage des valeurs théoriques) sur la production de gaz total *in vitro*, après 24h de fermentation.

Mixtures	PG observé	PG théorique	obs/cal (%)
60% Cactus+ 40% foin	21,50	26,90	-20,07***
30% Cactus+ 70% foin	28,50	27,95	1,96*
60% <i>A.nilotica</i>+ 40% foin	21,00	20,60	1,94
30% <i>A.nilotica</i> + 70% foin	24,50	24,80	-1,20
60% <i>A.cyanophylla</i>+ 40% foin	19,50	19,40	0,51
30% <i>A.cyanophylla</i> + 70% foin	23,50	24,20	-2,89*

* : P < 0.05, ** : P < 0.01, *** : P < 0.001 ; PG : production de gaz total ;

Obs/Cal (%) = 100x [(valeur observée-valeur théorique)/valeur théorique]; Où, Valeur observée: obtenue par les mesures, Valeur théorique : calculée par la moyenne des valeurs obtenues par les incubations respectives de plantes individuelles présentes dans les mélanges.

Les valeurs positives ou négatives indiquent un effet associatif positif ou négatif entre les plantes dans les mixtures, respectivement.

Lorsque les ruminants sont alimentés avec un mélange de fourrages, des interactions digestives peuvent se produire entre les nutriments contenus dans les différentes plantes (Niderkorn and Baumont, 2009). Ces interactions, appelées effets associatifs, peuvent modifier les processus métaboliques dans le tube digestif, en particulier dans le rumen. Si bien que la réponse d'un animal à une combinaison de fourrages peut différer (supérieure ou inférieure) des valeurs médianes pondérées de ses composants pris individuellement. Ce type de réponse peut être positif (synergique) ou négatif (antagoniste) (Rosales and Gill, 1997; Jayanegara *et al.*, 2013). Selon Niderkorn and Baumont (2009) et Niderkorn *et al.*(2011), ces réponses semblent être liées à la nature des composants alimentaires et leur composition en et qualité nutritionnelle et à la présence éventuelle de composés secondaires bioactifs. Bien que très peu de travaux ont spécifiquement étudié les effets non additifs de substrats alimentaires ou des plantes caractérisées par des composés spécifiques sur la fermentation ruminale *in vitro* (Liu *et al.*, 2002; Jayanegara *et al.*, 2013) et *in vivo* (Wang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010), les résultats présentés jusqu'à présent sont très variables : certains mélanges ayant des effets non additifs (favorables ou défavorables) et d'autres non additifs.

Dans cette présente étude, les effets associatifs « négatifs et positifs », en terme de production de gaz total, sont probablement reliés au synchronisme ou à l'asynchronisme dans la libération du contenu des protéines et d'autres constituants nutritifs dans les mélanges. Dans les proportions arbuste-fourrage conventionnelle analysées dans cette étude, les combinaisons de cactus et d'*A.cyanophylla* avec le foin de vesce avoine à raison de 60-40 (% /%) et de 30-70 (%/%), respectivement produisent des effets antagonistes sur la production de gaz après 24 heures d'incubation. Ainsi, il semblerait que l'accélération de la digestion du foin due à la présence d'arbuste riche en sucres solubles n'a pas totalement compensé le ralentissement de la digestion de l'arbuste, en raison de la présence du foin dans le mélange. Cette diminution dans la production de gaz induite par l'addition d'*A.cyanophylla* au foin est probablement due à l'effet inhibiteur des TCT présents dans l'*Acacia* (McSweeney *et al.*, 2001). Selon Rosales and Gill (1997), dans des mélanges à base d'arbres fourragers, les effets associatifs négatifs pourraient être liés à des protéine alimentaires protégées de la fermentation par les tanins et fournissant ainsi les protéines de dérivation. Les tannins ont la propriété de complexer les protéines à un pH neutre et de les libérer à un pH bas, les TCT peuvent être utilisés pour réduire le taux de dégradation des protéines solubles dans le rumen et ainsi augmenter le taux de passage de l'azote non ammoniacal jusqu'à l'intestin grêle. Dans ce cas, un effet négatif sur la digestibilité peut être un effet positif en termes de performances des animaux. Par ailleurs, les résultats de Rosales (1996) ont montré des effets associatifs négatifs en mélangeant des plantes contenant des tanins avec du matériel végétal sans tanins mais riche en protéines solubles. Bien que l'ampleur soit importante, ces effets n'étaient pas statistiquement significatifs aux niveaux utilisés. Le seul cas d'un effet associatif négatif significatif a été trouvé pour un mélange à base de deux plantes toutes deux riches en tanins, indiquant un antagonisme des deux composants en fermentescibilité. Dans cette étude aucun effet associatif sur la production de gaz n'est observé lorsqu'*A.cyanophylla* est associée au foin de vesce avoine à raison de 60% dans le mélange. Ce résultat ne concorde pas avec les études précédentes montrant que l'effet néfaste des TCT sur la digestion ruminale se produit à des concentrations accrues (Waghorn, 2008).

L'effet antagoniste sur la production de gaz total, généré en associant les raquettes de cactus au foin de vesce avoine à raison de 60-40 (% /%) est probablement liée à la présence des oxalates en concentration élevée dans le cactus. Les effets négatifs de ces composés secondaires sur la digestion alimentaire et la fermentation de la cellulose ont été également démontrés dans des travaux *in vivo* (James and Butcher, 1972) et *in vitro* (James *et al.*, 1967).

Cependant, l'effet inhibiteur induit par ces derniers sur l'activité du microbiote ruminal ne semble pas être observé pour la proportion 30% de cactus ajoutés au foin, bien au contraire un effet synergétique sur la production de gaz est engendré par cette combinaison. Ceci pourrait probablement s'expliquer par un effet nul ou non significatif de ces substances à cette faible dose de cactus et/ou par une adaptation du microbiote ruminal de bovins, vraisemblablement en raison de l'effet de dilution des oxalates dans le mélange. Ce résultat est cohérent avec les études précédentes montrant que l'effet néfaste des oxalates sur la fermentation ruminale se produit à des concentrations élevées (Rahman *et al.*, 2013). En effet, lorsque de faibles quantités d'oxalates sont consommées, la plupart des oxalates peuvent être détruits par les bactéries du rumen (Fournier and Ruel, 2002). Selon Knight and Walter (2001), les ruminants broutant de faibles quantités de plantes riches en oxalates peuvent augmenter leur tolérance pour l'oxalate de 30% et plus en quelques jours. Une fois adapté à l'oxalate, les ovins et les bovins peuvent utiliser efficacement une variété de fourrages riches en oxalates qui autrement auraient été toxiques (Knight and Walter, 2001).

Par ailleurs, la présence du foin de vesce avoine à une proportion élevée dans le mélange aurait contrecarré l'effet négatif des oxalates sur la production de gaz. En raison de son niveau élevé en azote, le foin de vesce avoine semble probablement avoir compensé la faible teneur en N du cactus et avoir dilué ses effets négatifs associés aux oxalates. Ben Salem *et al.* (2002a) ont fait les mêmes conclusions en associant l'*Atriplex* et le cactus et en observant que l'azote et le sodium contenus dans l'*Atriplex* auraient neutralisé les effets des oxalates du cactus. Dans ses travaux *in vitro*, Rosales and Gill (1997) démontrent que les effets associatifs de mélanges à base de feuilles d'arbustes fourragers varient avec le temps et avec le niveau d'azote du mélange. Ils suggèrent que ces effets sont régis par le degré de synchronisation des taux des différents composants individuels du mélange, ils dépendent à leur tour de la fermentescibilité de leurs constituants chimiques. Dans cette présente étude, une synchronisation dans la libération des protéines et /ou des fibres et des glucides facilement fermentescibles contenus dans le foin et le cactus, respectivement, pourrait probablement expliquer l'effet associatif synergétique de ce mélange sur la production de gaz total. Glenn (1989) suggère que le mode d'action des effets associatifs positifs dans des mélanges de luzerne (*Medicago sativa*) et de dactyle (*Dactylis glomerata*) serait une synergie entre les NDF et l'azote des deux espèces, en terme de fermentation dans le rumen. Dans leur étude Rosales and Gill (1997) observent que les mélanges de plantes riches en glucides rapidement fermentescibles avec des fourrages riches en azote soluble et fermentescible

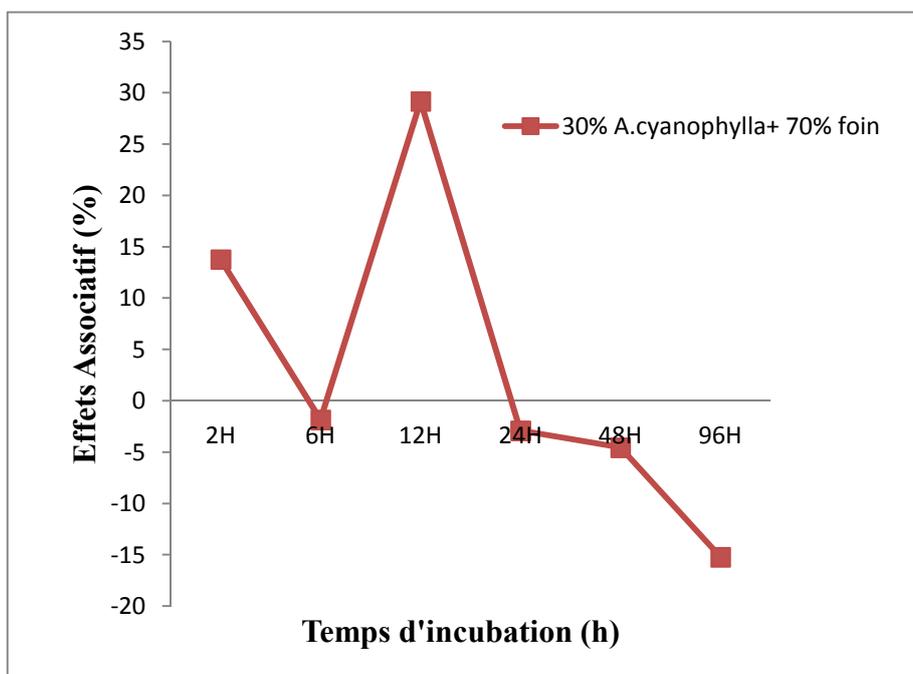
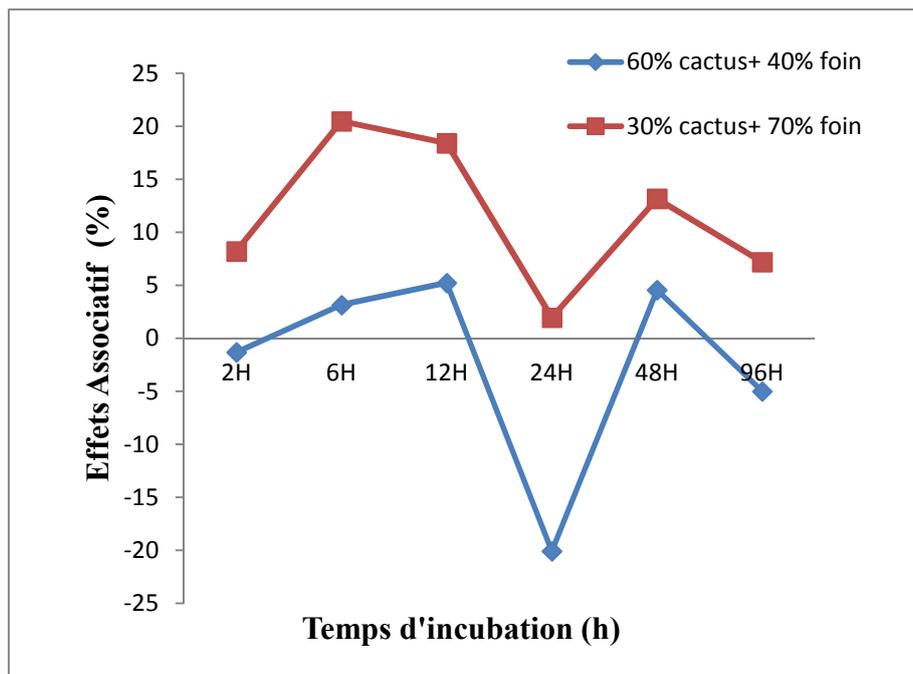
engendrent l'effet associatif positif le plus élevé de tous. Divers auteurs proposent que l'efficacité de la croissance du microbiote ruminal et donc les performances des animaux peuvent être améliorées par une synchronisation de l'apport énergétique et azoté dans le rumen (Liu *et al.*, 2002). Selon Rosales (1996), les principaux composants chimiques impliqués dans les effets associatifs sont les protéines (au moins deux fractions dans chaque composant du mélange), les sucres, l'amidon et la cellulose. Les composés secondaires jouent également un rôle en affectant les taux de fermentation et donc la synchronie. Cependant, il est difficile de prédire l'effet associatif de la composition chimique du fait que l'effet est produit par l'interaction de tous les composants.

Dans cette étude la synchronisation s'est produite à des moments différents au cours de la période d'incubation, elle est caractérisée par des changements dans la cinétique de fermentation du mélange (figure 8). Ces effets associatifs sont plus prononcés durant les premières heures d'incubation, en comparaison avec 24h d'incubation et l'ampleur de ces différences varie avec les combinaisons d'aliments. Ces résultats sont similaires à ceux de Niderkorn *et al.* (2011) et Robinson *et al.* (2009). Dans un système *in vitro*, ces derniers observent des effets non additifs sur la production de gaz aux temps d'incubation 3,5 ou 8 h nettement supérieurs à ceux de 24h. Par ailleurs, les résultats de Robinson *et al.* (2009) ont démontré que les effets associatifs pouvaient atteindre 15 à 25% au début de l'incubation pour se dissiper avec la progression de la fermentation. Hristov *et al.* (2008) notent que les incubations à court terme pourraient fournir des estimations plus fiables des variables de fermentation dans le rumen que ne le font les incubations à long terme. L'impact pratique de ces effets associatifs relativement plus élevés aux premières heures d'incubation n'est pas encore connu.

Toutefois, ces mesures *in vitro* sont à partir d'une culture discontinue où la possibilité d'influences négatives, par exemple, de l'amidon sont susceptibles d'être maximales aux premières heures d'incubation. Après que l'amidon soit fermenté, la fermentation pourrait devenir principalement cellulolytique. En revanche, l'amidon ne disparaît jamais complètement du rumen *in vivo* et sa fermentation peut avoir un effet négatif relativement constant sur la fermentation des fibres alimentaires complémentaires, tels que l'inactivité relative de microorganismes cellulolytiques dans la dégradation des fibres, résultant probablement du piégeage de glucose par les microorganismes amylolytiques. Ceci suggère

que les associations à court terme produites en début d'incubation seraient de plus en plus pertinentes dans une situation *in vivo*.

Figure 8 : Effets associatifs des mixtures (significatifs à 24h) sur la production de gaz *in vitro*, à différents temps d'incubations



2.1.3. Cinétique de la production de gaz *in vitro*

Les cinétiques de production de gaz des différents substrats et de leurs mélanges sont illustrées par la figure 9. Elles indiquent que les quatre substrats sont intensément dégradés durant la phase exponentielle, où environ 75% du gaz cumulé est produit. Cette période dure de 0 à 24 heures pour le cactus et de 0 à 48 heures pour le foin de vesce avoine et les Acacias. Par la suite, un ralentissement dans la production de gaz est observé. La phase stationnaire est atteinte après 72 h d'incubation pour le foin et les acacias et 48 h pour le cactus, elle correspond à l'épuisement du milieu de fermentation (dégradation complète du substrat) et aux conditions défavorables engendrées dans le milieu par l'acidité résultante de l'accumulation des acides gras volatils (AGV). De façon générale, le cactus inerme a une plus forte production de gaz dans les premières 24 heures mais c'est le foin de vesce avoine qui produit le plus de gaz durant les 72 heures d'incubation. Cette situation est essentiellement liée à leurs contenus soluble (fraction NFC) et insoluble (fraction NDF) élevés. La dégradation relativement intense du cactus durant les premières 24h d'incubation peut résulter à la fois par son contenu cellulaire riche en sucres rapidement fermentescibles, permettant une activité microbienne intense, et par son contenu minéral élevé qui pourrait faciliter l'adhésion des microorganismes du rumen à leur substrats (flore cellulolytique). Nefzaoui and Ben Salem (2001) ont également rapporté que les composants de raquettes de cactus sont dégradés rapidement dans le rumen durant les premières heures d'incubation, en comparaison au foin de luzerne. En général, la production de gaz *in vitro* des mixtures étudiées évolue progressivement juste après l'incubation de la même façon, suivant une allure ascendante pour atteindre un pic vers 48 h d'incubation pour la plupart des échantillons.

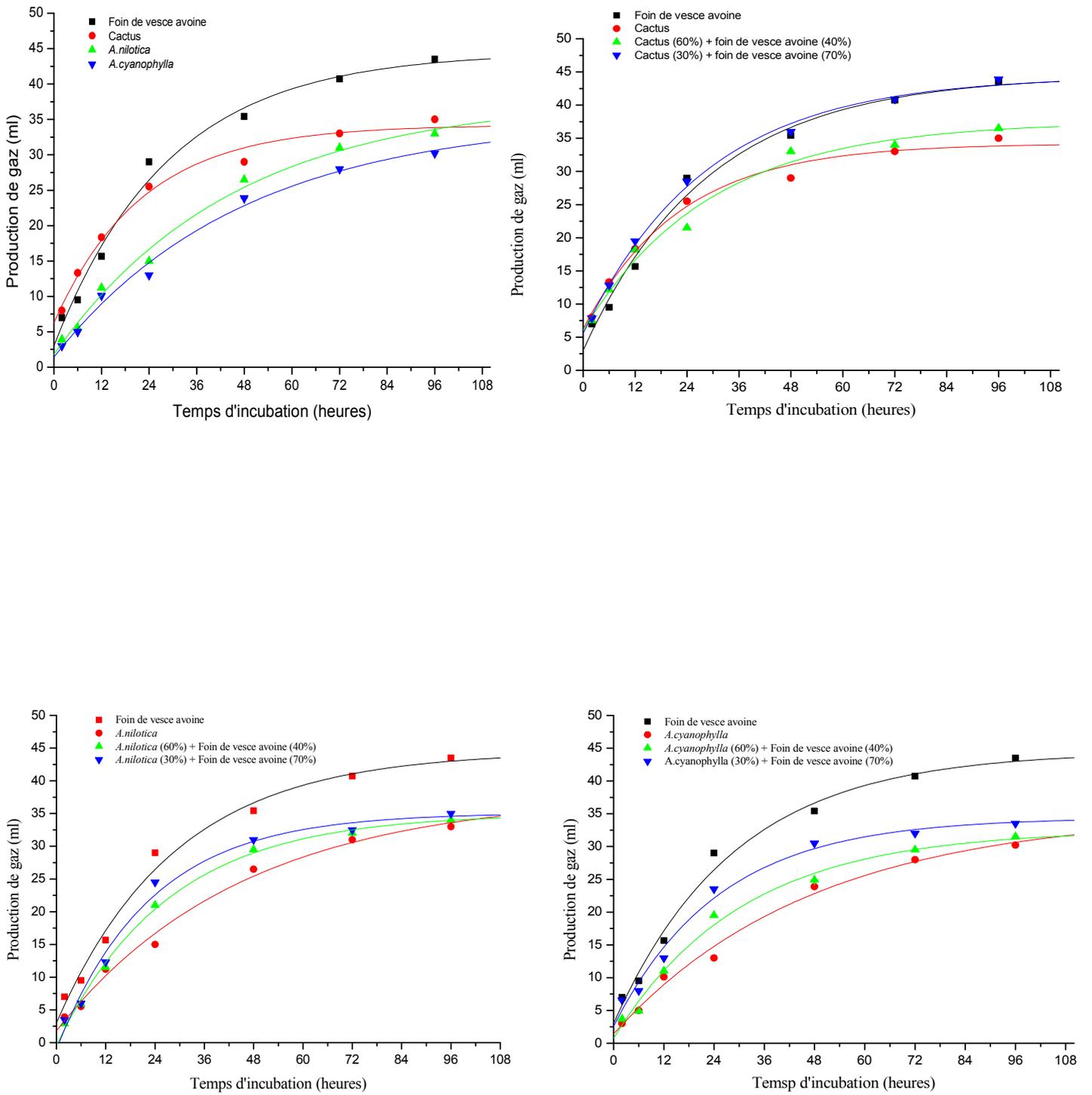


Figure 9. Cinétique modélisée de la production de gaz des substrats et des mélanges

2.1.4. Ajustement de la cinétique de production de gaz *in vitro* par le modèle d'Orskov

Les paramètres cinétiques de la fermentation *in vitro* des différents substrats seuls et de leurs mélanges, déduits du modèle exponentiel d'Orskov et Mc Donald (1979), sont mentionnés dans le tableau 14. Il en ressort que la production de gaz résultant de la fraction soluble (a) est significativement supérieure chez le cactus (6,26 ml), comparativement aux trois autres plantes ($P < 0,05$). La plus faible est notée pour *A.cyanophylla* (1,43ml). Les valeurs positives de la production de gaz engendrées par la fraction (a) sont également signalées pour des plantes de même nature par d'autres auteurs (Cerrillo and Juarez, 2004; Bouazza *et al.*, 2012). Ils sont synonymes d'une absence de phase de latence due à la colonisation et à la dégradation rapide de la fraction pariétale. Cependant, il apparaît que la fermentation *in vitro* des différents mélanges à base d'*A.nilotica* est tributaire d'une phase de latence, indiquée par les valeurs négatives de la fraction (a) (-0,44 pour 60% d'*A.nilotica* et -1,00 ml pour 30% d'*A.nilotica*) de l'aliment (Orskov and Ryle, 1990). Cette phase pourrait être attribuée à l'action des tanins sur la dégradation des fibres, soit directement par la formation de complexes avec la matière lignocellulosique qui empêchent l'adhésion des microorganismes ou indirectement en inhibant les cellulases impliquées dans leur dégradation (McSweeney *et al.*, 2001).

La production de gaz à partir de la fraction insoluble mais potentiellement fermentescible (b) est aussi significativement différente entre les substrats étudiés ($P < 0,05$). Le foin de vesce-avoine a la valeur la plus élevée (41,47 ml/g MS), il est suivi par les Acacias (36,13 ml pour *A.nilotica* et 33,7 ml pour *A.cyanophylla*). Les raquettes de cactus se distinguent par la faible dégradation de leur fraction insoluble (27,95 ml/g MS). L'estimation de la production de gaz à partir de la fraction (b) montre clairement qu'*A.nilotica* et, à moindre degré, *A.cyanophylla* se caractérisent par une bonne fermentescibilité des constituants de leurs parois cellulaires par le microbiote ruminal, malgré leur concentration en lignine élevée. Cette situation pourrait être liée à la structure, la disposition et la configuration des polysaccharides pariétaux dans la paroi cellulaire (Longuo and Ouled Belkher, 1989).

Tableau 14. Paramètres cinétiques du modèle exponentiel des substrats singuliers et des mélanges.

Paramètres cinétiques	cactus +foin				<i>A.nilotica</i> +foin				<i>A.cyanophylla</i> +foin				S.E.M
	100%	60%	30%	0%	100%	60%	30%	0%	100%	60%	30%	0%	
a (ml)	6,26 ^a	6,01 ^b	5,58 ^c	3,01 ^d	1,80 ^f	-0,44 ⁱ	-1,00 ^j	3,01 ^d	1,43 ^g	0,76 ^h	2,59 ^e	3,01 ^d	0,53
b (ml)	27,95 ^j	31,50 ⁱ	38,77 ^b	41,47 ^a	36,13 ^c	35,41 ^e	36,10 ^d	41,47 ^a	33,70 ^f	31,78 ^g	31,82 ^h	41,47 ^a	0,46
c (h⁻¹)	0,045 ^a	0,035 ^f	0,035 ^e	0,035 ^f	0,022 ^h	0,037 ^d	0,044 ^b	0,035 ^f	0,021 ⁱ	0,033 ^g	0,039 ^c	0,035 ^f	0,69

a : gaz produit à partir de la fraction soluble (ml/200mg MS), **b** : gaz produit à partir de la fraction insoluble mais potentiellement fermentescible (ml/200mgMS), **c** : vitesse de production de gaz (h⁻¹).

a, b, c, d, e, f, g, h, i moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes (P < 0,05). **S.E.M.** : erreur standard des moyennes

La vitesse de production de gaz (c) à partir de la fraction (b) est significativement différente entre les fourrages ($P < 0,05$). Les raquettes de cactus sont les plus rapidement fermentées par le microbiote ruminal ($0,0451 \text{ h}^{-1}$), elles sont suivies du foin de vesce avoine ($0,0347 \text{ h}^{-1}$) et des Acacias qui sont sensiblement dégradées à la même vitesse ($0,0221$ et $0,021 \text{ h}^{-1}$, pour respectivement *A.nilotica* et *A.cyanophylla*). Ces différences sont certainement liées à la composition chimique différente des substrats étudiés. Les paramètres de production de gaz sont comparables à ceux rapportés pour des arbustes fourragers à usages multiples (Larbi *et al.*, 1998). Dans cette étude, la vitesse de production de gaz de 18 échantillons de fourrages se situait dans un intervalle de $0,0248 \pm 0,1256 \text{ h}^{-1}$. La vitesse de production de gaz agit sur l'ingestion des aliments car elle affecte la vitesse de passage des particules alimentaires (k) dans le rumen. Elle dépend de la nature du substrat et plus précisément de son contenu fibreux (Khazaal *et al.*, 1995). Ben Salem *et al.* (2002b) ont souligné la nécessité de combiner les raquettes de cactus à d'autres fourrages car, ingérées seules, elles peuvent augmenter la vitesse de passage des aliments dans le système digestif et causer de la diarrhée chez l'animal.

Concernant les mélanges, l'addition du cactus inerme au foin entraîne un accroissement significatif dans les valeurs de la fraction soluble (a) et les valeurs de (c), en comparaison avec le foin de vesce avoine incubé seul ($P < 0,05$). Une tendance inverse est observée pour la fraction (b) où l'on constate que l'incorporation du cactus induit une diminution dans les valeurs de la fraction insoluble mais potentiellement fermentescible ($P < 0,05$). Ces effets sont dose-dépendants. Ces constats pourraient être expliqués : dans le premier cas par l'accroissement du contenu énergétique et minéral qu'apportent les raquettes aux mixtures et, dans le second cas, par une éventuelle inhibition sélective du microbiote qui dégrade la fraction pariétale du foin de vesce-avoine et par les substances antinutritionnelles présentes dans le cactus.

2.1.5. Corrélation entre les constituants nutritifs, les métabolites secondaires, la production de gaz

Les corrélations entre les volumes de gaz produits, les paramètres cinétiques et les constituants chimiques des substrats étudiés sont consignées dans le tableau 15. Parmi la fraction pariétale, seule l'ADL est significativement et négativement corrélée à la production de gaz, surtout pendant les premières 12 heures d'incubation ($r = -0,1000$, $P < 0,001$; $-0,967$,

$P < 0,05$ et $-0,993$; $P < 0,01$, pour respectivement 2h, 6h et 12h). De même, la lignine a une influence négative sur la vitesse de dégradation c ($r = -0,973$, $P < 0,05$). En effet, la fraction ADL est reconnue comme étant un rempart indigestible pour tout le microbiote ruminal. Ces résultats concordent avec les travaux de Bouazza (2014) et Abdulrazak *et al.* (2000). Dans la présente étude, il ya une faible relation entre la fraction pariétal (NDF et ADF) et la production de gaz *in vitro*. Ceci est en contradiction avec les résultats obtenus par Salem *et al.* (2007), qui montrent une corrélation significativement négative, pour toutes les durées de fermentation. La matière azotée totale n'est pas reliée à la production de gaz, ce qui reflète la faible contribution du contenu azoté à la production de gaz, situation signalée par de nombreux auteurs (Long *et al.*, 1999; Aregheore, 2000). Les composés phénoliques sont corrélés négativement ($P < 0,05$) à la production de gaz durant les premières 24h d'incubation ($r = -0,966$; $-0,944$, et $-0,976$, pour respectivement 2h, 12h et 24h). Une tendance similaire est constatée pour les tannins condensés totaux. Khazaal *et al.* (1994) et Tolera *et al.* (1997) ont rapporté également une corrélation significative entre les TCT et la production de gaz. Cependant, Larbi *et al.* (1998) n'ont signalé aucune corrélation significative entre les tannins et les valeurs de production de gaz de 18 arbres à usages multiples en saisons humide et sèche dans l'ouest de l'Afrique. Cette situation peut être due aux différences dans la nature des tanins entre les espèces ligneuses (Jackson *et al.*, 1996). Les oxalates totaux son liées positivement à la production de gaz mais cette corrélation est significative seulement au temps d'incubation 6h ($r = 0,977$, $P < 0,05$). De plus, ils influencent positivement et significativement la fraction soluble (a) ($r = 0,997$, $P < 0,01$) et à un degré moindre la vitesse de production de gaz (c) ($r = 0,970$, $P < 0,05$).

Tableau 15. Coefficient de Corrélations (r) entre les composants nutritifs, composés secondaires, et production de gaz *in vitro* des substrats examinés.

	G2h	G6h	G12h	G24h	G48h	G72h	G96h	a	b	C
MS	0,91ns	0,97*	0,94ns	0,78ns	0,48ns	0,42ns	0,41ns	0,94ns	-0,45ns	0,97*
MM	-0,58ns	-0,77ns	-0,68ns	-0,28ns	0,11ns	0,17ns	0,20ns	-0,89ns	0,89ns	-0,75ns
MO	0,58ns	0,77ns	0,67ns	0,28ns	-0,11ns	-0,17ns	-0,20ns	0,89ns	-0,89ns	0,75ns
MAT	-0,79ns	-0,82ns	-0,81ns	-0,76ns	-0,51ns	-0,46ns	-0,46ns	-0,75ns	0,27ns	-0,84ns
NDF	0,16ns	-0,002ns	0,08ns	0,46ns	0,62ns	0,64ns	0,67ns	-0,21ns	0,69ns	0,03ns
ADF	-0,26ns	-0,45ns	-0,36ns	0,09ns	0,40ns	0,45ns	0,48ns	-0,64ns	0,89ns	-0,42ns
ADL	-0,10***	-0,98*	-0,99**	-0,94ns	-0,74ns	-0,69ns	-0,68ns	-0,89ns	0,16ns	-0,97*
MG	0,92ns	0,92ns	0,93ns	0,77ns	0,56ns	0,51ns	0,48ns	0,91ns	-0,32ns	0,91ns
NFC	-0,50ns	0,44ns	-0,47ns	-0,65ns	-0,59ns	-0,57ns	-0,59ns	-0,29ns	-0,20ns	-0,47ns
PT	-0,97*	-0,91ns	-0,95*	-0,98*	-0,82ns	-0,78ns	-0,77ns	-0,78ns	0,01ns	-0,92ns
TCT	-0,96*	-0,93ns	-0,95*	-0,95 *	-0,76ns	-0,72ns	-0,70ns	-0,82ns	0,10ns	-0,94ns
OXT	0,89ns	0,98*	0,94ns	0,69ns	0,36ns	0,30ns	0,274ns	0,99**	-0,59ns	0,97*

G2h : gaz pour à 2 heures, **MS** : matière sèche, **MO** : matière organique **MM** : matières minérales, **MAT** : matières azotée totale, **NDF** : neutral detergent fibre, **ADF** : acid detergent fibre, **ADL** : acid detergent lignin, **MG** : matières grasses, **NFC** : hydrates de carbones non fibreux, **PT** : Phénols totaux, **TCT** : tannins condensés totaux, **OXT** : oxalates totaux. **a** : gaz produit à partir de la fraction soluble (ml/200mg MS), **b** : gaz produit à partir de la fraction insoluble mais potentiellement fermentescible (ml/200mgMS), **c** : vitesse de production de gaz (h-1). * : P < 0,05, ** : P < 0,01, *** : P < 0,001, **ns** : non significative (P > 0,05).

2.2. Profil fermentaire des substrats et des mixtures

2.2.1. pH

Les valeurs de pH mesurées après 24h d'incubation pour les substrats et les mélanges sont représentées dans le tableau 16. Il en ressort qu'elles sont statistiquement distinctes ($P < 0,05$), et varient entre 6,87 et 7,25. La valeur la plus élevée est obtenue pour le cactus mis à fermenter seul et la plus basse est enregistrée pour le mélange à base de 30% cactus et 70% foin de vesce avoine. L'acidification du milieu de fermentation est essentiellement due à l'accumulation des acides gras volatiles (AGV). Ces valeurs restent au dessus du seuil critique d'inhibition de la croissance et de l'activité cellulolytique du microbiote ruminal ($\text{pH} \geq 6$) (Hoover, 1986), même lorsque les mélanges comprennent la dose la plus élevée en arbuste. Donc malgré la richesse de ce dernier en hydrates de carbone hautement fermentescibles, le pH ruminal n'est pas affecté négativement par leur présence dans les mixtures. Cette situation inattendue a également été rapportée par d'autres études *in vivo* (Ben Salem *et al.*, 1996 ; Misra *et al.*, 2006), qui l'expliquent par l'abondance de mucilage et de sels minéraux dans les raquettes de cactus qui amélioreraient la salivation, conduisant ainsi à la stabilité du pH ruminal. Dans notre cas, nous pouvons également l'attribuer, par analogie, à l'efficacité de la solution tampon utilisée (Juul, 1981).

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

Les résultats de l'azote ammoniacal (N-NH₃) des substrats et de leurs mixtures sont également présentés dans le tableau 16. La concentration en ammoniac mesurée après 24h de fermentation est statistiquement distincte entre les substrats testés ($P < 0,0001$). La production d'ammoniac issue de la dégradation d'*A. nilotica* est faible (12,4mg/100ml), comparativement à celle notée pour le foin de vesce avoine (14,41mg/100ml). Le cactus et *A. cyanophylla* produisent également de plus faibles taux d'azote ammoniacal (10,76 et 10,5 mg/100ml, respectivement). Par ailleurs, les résultats obtenus montrent que l'utilisation de chacun des arbustes dans le régime alimentaire peut modifier significativement la production d'ammoniaque après 24 h d'incubation pour les proportions étudiées ($P < 1\%$). En effet, comparativement au foin de vesce avoine mis à fermenter seul, l'incorporation que ce soit d'*A. nilotica* ou d'*A. cyanophylla* dans les mélanges, induit une diminution significative et linéaire dans la production d'N-NH₃, avec effet dose-dépendant. La réduction la plus élevée est observée pour la dose 60% d'*A. cyanophylla* (33,31%). Une même tendance est obtenue après addition du cactus à une proportion de 60% au foin de vesce avoine. Ces résultats

recourent parfaitement ceux d'autres études menées *in vivo* chez des ovins nourris de régimes à base de raquettes de cactus (Misra *et al.*, 2006). Toutefois, l'addition de 30% de cactus au foin augmente la production d' N-NH_3 de 3,4%, ce qui indique une stimulation de la protéolyse ruminale. Néanmoins, toutes les valeurs obtenues dans cette étude restent supérieures à celles de Nagadi *et al.*, (2000) qui estiment qu'une concentration en N-NH_3 de 80 mg/l est nécessaire pour assurer une activité métabolique maximale du microbiote ruminal *in vitro*.

Selon la littérature, la dégradation de la masse protéique alimentaire conduit essentiellement à la production d' N-NH_3 et à la biomasse bactérienne (Blümmel *et al.*, 1999; Jouany, 1994). Il s'avère que les arbustes sont pauvres en ammoniacque, comparativement au foin de vesce-avoine. Ce résultat pourrait probablement être attribué à l'inhibition de la dégradation des protéines et des processus de désamination par les TCT contenues dans les acacias (Goel and Makkar, 2012 et Soltan *et al.*, 2012). Ces derniers auteurs ont également rapporté de faibles concentrations d' N-NH_3 dans le liquide ruminal chez l'*Acacia* et *Leucaena*. Par ailleurs, la faible teneur en matières azotées totales des raquettes de cactus relativement au témoin, pourraient probablement expliquer les faibles concentrations en N-NH_3 pour le cactus.

De plus, les faibles teneurs en N-NH_3 de dégradation des régimes à base de cactus et des acacias sont probablement dues au déséquilibre observé dans leur faune ruminale (nombre des protozoaires). En effet, ces derniers jouent un rôle primordial dans la protéolyse où leur activité spécifique de désamination des acides aminés est trois fois supérieure à celle des bactéries (Eugène, 2002).

Il est également possible que les faibles concentrations en N-NH_3 observée soient due à une bonne assimilation et incorporation de l'azote par le microbiote ruminal (Nagadi *et al.*, 2000). Il a été rapporté que les NFC ont une relation positive à l'utilisation de l' N-NH_3 dans le rumen (Tylutki *et al.*, 2008). Etant donnée que l'utilisation de l'azote par le microbiote du rumen est liée à la quantité d'énergie fermentescible, les concentrations en NFC adéquates dans les substrats auraient probablement augmenté l'efficacité de la synthèse de protéines microbiennes, en favorisant une meilleure utilisation du N-NH_3 ruminal libéré dans le rumen (Cabrita *et al.*, 2006).

Tableau 16. Profil fermentaire (pH, concentrations en azote ammoniacal, AGVt et proportions des différents AGV) des substrats et des mixtures

Plantes/Mixtures	pH	N-NH ₃ (mg/100ml)	AGV t (mmol L ⁻¹)	AGVs, mmol L ⁻¹			
				Acetate,C2	Propionate,C3	Butyrate,C4	C2 : C3 ratio
Foin de vesce avoine	7,07ba	14,41b	40,29a	28,20a	4,34b	4,01a	3,49ba
<i>O. ficus indica</i>	7,29a	10,76h	19,93b	13,98b	8,07a	1,60b	3,22ba
<i>A. nilotica</i>	7,01ba	12,40g	24,61b	17,59b	5,47ba	1,55b	3,21ba
<i>A. cyanophylla</i>	6,97ba	10,50i	23,48b	16,92b	4,75b	1,80b	3,56a
Cf (60%+40%)	6,97ba	13,33 ^e	23,74b	16,44b	5,05b	2,24b	3,25ba
A.n f (60%+40%)	6,91b	13,00f	19,66b	13,99b	4,07b	1,59b	3,43ba
A.c f (60%+40%)	6,92b	9,61j	24,69b	17,21b	5,10b	2,38b	3,37ba
Cf (30%+70%)	6,87b	14,90a	19,88b	13,55b	4,10b	2,23b	3,30ba
A.n f (30%+70%)	7,13ba	14,25c	24,76b	16,84b	5,30ba	2,62b	3,18b
A.c f (30%+70%)	7,04ba	14,01d	24,50b	16,65b	5,21b	2,64b	3,20b
S.E.M	0,0300	0,6600	0,001	0,0009	0,0002	0,00017	0,0330

N-NH₃ : azote ammoniacal, DMO : digestibilité de la MO, AGVt : acides gras volatils totaux, C2 : acétate, C3 : propionate, C4 : butyrate, C₂:C₃= acétate propionate ratio. ^a, ^b, ^c, ^d, ^e, ^f, ^g, ^h moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes (P < 0,05). S.E.M. : erreur standard des moyennes. Cf : mélange cactus et foin de vesce avoine ; A.n f : mélange *A. nilotica* et foin de vesce avoine ; A.c f : mélange *A. cyanophylla* et foin de vesce avoine.

2.2.3. Production d'acides gras volatiles (AGV)

Les concentrations en AGV totaux (mmol/l) et le pourcentage molaires des AGV individuels sont présentés dans le tableau 16. La production en AGV totaux des différentes espèces arbustive est significativement plus faible de celle du foin de vesce-avoine ($P < 0,05$). Cependant, les valeurs obtenues pour le cactus, *A.nilotica* et *A.cyanophylla* sont comparables entre elles. La concentration la plus élevée est enregistrée pour le foin de vesce-avoine (40,29 mmol/l) et la plus faible pour le cactus (19,93 mmol/l). Les proportions d'acétate (C₂), propionate (C₃) et butyrate (C₄) sont significativement différentes entre les substrats étudiés ($P < 0,05$). La concentration la plus élevée en acétate est notée pour le foin de vesce-avoine (28,20 mmoles/l) et la plus faible pour le cactus (13,98 mmoles/l). La tendance inverse est constatée pour les proportions de propionate qui sont les plus élevées chez le cactus (8,07 mmoles/l), suivi d'*A.nilotica* (5,47 mmoles/l). Les plus faibles sont notées pour *A.cyaophylla* et le foin de vesce avoine, avec des valeurs relativement proches (4,75 et 4,34 mmoles/l, respectivement). Cependant, la proportion molaire du butyrate est significativement plus faible ($P < 0,05$) lors de la dégradation du cactus et des Acacias, comparativement au foin de vesce avoine, avec la valeur la plus élevée de 4,01 mmoles/l. Ce qui conduit à des ratios acétate/propionate (C₂/C₃) élevés. Il est relativement le plus important pour *A.cyanophylla* (3,56) et le plus faible pour *A.nilotica*, le cactus et le foin de vesce avoine, (3,21, 3,22 et 3,49, respectivement). Ce ratio est, cependant, comparable entre ces trois derniers substrats ($P > 0,05$).

Comparativement au foin de vesce avoine mis à fermenter seul, toutes les mixtures engendrent une diminution dans la production total d'AGV et dans les proportions de C₂ et C₄ ($p < 0,05$). Néanmoins, ces valeurs ne varient pas statistiquement entre les différents mélanges. L'incorporation de chacun des arbustes au foin n'a aucune influence significative ($P > 0,05$) sur la production de C₃, excepté pour la combinaison *A.nilotica*+foin (30 /70) (%/%), qui engendre une augmentation significative ($p < 0,05$) de la proportion molaire du C₃ (5,30 mmoles/l), relativement au foin mis à fermenter seul (4,34 mmoles/l). L'adition d'*A.niloica* ou d'*A.cyanophylla* à raison de 30% dans les mélanges induit une diminution significative ($p < 0,05$) du ratio (C₂/C₃) (3,17 et 3,19 respectivement), comparativement au foin. Toutefois, le ratio obtenu à partir des autres mixtures est statistiquement comparable au foin de vesce avoine. Il est à noter que la fermentation *in vitro* des différents substrats conduit également à la formation d'acides isobutyrique, isovalérique, valérique et caproïque mais en concentrations négligeables.

Les AGV produits par la fermentation ruminale fournissent plus de 70% de l'approvisionnement énergétique pour les ruminants (Rahman *et al.*, 2013), ils reflètent l'activité microbienne et le taux d'absorption à travers la paroi du rumen (De Campos *et al.*, 2002). Les AGV produits sont continuellement transportés vers le foie après absorption dans le flux sanguin à travers l'épithélium. L'élimination continue des AGV du rumen est importante, non seulement pour la distribution, mais aussi pour éviter une acidité excessive dans le liquide du rumen (Rahman *et al.*, 2013). Dans cette étude, la production des AGV totaux varie de 19,85 à 40,29 mmol /l, les plantes étudiées ont donc probablement un effet plutôt positif sur le métabolisme énergétique global dans le rumen. Des résultats approximatifs ont été obtenus par Souza *et al.* (2009), évaluant la fermentation dans le rumen de chèvres alimentées par des arbustes fourragers.

Selon Jaroslav *et al.* (2009), la fermentation d'aliments riches en amidon et en sucres facilement fermentescibles tend à produire plus de propionate et de butyrate, tandis que des substrats fibreux aboutissent à une formation plus importante d'acétate. Ainsi, la prédominance d'acétate dans le pool des AGVt s'expliquerait par le contenu relativement élevé en NDF des substrats étudiés. Les ratios (C_2/C_3) obtenus dans cette étude se situent dans l'intervalle compris entre 3 et 4,1 rapporté *in vivo* par DePeters *et al.*, (2000). Des ratios variant entre 2,0 et 4,1 ont été également notés *in vitro* par différents auteurs (Blümmel *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2002) qui concluent qu'un ratio C_2/C_3 élevé est une indication d'une proportion élevée en NDF digestibles dans les aliments. Bien que l'incorporation du cactus ou de l'une des deux Acacias au foin de vesce avoine, à différentes doses, induise une diminution significative dans la production d'AGV totaux, le rapport C_2/C_3 résultant de la dégradation de ces mélanges reste dans la fourchette optimale d'une bonne activité fermentaire. D'autre part, Beuvink and Spoelstra (1992) stipulent que la production d'acétate est liée à la production de gaz, engendrée par la dégradation des composants de l'aliment. Par contre, la formation de propionate est en relation avec les gaz libérés à partir du système tampon, induisant donc une diminution concomitante de la production de gaz total. De ce fait, le profil fermentaire obtenu confirme la bonne fermentescibilité *in vitro* de nos substrats par le microbiote ruminal.

2.3. Etude de la digestibilité des substrats et de leurs mixtures

La composition chimique seule ne suffit pas pour apprécier la valeur nutritive d'un aliment. Elle doit être couplée à la notion de sa digestibilité-indigestibilité qui détermine le niveau de métabolisation des éléments nutritifs révélés par les analyses chimiques.

2.3.1. Digestibilité apparente de la matière sèche

La digestibilité apparente de la matière sèche (DMS) des substrats étudiés et des mélanges est montrée dans le tableau 17. La DMS est significativement distinctes entre les fourrages ($P < 0,0001$). La DMS varie entre 49 et 67,04%. Les valeurs les plus élevées sont obtenues pour le foin de vesce avoine, il est suivi du cactus, par rapport à des valeurs de digestibilité relativement plus faibles constatées chez le feuillage des deux espèces d'*Acacia* (54,03% pour *A.nilotica* et 49% pour *A.cyanophylla*).

2.3.2. Estimation de la digestibilité de la matière organique et de l'énergie métabolisable

La digestibilité de la matière organique (DMO) et de l'énergie métabolisable (EM) des substrats testés sont également présentées dans le tableau 17. Elles varient significativement entre les différents substrats étudiés ($P < 0,05$), avec des valeurs relativement plus faibles chez *A.cyanophylla* et *A.nilotica* (33,50% et 39,15%, respectivement pour la DMO et 4,86 et 5,46 MJ/Kg MS, respectivement pour l'EM), comparativement au foin de vesce avoine qui se distingue avec les valeurs les plus élevées (43,08% pour la DMO et 6,45 MJ/Kg MS, pour l'EM). Les raquettes de cactus semblent avoir des valeurs intermédiaires (41, 5%, pour la DMO et 6,11 MJ/Kg MS, pour l'EM). La matière organique digestible est importante pour la synthèse des protéines microbiennes du rumen comme source d'énergie. L'azote stimule la croissance microbienne dans le rumen, ce qui favorise une activité cellulolytique. En réponse, le microbiote du rumen rend plus d'énergie disponible sous la forme d'acides gras et réduit la quantité de protéines qui échappe à la dégradation ruminale (Costa *et al.*, 2012).

La classification des fourrages sur la base de la digestibilité est alors comme suit : **Foin de vesce-avoine > cactus inerme > *A. nilotica* > *A. cyanophylla*.**

Tableau 17. Coefficient de digestibilité apparente (CD% de MS), digestibilité de la matière organique et énergie métabolisable estimées des substrats et des mixtures

% substrat	Cactus +foin de vesce avoine				<i>A.nilotica</i> +foin de vesce avoine				<i>A.cyanophylla</i> +foin de vesce avoine				S.E.M
	100%	60%	30%	0%	100%	60%	30%	0%	100%	60%	30%	0%	
CD (%)	64,04 ^b	62,00 ^c	67,02 ^a	67,04 ^a	54,03 ^g	55,50 ^e	57,00 ^d	67,04 ^a	49,00 ⁱ	52,80 ^h	54,90 ^f	67,04 ^a	1,37
DMO (%)	41,050 ^e	38,04 ^h	44,67 ^a	43,08 ^b	39,15 ^f	42,05 ^c	43,28 ^b	43,08 ^b	33,50 ⁱ	38,40 ^g	41,30 ^d	43,08 ^b	0,71
EM (MJ/KgMS)	6,11 ^e	5,63 ^g	6,64 ^a	6,45 ^b	5,62 ^c	6,13 ^d	6,37 ^c	6,45 ^b	4,86 ^d	5,63 ^g	6,09 ^f	6,45 ^b	0,11

DMO (%) = $14,88 + 0,889 * Gv + 0,45 * CP$; **EM (MJ/KgMS)** = $2,20 + 0,136 * Gv + 0,057 * PB$ où, **DMO** est la digestibilité de la matière organique (%); **EM** : énergie métabolisable; **PB** : protéines brutes en pourcentage; and **Gv**: la production net de gaz en ml /200mg MS d'échantillon, après 24h d'incubation (Menke et al., 1979). **nd** : non déterminé. ^{a, b, c, d, e, f, g, h, i} moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes (P < 0,05). **S.E.M.** : erreur standard des moyennes.

Les faibles valeurs de la DMS, DMO et l'EM d'*A.cyanophylla* et d'*A.nilotica* sont probablement dues à leur contenu élevé en lignine et en tannins. La Teneur en fibres, en particulier la lignine, est un facteur clé qui influe sur la digestibilité de la MS et par conséquent sur la disponibilité de l'énergie dans le fourrage (Van Soest, 1994). Cependant, l'évaluation du taux auquel la teneur en fibres limiterait la disponibilité de l'énergie dans les fourrages riches en tanins est complexe en raison de la capacité des tanins à interférer avec les dosages de fibres. Les tanins ont tendance à gonfler les résultats des dosages de fibre et l'étendue de cette ingérence est imprévisible (Van Soest, 1994). En conséquence, il peut être difficile de savoir si la DMS, la DMO ou l'EM des fourrages sont plus influencées par le contenu de la paroi cellulaire que par leur haute teneur en tanins (Alam *et al.*, 2007). Al-Soqeer, (2008) a rapporté que les effets de polyphénols sur la production de gaz *in vitro* sont aussi complexes et ils varient selon les espèces ligneuses. Il suggère ainsi que l'impact des fibres peut être plus important que celui des tanins dans l'inhibition de la fermentation *in vitro*.

Les fibres représentent la fraction la plus difficile à digérer, elles semblent altérer le métabolisme et les fermentations dans la panse, s'ils sont présents en quantité importante dans un aliment. La lignine, par exemple, est la fraction de NDF quasi indigeste qui durcit les parois cellulaires, entraînant ainsi une diminution de la digestibilité (Van Soest, 1994). Les valeurs de la digestibilité *in vitro* des feuilles d'*A.cyanophylla* et *A.nilotica* sont supérieures à celles enregistrées *in vitro* par Krebs *et al.* (2007). Par ailleurs, l'EM et la DOM% des acacias testées dans cette étude sont dans l'intervalle des valeurs estimées par Al-Soqeer (2008). Mais elles restent en dessous des résultats rapportés par Abdulrazak *et al.* (2000). Ces différences pourraient s'expliquer par les différents procédés appliqués pour ces tests. De plus, le coefficient de digestibilité du fourrage dépend de la proportion et de la digestibilité des membranes qui diminue quand augmente la proportion des membranes dans la plante ainsi que leur lignification. En termes histologiques, on peut dire que les tissus celluloseux (parenchymes...) sont entièrement digestibles alors que les tissus lignifiés (sclérenchyme, tissus conducteurs...) sont presque entièrement indigestibles, ils se retrouvent alors réduits à l'état de fines particules dans les fèces (Gorshkova *et al.*, 2000).

Ces résultats montrent aussi que la digestibilité des Acacias est clairement entravée par les teneurs élevées en tannins condensés (TCT), comme rapporté, dans une étude similaire par McSweeney *et al.* (2008). Barman and Rai (2008) ont observé que les tannins contenus

dans *A.nilotica* réduisent la digestibilité *in vitro* de la matière sèche, de la matière organique et des protéines brutes. Les effets adverses des TCT sur la EM et la DMO% des espèces d'*Acacia* sont en accord avec d'autres travaux réalisés *in vitro* et *in vivo* (Getachew *et al.*, 2000, 2008,; Hervás *et al.*, 2003). Au niveau du rumen la complexation excessive des TCT avec les protéines et les fibres alimentaires les rendrait moins digestibles (McSweeney *et al.*, 2008). La consommation de TCT affecterait aussi la digestion des lipides et la production des acides gras (McSweeney *et al.*, 2008). Enfin, des ingestions massives de TCT peuvent perturber la digestibilité ruminale par une réduction globale des activités enzymatiques de la flore (McSweeney *et al.*, 2001).

Les résultats de digestibilité obtenus pour les raquettes de cactus sont inférieurs à ceux rapportés *in vitro* par Einkamerer (2008) (71,1% et 73,4% pour DMS et DMO, respectivement) et Costa *et al.* (2012) (70,2% et 73% pour DMS et DMO, respectivement). Pinos-Rodríguez *et al.* (2010) stipulent que les résultats de la digestibilité *in vitro* du cactus inerme varient selon le stade de maturité de la plante. Batista *et al.* (2003) ont noté que la DMS des raquettes de cactus inerme pourrait être similaire ou supérieure à celle des fourrages conventionnels tels que la luzerne. Dans notre étude, les valeurs de digestibilités sont inférieures à celle du foin de vesce avoine mais elles restent dans l'intervalle des valeurs trouvées chez des moutons *in vivo* par Nefzaoui and Ben Salem (2001) (de 60 à 65% pour la DMS). Ces derniers rapportent que ces coefficients sont semblables à ceux observés avec les cultures fourragères conventionnelles. La principale différence entre le cactus et les autres plantes fourragères est la dégradabilité des nutriments dans le rumen. Bien que le potentiel de dégradabilité des fourrages dans le rumen est souvent atteint après 48 heures, les éléments nutritifs du cactus sont plus rapidement dégradés (entre 6 et 12 heures) et aucune extraction importante ne s'opère après 24 heures de fermentation (Nefzaoui and Ben Salem, 2001). Par ailleurs, selon les travaux de Ben Salem *et al.* (1996), un taux de digestion rapide signifie un passage plus rapide de la matière à travers le tube digestif. Cela signifie également que la MS du cactus reste dans le tractus gastro-intestinal seulement pendant une courte période, laissant plus de volume disponible pour une autre prise. En conséquence, l'augmentation de la proportion de cactus dans le régime alimentaire ne réduirait pas la l'ingestion d'autres composants de la ration.

Pour les mixtures, l'incorporation du cactus, d'*A.nilotica* ou d'*A.cyanophylla* au foin de vesce avoine et aux différentes concentrations entraîne une diminution significative ($P < 0,05$) dans la digestibilité de la MS, comparativement à la digestibilité du foin mis à fermenté

seul. Cette chute dans la digestibilité est positivement liée à la dose utilisée. Elle est de 7,51% pour le mélange 60% cactus-40% foin de vesce-avoine mais elle est non significative pour la proportion 30% de cactus ajouté. Cette diminution est encore plus importante pour les mélanges à base d'*Acacia* (*A. nilotica* avec des taux de : 17,21 et 14,97% pour respectivement les dose 60 et 30% d'*A. nilotica* ajoutées et de 21,24 et 18,10%, pour respectivement les dose 60 et 30%, d'*A. cyanophylla* ajoutée). Ces diminutions sont probablement dues aux teneurs élevées en métabolites secondaires dans les arbustes étudiés (Ben Salem *et al.*, 2002a). Par ailleurs, la concentration élevée en minéraux d'*Opuntia* peut limiter la croissance microbienne dans le rumen qui pourrait affecter à son tour la digestibilité apparente des nutriments (Einkamerer, 2008). (Nefzaoui and Ben Salem (2001), ont également indiqué que le cactus diminuait la digestibilité des fibres du régime alimentaire, à cause de l'effet inhibiteur de son contenu élevé en hydrates de carbone solubles sur les bactéries cellulolytiques du rumen. Un effet positif de l'incorporation *in vivo* de l'azote organique sur la DMS des régimes à bases d'*Opuntia* a été démontré par Ben Salem *et al.*, (2002a). En effet, l'ajout d'azote améliore l'activité microbienne dans le rumen. D'après Vieira *et al.* (2008), les effets du cactus sur la digestibilité des régimes alimentaires et des fourrages sont contradictoires. Certaines études menées *in vivo* ont également rapporté que la DMS avait une tendance à diminuer avec l'incorporation du cactus épineux dans les régimes, chez le mouton recevant du foin de *Cenchrus ciliaris* (Misra *et al.*, 2006). Néanmoins, Ben Salem *et al.* (1996) ont observé une amélioration significative de la digestion des régimes à base de paille de blé, linéairement avec l'augmentation de la proportion de cactus inerme dans le régime. Il semblerait alors que la réponse de l'animal au cactus dépende de la nature du fourrage grossier auquel il est associé et de l'espèce du cactus (Abidi and Ben Salem, 2010).

Les valeurs de DMS, la DMO et l'EM de la combinaison (30-70%, cactus-foin), sont comparables ou supérieures à celles du substrat de référence, mis à fermenter seul. Ces résultats indiquent que leur contenu fibreux est digestible par le microbiote ruminal. Ainsi, leur digestibilité n'apparaît pas être un facteur limitant pour leur utilisation dans les rations des ruminants. Ceci suggère, par ailleurs, que les nutriments présents dans les raquettes de cactus peuvent être utilisés efficacement par les ruminants, en tant que partie d'un régime alimentaire équilibré.

2.3.3. Corrélations entre les constituants nutritifs, les métabolites secondaires, et la digestibilité *in vitro*

Les interrelations existantes entre la digestibilité et la composition chimique et phénolique des fourrages étudiés sont illustrées dans le tableau 18. Les résultats saillants montrent que la digestibilité apparente de la MS est négativement corrélée avec les fractions de fibres (NDF, ADF et ADL). Cependant, cette corrélation est non significative ($P > 0,05$) avec l’NDF et l’ADF mais significative avec l’ADL ($r = -0,945$; $P < 0,05$). Ces résultats sont comparables à ceux d’Al-Soqeer (2008). Il est un fait bien établi que la concentration des fourrages en lignine est négativement corrélée à la dégradation potentielle de la MS. Elle influence aussi la quantité de MS qui peut être consommée par le ruminant (Jung and Deetz, 1993). Dans la présente étude, l’effet de la MO et des MAT sur la DMS n’est pas significatif ($P > 0,05$). Certaines corrélations insignifiantes peuvent être attribuées à l’absence des processus d’ingestion et de mastication lors de l’estimation de la DMS. Le contenu phénolique est négativement et significativement corrélé à la DMS ($r = -0,953$; $P < 0,05$). Alors que les TCT sont négativement mais non significativement reliée à la DMS ($P > 0,05$). Barman and Rai (2008) ont rapporté une corrélation négativement significative entre les tannins des fourrages, la DMS et la DMO. Ben Salem *et al.* (2005) font également état d’une corrélation négative entre les composés secondaires, la production de gaz *in vitro* et la digestibilité de la MS d’*A.saligna*, en utilisant un inoculum d’ovins.

De plus, le tableau 19 montre une corrélation hautement négative entre la MO et les MM ($r = -1,000$; $P < 0,001$). La fraction ADL est associée positivement aux PT ($r = 0,968$; $P < 0,05$) et aux TCT ($r = 0,964$; $P < 0,05$). Des résultats similaires sont enregistrés par Reed (1986) et Singh *et al.* (2005). Les composés phénoliques, TP et TCT, sont très significativement corrélés entre eux ($r = 0,994$; $P < 0,001$). Cette observation est identique à celles de Vitti *et al.* (2005); Singh *et al.* (2005) et Makkar *et al.* (1993). Ces derniers auteurs rapportent que les tanins mesurés par gravimétrie, après précipitation avec le polyvinylpyrrolidone (PVP) qui est en principe similaire à l’essai au Folin-Ciocalteu, sont reliés aux TCT mesurés par d’autres méthodes.

Tableau 18. Coefficient de Corrélations (r) entre les composants nutritifs, composés secondaires et la digestibilité *in vitro* des substrats examinés.

	DMS	DMO	EM	MS	MM	MO	PB	NDF	ADF	ADL	PT	TCT
MS	0,75ns	0,52ns	0,61ns									
MM	-0,29ns	-0,14ns	-0,18ns	-0,78ns								
MO	0,29ns	0,14ns	0,18ns	0,78ns	-1,00***							
PB	-0,68ns	-0,38ns	-0,49ns	-0,93ns	0,58ns	-0,58ns						
NDF	0,36ns	0,19ns	0,27ns	0,12ns	0,49ns	-0,49ns	-0,42ns					
ADF	0,02ns	-0,01ns	0,02ns	-0,38ns	0,85ns	-0,85ns	0,08ns	0,87ns				
ADL	-0,94*	-0,83ns	-0,88ns	-0,91ns	0,59ns	-0,58ns	0,79ns	-0,16ns	0,26ns			
PT	-0,95*	-0,79ns	-0,86ns	-0,89ns	0,45ns	-0,45ns	0,87ns	-0,40ns	0,04ns	0,97*		
TCT	-0,92ns	-0,73ns	-0,80ns	-0,93ns	0,52ns	-0,52ns	0,91ns	-0,37ns	0,09ns	0,96*	0,99**	
OXT	0,69ns	0,54ns	0,59ns	0,96*	-0,89ns	0,89ns	-0,80ns	-0,16ns	-0,60ns	-0,89ns	-0,80ns	-0,84ns

DMS : digestibilité apparente de la MS, **DMO** : la digestibilité de la matière organique (%); **EM**: énergie métabolisable. **MS** : matière sèche, **MO** : matière organique **MM** : matières minérales, **PB** : protéines brutes, **NDF** : neutral detergent fibre, **ADF** : acid detergent fibre, **ADL** : acid detergent lignin,, **PT** : Phénols totaux, **TCT** : tannins condensés totaux, **OXT** : oxalates totaux. * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$, *** : $P < 0,001$, ns : non significative ($P > 0,05$).

La DMS est corrélée positivement et significativement à la production de gaz enregistrée après 24 heures d'incubation ($r=0,989$; $P < 0,05$) (tableau 19). Ahmed and El-Hag, (2004) constate que les coefficients de corrélation après 48, 72 et 96 heures sont faibles, comparativement à ceux enregistrés entre 8 et 24 heures d'incubation. Paya *et al.* (2007) ont rapporté une forte corrélation positive entre la production de gaz *in vitro* et la digestibilité apparente de la MS et de la MO. La DMS est positivement corrélée à la DMO et l'EM, avec respectivement $r = -0,936$; $P < 0,05$ et $r = 0,973$; $P > 0,05$. La DMO et l'EM sont également reliées positivement et très significativement ($r = 0,991$; $P > 0,01$) (tableau 19). Ces résultats recourent ceux de Andueza *et al.* (2012). Tilley and Terry (1963) ont rapporté que la digestibilité *in vivo* de plusieurs graminées et de légumineuses pourrait être prédite à partir de la DMS avec un degré de précision élevé. Aufrère and Demarquilly (1989) ont également établi une relation significative entre la DMO et la digestibilité enzymatique pour différents types de fourrages.

Tableau 19. Coefficient de Corrélations (r) entre les paramètres de digestibilité et la production de gaz *in vitro* des substrats examinés.

	DMS	DMO	EM
G24	0,99*	0,88ns	0,93ns
A	0,69ns	0,56ns	0,60ns
B	0,17ns	0,28ns	0,26ns
C	0,85ns	0,69ns	0,75ns
DMS	1,0000		
DMO	0,94	1,000	
EM	0,973*	0,991**	1,000

G24h : gaz pour à 24 heures, **DMS** : digestibilité apparente de la MS, **DMO** : la digestibilité de la matière organique (%); **EM** : énergie métabolisable. **a** : gaz produit à partir de la fraction soluble (ml/200mg MS), **b** : gaz produit à partir de la fraction insoluble mais potentiellement fermentescible (ml/200mgMS), **c** : vitesse de production de gaz (h-1). * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$, *** : $P < 0,001$, ns : non significative ($P > 0,05$).

3. Analyse qualitative et quantitative de la phase gazeuse (production de méthane)

Le rôle du rumen est essentiel dans la partition globale de carbone. Au niveau du rumen le flux de carbone fermenté par le microbiote se répartit entre la biomasse microbienne (25%), les AGV (56%) et les gaz (19%) produits. Les principales causes de variations de cette partition sont le profil des AGV et l'efficacité de la croissance microbienne (Sauvant and Giger-Reverdin, 2009).

Les gaz majoritairement produits lors des fermentations sont du méthane (CH₄) et du gaz carbonique (CO₂), leur volumes après 24h de fermentation est différent statistiquement pour chaque substrat mis à fermenter seul ($P < 0,0001$) (tableau 20). Il apparaît que le gaz CO₂ est produit en un volume supérieur à celui du CH₄ pour tous les échantillons étudiés (figure 10). Toutefois, cette production de CO₂ est plus élevée lors de la dégradation du foin de vesce avoine par le microbiote ruminal (21ml/200mg MS), la plus faible est notée chez *A.cyanophylla* (10 ml/200mg MS). De faibles productions de CH₄ sont enregistrées pour le cactus (5 ml/200 mg MS), il est suivi de l'*A.nilotica* (3,5 ml/200 mg/MS) et d'*A.cyanophylla* (3 ml/200 mg/MS), comparativement au foin de vesce avoine (8ml/200mg MS). Les résultats montrent également que l'incorporation d'*A.nilotica* ou d'*A.cyanophylla* au foin de vesce avoine engendre une diminution significative ($P < 0,0001$) dans la production de CH₄ dans le pool gazeux, comparativement au control mis à fermenter seul. Cette chute est dose-dépendante, avec néanmoins un plus faible effet pour *A.nilotica* (réduction de CH₄ par 12,5 et 25%, respectivement pour les doses 30 et 60%), relativement à *A.cyanophylla* (réduction de 37,5 et 62,5%, respectivement pour les doses 30 et 60%). Par ailleurs, l'addition des raquettes de cactus au foin de vesce avoine induit une diminution significative du volume de CH₄ produit (12,5%) mais uniquement lorsque la concentration en cactus est de 60% dans la mixture ($P < 0,0001$). En effet, l'addition du cactus à une proportion moindre (30%) n'induit pas une réduction du CH₄ ($P > 5\%$), bien au contraire cette production (8ml/200mgMS) est comparable à celle du foin de vesce avoine mis à fermenter seul.

Tableau 20. Analyse qualitative du pool gazeux des substrats et des mixtures (ml/200mgMS) après 24h de fermentation.

% substrat	Cactus +foin de vesce avoine				<i>A.nilotica</i> +foin de vesce avoine				<i>A.cyanophylla</i> +foin de vesce avoine				S.E.M
	100%	60%	30%	0%	100%	60%	30%	0%	100%	60%	30%	0%	
CH4	5,00 ^d	7,00 ^b	8,00 ^a	8,00 ^a	3,50 ^f	6,00 ^c	7,00 ^b	8,00 ^a	3,00 ^g	5,00 ^e	7,00 ^b	8,00 ^a	0,31
CO2	20,50 ^b	14,50 ^f	20,50 ^b	21,00 ^a	11,50 ^g	15,00 ^e	17,50 ^c	21,00 ^a	10,00 ^h	14,50 ^f	16,50 ^d	21,00 ^a	0,67
CO2/CH4	4,10 ^a	2,07 ⁱ	2,56 ^f	2,62 ^e	3,28 ^c	2,50 ^g	2,50 ^g	2,62 ^e	3,33 ^b	2,90 ^d	2,35 ^h	2,62 ^e	0,66

a, b, c, d, e, f, g, h, i moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes (P < 0,05). S.E.M. : erreur standard des moyennes.

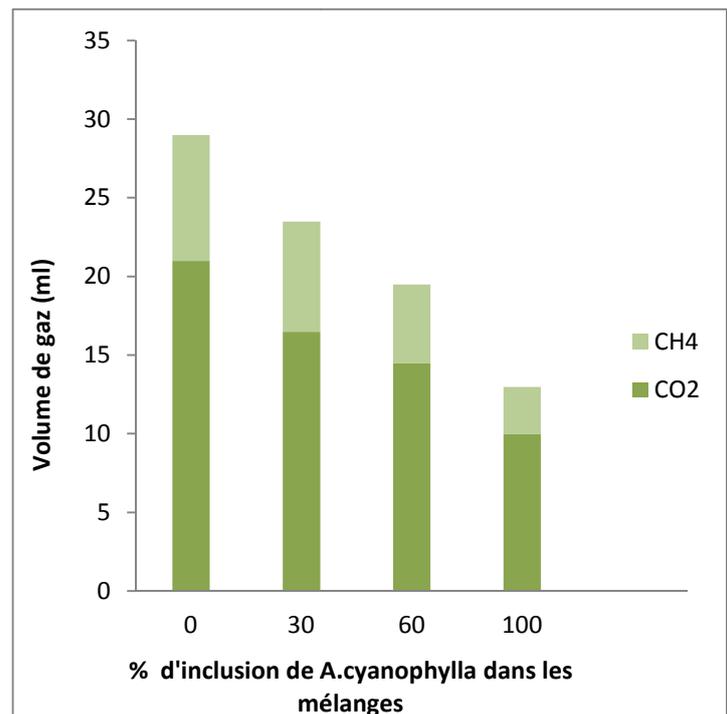
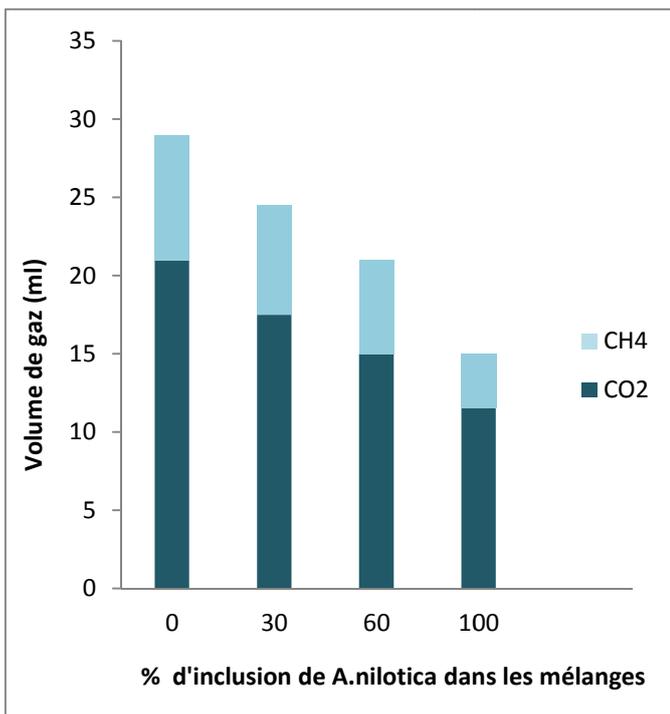
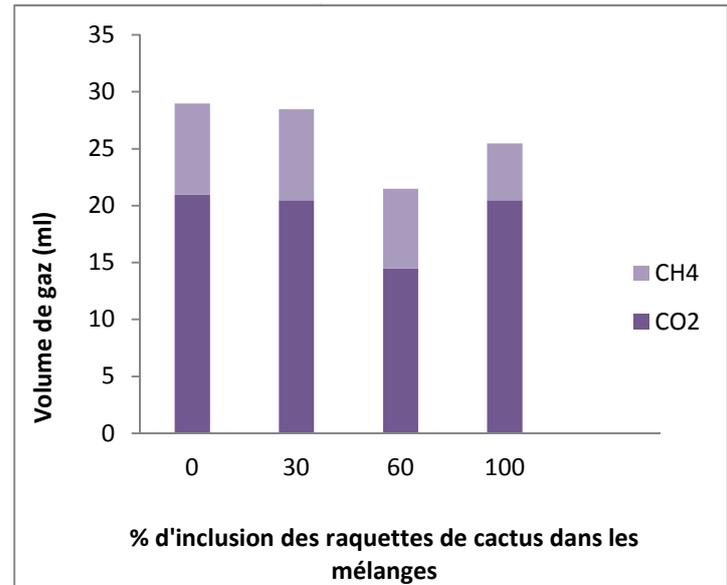
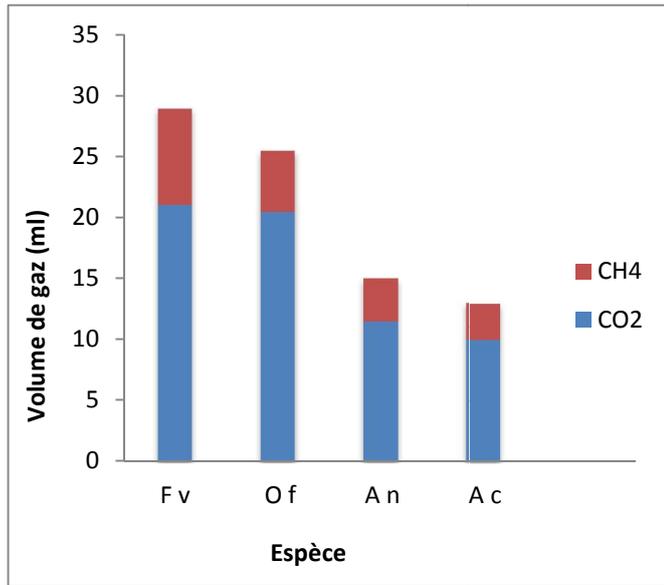


Figure 10. Caractérisation qualitative de la production de gaz due à la fermentation des substrats et de leurs mixtures.

Fv : Foin de vesce avoine ; Of : *O. ficus indica* ; An : *A.nilotica* ; Ac : *A.cyanophylla*

Chouinard (2000) a rapporté que tous les animaux d'élevage produisent du CH₄ et du CO₂ par la dégradation anaérobie de la biomasse ingérée, par les microorganismes de leur tube digestif. Le CO₂ provient principalement du système tampon. En effet, ce gaz est produit soit directement de la dégradation des hydrates de carbones de l'aliment, soit indirectement à partir des sels (HCO₃) présents dans la salive artificielle lors de la neutralisation de l'acidité, induite par la production des AGV (Archimede *et al.*, 1999). Ce CO₂ représente environ plus de la moitié du volume total du gaz produit dans le cas de l'utilisation du tampon de Menke (Menke and Steingass, 1988). Par ailleurs, des travaux ont montré que les concentrations de CH₄ et de CO₂ évoluent en sens inverse au cours de la journée : les concentrations de l'un étant maximales dans le contenu ruminal au moment où les concentrations de l'autre sont minimales (Vermorel, 1995). Le rapport CO₂/CH₄ (tableau 20) est significativement différent ($P < 0,0001$) entre les échantillons testés, il varie de 2,07 à 4,1 avec la valeur la plus élevée pour les raquettes de cactus. Ces résultats recourent ceux de Plumed (2014).

Le volume le plus élevé de CH₄, résultant de la dégradation du foin de vesce avoine peut être dû à sa teneur relativement élevée en fraction pariétale (NDF) (Agarwal *et al.*, 2008). La faible production de CH₄ enregistrée pour les raquettes de cactus est probablement liée à leur richesse en sucres solubles fermentescibles (28,18%), dont la dégradation conduit théoriquement selon l'équation stœchiométrique de Wolin à une fermentation propionique et butyrique productrice de CO₂. En effet, la production des gaz fermentaires est un facteur corrélé à la production quantitative et qualitative des AGV (Blümmel and Becker, 1997). Selon de nombreux auteurs, la dégradation des substrats riches en amidon et en sucres solubles est favorable aux fermentations propionique et butyrique, corrélatives à celle du CO₂ (Fonty *et al.*, 1995; Keir *et al.*, 1997). Tandis que la dégradation des substrats riches en fibres aboutit à la formations plus importante d'acide acétique, elle-même étant associée à une production importante d'H₂ dont l'élimination engendre alors une production accrue de gaz sous forme de CH₄ (Orskov and Ryle, 1990). Une méta analyse réalisée sur 101 expérimentations et 290 traitements a permis de montrer que la part d'énergie métabolisable perdue sous forme de CH₄ diminue significativement lorsque la proportion de concentré (ou de céréales) représente plus de 40% de la ration (Sauvant and Giger-Reverdin, 2007).

La relation entre la production de CO₂ avec la concentration des tannins condensés totaux (TCT) est représentée par la droite de régression (figure 11). Elle présente une pente négative ($y = -63,30x + 1351$; $R^2 = 0,9479$). Le même résultat est observé pour l'effet des TCT

sur la production de CH₄ (figure 12) : les tannins influencent négativement cette production ($y = -131,75x + 996,26$; $R^2 = 0,6159$). Ces observations recourent ceux de Animut *et al.*, (2008) qui suggèrent que les TCT sont négativement corrélés à la production de CH₄. Les plus faibles émissions de CH₄ issues de la dégradation d'*A. nilotica* et d'*A. cyanophylla* mis à fermenter seuls ou en mélanges, comparativement au témoin, sont donc probablement liées à leur forte teneur en tannins. Ces résultats sont en accord avec ceux de Soltan *et al.*, (2012) , qui a montré une réduction de CH₄ prononcée avec *A. saligna*, associée à leur haute teneur en TCT. Dans son étude, Bouazza (2014) a rapporté que l'addition de PEG augmentait significativement la production de CH₄ ($P < 0,05$), essentiellement chez *A. nilotica* et *A. cyanophylla*, suggérant que l'effet des tannins sur la production de CH₄ est aussi significatif ($P < 0,05$). Beaucoup d'autres études, *in vitro* et *in vivo*, ont démontré l'activité antiméthanogène de tannins (Hess *et al.*, 2006a; Tavendale *et al.*, 2005; Waghorn, 2008; Goel and Makkar, 2012). Bien que les tannins soient connus pour leur effet antagoniste vis-à-vis de la production de CH₄, leur mode d'action n'est pas complètement élucidé à ce jour (Bodas *et al.*, 2012). Ces entités chimiques agissent soit directement sur les archées méthanogènes du rumen, (probablement par la formation de complexes tannins-protéines/enzymes microbiens) et/ou indirectement en limitant les processus métaboliques microbiens impliqués dans la méthanogenèse (Tavendale *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2011). En effet, dans certains cas, la production CH₄ est influencée à la suite des effets des métabolites secondaires sur la fermentation ruminale, redirigeant le processus vers des réactions métaboliques résultant en une production moindre de CH₄ (par exemple, la fermentation vers une plus grande formation de propionate entraînera moins de CH₄), ou en réduisant la disponibilité d'H₂ métabolique nécessaire pour la méthanogenèse. Enfin, le CH₄ peut également être réduit si la fermentation ruminale est diminuée mais cet effet est généralement non spécifique et d'intérêt moindre car il entraîne une faible efficacité dans l'utilisation des aliments (Bodas *et al.*, 2012). Par ailleurs, les tannins peuvent influencer indirectement les *Archéa* méthanogènes associées aux protozoaires, en inhibant ces derniers (Tavendale *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2011). Ces composés secondaires peuvent aussi affecter négativement les bactéries cellulolytiques (Waghorn, 2008; Patra and Saxena, 2009) et, par conséquent, la fermentation anaérobie des glucides en acides gras à chaîne courte. En particulier l'acétate, réduisant ainsi la formation de CO₂ et d'H₂ nécessaires à la méthanogenèse (Bodas *et al.*, 2012). L'effet des tannins sur le CH₄ dépend de la dose, du type et de la source des tannins, ainsi que du type de régimes alimentaires ingérés (Patra and Saxena, 2010; Pellikaan *et al.*, 2011). A titre d'exemple, les extraits de Quebracho (avec des doses de 5 et 25% des substrats) ont diminué

linéairement, de 13 et 54% respectivement, la production de méthane (Bhatta *et al.*, 2009). Cependant, quelques études ont montré que de faibles doses de tannins n'ont aucun effet sur la diminution de la production de méthane (Śliwiński *et al.*, 2002a). Ainsi l'utilisation de la dose adéquate de tannins est très importante. Une diminution significative de la méthanogenèse peut ne pas être associée à une réduction significative de la digestibilité et de la concentration en acides gras volatiles (Carulla *et al.*, 2005; Hariadi and Santoso, 2010). En outre, les microorganismes du rumen peuvent développer des mécanismes d'adaptation leur permettant de devenir résistants aux effets néfastes des tannins par : la désintoxication des tannins, la synthèse de polymères complexant les tannins ou la formation de glycocalyx extra-cellulaire (Smith *et al.*, 2005; Patra and Saxena, 2010).

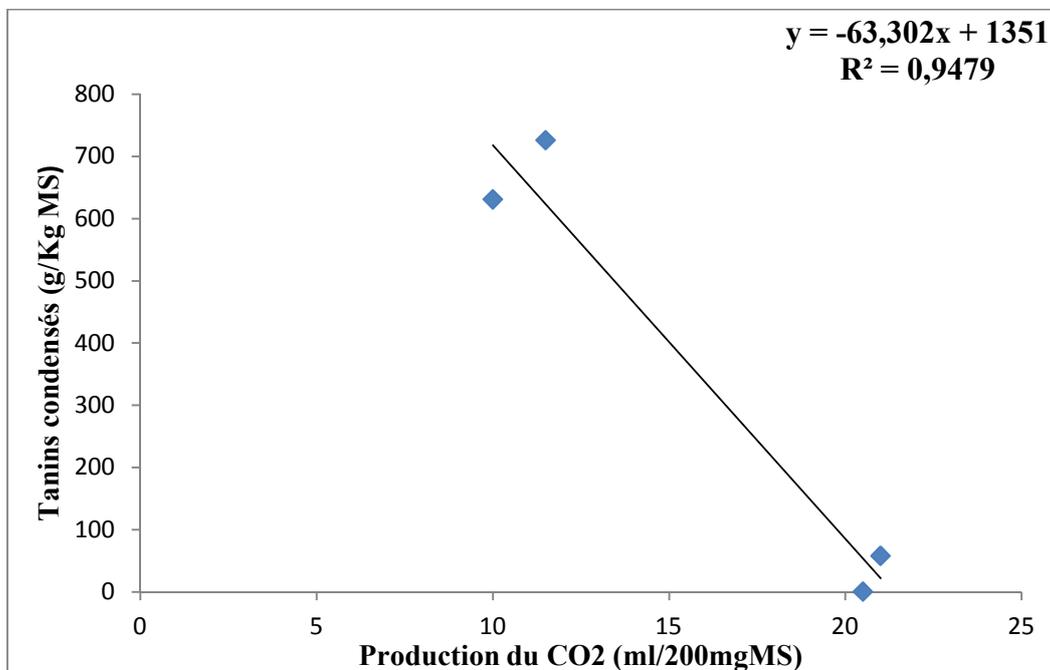


Figure 11. Relation entre la production du CO2 et les Tanins condensés.

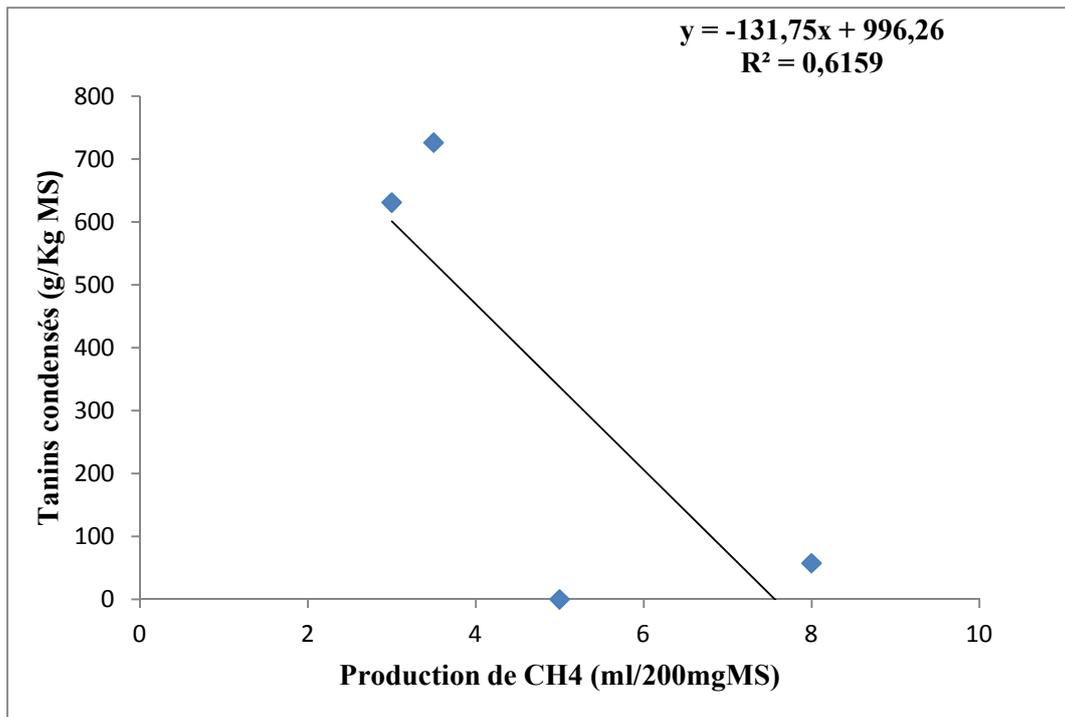


Figure 12. Relation entre la production de CH₄ et les Tanins condensés.

4. Corrélations entre composant des substrats, méthanogénèse et profil des AGV

Les corrélations existant entre la production quantitative et qualitative des AGV, les composés chimiques et la production de CH₄ des fourrages étudiés sont résumées dans le tableau 21. Il en ressort que la fraction NDF est corrélée négativement mais non significativement à la production de C₃. Cependant, cette dernière est significativement et négativement liée à la fraction ADF ($r=-0,942$, $P < 0,05$). Ce résultat est clairement mentionné dans la littérature (Bannink *et al.*, 2006). Les PT et les TCT ne jouent pas un effet corrélatif significatif sur le processus de production des AGV. Ces résultats sont en contradiction avec les travaux de Bannink *et al.* (2006) et Garcia-Gonzalez *et al.* (2008) qui mentionnent un effet négatif des TCT sur la production des AGV. La production d'AGV totaux est positivement liée aux proportions molaires du C₂ et C₄ ($r=0,993$, $P < 0,001$ et $r=-0,973$, $P < 0,05$, respectivement). Contrairement aux travaux de Getachew *et al.* (2002), aucune corrélation significative n'est établie entre la production de gaz après 24h d'incubation et la production d'AGV.

La production de CH₄ est significativement et positivement corrélée à la production de C₂ ($r=0,957$, $P < 0,05$), et aux AGV ($r=0,946$, $P < 0,05$). Par contre la production de CH₄ est significativement et négativement associée à la production de C₃ ($r=-0,872$, $P < 0,05$) (figure13). Ces résultats concordent parfaitement avec ceux de Rahman *et al.* (2013). Ces derniers ont observé *in vitro* une production de CH₄ proportionnelle à l'acétate ($y = 0,0846x$, $R^2 = 0,58$), et à la production d'AGVt ($y = 0,0508x$, $R^2 = 0,58$). De plus, la corrélation positive entre la production totale d'AGV et le CH₄ confirme également le constat de Kamalak *et al.* (2002). Par ailleurs, Tavendale *et al.* (2005) ont trouvé que les productions *in vitro* des AGV et du CH₄ dans le rumen sont fortement corrélées avec le ratio C₂/C₃, qui est dépendant du pH et du substrat (Russell, 1998).

En général, l'inhibition de la production de CH₄ entraîne une modification dans le profil des AGV (Ungerfeld *et al.*, 2003; Cieslak *et al.*, 2012). Le C₂ augmente linéairement avec la production de ce gaz mais le C₃ diminue avec la production globale de CH₄ (Groot *et al.*, 1998). La relation négative entre la proportion molaire du C₃ et la production de CH₄, observée dans cette étude est cohérente avec les travaux de Cieslak *et al.* (2012) qui ont rapporté que la production de C₃ et la méthanogenèse sont compétitifs. Pendant la fermentation, la conversion de l'amidon en acide propionique peut perturber le transfert d'hydrogène horizontal, conduisant ainsi à l'inhibition des processus de méthanogenèse (Szumacher-Strabel and Cieslak, 2012). Selon Tavendale *et al.* (2005), la forte relation inverse entre la proportion molaire du C₃ et de CH₄ peut dépendre des interactions entre la population microbienne du rumen et des composés qui favorisent la production élevée de C₃ dans le rumen. Par ailleurs, les résultats obtenus dans cette étude rejoignent également ceux de Wang *et al.* (2012). Ces derniers stipulent que l'augmentation relative de C₃ et la diminution de la proportion de C₄ dans le rumen peuvent également être associées à la réduction des populations de protozoaires. Les variations en nombre de protozoaires dans le rumen peuvent conduire à des changements dans la production et la composition des AGV (Mathieu *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2012).

Tableau 21. Coefficient de Corrélations (r) entre les composants chimiques, méthanogénèse et le profil des acides gras volatils des substrats examinés.

	AGVt	C2	C3	C4	C2 :C3
PB	-0,19ns	-0,12ns	-0,39ns	-0,37ns	-0,19ns
NDF	0,85ns	0,85ns	-0,66ns	0,91ns	0,83ns
ADF	0,85ns	0,86ns	-0,94*	0,79ns	0,81ns
ADL	-0,23ns	-0,19ns	-0,59ns	-0,38ns	0,31ns
NFC	-0,54ns	-0,53ns	0,17ns	-0,71ns	-0,66ns
PT	-0,40ns	-0,37ns	-0,36ns	-0,56ns	0,06ns
TCT	0,05ns	-0,50ns	-0,41ns	-0,29ns	-0,32ns
OXT	-0,43ns	-0,03ns	0,84ns	-0,25ns	-0,22ns
G24	0,55ns	0,52ns	0,22ns	0,68ns	-0,06ns
CH4	0,95*	0,96*	-0,87*	0,86ns	0,57ns

AGVt : acides gras volatils totaux, C2 : acétate, C3 : propionate, C4 : butyrate. PB : protéines brutes, NDF : neutral detergent fibre, ADF : acid detergent fibre, ADL : acid detergent lignin, PT : Phénols totaux, TCT : tannins condensés totaux, OXT : oxalates totaux. * : P < 0,05, ns : non significative (P > 0,05).

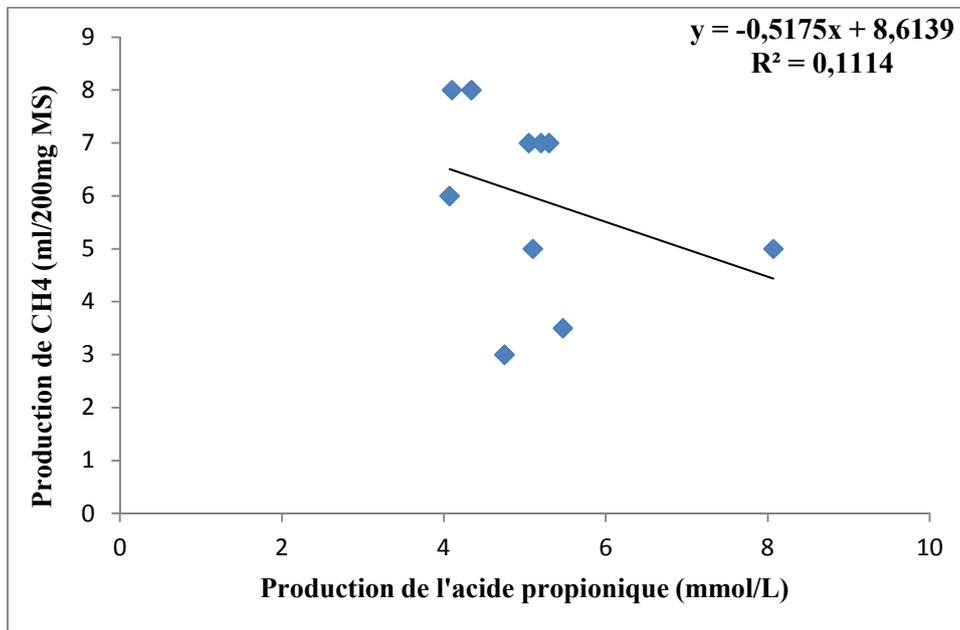


Figure 13. Relation entre la proportion molaire du propionate et la production de CH4

5. Estimation de l'activité carboxyméthylcellulase des substrats et des mélanges

L'activité spécifique de la carboxyméthylcellulase (CMCase) issue de la dégradation des différents substrats étudiés et de leurs mélanges est représentée dans le tableau 22. L'activité spécifique de la CMCase diffère statistiquement entre les substrats étudiés ($P < 0,001$). La CMCase engendrée par la dégradation du foin de vesce avoine (400 U/mg protéine) est nettement plus intense que celle des trois arbustes fourragers et la valeur la plus faible est notée chez *A.cyanophylla* (328 U/mg protéine). De plus, elle diminue linéairement avec l'incorporation des raquettes de cactus, des feuilles d'*A.nilotica* ou d'*A.cyanophylla* dans les mélanges ($P < 0,001$), cette diminution est dose-dépendante. A l'exception de la proportion 30% d'*A.nilotica* incorporée qui engendre une activité comparable à celle du foin.

Cette inhibition de l'activité CMCase peut être reliée à l'effet antiprotozoaire des plantes arbustives, constaté dans cette étude. En effet, il a été établi que les protozoaires du rumen (à travers leurs cellulases indigènes ou leurs enzymes bactériennes ingérées) sont responsables d'environ 38% de l'activité cellulasique présente dans la phase liquide du contenu ruminal (Hristov *et al.*, 1999; Patra *et al.*, 2006). Par ailleurs, la forte teneur en éléments minéraux des raquettes de cactus peut être un facteur limitant pour le développement microbien dans le rumen et donc avoir un effet négatif sur l'activité de la CMCase (Nefzaoui and Ben Salem, 2001).

L'inhibition de l'activité enzymatique induite par la dégradation d'*A.nilotica* ou d'*A.cyanophylla* peut être attribuée à la présence de tannins dans les substrats qui se lient aux enzymes pour former un complexe (Butler, 1992). Selon Reed (1995). La paroi cellulaire des enzymes bactériennes associées sont plus résistants à l'inhibition de tannins que les enzymes extracellulaires. Makkar *et al.* (1988) ont rapporté une diminution de l'activité de diverses enzymes du rumen, comme l'uréase, la carboxyméthyl cellulase, la protéase, la glutamine et l'alanine déshydrogénase et transférase et ont suggéré que la modification de la conformation des enzymes, en présence de tannins, pourrait être une raison de l'inhibition chez les ovins nourris avec *A. nilotica*.

Tableau 22. Activité spécifique de la carboxyméthylcellulase (CMCase) des substrats singuliers et des mixtures, après 24h de fermentation.

%substrat	Cactus +foin				<i>A.nilotica</i> +foin				<i>A.cyanophylla</i> +foin				S.E.M
	100%	60%	30%	0%	100%	60%	30%	0%	100%	60%	30%	0%	
Activité spécifique de la CMCase (U/mg protein)	350f	357d	380b	400a	340h	351e	402a	400a	328j	331i	348g	400a	4,81

CMCase : carboxyméthylcellulase, U : nmol glucose released ml⁻¹ h⁻¹.

^{a, b, c, d, e} Moyennes dans une même ligne affectées d'exposants différents sont statistiquement distincts (P <0,05).

6. Analyse du profil microbien du rumen

Le rumen abrite une communauté complexe de microorganismes, dont les bactéries, les protozoaires, les champignons et les archées méthanogènes, responsables en consortium de la dégradation enzymatique des aliments pour fournir de l'énergie et des nutriments pour le ruminant hôte. Les méthodes d'énumération classiques du microbiote ruminal ont été rapidement remplacées par des techniques moléculaires qui peuvent être utilisées pour caractériser les communautés microbiennes complexes sans incubation (Higuera, 2012). Bien que ces techniques fournissent des informations utiles sur la composition des populations microbiennes, elles offrent généralement peu ou pas d'informations sur le rôle fonctionnel des microorganismes spécifiques du rumen. Par conséquent, la combinaison de techniques moléculaires avec des mesures de la fonction du rumen aiderait à comprendre les mécanismes impliqués dans la fonction complexe du rumen, ainsi que pour développer des stratégies pour l'amélioration de la productivité du ruminant. La PCR en temps réel (qPCR) a été utilisée durant ces dernières années pour mesurer l'abondance microbienne relative du rumen chez différentes espèces de ruminants (Denman and McSweeney, 2006; Jiao *et al.*, 2015). Les populations microbiennes du rumen sont affectées par un large éventail de facteurs, le régime alimentaire étant l'un des plus pertinents (Liu *et al.*, 2015). Les composés secondaires des plantes sont bien connus comme agents antimicrobiens qui agissent contre les bactéries, les protozoaires et les champignons. Les composés phénoliques sont les principaux composants actifs (Burt, 2004), bien que l'activité antibactérienne a également été signalée dans une grande variété de substances non phénoliques (Burt, 2004). Ce mode d'action antimicrobien, microbicide ou microstatique, provient essentiellement de leur potentiel d'intrusion dans la membrane de la cellule bactérienne, désintégrant ainsi les structures membranaires, provoquant ainsi une perte d'ions. Leurs effets sur l'activité des microorganismes du rumen dépendent des espèces végétales consommées et de leur composition chimique.

Tableau 23. Effets des substrats et des mélanges sur le profil microbien du rumen, déterminés par la PCR en temps réel et la quantification des protozoaires du rumen par comptage direct, après 24 h contre 0h (contrôle) d’incubation.

Population cible par qPCR*	cactus +foin					<i>A.nilotica</i> +foin				<i>A.cyanophylla</i> +foin				S.E.M
	Contrôle (0h)	100%	60%	30%	0%	100%	60%	30%	0%	100%	60%	30%	0%	
Méthanogènes	1,00e	0,90h	0,80i	0,98g	1,30d	6,50a	1,30d	2,15b	1,30d	1,70c	1,68c	1,29d	1,30d	0,28
Champignons anaérobies	1,00e	0,03k	0,19j	1,00f	1,20c	0,30h	0,20i	1,10d	1,20c	2,00a	1,90b	0,90g	1,20c	0,11
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	1,00f	0,10k	0,60g	1,35d	1,20 ^e	0,40h	0,20j	1,90a	1,20 ^e	0,30i	1,19 ^e	1,50b	1,20 ^e	0,10
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	1,00k	4,90i	15,10 ^e	14,50f	19,80d	3,10j	11,80g	29,20a	19,80d	8,50h	20,7b	20,20c	19,80d	0,46
Comptage directe (*10⁴Cell mL⁻¹) Protozoaires		5,59d	4,146g	8,474b	12,12a	5,34e	3,965i	3,98h	12,12a	3,685j	4,774f	6,02c	12,12a	0,6900

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes (P < 0,05). S.E.M. : erreur standard des moyennes.

qPCR: quantitative PCR, les valeurs ΔCT sont calculées relativement au contrôle T0.

Dans cette étude, les variations du profil microbien en réponse aux substrats analysés semblent affecter une grande partie de la communauté microbienne du rumen de bovins. L'abondance relative des populations microbiennes présentes dans le rumen, déterminée par la PCR en temps réel et le dénombrement des protozoaires du rumen par comptage direct sont résumés dans le tableau 23. Il en ressort des différences significatives ($p < 0,05$) dans le nombre de protozoaires, les archées méthanogènes, les champignons anaérobies et les bactéries cellulolytiques (*R. flavefaciens*, *F. succinogenes*) entre les différents substrats ou mélanges étudiés.

6.1. Protozoaires

Les résultats relatifs à la détermination des pourcentages des principaux genres de protozoaires existant dans le rumen de bovins en fonction des régimes alimentaires testés, sont regroupés dans la figure 14. Il ressort que les Entodiniomorphes représentent la population majeure parmi les protozoaires ciliés, comparativement aux holotriches. De plus, les Entodiniomorphes sont dominés par le genre *Entodinium*, de taille inférieure à $100\mu\text{m}$ (de 81 jusqu'à 95% des protozoaires totaux), indépendamment du régime alimentaire. Ce qui va dans le même sens que les résultats de Dehority (2003) et Rouissi and Guesmi (2004). Tymensen *et al.* (2012) ont également rapporté que le genre *Entodinium* est prédominant dans le rumen de bovins, indépendamment du régime. Sadet (2008) a constaté que la majeure partie de la communauté des protozoaires du rumen de bovins nourris avec différents régimes alimentaires était représentée par les Entodiniomorphes (jusqu'à 97%), avec cependant l'absence des holotriches dans le régime à base de paille de céréales. Le type et la composition de la ration alimentaire conditionnent fortement les populations de protozoaires (Jouany and Ushida, 1999). Ainsi, la population de protozoaires est modulée par la proportion de concentré de la ration. La population des Entodiniomorphes augmente quand le pourcentage d'amidon de la ration augmente jusqu'à 60%. En ce qui concerne la population des holotriches, elle augmente quand le pourcentage de sucres solubles de la ration augmente jusqu'à 40% (Eugène, 2002).

La variation quantitative de la faune ruminale (protozoaires) totale entre les différents substrats et leurs mélanges est mentionnée dans le tableau 23. Le nombre des protozoaires totaux est significativement différent entre les substrats étudiés ($p < 0,0001$). De faibles valeurs sont constatées pour *A.cyanophylla*, *Opuntia* et *A.nilotica* ($3,68$; $5,59$ et $5,34 \cdot 10^4$ cell/ml, respectivement), comparativement au foin de vesce avoine ($12,12 \cdot 10^4$ cell/ml). Il faut

également signaler que l'incorporation du cactus ou l'une des deux Acacias au foin de vesce-avoine, à différentes concentrations permet une mauvaise croissance des protozoaires, avec une diminution de leur nombre total ($p < 0,0001$). Cette diminution est linéaire, avec l'augmentation de la proportion de l'arbuste fourrager dans la mixture. La proportion 60% d'*A. nilotica* incorporée se distingue avec la réduction la plus importante du nombre total de protozoaires (de 67,24%).

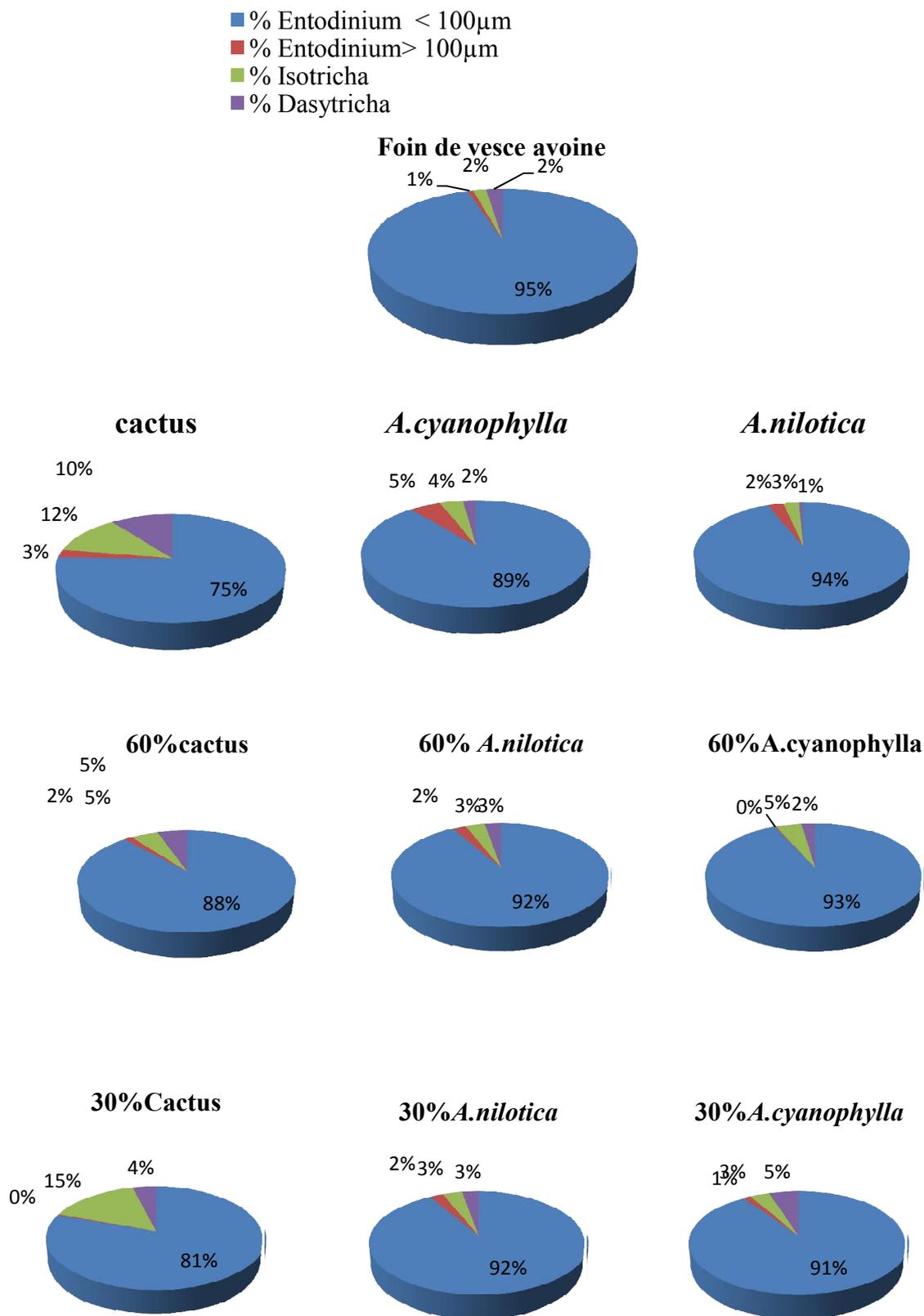


Figure 14. Comparaison des différents groupements majeurs présents au sein de la communauté des protozoaires ruminal chez le bovin entre les différents régimes alimentaires testés.

Un effet anti-protozoaire est probablement induit par les tanins contenus dans les Acacias, ce qui est cohérent avec les travaux de Cieslak *et al.* (2012), qui ont démontré que les tanins de *Vaccinium vitis idaea* réduisent le nombre de protozoaires dans le rumen des vaches laitières de race Holstein Frisonne. De même, Sallam *et al.* (2010) ont rapporté que les TCT de *leucaena*, d'*Acacia* et d'eucalyptus ont des effets inhibiteurs sur protozoaires ciliés. Récemment, Bhatta *et al.* (2015) ont également signalé une diminution dans le nombre de protozoaires totaux par des feuilles d'arbres tropicaux riches en tanins. Les tannins peuvent avoir divers effets sur les protozoaires des rumens : les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'ils réduisent généralement les populations des protozoaires du rumen (Monforte-Briceño *et al.*, 2005; Animut *et al.*, 2008). Dans d'autres cas, certaines études rapportent que leurs effets ne sont pas encore clairs (Śliwiński *et al.*, 2002b), tandis que d'autres font état d'un effet de défaunation (Monforte-Briceño *et al.*, 2005; Bhatta *et al.*, 2009). Bodas *et al.* (2012) ont noté que le mode d'action des tanins sur les protozoaires n'est pas clair mais il pourrait être similaire à celui observé chez les bactéries.

La réduction du nombre des protozoaires est associée proportionnellement à la diminution observée de la concentration d' N-NH_3 dans les Acacias et dans une moindre mesure chez le cactus, relativement au foin de vesce avoine (figure 15). Ce qui confirme le postulat rapporté plus haut. Cette situation pourrait être due à une réduction de l'activité protéolytique des protozoaires (Doreau and Ferlay, 1995). Soares *et al.* (2008) ont également fait état d'une corrélation positive entre le nombre de protozoaires total et la production d' N-NH_3 dans le rumen de bovins.

Dans cette étude les protozoaires totaux sont positivement corrélés aux AGV totaux, au C_2 et au C_4 ($r=0,711$; $0,694$; $0,740$, respectivement ; $P<0,05$) (tableau 24). Ces résultats expliquent probablement la réduction dans la proportion molaire du C_4 ($p<0,05$), trouvée plus haut et engendrée par la dégradation des mélanges à base d'arbustes fourragers, comparativement au foin de vesce avoine. En effet, les protozoaires du rumen produisent de l'acide butyrique comme produit final de la fermentation des hydrates de carbone et la défaunation est souvent associée à une réduction dans la concentration en C_4 du rumen (Williams and Coleman, 1992). Par ailleurs, ces résultats rejoignent ceux d'Eugène *et al.* (2004) qui stipulent que des concentrations plus élevées en C_2 et C_4 chez des ruminants non défaunés, peuvent être directement attribuées aux protozoaires ruminiaux, étant donné que ces AGV sont les principaux produits de leur métabolisme. De plus ces corrélations sont également rapportées dans d'autres travaux (Hristov *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2008).

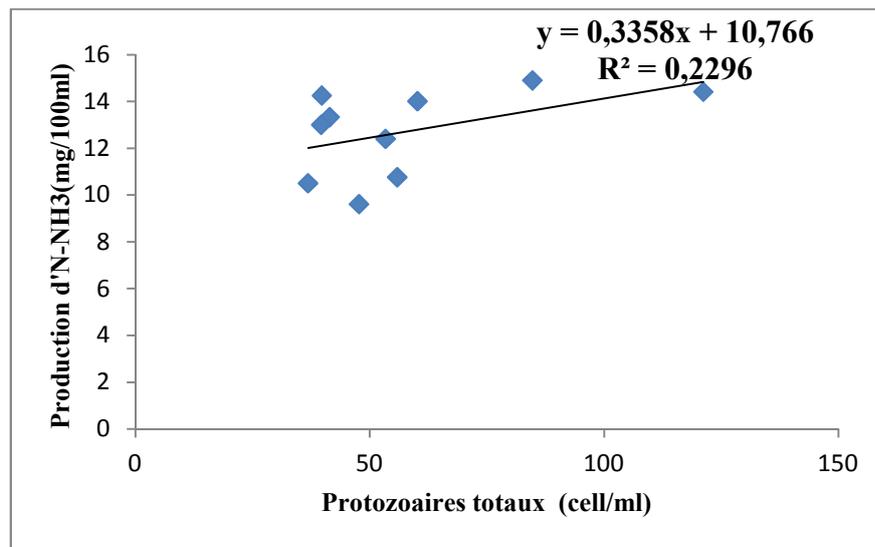


Figure 15. Relation positive entre le nombre de protozoaires total et la production d’N-NH3

Tableau 24. Coefficient de Corrélations (r) et le niveau de signification (p) entre le nombre total en protozoaires totaux, le profil des acides gras volatils des substrats examinés.

Paramètres statistiques	AGVt	C2	C3	C4	C2 :C3
R	0,711	0,694	-0,218	0,740	0,212
P	0,021	0,025	0,544	0,014	0,556

AGVt : acides gras volatils totaux, C2 : acétate, C3 : propionate, C4 : butyrate, C₂:C₃= acétate propionate ratio.

6.2. *Archaea* méthanogènes

Après 24h d’incubation, le nombre total des copies du gène *mcrA* est 6,48 fois plus élevé (P<0,05) dans le rumen chez *A.nilotica*, comparativement au contrôle T₀. *A.cyanophylla* et le foin de vesce avoine présentent des taux d’augmentations plus faibles dans l’abondance relative des méthanogènes totaux (1, 73- et 1,34- fois, respectivement). En revanche, seul le cactus inerme induit une inhibition de 0,90 fois de la population des méthanogènes, par rapport au contrôle. Concernant les mélanges, une diminution linéaire (P<0,05) est observée dans l’abondance relative des méthanogènes, avec l’incorporation des raquettes de cactus au foin de vesce avoine, comparativement au contrôle. L’addition d’*A.cyanophylla* induit une augmentation dans le nombre des méthanogènes, avec un effet linéaire (jusqu’à +1,68 fois relativement au contrôle). L’incorporation d’*A.nilotica* à 60% induit une augmentation de 1,3 fois dans la population des méthanogènes et à 30%, elle

induit une augmentation encore plus remarquable de cette population, relativement au contrôle (+2,15- fois).

La composition de la ration et la nature de l'aliment concentré influencent l'orientation des fermentations ruminales mais aussi la communauté des *Archaea* méthanogènes (Popova *et al.*, 2011). Ces mêmes auteurs ont rapporté que la communauté méthanogène dans le rumen de bovins était plus riche et plus diverse chez des animaux recevant un concentré fibreux, comparés à des animaux recevant un concentré riche en amidon et en lipides (Popova *et al.*, 2011). Les sucres solubles exerceraient aussi une pression sélective sur les méthanogènes du rumen (Popova *et al.*, 2011). Ce qui expliquerait, entre autre, la diminution numérique dans les l'ADN des populations méthanogènes, lors de la dégradation des régimes à base de raquettes de cactus. Cependant, les augmentations observées dans cette population, engendrées par la fermentation des régimes à base d'*A.nilotica* ou d'*A.cyanophylla*, peuvent être due aux contenus fibreux élevés de ces espèces arbustives (Agarwal *et al.*, 2008).

La recherche sur les effets des tanins sur les populations méthanogènes a été réalisée à la fois dans des conditions *in vivo* et *in vitro*. Cependant, les résultats n'étaient pas toujours sans équivoque (Bhatta *et al.*, 2009; Cieslak *et al.*, 2012; Szumacher-Strabel and Cieslak, 2012; Tavendale *et al.*, 2005). Tavendale *et al.* (2005) ont suggéré que l'inhibition de la croissance des méthanogènes du rumen est due à des effets bactériostatiques et/ou bactéricides des TCT. L'étude a démontré la désactivation de méthanogènes (*M. ruminantium*), liée à la réduction de CH₄ produit (Tavendale *et al.*, 2005). Des conclusions similaires ont été tirées par Pellikaan *et al.* (2011). Cependant, dans la présente étude, un effet contraire est constaté pour les plantes riches en tanins (*A.nilotica* et *A.cyanophylla*). En effet, leur fermentation induit une augmentation relativement importante du nombre total d'archées méthanogènes dans le rumen. Une explication possible peut être basée sur une résistance potentielle de cette population aux tanins des *Acacias* étudiées. Ce mécanisme pourrait être lié à des sécrétions extracellulaires microbiennes qui réduisent l'effet des tanins et / ou des enzymes dégradant les tanins. Selon Longo *et al.* (2013), d'autres études sur la résistance, la tolérance ou l'adaptation des méthanogènes aux tannins doivent être effectuées. En outre, l'abondance relative des méthanogènes totaux dans le rumen peut être liée à l'origine des tannins ou à leur nature (par exemple, hydrolysable ou condensé). Les Tanins condensés semblent diminuer la production de CH₄ à travers principalement une réduction dans la digestion des fibres (effet indirect), tandis que les tanins hydrolysables (TH) semblent agir plus par l'inhibition de la croissance et / ou l'activité de bactéries méthanogènes et / ou des

microorganismes producteurs d'hydrogène (effet directe) (Jayanegara *et al.*, 2010). De plus, Goel and Makkar (2012) ont montré que les TH induisent une plus grande réduction de la population des méthanogènes ou des microorganismes leur fournissant l'H₂ que les TCT.

L'interprétation des résultats avec des extraits végétaux contenant des molécules bioactives, même à une concentration prédominante, est difficile en raison de la complexité des structures, ainsi que la possibilité d'interactions entre les différents composants d'extrait bioactifs ou des composants d'extrait bioactifs et de composants alimentaires. Soltan *et al.* (2012) ont également suggéré que les propriétés anti méthanogènes potentielles des aliments contenant des tanins peuvent être liées non seulement à la teneur en tanin mais aussi à d'autres facteurs.

6.3. Champignons anaérobies

Comparativement au contrôle (T₀), l'abondance relative de la population fongique est réduite significativement de 0,30 fois avec *A.nilotica* et de 0,031 fois avec *Opuntia*, après 24h d'incubation ($p < 0,0001$) (tableau 23). Cependant, les dégradations d'*A.cyanophylla* et du foin de vesce avoine induisent des augmentations de 1,24 et de 2 fois dans le nombre relatif des champignons anaérobies, respectivement ($p < 0,0001$). Concernant les mélanges, une réduction significative et linéaire dans l'abondance relative des champignons anaérobies est notée pour toutes les mixtures, à l'exception de la proportion 60% d'*A.cyanophylla* incorporée, où l'on remarque une augmentation relative de la population fongique (1,9 fois), comparativement au foin de vesce avoine mis à fermenter seul ($p < 0,0001$).

Les champignons du rumen sont des « dégradeurs » actifs de fibres végétales. Bien que la connaissance de leurs caractéristiques reste encore limitée, ils sont considérés comme des colonisateurs primaires de la biomasse végétale (Edwards *et al.*, 2008). L'augmentation relative de l'ADN fongique après 24h d'incubation, chez le foin de vesce-avoine et *A.cyanophylla*, est probablement due aux teneurs relativement élevées en fibres de ces fourrages, notamment en NDF. De plus, cela en va probablement de même pour la bonne croissance des champignons observée dans le rumen en réponse à la ration 60-40 d'*A.cyanophylla*-foin. En revanche, le cactus et *A.nilotica* diminuent relativement le nombre des champignons totaux après 24h de fermentation, probablement en raison de leur teneur élevée en NFC. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres études qui suggèrent que le régime alimentaire peut avoir un effet important sur les populations fongiques : les régimes riches en fibres favorisant une population de champignons très importante par rapport aux

régimes riches en concentrés (Bauchop, 1979). Peu d'études ont été menées sur l'effet d'extraits végétaux sur les champignons du rumen (Patra and Saxena, 2009). McSweeney *et al.* (2001) ont indiqué que les effets des tanins sur les champignons sont plus subtils que sur les bactéries et varient en fonction de la structure chimique des tanins et selon leurs différents récepteurs de surface cellulaire.

6.4. Bactéries cellulolytiques

Après 24h d'incubation, les plantes à tannins et les raquettes de cactus réduisent significativement l'abondance relative de *Ruminococcus flavefaciens*, en comparaison au contrôle T₀ (p<0,0001), avec la diminution la plus élevée pour *A.nilotica* (0,4 fois), suivie d'*A.cynaophylla* (0,3 fois) et du cactus (0,1 fois). En revanche, la biomasse de cette population bactérienne est 1,2 fois plus élevée pour le foin de vesce avoine (p<0,0001), par rapport au T₀. Par ailleurs, toutes les proportions (30-70, arbuste-foin) engendrent une augmentation dans l'ADN bactérien de *R.flavefaciens* jusqu'à 1,9 fois pour la proportion 30% d'*A.nilotica* incorporée, en comparaison avec le foin mis à fermenter seul. Cependant, une diminution significative dans la biomasse de *R.flavefaciens* est notée chez toutes les proportions (60-40, arbuste-foin), avec la diminution la plus importante pour 60% d'*A.nilotica* incorporée (0,2fois). Des augmentations remarquables dans l'abondance relative de l'ADN bactérien de *Fibrobacter succinogenes*, variant entre 3,1 à 29,2 fois, sont observées dans tous les échantillons testés, comparativement au control T₀ (p<0,0001).

Parmi les bactéries cellulolytiques quantifiées, la population de *F.succinogenes* est la plus abondante dans tous les substrats. Ces résultats confirment les conclusions tirées par d'autres auteurs qui notent *F.succinogenes* comme l'espèce prédominante des bactéries cellulolytiques dans le rumen, indépendamment des conditions alimentaires (Mosoni *et al.*, 2011). Selon Jun *et al.* (2007), ils constituent environ 5 à 6% du nombre total de l'ARN r 16S des procaryotes dans le rumen de bovins. Toutes ces études indiquent l'importance écologique et fonctionnelle de *F.succinogenes* parmi les espèces connues de bactéries cellulolytiques. Par ailleurs, certaines études ont indiqué que *F.succinogenes* est la principale espèce cellulolytique affectée négativement par les tannins (McSweeney *et al.*, 2001; Longo *et al.*, 2013). Toutefois, dans la présente étude, la réduction de la taille de la population de *F. succinogenes* n'a pas été observée mais un effet sélectif potentiel des tannins sur *R. flavefaciens* a été observé. Cette situation se produit à partir de 30% d'*A .nilotica* ou *A.cynaophylla* ajoutées. Les tannins peuvent être particulièrement toxiques pour les bactéries

fibrolytiques (Bhatta *et al.*, 2009) par : (i) une action bactériostatique sur les enzymes microbiennes telles que les endoglucanases (Guimarães-Beelen *et al.*, 2006) (ii) un effet direct (Koike *et al.*, 2009) ou bien (iii) par réduction de la disponibilité des nutriments (Sallam *et al.*, 2010). Certaines études ont suggéré une activité prédatrice sélective envers des bactéries cellulolytiques (Ozutsumi *et al.*, 2006) dont le nombre augmente avec l'élimination des protozoaires, bien qu'il puisse également s'agir, comme suggéré par Mosoni *et al.* (2011), d'une compétition pour le substrat entre protozoaires et bactéries fibrolytiques. Ces observations pourraient probablement expliquer l'augmentation relativement remarquable de l'ADN de *F.succinogenes*, constatée dans cette étude.

6.5. Effets des populations microbiennes cellulolytiques sur l'activité enzymatique et la fermentation ruminale

Les Ruminants digèrent la cellulose via une relation symbiotique avec les microorganismes du rumen. La digestion des fourrages est réalisée en grande partie par une population mixte de bactéries, protozoaires et champignons (Michalet-Doreau *et al.*, 2001). Une attention particulière est prêtée à la croissance des bactéries parce qu'elles sont indispensables à la digestion de la cellulose, notamment les espèces majeures : *Fibrobacter succinogenes* et *Ruminococcus flavefaciens*. Certaines celluloses sont également digérées par les protozoaires mais des études *in vivo* et *in vitro* ont indiqué que leur activité est très inférieure à celle des bactéries (Lee *et al.*, 2000). Les champignons jouent également un rôle dans la digestion de la cellulose, lorsque des fourrages de qualité médiocre sont utilisés dans l'alimentation animale (Bauchop, 1979). Cependant, les champignons du rumen sont inhibés par des substances produites par les bactéries, comme les bactériocines (Dehority and Tirabasso, 2000).

L'analyse des résultats ne montre aucune corrélation ($P > 0,05$) entre la CMC_{Case} et l'abondance relative de la majorité des populations cellulolytiques quantifiées dans cette étude, à savoir *R.flavefaciens*, les champignons et les protozoaires. Ces résultats sont en accord avec Higuera (2012). Selon ce dernier auteur, cette situation pourrait probablement s'expliquer par le retard induit dans la production d'enzymes cellulolytiques après la fixation microbienne aux particules alimentaires, induisant un temps de latence entre l'arrivée de l'alimentation dans le rumen et sa dégradation par le microbiote fibrolytique. En revanche, le nombre relatif des espèces de *F.succinogenese* est lié positivement à la CMC_{Case} ($r = 0,6216$; $P < 0,05$). Il semblerait donc que ces bactéries jouent un grand rôle dans la digestion de la cellulose des

substrats analysés dans cette étude. De plus, la biomasse relative de cette même espèce bactérienne est corrélée positivement à la fraction NDF ($r=0,964$; $P<0,05$). Ces résultats rejoignent les conclusions d'autres auteurs qui stipulent que des teneurs élevées en fibres dans la ration engendrent une augmentation dans l'activité des enzymes fibrolytiques et le nombre des populations cellulolytiques dans le rumen (Agarwal *et al.*, 2004). Ce qui reflète la dépendance du profil microbien à la composition chimique du substrat. En étudiant l'influence de l'alimentation à base d'extrait de *Sapinus rarak* sur le microbiote ruminal, Wina *et al.* (2005) ont observé une réduction dans toutes les populations cellulolytiques étudiées, sauf pour *Fibrobacter* sp. Indiquant des réponses variables de différentes populations microbiennes fibrolytiques à l'additif alimentaire. Ce qui rejoint, notamment, les constatations établies plus haut concernant l'absence d'effet des métabolites secondaires contenus dans les plantes étudiées sur la population de *F.succinogenese*. L'abondance relative de l'ADN bactérien de *R.flavefaciens* et *F.succinogenese* est corrélée positivement à la production de C_4 ($r=0,658$ et $0,885$, respectivement). Par contre, aucune corrélation ($P>0,05$) n'est notée entre la population fongique et les paramètres fermentaires. En accord avec les résultats de Higuera (2012), une corrélation positive et hautement significative ($r=0,885$; $P<0,001$) est observée dans cette étude entre l'abondance relative des populations de *R.flavefaciens* et *F.succinogenese*, indiquant des similitudes dans leur réponse aux conditions du rumen.

L'absence de corrélation entre l'abondance relative de la majorité des populations cellulolytiques ($P>0,05$) avec la CMC_{case} observée dans cette étude rejoint les résultats de Martin *et al.* (2001), qui ont observé que l'incorporation de l'orge (40% de la ration totale) aux bovins engendrait une réduction dans l'activité fibrolytique mais sans changement sur la structure de la communauté bactérienne cellulolytique du rumen. Un manque de corrélation entre l'abondance relative des bactéries cellulolytiques et les activités enzymatiques fibrolytiques (Michalet-Doreau *et al.*, 2001) ou des paramètres de fermentation (Weimer *et al.*, 1999) a déjà été signalée et les auteurs ont souligné que les techniques moléculaires ne fournissent aucune information concernant la viabilité, l'activité métabolique ou le stade de croissance des bactéries, qui tous affectent la production d'enzymes et la dégradation des aliments. De plus, l'absence de corrélations entre l'ADN bactérien et l'activité CMC_{case} est difficile à interpréter tant les bactéries du rumen sont une population complexe et diversifiée, incluant les microorganismes avec un large éventail d'activités enzymatiques (Higuera, 2012). Il faut également signaler que les changements observés dans les populations microbiennes

cellulolytiques dans notre étude n'impliquent pas nécessairement des conséquences sur la fonction ruminale car il a été rapporté que les ruminants nourris avec des fourrages différents dans la composition et dans les caractéristiques de la paroi cellulaire avaient des activités fibrolytiques similaires dans le rumen mais à des taux de dégradation de fourrages différents (Higuera, 2012).

6.6. Effets des hautes teneurs du cactus en oxalates sur le profil microbien du rumen

L'utilisation de *O. ficus indica* comme substrat mis à fermenter seul ou en mélange diminue de manière significative ($P < 0,05$) la quantification relative des archées méthanogènes, des champignons anaérobies, de *R. flavefaciens* et des protozoaires. Cela pourrait probablement être lié à la teneur élevée en oxalates des raquettes de cactus. Ces observations n'ont pas été rapportées auparavant. En utilisant des techniques moléculaires, Belenguer *et al.* (2013) ont étudié l'impact de l'acide oxalique (AO) sur la communauté bactérienne du rumen chez les ovins et ont trouvé des variations rapides dans le microbiote ruminal qui se produisaient avec l'administration de l'AO dans les régimes. L'administration de l'AO altère l'environnement du rumen, y compris la communauté bactérienne. Les oxalates possèdent le potentiel de former un chélate solide avec le calcium alimentaire sous la forme de cristaux d'oxalate de calcium (McConn and Nakata, 2004; Contreras-Padilla *et al.*, 2011, ce qui rend cet anion moins disponible pour les animaux (Nefzaoui and Ben Salem, 2001). Chez les ruminants, certains minéraux essentiels comme le calcium et le phosphore sont d'importants modulateurs de la fermentation microbienne (Durand and Komisarczuk, 1988).

Le calcium (Ca^{2+}) est le support le plus universel des signaux biologiques, il module en particulier la vie cellulaire (Carafoli, 2007). Cette molécule de signalisation régule un certain nombre de processus essentiels chez les eucaryotes (Clapham, 2007). Chez les procaryotes, divers processus physiologiques, tels que la formation de spores ; la motilité ; la différenciation cellulaire ; le transport et la virulence et l'expression des gènes bactériens, sont modulés par le Ca^{2+} (Domínguez *et al.*, 2011; Guragain *et al.*, 2013). Il est connu que la fonction de signalisation de Ca^{2+} possède un certain nombre de propriétés uniques ; une propriété distinctive du signal Ca^{2+} est l'autorégulation qui se produit au niveau transcriptionnel et post traductionnel (Carafoli, 2007).

La consommation des ressources alimentaires riches en oxalates, en quantité suffisante, peut provoquer principalement l'hypocalcémie et l'insuffisance rénale, ce qui conduit à

l'empoisonnement du bétail (James, 1972 ; Cheeke, 1995). Cependant, l'adaptation du microbiote ruminal à l'oxalate peut empêcher une intoxication des animaux, par détoxification microbienne (Allison *et al.*, 1981). Belenguer *et al.* (2013) ont observé une adaptation rapide du microbiote ruminal à la consommation de l'AO, liée à l'augmentation rapide de l'abondance estimée de *Oxalobacter formigenes* (0,002 à 0,007% de gène OXC par rapport au nombre total de 16S de bactéries ADNr: $P < 0,01$), bactérie responsable de la dégradation de l'oxalate.

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif principal assigné à ce travail est d'évaluer la valeur nutritive d'arbustes fourragers collectés à partir de parcours situés dans les régions arides et semi-arides de notre pays. Le but est d'utiliser ces substrats comme un moyen potentiel pour augmenter la qualité et la disponibilité des ressources alimentaires vertes pour les ruminants locaux et de préserver les parcours pastoraux, surtout pendant les périodes de sécheresse. Dans cet optique, nous avons entrepris l'étude de la composition chimique et de la fermentescibilité *in vitro* de 03 arbustes fourragers de zones arides, à savoir : *Opuntia ficus indica* (cactus inerme), *Acacia nilotica* et *A. cyanophylla*. Ces plantes peuvent par ailleurs lutter contre la désertification, atténuer les effets de la sécheresse, permettre la fixation des sols et améliorer la restauration de la végétation et la récupération des terres de parcours. L'étude de ces substrats est menée comparativement à un substrat de référence qui est le foin de vesce-avoine. L'éventuelle incorporation de ces plantes arbustive en mélange dans l'alimentation des ruminants est également testée sous diverses conditions.

Dans un second volet, nous avons effectué des investigations sur l'influence de la haute teneur en métabolites secondaires de ces plantes sur la réduction de la méthanogenèse ruminale, en vue de réduire les pertes en matières azotées qui induisent des pertes énergétiques et, par ricochet, la minimisation des effets néfastes des émanations de méthane sur l'environnement.

Pour préciser la relation régime alimentaire-variations dans les écosystèmes microbiens chez les ruminants, les fluctuations quantitatives du consortium microbien du rumen ont été également étudiées dans ce travail. Les effets des hautes teneurs en métabolites secondaires, notamment les tannins condensés, de ces plantes sur le changement potentiels dans le profil microbien du rumen ont été plus spécifiquement visés, ces composés étant considérés comme les principaux facteurs d'entrave à l'utilisation nutritive des arbustes fourragers.

Dans ce cadre, ce travail a consisté à étudier plusieurs aspects relatifs à ces fourrages :

- 1- Détermination de la composition chimique des échantillons collectés,
- 2- Etude de la fermentescibilité *in vitro* des substrats retenus et de leurs mixtures par le microbiote ruminal de bovins et donc, indirectement, de leur valeur nutritive,
- 3- Etude de l'effet des plantes collectées et de leurs mixtures sur la méthanogenèse ruminale,

4- Etude des effets antinutritionnels des hautes teneurs en composées secondaires des plantes étudiées sur les changements potentiels dans le profil microbien du rumen, par la technique de PCR en temps réel (qPCR).

Sur la base de leur composition chimique, les arbustes prospectés sont une source importante de matière sèche et d'énergie, de niveau intermédiaire entre les concentrés et les fourrages. Ce qui indique un potentiel d'utilisation comme fourrage dans les rations du cheptel local. Cependant, des dissimilitudes notables entre les différents genres arbustifs ressortent de cette étude. Les espèces d'*Acacia* étudiées peuvent être classées parmi les fourrages fibreux car elles se distinguent par des taux élevés en fibres (NDF et ADF) et en lignine (ADL). Avec notamment une composition pariétale relativement plus importante chez *A.cyanophylla* comparativement à *A.nilotica*. Les Acacias détiennent aussi les valeurs les plus élevées en protéines brutes, nettement au dessus du niveau minimum de 7-8% MS requis pour le fonctionnement optimal du rumen et l'ingestion alimentaire dans l'élevage des ruminants (Van Soest, 1994), ce qui est un bon paramètre quant à leur valorisation comme fourrage. Néanmoins, la présence de tannins en grande quantité chez les deux espèces d'*Acacia*, conjuguée à leur taux élevé en lignine, ne les prédispose pas à une utilisation comme fourrage principal. De plus, il est important de mentionner qu'une forte proportion de TCT des Acacias est récupérée dans cette étude sous forme de Tanins condensés libres, qui pourraient être responsables d'éventuels effets néfastes sur la fermentation microbienne des aliments dans le rumen (Barry et McNabb, 1999). Les Acacias pourraient donc être envisagés comme palliatif au déficit fourrager en période de disette. Autrement, ils pourraient être aussi incorporés en proportion convenable dans les rations alimentaires des ruminants, en tant que supplément protéique aux pâturages naturels ou à des rations de mauvaise qualité (à faible teneur en N). Quant à *Opuntia ficus indica* (cactus inerme), elle peut être classée parmi les fourrages riches en énergie, en eau et en minéraux, ce qui permet également de promouvoir cette espèce comme supplément pouvant améliorer les rations de base comme les pailles ou les foin généralement distribuées aux ruminants par les éleveurs locaux, surtout pendant les périodes de sécheresse. Comme, elle pourrait être utilisée pour combler les déficits en besoins minéraux dans certaines conditions physiologiques. Cependant, il est clair que le cactus ne doit pas être considéré comme une culture fourragère équilibrée car bien qu'il représente une excellente source en NFC (source importante d'énergie pour les ruminants) et en vitamines, ses faibles teneurs en fibres pariétales et en protéines brutes restent insuffisantes pour des performances adéquates de production animale. D'autre part, la présence conséquente des

oxalates dans les raquettes de cactus peut également entraver leur utilisation en tant que fourrage unique. Les oxalates sont des composés antinutritionnels, susceptibles de chélater le calcium, rendant cet anion indisponible pour l'animal. D'où la nécessité de les combiner à une autre source de protéines et de fibres (comme le foin de vesce avoine).

La composition morphologique, la variété de l'espèce végétale, la saison de récolte, les substances anti-nutritionnelles et les conditions agronomiques sont parmi les facteurs discriminatoires de leur valeur nutritive, essentiellement chez les arbustes fourragers (Arab *et al.*, 2009). Par conséquent, il peut être difficile de suggérer l'utilisation de ces arbustes fourrages comme constituant optimal des rations alimentaires, sur la base essentiellement de leur composition chimique. C'est dans cette optique qu'ont été évaluées les caractéristiques nutritionnelles de ces plantes fourragères, mises à fermenter seules ou en mélanges par des études biologiques (étude *in vitro*).

L'évaluation de la fermentescibilité *in vitro* des substrats par le microbiote ruminal montre que les acacias sont faiblement dégradés, relativement au substrat de référence. Tandis que le cactus inerme a un comportement intermédiaire. Leur classement sur la base des résultats de la production de gaz *in vitro* après 96 heures d'incubation est le suivant : foin de vesce-avoine > cactus > *A.nilotica* > *A.cyanophylla*. L'incorporation d'*A.nilotica* ou d'*A.cyanophylla* au foin de vesce avoine induit une réduction dans la production de gaz total et cette diminution est dose-dépendante, avec notamment un effet plus prononcé pour les mixtures à base d'*A.cyanophylla* (réduction jusqu'à 26,74% pour la proportion 60% d'*A.cyanophylla* incorporée). Cette situation peut s'expliquer à la fois par la richesse des acacias en TCT, connus pour leurs actions antagonistes vis-à-vis des molécules nutritives et des enzymes microbiens (Edwards *et al.*, 2012) et/ou par leur structure très lignifiée qui constitue un rempart quasi indigestible pour tout le microbiote ruminal. En effet, par référence aux valeurs des coefficients de Pearson obtenues dans cette étude, la fraction ADL et les TCT sont négativement corrélés à la production de gaz total ($P < 0,05$). Cependant, l'effet des TCT reste significatif jusqu'à 24h de fermentation, ce qui suggère que les TC contenus dans les acacias ont un impact négatif plus prononcé dans le temps sur la production de gaz que la fraction ADL. Par ailleurs, un simple effet additif est engendré par toutes les mixtures, excepté pour la mixture (30-70%, *A.cynaophylla*- foin) qui engendre un effet antagoniste sur la production cumulative de gaz. L'estimation du taux et de la vitesse de production de gaz à partir de la fraction insoluble mais potentiellement fermentescible (b) montre clairement que les régimes à base d'*A.nilotica*, en particulier la combinaison (30-70%, *A.nilotica*-foin) se

caractérise par une bonne fermentescibilité des constituants de leurs parois cellulaires par le microbiote ruminal. Ce qui peut s'expliquer par une fraction NDF hautement digestible, qui engendre par ailleurs la libération de l'azote fixé aux fibres. L'incorporation des raquettes de cactus inerme à raison de 60 % dans les mélanges induit également une diminution dans la production de gaz *in vitro* mais à un degré beaucoup plus faible par rapport aux acacias. Cette réduction est probablement liée à la présence des oxalates en excès dans les raquettes de cactus. Cependant, l'effet inhibiteur induit par ces métabolites secondaires sur l'activité du microbiote ruminal n'est pas observé pour la proportion 30% de cactus ajoutés, où l'on note au contraire une augmentation dans le volume de gaz produit. Ce qui pourrait s'expliquer par un effet nul ou non significatif de ces substances à cette faible dose de cactus et /ou par une adaptation du microbiote ruminal de bovins. Lorsque de faibles quantités d'oxalates sont consommées, la plupart de ces métabolites peuvent être détruits par les bactéries du rumen (Rahman *et al.*, 2013). Ces résultats sont conformes à l'estimation des effets associatifs des différentes mixtures qui révèle un effet antagoniste engendré par la combinaison (60-40%, cactus- foin) et un effet synergique engendré par la combinaison (30-70%, cactus-foin) sur la production de gaz cumulative, mesurée après 24h d'incubation. Cette synergie entre les deux substrats est intéressante et indique une synchronisation potentielle dans la libération du contenu énergétique et azoté de la ration dans le rumen qui peut améliorer la croissance et l'activité du microbiote ruminal. La fermentation des mélanges à base de cactus inerme induit une augmentation linéaire dans la production de gaz résultant de la fraction soluble (a). De plus, ils sont plus rapidement fermentés par le microbiote ruminal, comparativement au témoin de référence. La proportion 30% de cactus ajoutée se distingue notamment par des valeurs de paramètres cinétiques (a, b et c) proches ou supérieurs à celles du témoin.

Les essais de digestibilité *in vitro* de la MS concordent avec les résultats de la production de gaz *in vitro* ($r=0,989$; $P < 0,05$). Cette relation positive entre ces deux paramètres a déjà été observée antérieurement (Paya *et al.*, 2007). La classification des fourrages sur la base de la digestibilité apparente de la MS est alors la suivante : foin de vesce-avoine > cactus inerme > *A. nilotica* > *A. cyanophylla*. Les faibles valeurs de la digestibilité *in vitro* des feuilles d'*A. cyanophylla* et *A. nilotica* confirment raisonnablement les appréhensions sur la qualité fourragère de ces arbustes. Leurs taux élevés en lignine ne les préfigurent pas, *a priori*, à un statut de fourrage de qualité, malgré leur richesse en matières azotées et en NDF. Malgré des valeurs de digestibilités des raquettes de cactus inerme inférieures à celles du témoin, elles restent dans l'intervalle des valeurs observées avec

d'autres cultures fourragères conventionnelles (Batista *et al.*, 2003). L'incorporation d'*A.nilotica* ou d'*A.cyanophylla* au foin de vesce avoine à différentes concentrations entraîne une diminution de la digestibilité apparente de la MS, comparativement au témoin mis à fermenté seul. Cette chute est positivement liée à la dose utilisée et elle est plus prononcée pour les mixtures à base d'*A.cyanophylla* (jusqu'à 21,24% de réduction). L'incorporation d'*A.nilotica* à raison de 30% dans le mélange induit une digestibilité de la MO comparable à celle du foin de vesce avoine. L'addition des raquettes de cactus à raison de 60% au foin réduit également la digestibilité du mélange. Cependant, la digestibilité de la combinaison (30-70%, cactus-foin), est comparable à celle du témoin mis à fermenter seul. Ce résultat indique que le contenu fibreux des raquettes de cactus inerme est digestible par le microbiote ruminal. De ce fait, sa digestibilité n'apparaît pas être un facteur limitant pour son utilisation dans les rations des ruminants. Ce qui suggère, par ailleurs, que les nutriments des raquettes de cactus peuvent être efficacement valorisés par les ruminants, si elles sont utilisées en tant que composante d'un régime alimentaire équilibré.

En général, le pourcentage d'arbuste dans le mélange diminue la concentration ruminale d'azote ammoniacal (N-NH₃) : jusqu'à -33,31% pour la dose 60% d'*A.cyanophylla* ajoutée. Ce qui peut s'expliquer, entre autres, par une bonne assimilation et incorporation de l'azote par le microbiote ruminal. L'introduction du cactus inerme à raison de 30% au foin engendre au contraire une augmentation de la production de l'N-NH₃ (+3,4%), ce qui indique une stimulation de la protéolyse ruminale. Toutes les valeurs de N-NH₃ obtenues dans cette étude sont néanmoins supérieures au seuil préconisé par Nagadi *et al.*, (2000) pour assurer une activité métabolique maximale du microbiote ruminal *in vitro*. La production ruminale d'AGV totaux respective des différentes espèces arbustives, mises à fermenter seules ou en mélanges, est comparables entre elles mais significativement inférieure à celle du foin de vesce-avoine. Néanmoins, les ratios acétate/propionate, de fait les deux AGV majeurs, sont compris entre 3 et 4,1. Ils sont du même ordre que les ratios rapportés considérés comme appréciables pour une bonne activité fermentaire (DePeters *et al.*, 2000). Ce qui indique notamment une proportion élevée en NDF digestible dans les aliments et un effet positif sur le métabolisme énergétique global.

L'analyse de l'activité méthanogène du microbiote ruminal montre que les plantes arbustives étudiées produisent de faibles taux de méthane, comparativement au standard. Les résultats montrent également que l'incorporation soit d'*A.nilotica* ou d'*A.cyanophylla* au foin de vesce avoine engendre une diminution intéressante dans la production de CH₄ dans le pool

gazeux qui pourrait s'expliquer par l'effet anti-méthanogène des tanins. Cette chute est dose-dépendante, avec néanmoins un effet plus prononcé chez *A.cyanophylla* : jusqu'à - 62,5%, relativement à *A.nilotica* (-25%). Par ailleurs, l'addition du cactus inerme au foin de vesce avoine induit une diminution moins importante du volume de CH₄ produit (-12,5%), mais uniquement lorsque la concentration en cactus est de 60% dans la mixture.

Le profil du microbiote ruminal de bovins varie significativement en réponse aux différents substrats et mixtures étudiés, indiquant l'influence potentielle de la haute teneur en métabolites secondaires des arbustes sur une grande partie de la communauté microbienne du rumen. Le nombre total des protozoaires diminue linéairement, avec l'augmentation de la proportion de l'arbuste fourrager dans la mixture. La réduction la plus importante est obtenue avec la proportion 60% d'*A.nilotica* incorporée (-67,24%). La PCR en temps réel révèle une diminution linéaire dans l'abondance relative des archées méthanogènes, avec l'incorporation des raquettes de cactus inerme au foin, comparativement au contrôle T₀, ce qui peut s'expliquer par la nature chimique du substrat et/ou l'effet inhibiteur des oxalates. Les mixtures à base de plantes à tannins induisent une réponse différente, se traduisant par une augmentation remarquable dans l'abondance relative des archées méthanogènes (+6,5 fois pour la fermentation d'*A.nilotica*). Ce qui peut s'expliquer par une résistance potentielle de cette population aux tanins des Acacias étudiés et/ou à l'origine et la nature de ces tannins (par exemple, hydrolysable vs condensé). Une bonne croissance des champignons anaérobies dans le rumen est observée uniquement en réponse aux régimes : foin de vesce avoine, *A.cyanophylla* mis à fermenter seuls chacun et de leur association à raison de (60-40%, *A.cyanophylla*-foin), Ce qui pourrait être lié à la richesse en fibres pariétaux de ces substrats. Concernant les bactéries cellulolytiques du rumen, les populations de *F.succinogenes* sont numériquement dominantes. Des augmentations considérables dans l'abondance relative de l'ADN bactérien de *F. succinogenes*, variant entre 3,1 à 29,2, fois, sont observées dans tous les échantillons testés, comparativement au contrôle T₀. Ce qui peut être lié à la diminution de l'activité prédatrice sélective des protozoaires envers ces bactéries cellulolytiques. Tous les arbustes mis à fermenter seuls ou en mélanges avec le foin à raison de (30-70%) engendrent une augmentation de l'ADN bactérien de *Ruminococcus flavefaciens*, jusqu'à 1,9 fois pour la proportion 30% d'*A.nilotica* incorporés. Une diminution dans la biomasse relative de *R.flavefaciens* est notée pour toutes les proportions (60-40, arbuste-foin), avec la diminution la plus importante pour 60% d'*A.nilotica* incorporés (0,2 fois), indiquant un effet inhibiteur sélectif des métabolites secondaires contenus dans les plantes étudiées envers *R. flavefaciens*,

uniquement à partir de la proportion 60% d'arbuste. L'analyse des coefficients de corrélations révèle que parmi les populations cellulolytiques du rumen, l'abondance relative de *F.succinogenese* joue un grand rôle dans l'activité spécifique de la carboxyméthylcellulase ($r= 0,6216$; $P<0,05$). Elle est concomitante à la teneur en fraction NDF ($r=0,964$; $P<0,05$). La forte baisse relative de l'activité de la CMCase à partir de la dégradation des mélanges à base d'*A.cyanophylla* se reflète dans la diminution du profil métabolique et de la production de gaz dans le rumen des bovins. Toutefois, on remarque une bonne croissance de *F.succinogenese*. Cette situation laisse supposer que les TCT ont diminué la digestion des fibres pariétales à travers l'inactivation de la cellulase ou sa complexation avec les polysaccharides et non pas à travers l'inhibition des microorganismes cellulolytiques du rumen. La combinaison (30-70%, *A.nilotica*-foin) se distingue par un accroissement dans l'abondance relative des bactéries cellulolytiques et des champignons, ce qui est corroboré à une bonne activité fermentaire des populations cellulolytiques : l'activité spécifique de la CMCase obtenue pour ce mélange est comparable à celle du foin. Ces résultats confirment par ailleurs ceux de l'augmentation du taux et de la vitesse de production de gaz à partir de la fraction insoluble mais potentiellement fermentescible (b) pour ce mélange. La combinaison (30-70%, cactus inerme-foin) se distingue également par bonne croissance microbienne, reflétée à travers une bonne fermentescibilité et digestibilité des constituants de ce mélange. La diminution dans les valeurs de la fraction insoluble mais potentiellement fermentescible à partir de 60% de cactus inerme incorporés dans le mélange est corroborée par l'inhibition sélective du microbiote impliqué dans la dégradation de la fraction pariétale du foin de vesce-avoine, probablement par le biais des oxalates présents dans le cactus. Néanmoins, Il faut signaler que les changements observés dans les populations microbiennes cellulolytiques dans notre étude n'impliquent pas nécessairement des conséquences sur la fonction ruminale globale.

➤ **Rôle du changement dans la taille du consortium microbien du rumen dans le processus de méthanogenèse**

Bien que le méthane soit un produit naturel des fermentations ruminales, sa production représente une perte énergétique de l'ordre de 2 à 12% de l'énergie ingérée par l'animal (Johnson and Johnson, 1995). Il est rejeté dans l'atmosphère essentiellement par voie orale (95%) au cours d'éructions régulières ou par les poumons, après passage dans le sang. A l'échelle de la ferme, la contribution du CH₄ aux émissions de gaz à effet de serre est comprise entre 40 et 60%. Le CH₄ d'origine entérique en représente 80% et les 20% restants

provenant des effluents d'élevage (Gill *et al.*, 2010). La réduction des émissions de CH₄ par les ruminants présente ainsi des intérêts nutritionnels pour l'animal et environnementaux.

Le CH₄ est formé dans le rumen quand l'hydrogène (H₂), libéré par les microorganismes fermentaires (bactéries, champignons et protozoaires), est utilisé par d'autres microorganismes : les *Archaea* méthanogènes, dans la réduction du CO₂. En tant qu'uniques producteurs de CH₄, les *Archaea* méthanogènes du rumen ont fait l'objet de nombreuses études (Janssen and Kirs, 2008). Cependant, comme pour tout écosystème complexe, il est important de considérer les différentes interactions existant entre les microorganismes et leur environnement : les conditions physico-chimiques du rumen et la physiologie de l'animal hôte, d'une part, et entre les différentes populations microbiennes (symbiose, prédation, compétition) d'autre part. Dans ce contexte, concentrer les recherches exclusivement sur les producteurs directs de CH₄, en les isolant de leur environnement naturel peut conduire à de mauvaises interprétations en ce qui concerne la régulation de la production de CH₄ dans l'écosystème ruminal. Peu d'études ont cherché à relier au sein d'un même essai la production de CH₄ et l'ensemble des mécanismes microbiens qu'elle implique. La production de CH₄ dans le rumen dépend de deux facteurs d'égale importance mais régulés autant l'un que l'autre par les concentrations en H₂ : la dynamique et l'activité de la population méthanogène et la thermodynamique des fermentations ruminales (Janssen, 2010). De ce fait, comprendre l'écologie et la dynamique des archées méthanogènes chez les ruminants nourris de différents régimes alimentaires peut aider à élucider les mécanismes microbiens de la production de CH₄ dans le rumen (Popova, 2011).

L'hypothèse de départ dans ce travail était que les variations observées dans la production de CH₄ dans le rumen seraient dues à l'impact direct et/ ou indirect des métabolites secondaires sur les populations productrices de CH₄. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons choisi le gène *mcrA* en tant que marqueur phylogénétique. Ce gène qui code pour le coenzyme M-réductase est crucial à l'étape terminale de la méthanogenèse. Ce choix du gène est motivé par le fait de son importance dans la survie de la cellule méthanogène et de sa bonne conservation au cours de l'évolution. Les outils de biologie moléculaire qui ciblent le gène *mcrA* dans l'ADN extrait de la panse constituent de fait une méthode fiable pour estimer l'abondance et l'activité des bactéries méthanogènes du rumen (Popova, 2011).

Les résultats de cette investigation révèlent des contradictions entre l'abondance relative des copies du gène *mcrA* et la production de CH₄ au sein du rumen ($y = -0,371x + 617$; $R^2 = 0,113$). Cieslak *et al.* (2012) ont noté que la méthanogenèse ruminale ne peut pas toujours être corrélée au nombre d'archées méthanogènes dans le rumen. Ce qui suggère que ces populations ne sont peut être pas un facteur clé qui influe sur la production de CH₄ dans toutes les situations ?

Les principaux AGV produits par les protozoaires du rumen sont le butyrate et l'acétate, donc des voies métaboliques productrices d'H₂. De ce fait, certains méthanogènes du rumen, peuvent être associés d'une manière intracellulaire (endosymbiose) ou extracellulaire (ectosymbiose) à des protozoaires ciliés (Tokura *et al.*, 1999). Cette relation symbiotique engendre 40% de la méthanogenèse dans le liquide du rumen (Hegarty, 1999). Généralement, la défaunation est combinée à une réduction moyenne de 10% de la production de CH₄ dans le rumen (Morgavi *et al.*, 2010). Etant donnée que les archées méthanogènes perdent leur partenaire symbiotique, cette situation entraîne une réduction de leur activité biologique (Kamra *et al.*, 2006). On pourrait donc s'attendre à des changements brusques dans la structure (nombre et diversité) de la communauté méthanogène et par conséquent dans l'orientation des fermentations ruminales quand les protozoaires sont éliminés.

Néanmoins, dans notre étude la réduction de la population des protozoaires n'est pas proportionnellement liée à la diminution de la biomasse des *Archeae* méthanogènes ($r = -0,086$; $p = 0,812$). De plus, on constate en général qu'en l'absence des protozoaires le nombre de méthanogènes augment, alors que la production de CH₄ diminue significativement et linéairement ($P < 0,05$), avec des niveaux croissant de métabolites secondaires contenus dans les plantes *in vitro*. A titre d'exemple, l'abondance relative des méthanogènes était jusqu'à 6,5 fois plus élevée dans le rumen pour *A. nilotica* ($P < 0,05$) mais alors avec une réduction de 56,25% dans l'émission de CH₄, engendrée par la dégradation de ce même substrat alimentaire. Nos résultats sont en contradiction avec ceux d'autres études où le nombre des archées méthanogènes diminue ou ne change pas, avec l'inhibition des protozoaires (Takenaka and Itabashi, 1995; Ohene-Adjei *et al.*, 2007). Mais ils sont en accord avec ceux de Carberry *et al.*, (2014). Dans l'étude de Mosoni *et al.*, (2011), les outils d'empreinte moléculaire ont également révélé que la concentration des copies *mcrA* avait augmenté d'un log après la défaunation de moutons, alors que la production de CH₄ avait diminué de 20%. Stumm *et al.* (1982) ont démontré que quand la contribution relative des protozoaires à la production totale d'H₂ dans le rumen diminue, le nombre d'association ectosymbiotiques avec

les *Archaea* méthanogènes diminue également. De plus, des effets inhibiteurs de la moindre disponibilité en H₂ sur l'activité méthanogène dans le rumen de moutons défaunés ont été démontrés en mesurant l'expression du gène fonctionnel *mcrA* (Popova, 2011). En absence de protozoaires, la production de CH₄ avait diminué et la population méthanogène était 2,5 fois moins active qu'en présence de protozoaires. Cette baisse dans l'activité des *Archaea* méthanogènes est probablement liée à une moindre disponibilité de l'H₂. Intuitivement, la diminution concomitante de la production de CH₄, avec la réduction de la population des protozoaires observée dans cette étude, pourrait être expliquée par un changement dans la diversité des *Archaea* vers des espèces (ou souches) moins actives dans la production de CH₄. D'un autre côté, ces résultats pourraient également être liés à la conclusion de Goel and Makkar (2012) qui ont montré que les métabolites secondaires végétaux pouvaient provoquer une baisse de la population des *Methanobacteriaceae* associés aux protozoaires, avec l'augmentation simultanée dans le nombre des *Methanobacteriales* à l'état libre dans le rumen, après inhibition de protozoaires. Nos travaux montrent donc qu'il n'existe pas de lien étroit entre la quantité de CH₄ produit et le nombre des *Archaea méthanogènes* dans le rumen. Ces résultats suggèrent que les méthanogènes s'adaptent aux différentes conditions ruminales qui leur sont proposées. Ils seraient capables de se maintenir dans un état de latence.

La diminution des protozoaires est associée à une augmentation de la proportion molaire du C₃ aux dépens du C₂ et surtout du C₄ ($r=0,711$; $0,694$; $0,740$, respectivement à $P<0,05$). Comme discuté précédemment, ces réorientations fermentaires sont à l'origine d'une moindre disponibilité de l'H₂ pour la méthanogenèse. Elles peuvent être attribuées au métabolisme des protozoaires (producteurs importants de C₄), mais également à leur activité prédatrice envers les bactéries. En effet, en absence de protozoaires, le nombre des bactéries est plus élevé (Ozutsumi *et al.*, 2006 ; Mosoni *et al.*, 2011). La croissance et le maintien de la biomasse bactérienne exige également une réorientation de l'H₂ vers la synthèse de nouvelles cellules, mais aussi de protéines bactériennes. Par ailleurs, la production de CH₄ est significativement et positivement corrélée à la production de C₂ ($r=0,957$, $P <0,05$) et aux AGV totaux ($r=0,946$, $P <0,05$). Par contre, la production de C₃ augmente linéairement avec la réduction dans la production de CH₄ ($r=-0,872$, $P <0,05$). Cette compétition entre la propionogénèse et la méthanogenèse est également rapportée par d'autres auteurs (Cieslak *et al.*, 2012). Nos résultats confirment les hypothèses précédentes et suggèrent que la baisse constatée dans l'activité métabolique des archées méthanogènes, traduite concrètement par l'inhibition de la

méthanogenèse, pourrait probablement s'expliquer par le détournement de leurs substrats vers la production de C₃.

En plus des métabolites secondaires, qui peuvent agir sur les populations microbiennes et sur leurs activités, la composition et la nature de la ration alimentaire influencent également l'orientation des fermentations ruminales mais aussi la diversité de la communauté des *Archaea* méthanogènes (Zhou *et al.*, 2010). La sélection des méthanogènes serait réalisée en raison d'une moindre disponibilité du substrat H₂. Car avec des régimes riches en amidon, une réorientation des voies fermentaires vers la production de C₃ aux dépens de C₂ est souvent observée (Martin *et al.*, 2010). Les clades méthanogènes dominants resteraient toujours les mêmes, quel que soit le régime (Wright *et al.*, 2007) mais des différences au niveau des espèces (ou de souches) liées au changement alimentaire ont été rapportées (Zhou *et al.*, 2010).

En résumé, les tannins contenus dans les *Acacia* étudiés ne semblent pas avoir un effet direct sur les membres de la communauté méthanogènes. La réduction des émissions de méthane dans le rumen, observée dans nos conditions expérimentales, est probablement due à une baisse de l'activité métabolique des méthanogènes. D'une part, cette baisse d'activité pourrait s'expliquer par la sélection de méthanogènes capables de s'adapter à de nouvelles conditions environnementales mais qui auraient une moindre affinité pour l'hydrogène ou un taux de méthanogenèse plus faible. D'autre part, l'activité méthanogène dans le rumen est probablement régulée par la disponibilité de ce substrat limitant. Un rendement en hydrogène plus faible ou son utilisation par d'autres puits, et/ou sa déviation vers d'autres voies hydrogénotrophes, réduirait directement l'activité métabolique des méthanogènes. En effet, parallèlement à l'inhibition des protozoaires nous avons vu se développer deux autres puits d'H₂, notamment la production de C₃ et de biomasse bactérienne.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les principaux éléments d'étude de ce travail : composition chimique et digestibilité des substrats, production de gaz et profil en AGV, permettent de classer les plantes étudiées en deux catégories : fourrages de qualité nutritionnelle inférieure comprenant les feuilles d'*A.cyanophylla* et une deuxième catégorie de valeur nutritionnelle intéressante comprenant les raquettes de cactus inerme. Alors que les feuilles d'*A.nilotica* occupent une position intermédiaire entre les deux catégories de fourrages. Compte tenu des résultats obtenus avec les différentes mixtures dans différentes combinaisons, il serait préférable de proposer les raquettes de cactus inerme comme supplément et/ou comme ressource d'eau pour les ruminants, surtout pendant les périodes de sécheresse dans les zones arides et semi arides. Dans le cas de sa complémentation avec le foin de vesce-avoine, la proportion fortement recommandée serait de 30% de cactus, un pourcentage qui donne des résultats comparables ou même supérieurs à ceux du témoin de référence et un dilution de l'effet inhibiteur des oxalates contenus dans le cactus sur la fermentation ruminale. Cette combinaison offre, en particulier, une synergie en termes de production de gaz, une digestibilité élevée et un profil fermentaire remarquable, indiquant une association nutritionnelle équilibrée des contenus énergétique et azoté pour l'animal. Quant aux feuilles d'*A.nilotica*, de par leur bon profil fermentaire, elles s'avèrent raisonnablement intéressantes comme supplément protéiné mais à de faible pourcentages dans l'alimentation animal, alors que les feuilles d'*A.cyanophylla* présentent un moindre intérêt car leur incorporation à différentes concentrations se distingue à la fois par les plus faibles valeurs de digestibilité et un effet antagoniste sur la fermentation des substrats. Elles sont par conséquent, et à ce titre, déconseillées dans l'alimentation des ruminants. Ces résultats suggèrent par ailleurs que les tanins condensés de *A.cyanophylla* affectent considérablement la digestion ruminale, avec des effets inhibiteurs plus prononcés que ceux des TCT contenus dans *A.nilotica*, malgré la haute teneur relative d'*A.nilotica* en tanins condensés libres. Dès lors, Il semble nécessaire de procéder à un traitement visant à éliminer ou, à défaut, de minimiser les effets des tanins par des procédés chimiques ou physiques, afin d'optimiser l'incorporation d'*A.cyanophylla* comme constituant courant dans les rations alimentaires des ruminants. L'utilisation du feuillage d'*Acacia* et des raquettes de cactus, doit se faire d'une manière graduelle pour permettre l'adaptation du microbiote ruminal aux métabolites secondaires et éviter les cas d'intoxications engendrés par leurs effets antinutritionnels.

Ce travail de thèse montre que l'impact des composés secondaires des Acacias étudiés sur la réduction de méthane est tangible. Les tanins condensés de ces arbustes ont un effet

négatif sur la méthanogénèse ruminal. Ce qui recommanderait l'utilisation des Acacias pour réduire les pertes en énergie et en parallèle les effets néfastes des émissions atmosphériques de CH₄ et leurs effets sur l'environnement. Cependant, nous préconisons l'utilisation préférentiel d'*A. nilotica* à une faible proportion (30% dans le cas de sa complémentation avec le foin de vesce avoine) car elle a un double intérêt : nutritionnel et productif pour l'animal et environnemental pour la planète.

L'analyse moléculaire révèle un changement important dans le profil microbien du rumen de bovins, en réponse aux différents régimes riches en métabolites secondaires et ayant des compositions chimiques différentes, indiquant un comportement contrasté du microbiote du rumen. La population de *Ruminococcus flavefaciens* et les protozoaires ruminiaux semblent être plus sensibles aux tanins des espèces d'*Acacia* que les autres populations microbiennes étudiées, le seuil d'inhibition de *R. flavefaciens* est à partir de 60% d'*Acacia* dans le mélange. En outre, les tanins condensés ont des activités antiméthanogènes mais sans effets directs sur l'abondance relative de la population des *Archeae* méthanogènes. Dans ce contexte, la réduction des émissions de méthane ne peut être attribuée qu'aux changements induits dans le microbiote ruminal et au niveau de disponibilité de l'Hydrogène.

Cette étude a également montré une activité antimicrobienne des oxalates contenus dans les raquettes de cactus inerme mais cette activité est plus subtile que celle des tanins. Ces constats n'ont jamais été rapportés antérieurement. Par conséquent, ce mécanisme a besoin de davantage d'investigations quant au mode d'action de ces facteurs antinutritionnels et à une évaluation particulière au niveau du potentiel catalytique de *Oxalobacter formigenes*, bactérie capable de dégrader les oxalates.

Enfin, il semble important de conduire un complément d'études *in vivo*, d'explorer les caractéristiques agronomiques (production de biomasse végétale, phénomènes d'acidose, effet saisonnier sur la valeur nutritive) et zootechnique de ces arbustes fourragers (croissance animale, palatabilité, qualité de la viande et des produits laitiers, taux d'ingestion). D'un point de vue méthodologique, l'approche de biologie moléculaire nous a permis d'avoir un regard global et rapide sur les principales communautés microbiennes ruminales. Toutefois, une étude plus approfondie des fonctions des micro-organismes du rumen par des approches globales de métabolomique et de protéomique seraient intéressantes pour connaître la mise en place des voies fonctionnelles du rumen (voies métaboliques et/ou protéiques). Ces techniques permettraient aussi de comprendre davantage la dynamique et les fonctions des

microorganismes du rumen, par l'étude de l'ARNm ou des protéines d'intérêt fonctionnel dans l'écosystème ruminal, sans avoir recours à des mesures *in vitro*. D'autre part, étudier le microbiote par qPCR avec des amorces spécifiques de fonctions permettrait de donner une idée novatrice et précise de la composition de cet écosystème vital pour les ruminants et la production animale. Cela pourrait permettre de faire le lien entre la taxonomie et les fonctions des communautés qui composent le microbiote ruminal mais il reste à développer ces amorces spécifiques. Ainsi, ces approches globales du microbiome ruminal permettraient de pouvoir mettre en relation directement la composition taxonomique du microbiote à son activité métabolique, en précisant aussi son impact et sa relation à son hôte.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abdalla, M., Babiker, I., Al-Abraham, J., Mohammed, A., Elobeid, M., Elkhalfifa, K., 2014. Fodder potential and chemical composition of acacia nilotica fruits for livestock in the dry lands of sudan . *Int. J. Plant Anim. Environ. Sci.* 4, 2231–4490.
- Abdulrazak, S.A., Fujihara, T., Ondiek, J.K., Ørskov, E.R., 2000. Nutritive evaluation of some Acacia tree leaves from Kenya. *Anim. Feed Sci. Technol.* 85, 89–98.
- Abidi, S., Ben Salem, H., 2010. Etude comparative de l'ingestion et de la digestion chez des caprins recevant des raquettes de cactus épineux et de cactus inerme Comparative study of intake and digestion in goats fed spiny and spineless cactus pads. *Renc Rech Rumin.* 19, 219.
- Abidi, S., Ben Salem, H., Martín-García, A.I., Molina-Alcaide, E., 2009a. Ruminant fermentation of spiny (*Opuntia amyclae*) and spineless (*Opuntia ficus indica* f. *inermis*) cactus cladodes and diets including cactus. *Anim. Feed Sci. Technol.* 149, 333–340.
- Abidi, S., Ben Salem, H., Vasta, V., Priolo, A., 2009b. Supplementation with barley or spineless cactus (*Opuntia ficus indica* f. *inermis*) cladodes on digestion, growth and intramuscular fatty acid composition in sheep and goats receiving oaten hay. *Small Rumin. Res.* 87, 9–16.
- Adem, Ferrah, 2002. Les ressources fourragères en Algérie : Déficit structurelle et disparité régionale. Analyse du bilan fourrager pour l'année 2001.
- Aerts, R.J., Barry, T.N., McNabb, W.C., 1999. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agric. Ecosyst. Environ.* 75, 1–12.
- Aganga, A.A., Tshwenyane, S.O., 2003. Feeding values and anti-nutritive factors of forage tree legumes. *Pak. J. Nutr.* 2, 170–177.
- Aganga, A., Tsopito, C., Adogla-Bessa, T., 1998. Feed potential of Acacia species to ruminants in Botswana. *Arch Zootec* 47, 659–668.
- Agarwal, N., Kamra, D.N., Chatterjee, P.N., Kumar, R., Chaudhary, L.C., 2008. In vitro methanogenesis, microbial profile and fermentation of green forages with buffalo rumen liquor as influenced by 2-bromoethanesulphonic acid. *ASIAN Australas. J. Anim. Sci.* 21, 818.
- Agarwal, N., Saxena, J., Saha, S., Chaudhary, L.C., Kamra, D.N., 2004. Changes in fermentation characteristics, microbial populations and enzyme profile in the rumen of buffalo as affected by roughage level in the diet. *Bubalus Bubalis* 3, 81–90.
- Ahmed, M.M.M., El-Hag, F.M., 2004. Degradation characteristics of some Sudanese forages and tree pods using in sacco and gas production techniques. *Small Rumin. Res.* 54, 147–156.
- Alam, M.R., Amin, M.R., Kabir, A., Moniruzzaman, M., McNeill, D.M., 2007. Effect of Tannins in *Acacia nilotica*, *Albizia procera* and *Sesbania acculeata* Foliage Determined In vitro, In sacco, and In vivo. *ASIAN Australas. J. Anim. Sci.* 20, 220.
- Allam, A.M., Bakhashwain, A.A., Nagadi, S.A., Sallam, S.M., 2012. Nutritive value assessment of some sub-tropical browses grown in arid region using in vitro gas production technique. *J. Food Agric. Environ.* 10, 1339–1343.
- Allison, M.J., Cook, H.M., Dawson, K.A., 1981. Selection of oxalate-degrading rumen bacteria in continuous cultures. *J. Anim. Sci.* 53, 810–816.
- Allison, M.J., Dawson, K.A., Mayberry, W.R., Foss, J.G., 1985. *Oxalobacter formigenes* gen. nov., sp. nov.: oxalate-degrading anaerobes that inhabit the gastrointestinal tract. *Arch. Microbiol.* 141, 1–7.
- Al-Soqeer, A.A., 2008. Nutritive value assessment of Acacia species using their chemical analyses and in vitro gas production technique. *Res J Agric Biol Sci* 4, 688–694.

- Ammar, H., López, S., González, J.S., Ranilla, M.J., 2004. Comparison between analytical methods and biological assays for the assessment of tannin-related antinutritive effects in some Spanish browse species. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1349–1356.
- Ammar, H., López, S., Kammoun, M., Bodas, R., Giráldez, F.J., González, J.S., 2009. Feeding quebracho tannins to sheep enhances rumen fermentative activity to degrade browse shrubs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 149, 1–15.
- An, D., Dong, X., Dong, Z., 2005. Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses. *Anaerobe* 11, 207–215.
- Andersen, J.B., Sehested, J., Ingvarsen, K.L., 1999. Effect of dry cow feeding strategy on rumen pH, concentration of volatile fatty acids and rumen epithelium development. *Acta Agric. Scand. Sect. -Anim. Sci.* 49, 149–155.
- Andrade-Montemayor, H.M., Cordova-Torres, A.V., García-Gasca, T., Kawas, J.R., 2011. Alternative foods for small ruminants in semiarid zones, the case of Mesquite (*Prosopis laevigata* spp.) and Nopal (*Opuntia* spp.). *Small Rumin. Res.* 98, 83–92.
- Andrade, P.V.D., Giger-Reverdin, S., Sauvant, D., 2002. Relation entre deux paramètres (pH et potentiel redox) caractérisant l'état du rumen. Effet de la nature de la ration. *Renc Rech Rum* 9, 332.
- Andueza, D., Delgado, I., Muñoz, F., 2012. Relationships of digestibility and intake by sheep of whole-crop cereal hays with different chemical, biological and physical methods. *Small Rumin. Res.* 108, 73–76.
- Animut, G., Puchala, R., Goetsch, A.L., Patra, A.K., Sahlou, T., Varel, V.H., Wells, J., 2008. Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. *Anim. Feed Sci. Technol.* 144, 212–227.
- AOAC, 2000. Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis. 17th ed. Washington, DC., USA.
- AOAC, 1990. Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 15th ed. Arlington, VA. ed. USA.
- Araba, A., El Aich, A., Sarti, B., 2000. BTTA numéro 68: Valorisation du figier de barbarie en élevage, in: Bulletin Mensuel D'information et de Liaison Du PNTTA. BELBAHRI, L; BOUBKRAOUI, A et AIT HAMMOU, A, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Maroc.
- Arab, H., Haddi, M.L., Mehennaoui, S., 2009. Evaluation de la valeur nutritive par la composition chimique des principaux fourrages des zones aride et semi-aride en algerie. *Sci. Technol.* 30, 50–58.
- Archimede, 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. *J. Agric. Sci.* 133, 235–240.
- Aregawi, T., Melaku, S., Nigatu, L., 2008. Management and utilization of browse species as livestock feed in semi-arid district of North Ethiopia. *Livest. Res. Rural Dev.* 20, 86.
- Aregheore, E.M., 2000. Chemical composition and nutritive value of some tropical by-product feedstuffs for small ruminants—in vivo and in vitro digestibility. *Anim. Feed Sci. Technol.* 85, 99–109.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *Vet. Parasitol.* 99, 205–219.
- Aufrère, J., Demarquilly, C., 1989. Predicting organic matter digestibility of forage by two pepsin-cellulase methods, in: Proceedings of the 16th International Grassland Congress. Association Francaise pour la Production Feurragere Nice, pp. 877–878.

- Aufreere, J., Theodoridou, K., Baumont, R., 2012. Valeur alimentaire pour les ruminants des légumineuses contenant des tannins condensés en milieux tempérés. *Prod. Anim.* 25, 29.
- Avijit, D., Narayan, D., 2014. Exploring tanniferous tree leaves: potential applications in livestock production and health. *Univers. J. Pharm.* 03, 20–25.
- Azim, A., Ghazanfar, S., Latif, A., Nadeem, M.A., 2011. Nutritional Evaluation of Some Top Fodder Tree Leaves and Shrubs of District Chakwal, Pakistan in Relation to Ruminants Requirements. *Pak. J. Nutr.* 10, 54–59.
- Babayemi, O.J., Demeyer, D., Fievez, V., 2004. Nutritive value and qualitative assessment of secondary compounds in seeds of eight tropical browse, shrub and pulse legumes. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 69, 103–110.
- Bakhashwain, A.A., Sallam, S.M.A., Allam, A.M., 2010. Nutritive value assessment of some Saudi Arabian foliages by gas production technique in vitro. *Meteorol. Environ. Arid Land Agric. Sci.* 21.
- Bakshi, M.P.S., Wadhwa, M., 2007. Tree leaves as complete feed for goat bucks. *Small Rumin. Res.* 69, 74–78.
- Baldwin, R.L., Emery, R.S., 1960. The Oxidation-Reduction Potential of Rumen Contents. *J. Dairy Sci.* 43, 506–511.
- Balogun, R.O., Jones, R.J., Holmes, J.G., 1998. Digestibility of some tropical browse species varying in tannin content. *Anim. Feed Sci. Technol.* 76, 77–88.
- Bannink, A., Kogut, J., Dijkstra, J., France, J., Kebreab, E., Van Vuuren, A.M., Tamminga, S., 2006. Estimation of the stoichiometry of volatile fatty acid production in the rumen of lactating cows. *J. Theor. Biol.* 238, 36–51.
- Bapteste, E., Brochier, C., Boucher, Y., 2005. Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea Vanc. BC* 1, 353–363.
- Barman, K., Rai, S.N., 2008. In vitro Nutrient Digestibility, Gas Production and Tannin Metabolites of *Acacia nilotica* Pods in Goats. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 21, 59–65.
- Barry, T.N., McNabb, W.C., 1999. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *Br. J. Nutr.* 81, 263–272.
- Batista, A.M.V., Mustafa, A.F., Santos, G.R.A., De Carvalho, F.F.R., B Dubeux, J.C., Lira, M.A., Barbosa, S.B.P., 2003. Chemical composition and ruminal dry matter and crude protein degradability of spineless cactus. *J. Agron. Crop Sci.* 189, 123–126.
- Bauchop, T., 1979. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 148–158.
- Belachew, Z., Yisehak, K., Taye, T., Janssens, G.P.J., others, 2013. Chemical composition and in sacco ruminal degradation of tropical trees rich in condensed tannins. *Czech J. Anim. Sci.* 58, 176–192.
- Belanche, A., Fuente, G. de la, Moorby, J.M., Newbold, C.J., 2012. Bacterial protein degradation by different rumen protozoal groups. *J. Anim. Sci.* 90, 4495–4504.
- Belenguer, A., Ben Bati, M., Hervás, G., Toral, P.G., Yáñez-Ruiz, D.R., Frutos, P., 2013. Impact of oxalic acid on rumen function and bacterial community in sheep. *animal* 7, 940–947.
- Bell, A., El-Zik, K., Thaxton, P., 1992. Chemistry, biological significance, and genetic control of proanthocyanidins in cotton (*Gossypium* spp.), Hemingway R.W., Laks P.E. (Eds). *Plant polyphenols, synthesis, properties, significance.* ed. Plenum Press, London, UK.
- Bennick, A., 2002. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13, 184–196.

- Ben Salem, H., Abidi, S., Makkar, H.P.S., Nefzaoui, A., 2005. Wood ash treatment, a cost-effective way to deactivate tannins in *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage and to improve digestion by Barbarine sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 122, 93–108.
- Ben Salem, H., Nefzaoui, A., Abdouli, H., 1994. Palatability of shrubs and fodder trees measured on sheep and dromedaries: 1. Methodological approach. *Anim. Feed Sci. Technol.* 46, 143–153.
- Ben Salem, H., Nefzaoui, A., Ben Salem, L., 2002a. Supplementation of *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage-based diets with barley or shrubs from arid areas (*Opuntia ficus-indica* f. *inermis* and *Atriplex nummularia* L.) on growth and digestibility in lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 96, 15–30.
- Ben Salem, H., Nefzaoui, A., Ben Salem, L., 2002b. Supplementing spineless cactus (*Opuntia ficus-indica* f. *inermis*) based diets with urea-treated straw or oldman saltbush (*Atriplex nummularia*). Effects on intake, digestion and sheep growth. *J. Agric. Sci.* 138, 85–92.
- Ben Salem, H., Nefzaoui, A., Ben Salem, L., Tisserand, J.L., 1999. Intake, digestibility, urinary excretion of purine derivatives and growth by sheep given fresh, air-dried or polyethylene glycol-treated foliage of *Acacia cyanophylla* Lindl. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78, 297–311.
- Ben Salem, H., Norman, H.C., Nefzaoui, A., Mayberry, D.E., Pearce, K.L., Revell, D.K., 2010. Potential use of oldman saltbush (*Atriplex nummularia* Lindl.) in sheep and goat feeding. *Small Rumin. Res.* 91, 13–28.
- Bergström, R., 1992. Browse characteristics and impact of browsing on trees and shrubs in African savannas. *J. Veg. Sci.* 3, 315–324.
- Beuvink, J.M.W., Spoelstra, S.F., 1992. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms in vitro. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 505–509.
- Bhatta, R., Baruah, L., C S, P., 2015. Effects of graded levels of tannin-containing tropical tree leaves on in vitro rumen fermentation, total protozoa and methane production. *J. Appl. Microbiol.* 118, 557–564.
- Bhatta, R., Uyeno, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Yabumoto, Y., Nonaka, I., Enishi, O., Kurihara, M., 2009. Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *J. Dairy Sci.* 92, 5512–5522.
- Blümmel, M., Aiple, K.-P., Steingäß, H., Becker, K., 1999. A note on the stoichiometrical relationship of short chain fatty acid production and gas formation in vitro in feedstuffs of widely differing quality. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 81, 157–167.
- Blümmel, M., Becker, K., 1997. The degradability characteristics of fifty-four roughages and roughage neutral-detergent fibres as described by in vitro gas production and their relationship to voluntary feed intake. *Br. J. Nutr.* 77, 757–768.
- Blümmel, M., Orskov, E., 1993. Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 40, 109–119.
- Bobe, G., Young, J.W., Beitz, D.C., 2004. Invited Review: Pathology, Etiology, Prevention, and Treatment of Fatty Liver in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 87, 3105–3124.
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F.J., López, S., 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176, 78–93.
- Borreani, G., Peiretti, P., Tabacco, E., others, 2003. Evolution of yield and quality of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) in the spring growth cycle. *Agronomie* 23, 193–201.

- Bouazza, L., 2014. Etude de la valeur nutritive de légumineuses arbustives du genre *Acacia*. : Effets spécifiques de leurs hautes teneurs en tannins condensés sur la méthanogénèse ruminale d'ovins. Université Constantine 1, Constantine, Algérie.
- Bouazza, L., Bodas, R., Boufennara, S., Bousseboua, H., López, S., others, 2012. Nutritive evaluation of foliage from fodder trees and shrubs characteristic of Algerian arid and semi-arid areas. *J. Anim. Feed Sci.* 21, 521–536.
- Boulanouar, B., Chriyaa, A., Boutouba, A., Gintzburger, G., Bounejmate, M., Nefzaoui, A., others, 2000. Moroccan experience with fodder shrub research and development., in: *Fodder Shrub Development in Arid and Semi-Arid Zones. Volume 1. Proceedings of the Workshop on Native and Exotic Fodder Shrubs in Arid and Semi-Arid Zones, 27 October-2 November 1996, Hammamet, Tunisia. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA)*, pp. 134–152.
- Brown, V.E., Rymer, C., Agnew, R.E., Givens, D.I., 2002. Relationship between in vitro gas production profiles of forages and in vivo rumen fermentation patterns in beef steers fed those forages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 98, 13–24.
- Brugere, H., 1983. Biochimie du rumen: aspects physiologiques. *Bull. GTV-Group. Tech. Veterinaires Doss. Tech. Veterinaires*.
- Brulc, J.M., Antonopoulos, D.A., Miller, M.E.B., Wilson, M.K., Yannarell, A.C., Dinsdale, E.A., Edwards, R.E., Frank, E.D., Emerson, J.B., Wacklin, P., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Nelson, K.E., White, B.A., 2009. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1948–1953.
- Bruneton, J., 2009. *Pharmacognosie-Phytochimie, plantes médicinales*”, 4e éd, revue et augmentée, Tec & Doc-Éditions médicales internationales, Tec & Doc - Éditions médicales internationales. ed. Paris,France.
- Brunet, S., 2008. Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestif des ruminants. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- Bryant, M.P., Burkey, L.A., 1953. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *J. Dairy Sci.* 36, 205–217.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Cardozo, P.W., Kamel, C., 2005. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *J. Dairy Sci.* 88, 2508–2516.
- Butler, L.G., 1992. Antinutritional effects of condensed and hydrolyzable tannins. *Basic Life Sci.* 59, 693–698.
- Cabrita, A.R.J., Dewhurst, R.J., Abreu, J.M.F., Fonseca, A.J.M., 2006. Evaluation of the effects of synchronising the availability of N and energy on rumen function and production responses of dairy cows—a review. *Anim. Res.* 55, 1–24.
- Cai, S., Li, J., Hu, F.Z., Zhang, K., Luo, Y., Janto, B., Boissy, R., Ehrlich, G., Dong, X., 2010. *Cellulosilyticum ruminicola*, a Newly Described Rumen Bacterium That Possesses Redundant Fibrolytic-Protein-Encoding Genes and Degrades Lignocellulose with Multiple Carbohydrate- Borne Fibrolytic Enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3818–3824.
- Callaway, T.R., Dowd, S.E., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Krueger, N., Bauer, N., Kononoff, P.J., Nisbet, D.J., 2010. Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed different levels of dried distillers grains plus solubles using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. *J. Anim. Sci.* 88, 3977–3983.

- Camacho, L.M., Rojo, R., Salem, A.Z.M., Mendoza, G.D., Lopez, D., Tinoco, J.L., Albarran, B., Montanez-Valdez, O.D., 2010. In vitro ruminal fermentation kinetics and energy utilization of three Mexican tree fodder species during the rainy and dry period. *Anim. Feed Sci. Technol.* 160, 110–120.
- Cappelozza, B., 2013. Protein Nutrition for Cattle, in: *Beef Cattle Library*. Beef Cattle Library, Oregon State University, pp. 1–4.
- Carafoli, E., 2007. The unusual history and unique properties of the calcium signal. *New Compr. Biochem.* 41, 3–22.
- Carberry, C.A., Kenny, D.A., Kelly, A.K., Waters, S.M., 2014. Quantitative analysis of ruminal methanogenic microbial populations in beef cattle divergent in phenotypic residual feed intake (RFI) offered contrasting diets. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 5, 41.
- Cárdenas, A., Higuera-Ciapara, I., Goycoolea, F.M., 1997. Rheology and aggregation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) mucilage in solution. *J. Prof. Assoc. Cactus Dev.* 2, 152–159.
- Cardinale, B.J., Palmer, M.A., Collins, S.L., 2002. Species diversity enhances ecosystem functioning through interspecific facilitation. *Nature.* 415, 426–429.
- Carter, J., 1994. *Acacia nilotica*: a tree legume out of control, in: *Forage Tree Legumes in Tropical Agriculture*. Cab International Wallingford, pp. 338–351.
- Carulla, J.E., Kreuzer, M., Machmüller, A., Hess, H.D., 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Crop Pasture Sci.* 56, 961–970.
- Case, R.J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W.F., Kjelleberg, S., 2007. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 278–288.
- Castro-Montoya, J.M., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2011. Chemical composition of rumen microbial fraction and fermentation parameters as affected by tannins and saponins using an in vitro rumen fermentation system. *Can. J. Anim. Sci.* 91, 433–448.
- Caygill, J.C., Mueller-Harvey, I., others, 1999. *Secondary plant products. Antinutritional and beneficial actions in animal feeding*. Nottingham University Press.
- Cerrillo, M.A., Juarez, R.A.S., 2004. In vitro gas production parameters in cacti and tree species commonly consumed by grazing goats in a semiarid region of North Mexico. *Livest. Res. Rural Dev.* 16, 1–7.
- Chaban, B., Hill, J.E., 2011. A “universal” type II chaperonin PCR detection system for the investigation of Archaea in complex microbial communities. *ISME J.* 6, 430–439.
- ChaichiSemsari, M., MaheriSis, N., Sadaghian, M., Eshratkhab, B., Hassanpour, S., 2011. Effects of administration of industrial tannins on nutrient excretion parameters during naturally acquired mixed nematode infections in Moghani sheep. *J. Am. Sci.* 7.
- Chambon, F., 2011. *Transformation de la cellulose par catalyse hétérogène*. Université Claude Bernard-Lyon I.
- Chaucheyras-Durand, F., Ossa, F., 2014. Review: The rumen microbiome: Composition, abundance, diversity, and new investigative tools. *Prof. Anim. Sci.* 30, 1–12.
- Cheeke, P.R., 1995. Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock. *J. Anim. Sci.* 73, 909–918.
- Cheema, U.B., Sultan, J.I., Javaid, A., Akhtar, P., Shahid, M., 2011. Chemical composition, mineral profile and in situ digestion kinetics of fodder leaves of four native trees. *Pak J Bot* 43, 397–404.
- Chen, M., Wolin, M.J., 1979. Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 72–77.
- Chesson, A., Stewart, C.S., Wallace, R.J., 1982. Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 597–603.

- Chiquette, J., Cheng, K.-J., Costerton, J.W., Milligan, L.P., 1988. Effect of tannins on the digestibility of two isosynthetic strains of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) using in vitro and in sacco techniques. *Can. J. Anim. Sci.* 68, 751–760.
- Cho, S.J., Cho, K.M., Shin, E.C., Lim, W.J., Hong, S.Y., Byoung, R.C., Jung, M.K., Sun, M.L., Yong, H.K., Kim, H., others, 2006. 16S rDNA analysis of bacterial diversity in three fractions of cow rumen. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 92–101.
- Chouinard, Y., 2000. production et Émission du méthane et du gaz carbonique par les ruminants - Recherche Google, in: 65e Congrès de L'ordre Des Agronomes Du Québec. Presented at the Changement climatiques: comprendre pour mieux agir!, Canada, p. 10.
- Church, D.C., 1975. Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants. Vol. 1: Digestive Physiology: 2nd Ed. O. et B. Books, Corvallis, Oregon (USA). ed.
- Cieslak, A., Zmora, P., Pers-Kamczyc, E., Szumacher-Strabel, M., 2012. Effects of tannins source (*Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation in vivo. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176, 102–106.
- CIHEAM, 2010. Atlas MédiTerra : Agriculture, alimentation, pêche & mondes ruraux en Méditerranée, Presses de la Fondation nationale des Sciences Po. ed. Paris, France.
- Clapham, D.E., 2007. Calcium signaling. *Cell* 131, 1047–1058.
- Clauss, M., Lason, K., Gehrke, J., Lechner-Doll, M., Fickel, J., Grune, T., Jürgen Streich, W., 2003. Captive roe deer *Capreolus capreolus* select for low amounts of tannic acid but not quebracho: fluctuation of preferences and potential benefits. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 136, 369–382.
- Coen, J.A., Dehority, B.A., 1970. Degradation and utilization of hemicellulose from intact forages by pure cultures of rumen bacteria. *Appl. Microbiol.* 20, 362–368.
- Coleman, G.S., 1983. Hydrolysis of fraction 1 leaf protein and casein by rumen entodiniomorphid protozoa. *J. Appl. Bacteriol.* 55, 111–118.
- Collingborn, F.M., Gowen, S.R., Mueller-Harvey, I., 2000. Investigations into the Biochemical Basis for Nematode Resistance in Roots of Three *Musa* Cultivars in Response to *Radopholus similis* Infection. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5297–5301.
- Contreras-Padilla, M., Pérez-Torrero, E., Hernández-Urbiola, M.I., Hernández-Quevedo, G., del Real, A., Rivera-Muñoz, E.M., Rodríguez-García, M.E., 2011. Evaluation of oxalates and calcium in nopal pads (*Opuntia ficus-indica* var. *redonda*) at different maturity stages. *J. Food Compos. Anal.* 24, 38–43.
- Cordova-Torres, A., Gutierrez-Berroeta, L., Kawas, J., García-Gasca, T., Aguilera-Barreiro, A., Malda, G., Andrade-Montemayor, H., 2009. El Nopal (*Opuntia ficus indica*) puede ser una alternativa de suplementación para caprinos en regiones semiáridas: Efecto del tamaño o madurez de la penca en la digestibilidad in vivo y composición. Presented at the VI Congreso Latinoamericano de la Asociación de especialistas en pequeños rumiantes y camelidos sudamericanos. XXIV Reunión de la AMPCA, Querétaro, México, pp. 143–151.
- Costa, R.G., Treviño, I.H., de Medeiros, G.R., Medeiros, A.N., Pinto, T.F., de Oliveira, R.L., 2012. Effects of replacing corn with cactus pear (*Opuntia ficus indica* Mill) on the performance of Santa Inês lambs. *Small Rumin. Res.* 102, 13–17.
- Cuvelier, C., Cabaraux, J.-F., Dufrasne, I., Istasse, L., Hornick, J.-L., 2005. Production, digestion et absorption des acides gras chez le ruminant, in: *Annales de Médecine Vétérinaire. Annales Medecine Veterinaire.*
- Czerkawski, J.W., 1986. An introduction to rumen studies, Pergamon Press. Oxford. UK. ed. Elsevier.
- Czerkawski, J.W., others, 1986. An introduction to rumen studies. Pergamon Press Ltd.

- Dawson, K.A., Allison, M.J., Hartman, P.A., 1980. Characteristics of anaerobic oxalate-degrading enrichment cultures from the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 840–846.
- Dawson, K., Alison, M., 1988. Digestive disorders and nutritional toxicity., in: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Elsevier Science Publisher, New York, pp. 445–459. 527 p.
- De Andrade Ferreira, M., Bispo, S.V., Rocha Filho, R.R., Urbano, S.A., Costa, C.T.F., 2012. The Use of Cactus as Forage for Dairy Cows in Semi-Arid Regions of Brazil. *Org. FARMING FOOD Prod.* 169.
- Decandia, M., Sitzia, M., Cabiddu, A., Kababya, D., Molle, G., 2000. The use of polyethylene glycol to reduce the anti-nutritional effects of tannins in goats fed woody species. *Small Rumin. Res.* 38, 157–164.
- Degen, A.A., Blanke, A., Becker, K., Kam, M., Benjamin, R.W., Makkar, H.P.S., 1997. The nutritive value of *Acacia saligna* and *Acacia salicina* for goats and sheep. *Anim. Sci.* 64, 253–259.
- Dehority, B.A., 2003. *Rumen microbiology*. Nottingham University Press Nottingham.
- Dehority, B.A., Tirabasso, P.A., 2000. Antibiosis between ruminal bacteria and ruminal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2921–2927.
- Del Pino, M.C.Á., Hervás, G., Mantecón, Á.R., Giráldez, F.J., Frutos, P., 2005. Comparison of biological and chemical methods, and internal and external standards, for assaying tannins in Spanish shrub species. *J. Sci. Food Agric.* 85, 583–590.
- Demeyer, D., Fievez, V., 2000. Ruminants et environnement: la méthanogenèse. *Ann Zootech* 49, 95–112.
- Demeyer, D., Fievez, V., 2000. Ruminants et environnement: la méthanogenèse. *Ann Zootech* 49, 95–112.
- Denman, S.E., McSweeney, C.S., 2006a. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58, 572–582.
- Denman, S.E., McSweeney, C.S., 2006b. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58, 572–582.
- Denman, S.E., Tomkins, N.W., McSweeney, C.S., 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 313–322.
- DePeters, E.J., Fadel, J.G., Arana, M.J., Ohanesian, N., Etchebarne, M.A., Hamilton, C.A., Hinders, R.G., Maloney, M.D., Old, C.A., Riordan, T.J., others, 2000. Variability in the chemical composition of seventeen selected by-product feedstuffs used by the California dairy industry. *Prof. Anim. Sci.* 16, 69–99.
- Dijkstra, J., Boer, H., Van Bruchem, J., Bruining, M., Tamminga, S., 1993. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. *Br. J. Nutr.* 69, 385–396.
- D’Mello, J.F., Devendra, C., 1995. *Tropical legumes in animal nutrition*. CAB International.
- Domínguez, D.C., Lopes, R., Holland, I.B., Campbell, A.K., 2011. Proteome Analysis of *B. subtilis* in Response to Calcium. *J Anal Bioanal Tech.* S 6, 2.
- Doreau, M., Ferlay, A., 1995. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a review. *Livest. Prod. Sci.* 43, 97–110.
- Doreau, M., Ferlay, A., 1994. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 45, 379–396.
- Dragomir, C., Sauvants, D., Peyraud, J.-L., Giger-Reverdin, S., Michalet-Doreau, B., 2008. Meta-analysis of 0 to 8 h post-prandial evolution of ruminal pH.

- Dupchak, K., 2005. Non-Fibre Carbohydrates in Dairy Diets. University of Crescent. University of Crescent.
- Durand, M., Komisarczuk, S., 1988. Influence of major minerals on rumen microbiota. *J. Nutr.* 118, 249–260.
- Edwards, A., Mlambo, V., Lallo, C.H.O., Garcia, G.W., Diptee, M.D., 2012. In vitro ruminal fermentation of leaves from three tree forages in response to incremental levels of polyethylene glycol. *Open J. Anim. Sci.* 2, 142.
- Edwards, J.E., Huws, S.A., Kim, E.J., Lee, M.R.F., Kingston-Smith, A.H., Scollan, N.D., 2008. Advances in microbial ecosystem concepts and their consequences for ruminant agriculture. *Animal* 2, 653–660.
- Edwards, J.E., McEwan, N.R., McKain, N., Walker, N., Wallace, R.J., 2005. Influence of flavomycin on ruminal fermentation and microbial populations in sheep. *Microbiol. Read. Engl.* 151, 717–725.
- Einkamerer, O.B., 2008. Animal Performance and Utilization of Opuntia-based Diets by Sheep. University of the Free State.
- El Mourid, M., Malki, M., Sbeita, A., Chiriyaa, A., Nefzaoui, A., Shideed, K., Awawedha, F., Hassan, S.H., Sweidan, Y., 2001. Crop livestock integration: alternatives to stop desertification in arid regions of WANA, in: Expert Meeting: Scientific Research and Its Role in Combating Desertification and Stabilizing Sand Dunes. Taghit, Algeria, November. pp. 4–6.
- El Shaer, H.M., 2010. Halophytes and salt-tolerant plants as potential forage for ruminants in the Near East region. *Small Rumin. Res.* 91, 3–12.
- El-Waziry, A.M., 2007. Nutritive value assessment of ensiling or mixing Acacia and Atriplex using in vitro gas production technique. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 3, 605–614.
- Eugène, M., 2002. Effets de la défaunation de ruminants sur les performances de production, en fonction de la ration ingérée. Etude des variations de la protéosynthèse et de la cellulolyse microbienne ruminale. INAPG (AgroParisTech), France.
- Eugène, M., Archimede, H., Sauvart, D., 2004. Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. *Livest. Prod. Sci.* 85, 81–97.
- Evitayani, L.W., Fariani, A., Ichinohe, T., Abdulrazak, S.A., Fujihara, T., 2004. Comparative rumen degradability of some legumes forages between wet and dry seasons in West Sumatra, Indonesia. *Asian-Aust J Anim Sci* 17, 1107–1111.
- FAO, 1992. Foresterie en zones arides - Guide à l'intention des techniciens de terrain, Div. des Ressources Forestières. ed. FAO, Rome, Italy.
- FAO/FIDA, 1993. Projet de développement des monts de beni-Chougrane: étude de diagnostic des systèmes de production, F.A.O. ed. Rome, Italy.
- Felkener, P., 2001. Cactus (*Opuntia* spp.) as forage: FAO Plant Production and protection Paper, Mondragon, C. and Gonzalez, S. ed.
- Fernando, S.C., Purvis, H.T., Najjar, F.Z., Sukharnikov, L.O., Krehbiel, C.R., Nagaraja, T.G., Roe, B.A., DeSilva, U., 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7482–7490.
- Ferrer, M., Golyshina, O.V., Chernikova, T.N., Khachane, A.N., Reyes-Duarte, D., Santos, V.A.P.M.D., Strompl, C., Elborough, K., Jarvis, G., Neef, A., Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Golyshin, P.N., 2005. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environ. Microbiol.* 7, 1996–2010.
- Flint, H.J., Bayer, E.A., Rincon, M.T., Lamed, R., White, B.A., 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 121–131.
- Fonty, G., Chaucheyras-Durand, F., 2007. Les écosystèmes digestifs. Lavoisier.

- Fonty, G., Jouany, J.P., Forano, E., Gouet, P., 1995. L'écosystème microbien du réticulo-rumen. *Nutr. Rumin. Domest.* INRA Paris Fr. 299–347.
- Fournier, A., Ruel, D., 2002. Les plantes toxiques, un danger potentiel pour votre bétail. Réseau Agri MAPAQ Dir. Régional Cent-Qué. 1–11.
- Frutos, P., Hervás, G., García, F.G., Mantecón, A.R., 2004. Review. Tannins and ruminant nutrition. *Span. J. Agric. Res.* 2, 191–202.
- Frutos, P., Hervás, G., Ramos, G., Giráldez, F.J., Mantecón, 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.
- Gagen, E.J., Denman, S.E., Padmanabha, J., Zadbuke, S., Al Jassim, R., Morrison, M., McSweeney, C.S., 2010. Functional gene analysis suggests different acetogen populations in the bovine rumen and tammar wallaby forestomach. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7785–7795.
- García-González, R., López, S., Fernández, M., Bodas, R., González, J.S., 2008. Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147, 36–52.
- Gasmi-Boubaker, A., Kayouli, C., Buldgen, A., 2005. In vitro gas production and its relationship to in situ disappearance and chemical composition of some Mediterranean browse species. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123, 303–311.
- Gebremariam, T., Melaku, S., Yami, A., 2006. Effect of different levels of cactus (*Opuntia ficus-indica*) inclusion on feed intake, digestibility and body weight gain in tef (*Eragrostis tef*) straw-based feeding of sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131, 43–52.
- Getachew, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2002. Tropical browses: contents of phenolic compounds, in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. *J. Agric. Sci.* 139, 341–352.
- Getachew, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2000. Effect of polyethylene glycol on in vitro degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. *Br. J. Nutr.* 84, 73–83.
- 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., Gisi, D.D., Higginbotham, G.E., Riordan, T.J., 2005. Methane production from commercial dairy rations estimated using an in vitro gas technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123, 391–402.
- Ghali, M.B., Scott, P.T., Al Jassim, R.A.M., 2004. Characterization of *Streptococcus bovis* from the rumen of the dromedary camel and Rusa deer. *Lett. Appl. Microbiol.* 39, 341–346.
- Ghasemi, S., Naserian, A.A., Valizadeh, R., Tahmasebi, A.M., Vakili, A.R., Behgar, M., Ghovvati, S., 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. *Small Rumin. Res.* 104, 94–98.
- 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.
- Gill, M., Smith, P., Wilkinson, J.M., 2010. Mitigating climate change: the role of domestic livestock. *animal* 4, 323–333.

- Glenn, B., 1989. Ruminal fermentation of neutral detergent fibre and nitrogen in legume, grass and mixtures by growing steers. *Teaming Anim. Agric. Am. Dairy Sci. Assoc. Am. Soc. Anim. Sci. J. Anim. Sci. Suppl.* 2, 11.
- Goad, D.W., Goad, C.L., Nagaraja, T.G., 1998. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *J. Anim. Sci.* 76, 234–241.
- Goel, G., Makkar, H.P., 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 729–739.
- Gomes, H. de S., 1990. Phenolic profile of shrub live oak and its relation to goat diets in central Arizona. *AbstrInternational-B SciEng* 51, 1071.
- Gorshkova, T.A., Salnikov, V.V., Pogodina, N.M., Chemikosova, S.B., Yablokova, E.V., Ulanov, A.V., Ageeva, M.V., Van Dam, J.E.G., Lozovaya, V.V., 2000. Composition and distribution of cell wall phenolic compounds in flax (*Linum usitatissimum* L.) stem tissues. *Ann. Bot.* 85, 477–486.
- GOUET, P., Grain, J., DUBOURGUIER, H., Albagnac, G., others, 1986. Interactions entre espèces microbiennes anaérobies dans le rumen. *Reprod Nutr Dévelop* 26, 147–159.
- Grainger, C., Clarke, T., Auldist, M.J., Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Waghorn, G.C., Eckard, R.J., 2009. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 89, 241–251.
- Grenet, E., Besle, J., 1991. Microbes and fibre degradation, in: *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*. Editions Quae, pp. 107–129.
- Griffiths, D.W., 1986. The inhibition of digestive enzymes by polyphenolic compounds, in: *Nutritional and Toxicological Significance of Enzyme Inhibitors in Foods*. Plenum press, N.Y, pp. 509–516.
- Groot, J.C., Williams, B.A., Oostdam, A.J., Boer, H., Tamminga, S., 1998. The use of cumulative gas and volatile fatty acid production to predict in vitro fermentation kinetics of Italian ryegrass leaf cell walls and contents at various time intervals. *Br. J. Nutr.* 79, 519–525.
- Gruninger, R.J., Sensen, C.W., McAllister, T.A., Forster, R.J., 2014. Diversity of Rumen Bacteria in Canadian Cervids. *PLoS ONE* 9, e89682. doi:10.1371/journal.pone.0089682
- Guimarães-Beelen, P.M., Berchielli, T.T., Beelen, R., Medeiros, A.N., 2006. Influence of condensed tannins from Brazilian semi-arid legumes on ruminal degradability, microbial colonization and ruminal enzymatic activity in Saanen goats. *Small Rumin. Res.* 61, 35–44.
- Guragain, M., Lenaburg, D.L., Moore, F.S., Reutlinger, I., Patrauchan, M.A., 2013. Calcium homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa* requires multiple transporters and modulates swarming motility. *Cell Calcium* 54, 350–361.
- Hagerman, A.E., 2002. *Tannin handbook*.
- Hagerman, A.E., 1987. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. *J. Chem. Ecol.* 13, 437–449.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G., 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 256, 4494–4497.
- Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504.
- Hariadi, B.T., Santoso, B., 2010. Evaluation of tropical plants containing tannin on in vitro methanogenesis and fermentation parameters using rumen fluid. *J. Sci. Food Agric.* 90, 456–461.

- Haslam, E., 2007. Vegetable tannins—Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry* 68, 2713–2721.
- Haslam, E., 1989. Plant polyphenols: vegetable tannins revisited. CUP Archive.
- Hassanpour, S., Sadaghian, M., MaheriSis, N., Eshratkhah, B., ChaichiSemsari, M., 2011. Effect of condensed tannin on controlling faecal protein excretion in nematode-infected sheep: in vivo study. *J. Am. Sci.* 7, 896–900.
- Hegarty, R.S., 1999. Mechanisms for competitively reducing ruminal methanogenesis. *Crop Pasture Sci.* 50, 1299–1306.
- Henderson, G., Naylor, G.E., Leahy, S.C., Janssen, P.H., 2010. Presence of novel, potentially homoacetogenic bacteria in the rumen as determined by analysis of formyltetrahydrofolate synthetase sequences from ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2058–2066.
- Hernandez-Sanabria, E., Guan, L.L., Goonewardene, L.A., Li, M., Mujibi, D.F., Stothard, P., Moore, S.S., Leon-Quintero, M.C., 2010. Correlation of Particular Bacterial PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Patterns with Bovine Ruminal Fermentation Parameters and Feed Efficiency Traits. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6338–6350.
- Hervás, G., Frutos, P., Javier Giráldez, F., Mantecón, Á.R., Álvarez Del Pino, M.C., 2003a. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 109, 65–78.
- Hervás, G., Perez, V., Giráldez, F.J., Mantecon, A.R., Almar, M.M., Frutos, P., 2003b. Intoxication of sheep with quebracho tannin extract. *J. Comp. Pathol.* 129, 44–54.
- Hess, H.D., Tiemann, T.T., Noto, F., Carulla, J.E., Kreuzer, M., 2006. Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock, in: *International Congress Series*. Elsevier, pp. 164–167.
- Higuera, C.S., 2012. Estructura de las comunidades microbianas ruminales de ovejas alimentadas con diferentes dietas. *Universidad de León*.
- Himmel, M.E., 2009. *Biomass recalcitrance: deconstructing the plant cell wall for bioenergy*. Wiley-Blackwell.
- Hook, S.E., Wright, A.-D.G., McBride, B.W., 2010. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea* 2010.
- Hoover, W.H., 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69, 2755–2766.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* 22, 253–261.
- Hristov, A.N., Ivan, M., Rode, L.M., McAllister, T.A., 2001. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium-or high-concentrate barley-based diets. *J. Anim. Sci.* 79, 515–524.
- Hristov, A.N., McAllister, T.A., Cheng, K.-J., 1999. Effect of diet, digesta processing, freezing and extraction procedure on some polysaccharide-degrading activities of ruminal contents. *Can. J. Anim. Sci.* 79, 73–81.
- Hungate, R.E., 1966. The rumen and its microbes. *Rumen Its Microbes*.
- Iason, G.R., Hartley, S.E., Duncan, A.J., 1993. Chemical composition of *Calluna vulgaris* (Ericaceae): Do responses to fertilizer vary with phenological stage? *Biochem. Syst. Ecol.* 21, 315–321.
- Jackson, F.S., Barry, T.N., Lascano, C., Palmer, B., 1996. The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree, shrub and forage legumes. *J. Sci. Food Agric.* 71, 103–110.
- James, L.F., 1972. Oxalate toxicosis. *Clin. Toxicol.* 5, 231–243.

- James, L.F., Butcher, J.E., 1972. Halogeton poisoning of sheep: effect of high level oxalate intake. *J. Anim. Sci.* 35, 1233–1238.
- James, L.F., Street, J.C., Butcher, J.E., 1967. In vitro degradation of oxalate and of cellulose by rumen ingesta from sheep fed Halogeton glomeratus. *J. Anim. Sci.* 26, 1438–1444.
- Jami, E., Mizrahi, I., 2012. Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. P
- Janssen, P.H., 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Anim. Feed Sci. Technol.* 160, 1–22.
- Janssen, P.H., Kirs, M., 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3619–3625.
- jaroslav, F., Dvořák, R., others, 2009. Determination of the volatile fatty acid content in the rumen liquid: comparison of gas chromatography and capillary isotachopheresis. *Acta Vet. Brno* 78, 627–633.
- Jarrige, R., 1995. Nutrition des ruminants domestiques: ingestion et digestion. Editions Quae.
- Jarrige, R., Grenet, E., Demarquilly, C., Besle, J., 1995. Les constituants de l'appareil végétatif des plantes fourragères, in: *Nutrition Des Ruminants Domestiques: Ingestion et Digestion*. INRA Editions, pp. 25–81.
- Jarvis, G.N., Strömpl, C., Burgess, D.M., Skillman, L.C., Moore, E.R., Joblin, K.N., 2000. Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. *Curr. Microbiol.* 40, 327–332.
- Jayanegara, A., Marquardt, S., Wina, E., Kreuzer, M., Leiber, F., 2013. In vitro indications for favourable non-additive effects on ruminal methane mitigation between high-phenolic and high-quality forages. *Br. J. Nutr.* 109, 615–622.
- Jean-Blain, C., 2002. Introduction on the nutrition of domestic animals. Editions Tec & Doc.
- Jean-Blain, C., 1998. Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Rev. Médecine Vét.* 149, 911–920.
- Jiao, J., Huang, J., Zhou, C., Tan, Z., 2015. Taxonomic identification of the ruminal epithelial bacterial diversity during rumen development in goats. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.00203-15
- Jin, W., Cheng, Y.F., Mao, S.Y., Zhu, W.Y., 2014. Discovery of a novel rumen methanogen in the anaerobic fungal culture and its distribution in the rumen as revealed by real-time PCR. *BMC Microbiol.* 14, 104.
- Johnson, K.A., Johnson, D.E., 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73, 2483–2492.
- Jolly, S., Wallace, A., 2007. best practice for production feeding of lambs: a review of the literature. meat and livestock australia limited. sydney, australia.
- Jouany, J.-P., 1996. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *J. Nutr.* 126, 1335S–46S.
- Jouany, J.-P., 1994a. Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *Inra Prod. Anim.* 7, 207–225.
- Jouany, J.-P., 1994b. Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *Inra Prod. Anim.* 7, 207–225.
- Jouany, J.P., 1982. Dosage des acides gras volatils et des alcools dans les contenus digestifs, les jus d'ensilage, les cultures bactériennes et les contenus de fermenteurs anaérobies. *Sci Aliments* 2, 131–144.
- Jouany, J.P., Ushida, K., 1999. The Role of Protozoa in Feed Digestion (A review). *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 12, 113–128.
- Julien, C., Marden, J.P., Bonnefont, C., Moncoulon, R., Auclair, E., Monteils, V., Bayourthe, C., 2010. Effects of varying proportions of concentrates on ruminal-reducing power

- and bacterial community structure in dry dairy cows fed hay-based diets. *animal* 4, 1641–1646.
- Jung, H.I., Deetz, D., 1993. Cell wall lignification and degradability, in: *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Jung H.G., Buxton D.R., Hatfield R.D. and Ralph J. (Eds.), Madison, Wisconsin, USA, pp. 315–346.
- Jun, H.S., Qi, M., Ha, J.K., Forsberg, C.W., 2007. *Fibrobacter succinogenes*, a dominant fibrolytic ruminal bacterium: transition to the post genomic era. *ASIAN Australas. J. Anim. Sci.* 20, 802.
- Juul, N., 1981. In vitro feed test for evaluation of energetic and productive. *Trop Anim Prod* 6, 287–299.
- Kaitho, R.J., Tegegne, A., Umunna, N.N., Nsahlai, I.V., Tamminga, S., Van Bruchem, J., Arts, J.M., 1998. Effect of *Leucaena* and *Sesbania* supplementation on body growth and scrotal circumference of Ethiopian highland sheep and goats fed teff straw basal diet. *Livest. Prod. Sci.* 54, 173–181.
- Kali, S., Benidir, M., Kaci, K.A., Belkheir, B., Benyoucef, M.T., 2011. Situation de la filière lait en Algérie: Approche analytique d’amont en aval. *Livest. Res. Rural Dev.* 23.
- Kamalak, A., Gurbuz, y, Finlayson, H., 2002. 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.
- Kamra, D.N., Agarwal, N., Chaudhary, L.C., 2006. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds, in: *International Congress Series*. Elsevier, pp. 156–163.
- Karnati, S.K.R., 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. Anim. Sci.* 81, 812–815.
- Kazi Tani, C., 2014. Les plantes dangereuses pour le bétail. Une première synthèse pour la flore d’Algérie. *Fourrages* 217, 105–114.
- Keir, B., Nguyen, V.L., Preston, T.R., Orskov, E.R., 1997. Nutritive value of leaves from tropical trees and shrubs: 1 In vitro gas production and in sacco rumen degradability. *Livest Res Rural Dev.* 9.
- Kemp, P., Lander, D.J., Orpin, C.G., 1984. The Lipids of the Rumen Fungus *Piromonas communis*. *J. Gen. Microbiol.* 130, 27–37. doi:10.1099/00221287-130-1-27
- Kenters, N., Henderson, G., Jeyanathan, J., Kittelmann, S., Janssen, P.H., 2011. Isolation of previously uncultured rumen bacteria by dilution to extinction using a new liquid culture medium. *J. Microbiol. Methods* 84, 52–60.
- Khafipour, E., Li, S., Plaizier, J.C., Krause, D.O., 2009. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7115–7124.
- Khamisabadi, H., Kafilzadeh, F., Taasoli, G., 2011. Evaluation of *Opuntia ficus-indica* cactus grown in western region of Iran as animal feed. *Euphrates J. Agric. Sci.* 3, 5–19.
- Khan, S., Anwar, K., Kalim, K., Saeed, A., Shah, S.Z., 2014. Nutritional Evaluation of Some Top Fodder Tree Leaves and Shrubs of District Dir (Lower), Pakistan as a quality livestock feed. *Int J Curr Microbiol App Sci* 3, 941–947.
- Khazaal, K., Boza, J., Ørskov, E.R., 1994. Assessment of phenolics-related antinutritive effects in Mediterranean browse: a comparison between the use of the in vitro gas production technique with or without insoluble polyvinylpyrrolidone or nylon bag. *Anim. Feed Sci. Technol.* 49, 133–149.
- 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, E.T., Guan, L.L., Lee, S.J., Lee, S.M., Lee, S.S., Lee, I.D., Lee, S.K., Lee, S.S., 2015. Effects of Flavonoid-rich Plant Extracts on In vitro Ruminal Methanogenesis, Microbial Populations and Fermentation Characteristics. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 28, 530–537.
- Kittelmann, S., Naylor, G.E., Koolaard, J.P., 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.
- Knight, A.P., Walter, R.G., 2001. A guide to plant poisoning of animals in North America. Teton NewMedia.
- Koike, S., Handa, Y., Goto, H., Sakai, K., Miyagawa, E., Matsui, H., Ito, S., Kobayashi, Y., 2010. Molecular monitoring and isolation of previously uncultured bacterial strains from the sheep rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1887–1894.
- Koike, S., Kobayashi, Y., others, 2009a. Fibrolytic rumen bacteria: their ecology and functions. *Asian-Aust J Anim Sci* 22, 131–138.
- Koike, S., Kobayashi, Y., others, 2009b. Fibrolytic rumen bacteria: their ecology and functions. *Asian-Aust J Anim Sci* 22, 131–138.
- Koike, S., Pan, J., Kobayashi, Y., Tanaka, K., 2003. Kinetics of in sacco fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *J. Dairy Sci.* 86, 1429–1435.
- 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.
- Krause, D.O., McSweeney, C.S., Forster, R.J., 1999. Molecular ecological methods to study fibrolytic ruminal bacteria: phylogeny, competition and persistence, in: *International symposium on microbial ecology*. pp. 15–19.
- Krebs, G.L., Howard, D.M., Dods, K., 2007. The effects of feeding *Acacia saligna* on feed intake, nitrogen balance and rumen metabolism in sheep. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 20, 1367.
- Lamy, E., Rawel, H., Schweigert, F.J., Capela e Silva, F., Ferreira, A., Costa, A.R., Antunes, C., Almeida, A.M., Coelho, A.V., Sales-Baptista, E., others, 2011. The effect of tannins on Mediterranean ruminant ingestive behavior: the role of the oral cavity. *Molecules* 16, 2766–2784.
- 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 humid tropics. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72, 81–96.
- Larue, R., Yu, Z., Parisi, V.A., Egan, A.R., Morrison, M., 2005. Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. *Environ. Microbiol.* 7, 530–543.
- Lee, S.S., Ha, J.K., Cheng, K.-J., 2000. Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to in vitro degradation of orchard grass cell walls and their interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3807–3813.

- Le Houerou, H., 1992. An overview of vegetation and land degradation in world arid lands, in: *Degradation and Restoration of Arid Lands*. International Center for Arid and Semi-Arid Land Studie. H.E. Dregne (Editor). s, USA, pp. 127–163.
- Le Houérou, H.N., 1980. Chemical composition and nutritive value of browse in tropical West Africa. *Browse Afr. Curr. State Knowl.* Houerou HN Ed ILCA Addis Ababa 261–289.
- Le Houérou, H.N., Gintzburger, G., Bounejmate, M., Nefzaoui, A., others, 2000. Use of fodder trees and shrubs (trubs) in the arid and semi-arid zones of West Asia and North Africa: history and perspectives., in: *Fodder Shrub Development in Arid and Semi-Arid Zones*. Volume 1. Proceedings of the Workshop on Native and Exotic Fodder Shrubs in Arid and Semi-Arid Zones, 27 October-2 November 1996, Hammamet, Tunisia. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), pp. 9–53.
- Less, G., Hinks, C., Suttill, N., 1994. Effect of high temperature on condensed tannin accumulation in leaf tissues of big trefoil (*Lotus uliginosus* Schkur). *J Sci Food Agric* 65, 415–421.
- Leto, G., Todaro, M., Di Noto, A.M., Alicata, M.L., 2002. Comparison of Sulla-hay and Sulla-silage in the lactating ewes and their effects on milk and cheese characteristics. *Small Rumin. Res.* 45, 301–306.
- Libert, B., Franceschi, V.R., 1987. Oxalate in crop plants. *J. Agric. Food Chem.* 35, 926–938.
- Lin, C., Stahl, D.A., 1995. Taxon-specific probes for the cellulolytic genus *Fibrobacter* reveal abundant and novel equine-associated populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1348–1351.
- Liu, H., Vaddella, V., Zhou, D., 2011. Effects of chestnut tannins and coconut oil on growth performance, methane emission, ruminal fermentation, and microbial populations in sheep. *J. Dairy Sci.* 94, 6069–6077.
- Liu, J., Bian, G., Zhu, W., Mao, S., 2015. High-grain feeding causes strong shifts in ruminal epithelial bacterial community and expression of Toll-like receptor genes in goats. *Front. Microbiol.* 6.
- Liu, J.X., Susenbeth, A., Südekum, K.H., 2002. In vitro gas production measurements to evaluate interactions between untreated and chemically treated rice straws, grass hay, and mulberry leaves. *J. Anim. Sci.* 80, 517–524.
- 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.
- Longo, C., Abdalla, A.L., Liebich, J., Janzik, I., Hummel, J., Correa, P.S., Südekum, K.H., Burauel, P., others, 2013. Evaluation of the effects of tropical tanniferous plants on rumen microbiota using qRT PCR and DGGE analysis. *Czech J. Anim. Sci.* 58, 106–116.
- Long, R.J., Apori, S.O., Castro, F.B., Ørskov, E.R., 1999. 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.
- López-García, J., Fuentez-Rodríguez, J., Rodríguez, R., 2001. production and use of opuntia as forage in northern mexico. in: *cactus (opuntia spp.) as forage*. Presented at the FAO Plant Production and Protection Paper 169. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Mondragón-Jacobo, C. & Pérez-González, S., Rome, Italy, pp. 29–36.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., others, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–275.
- Luque, A., Barry, T.N., McNabb, W.C., Kemp, P.D., McDonald, M.F., 2000. The effect of grazing *Lotus corniculatus* during late summer–autumn on reproductive efficiency and wool production in ewes. *Crop Pasture Sci.* 51, 385–392.
- Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J., Riley, P.W., 2002. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148, 3521–3530.
- Lwin, K.O., Hayakawa, M., Ban-Tokuda, T., Matsui, H., 2011. Real-time PCR assays for monitoring anaerobic fungal biomass and population size in the rumen. *Curr. Microbiol.* 62, 1147–1151.
- Maasdorp, B.V., Muchenje, V., Titterton, M., 1999. Palatability and effect on dairy cow milk yield of dried fodder from the forage trees *Acacia boliviana*, *Calliandra calothyrsus* and *Leucaena leucocephala*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 77, 49–59.
- 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.
- Mackie, R., White, B., Isaacson, R.E., 1997. *Gastrointestinal microbiology*. Springer.
- Madani, T., MOUFFOK, C., FRIQUI, M., 2004. Effet du niveau de concentré dans la ration sur la rentabilité de la production laitière en situation semi-aride algérienne. *Rencontres Rech. Rumin.* Paris 11, 244.
- MADR, (Ministère de l’Agriculture et du Développement rural), 2003. La stratégie décennale de développement agricole et rural (2004-2013). Des orientations, un plan d’action décennal, un appui institutionnel, Alger.
- Makkar, H.P., 2003. *Quantification of tannins in tree and shrub foliage: a laboratory manual*, Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. ed. Springer.
- Makkar, H.P., Blümmel, M., Borowy, N.K., Becker, K., 1993a. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.* 61, 161–165.
- Makkar, H.P., Blümmel, M., Borowy, N.K., Becker, K., 1993b. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.* 61, 161–165.
- Makkar, H.P.S., 2003. *Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage: A Laboratory Manual*. Springer Science & Business Media.
- Makkar, H.P.S., Singh, B., Dawra, R.K., 1988. Effect of tannin-rich leaves of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. *Br. J. Nutr.* 60, 287–296.
- Mangan, J.L., 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutr. Res. Rev.* 1, 209–231.
- Manolaraki, F., 2011. *Propriétés anthelminthiques du sainfoin (Onobrychis viciifoliae): Analyse des facteurs de variations et du rôle des composés phénoliques impliqués*. Université de Toulouse, France.
- Marden, J.P., Bayourthe, C., Enjalbert, F., Moncoulon, R., 2005. A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 88, 277–281.
- Marounek, M., Bartos, S., Kalachnyuk, G.I., 1981. Dynamics of the redox potential and rh of the rumen fluid of goats. *Physiol. Bohemoslov.* 31, 369–374.
- Martin, C., Brossard, L., Doreau, M., 2006. Mécanismes d’apparition de l’acidose ruminale latente et conséquences physiopathologiques et zootechniques. *INRA Prod Anim* 19, 93–108.

- Martin, C., Djouvinov, D., Kristensen, N.B., Huhtanen, P., 1999. Influence du niveau d'alimentation sur la vitesse de production des acides gras volatils dans le rumen. *Renc Rech Rum* 6, 109.
- 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 associated with rumen solid digesta. *Reprod. Nutr. Dev.* 41, 413–426.
- 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. *Gastrointestinal Microbiology in Animals*. Research Signpost, Trivandrum, India.
- Mathieu, F., Jouany, J.P., Sénaud, J., Bohatier, J., Bertin, G., 1996. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reprod Nutr Dev* 36, 271–287.
- Max, R.A., 2010. Effect of repeated wattle tannin drenches on worm burdens, faecal egg counts and egg hatchability during naturally acquired nematode infections in sheep and goats. *Vet. Parasitol.* 169, 138–143.
- Mayouf, R., Arbouche, F., 2014. Chemical composition and relative feed value of three Mediterranean fodder shrubs. *Afr. J. Agric. Res.* 9, 746–749.
- Mbatha, K.R., Downs, C.T., Nsahlai, I.V., 2002. The effects of graded levels of dietary tannin on the epithelial tissue of the gastro-intestinal tract and liver and kidney masses of Boer goats. *Anim. Sci.-Glasg.-* 74, 579–586.
- McAllister, T.A., Cheng, K.-J., 1996. Microbial strategies in the ruminal digestion of cereal grains. *Anim. Feed Sci. Technol., N. American Nutrition Conferences* 62, 29–36.
- McConn, M.M., Nakata, P.A., 2004. Oxalate reduces calcium availability in the pads of the prickly pear cactus through formation of calcium oxalate crystals. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1371–1374.
- McCowan, R.P., Cheng, K.J., Costerton, J.W., 1980. Adherent bacterial populations on the bovine rumen wall: distribution patterns of adherent bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 233–241.
- McDonald, J.E., Allison, H.E., McCarthy, A.J., 2010. Composition of the Landfill Microbial Community as Determined by Application of Domain- and Group-Specific 16S and 18S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1301–1306.
- Mc Donald, P., Greenhalgh, J.F., Edwards, R., Morgan, C., 1995. *Animal Nutrition*. 5th Eds., Longmanns, London.
- Mciteka, H., 2008. *Fermentation Characteristics and Nutritional Value of Opuntia Ficus-indica Var. Fuscicaulis Cladode Silage*. University of the Free State.
- McSweeney, C.S., Collins, E.M.C., Blackall, L.L., Seawright, A.A., 2008. A review of anti-nutritive factors limiting potential use of *Acacia angustissima* as a ruminant feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147, 158–171.
- McSweeney, C.S., Palmer, B., McNeill, D.M., Krause, D.O., 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91, 83–93.
- Meissner, H., Viljoen, M., Van Niekerk, W., 1991. intake and digestibility by sheep of anthephora, panicum, rhodes and smooth finger grass, in: *Proc. 4th International Rangeland Congress*. September 17th–21st. Montpellier, France.
- Mellenberger, R.W., Satter, L.D., Millett, M.A., Baker, A.J., 1970. An Technique for Estimating Digestibility of Treated and Untreated Wood. *J. Anim. Sci.* 30, 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.
- Mertens, D.R., 1997. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80, 1463–1481.
- Michalet-Doreau, B., Fernandez, I., Peyron, C., Millet, L., Fonty, G., others, 2001. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reprod. Nutr. Dev.* 41, 187.
- 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 determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428.
- Minato, H., Mitsumori, M., Cheng, K.J., 1993. Attachment of microorganisms to solid substrates in the rumen. *Genet. Biochem. Ecol. Lignocellul. Degrad.* Shimada K Ohmiya K Kobayashi Hoshino Sakka K Karita Eds 139–145.
- Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T., McNabb, W.C., 2003a. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 106, 3–19.
- Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T., McNabb, W.C., 2003b. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 106, 3–19.
- Min, B.R., Hart, S.P., 2003. Tannins for suppression of internal parasites. *J. Anim. Sci.* 81, E102–E109.
- Miron, J., Ben-Ghedalia, D., Morrison, M., 2001. Invited Review : Adhesion Mechanisms of Rumen Cellulolytic Bacteria. *J. Dairy Sci.* 84, 1294–1309.
- Misra, A.K., Mishra, A.S., Tripathi, M.K., Chaturvedi, O.H., Vaithiyanathan, S., Prasad, R., Jakhmola, R.C., 2006. Intake, digestion and microbial protein synthesis in sheep on hay supplemented with prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica*(L.) Mill) with or without groundnut meal. *Small Rumin. Res.* 63, 125–134.
- Mlambo, V., Mould, F.L., Smith, T., Owen, E., Sikosana, J.L.N., Mueller-Harvey, I., 2009. In vitro biological activity of tannins from Acacia and other tree fruits: Correlations with colorimetric and gravimetric phenolic assays. *South Afr. J. Anim. Sci.* 39, 131–143.
- Mohammadabadi, T., Chaji, M., Tabatabaei, S., 2010. The effect of tannic acid on in vitro gas production and rumen fermentation of sunflower meal. *J Anim Vet Adv* 9, 277–280.
- Mohammedi, H., Labani, A., Khéloufi, B., 2006. Essai sur le rôle d'une espèce végétale rustique pour un développement durable de la steppe algérienne. *Dév. Durable Territ.*
- Mole, S., Waterman, P.G., 1986. Tannic acid and proteolytic enzymes: Enzyme inhibition or substrate deprivation? *Phytochemistry* 26, 99–102.
- Monforte-Briceño, G.E., Sandoval-Castro, C.A., Ramírez-Avilés, L., Leal, C.M.C., 2005. Defaunating capacity of tropical fodder trees: Effects of polyethylene glycol and its relationship to in vitro gas production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123, 313–327.
- Moore, K.M., Barry, T.N., Cameron, P.N., Lopez-Villalobos, N., Cameron, D.J., 2003. Willow *Salix* sp. as a supplement for grazing cattle under drought conditions. *Anim. Feed Sci. Technol.* 104, 1–11.

- Morand-Fehr, P., Tran, G., 2001. La fraction lipidique des aliments et les corps gras utilisés en alimentation animale. *Prod. Anim.* 14, 285–302.
- Morgavi, D., Kelly, W., Janssen, P., Attwood, G.T., 2013. La (méta) génomique des microorganismes du rumen et ses applications à la production des ruminants. *INRA Prod Anim* 26, 347–362.
- Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C., Newbold, C.J., 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *animal* 4, 1024–1036.
- Mosoni, P., Martin, C., Forano, E., Morgavi, D.P., 2011. Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.* 89, 783–791.
- Mould, F.L., 2003. Predicting feed quality—chemical analysis and in vitro evaluation. *Field Crops Res.* 84, 31–44.
- Mueller-Harvey, I., 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 86, 2010–2037.
- Mueller Harvey, I., McAllan, A.B., 1992. Advances in plant cell biochemistry and biotechnology, in: *Tannins: Their Biochemistry and Nutritional Properties*. Morrison I. M., London, pp. 151–217.
- Mulas, M., Mulas, G., 2009. The strategic use of atriplex and opuntia to combat desertification., Bellavite D, Zucca C, Belkheiri O and Saidi H (eds) *Etudes techniques et scientifiques à l'appui de l'implémentation du projet démonstratif SMAP de Lutte contre la Désertification*. NRD., ed. Université des Etudes de Sassari, Italy.
- Mulas, M., Mulas, G., 2004. The strategic use of Atriplex and Opuntia to combat desertification. *Sassari Desertification Res. Group Univ. Sassari Sassari*.
- Nadkarni, M.A., Martin, F.E., Jacques, N.A., Hunter, N., 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 148, 257–266.
- Nagadi, S., Herrero, M., Jessop, N.S., 2000. The effect of fermentable nitrogen availability on in vitro gas production and degradability of NDF. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87, 241–251.
- Nagaraja, T.G., Titgemeyer, E.C., 2007. Ruminant Acidosis in Beef Cattle: The Current Microbiological and Nutritional Outlook. *J. Dairy Sci.* 90, E17–E38.
- Nedjraoui, D., 2004. Evaluation des ressources pastorales des régions steppiques algériennes et définition des indicateurs de dégradation. Presented at the Ferchichi A. (comp.). *Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens. Rangeland and pasture rehabilitation in Mediterranean areas, CIHEAM-IAMZ, Cahiers Options Méditerranéennes*, pp. 239–243.
- Nedjraoui, D., 2002. Les ressources pastorales en Algérie. *Doc FAO En Ligne Www Fao OrgagagpagpcdocounprofAlgeriaAlgerie Htm*.
- Nedjraoui, D., Bédrani, S., 2008. La désertification dans les steppes algériennes : causes, impacts et actions de lutte. *VertigoO - Rev. Électronique En Sci. Environ.* 8. doi:10.4000/vertigo.5375
- Nefzaoui, A., 2002. Rangeland management options and individual and community strategies of agropastoralists in Central and Southern Tunisia. Presented at the International conference on policy and institutional options For the management of rangelands in dry areas. *CAPRI Working paper N° 23*, pp. 14–16.
- Nefzaoui, A., 1997. The Integration of Fodder Shrubs and Cactus in the Feeding of Small Ruminants in the Arid Zones of North Africa. Presented at the Second FAO Electronic conference on tropical livestock feeds.

- Nefzaoui, A., Ben Salem, H., 2002. Strategic fodder and efficient tool to combat desertification in the Wana region. Cactus as forage. FAO Plant production and protection paper 169.
- Nefzaoui, A., Ben Salem, H., 2001. *Opuntia* spp: a strategic fodder and efficient tool to combat desertification in the WANA region., in: Cactus (*Opuntia* Spp.) as Forage: FAO Plant Production and Protection Paper. Mondragon C, Gonzalez S (eds), pp. 73–90.
- Nefzaoui, A., Chermiti, A., 1991. Place et rôle des arbustes fourragers dans les parcours des zones arides et semi-arides de la Tunisie. *Option Méditerranéennes Ser A* 16, 119–25.
- Nefzaoui, A., El Mourid, M., 2008. Rangeland improvement and management in arid and semi-arid Environments of West Asia and North Africa. (ICARDA: Aleppo). Available at: http://icarda.org/wspublications//Regional_program_reports_archive/North_Africa/Rangeland_improvement.pdf.
- Nefzaoui, A., Salem, H.B., Zaafour, M., Chouki, S., Gintzburger, G., Bounejmate, M., others, 2000. Tunisian experience with fodder shrubs., in: *Fodder Shrub Development in Arid and Semi-Arid Zones. Volume 1. Proceedings of the Workshop on Native and Exotic Fodder Shrubs in Arid and Semi-Arid Zones, 27 October-2 November 1996, Hammamet, Tunisia. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA)*, pp. 210–228.
- Nelson, K.E., Zinder, S.H., Hance, I., Burr, P., Odongo, D., Wasawo, D., Odenyo, A., Bishop, R., 2003. Phylogenetic analysis of the microbial populations in the wild herbivore gastrointestinal tract: insights into an unexplored niche. *Environ. Microbiol.* 5, 1212–1220.
- Newbold, C.J., El Hassan, S.M., Ortega, M.E., Wallace, R.J., others, 1997. Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *Br. J. Nutr.* 78, 237–249.
- Newbold, C.J., McIntosh, F.M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R.J., 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114, 105–112.
- Niderkorn, V., Baumont, R., 2009. Associative effects between forages on feed intake and digestion in ruminants. *Animal* 3, 951–960.
- Niderkorn, V., Baumont, R., Le Morvan, A., Macheboeuf, D., 2011. Occurrence of associative effects between grasses and legumes in binary mixtures on in vitro rumen fermentation characteristics. *J. Anim. Sci.* 89, 1138–1145.
- Njidda, A.A., Ikhimioya, I., Aliyu, I., 2008. Nutritive evaluation of some browsable trees and shrubs leaves from semi-arid region of Nigeria. *J. Arid Agric.* 18, 21–27.
- 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.
- Njidda, A.A., Olatunji, E.A., Garba, M.G., 2013. In Sacco and In Vitro Organic Matter Degradability (OMD) Of Selected Semi Arid Browse Forages. *J. Agric. Vet. Sci.* 3, 09–16.
- Njidda, A.A., Olatunji, E., Raji, A., 2012. Semi arid browse forages: Their antinutritive substances and in sacco neutral detergent fibre and organic matter degradability. *J. Agric. Vet. Sci.* 1, 21–30.
- Nocek, J.E., 1997a. Bovine acidosis: Implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80, 1005–1028.
- Nocek, J.E., 1997b. Bovine acidosis: Implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80, 1005–1028.
- Nocek, J.E., Russell, J.B., 1988. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *J. Dairy Sci.* 71, 2070–2107.

- Nocek, J.E., Tamminga, S., 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.* 74, 3598–3629.
- Norton, B.W., 1994. Tree legumes as dietary supplements for ruminants., 20th Ed. CABI International. ed. Gutteridge R.C., Shelton H.M, Wallingford, UK.
- Nozière, P., Michalet-Doreau, B., 1994. Effect of extraction method on activities of polysaccharide-depolymerase enzymes in the microbial population from the solid phase in the rumen. *Reprod. Nutr. Dev.* 34, 281–288.
- Nozière, P., Ortigues-Marty, I., Loncke, C., Sauvant, D., 2010. Carbohydrate quantitative digestion and absorption in ruminants: from feed starch and fibre to nutrients available for tissues. *animal* 4, 1057–1074.
- NRC, 2001. National Research Council - NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Washington: D.C.
- 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.
- Offner, A., Sauvant, D., others, 2006. Thermodynamic modeling of ruminal fermentations. *Anim. Res.* 55, 343–365.
- Ogimoto, K., Imai, S., 1981. Atlas of rumen microbiology. Japan Scientific Society Press, Tokyo. Japan.
- Ohene-Adjei, S., Teather, R.M., Ivan, M., Forster, R.J., 2007. Postinoculation 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.
- Onwuka, C.F.I., 1992. Tannin and saponin contents of some tropical browse species fed to goats. *Trop. Agric.* 69, 176–180.
- Opong, S.K., Kemp, P.D., Douglas, G.B., 2008. Browse Shrubs and Trees as Fodder for Ruminants: A Review on Management and Quality. *J. Sci. Technol. Ghana* 28, 65–75.
- Orpin, C.G., 1977. On the induction of zoosporogenesis in the rumen phycomycetes *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and *Sphaeromonas communis*. *J. Gen. Microbiol.* 101, 181–189.
- Ørskov, E.R., McDonald, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 92, 499–503.
- Ørskov, E., Ryle, M., 1990. Energy nutrition of rumen microorganisms. In: Energy Nutrition in Ruminants. Elsevier Science (Eds.), New York, USA, in: Energy Nutrition of Rumen Microorganisms. New York, USA, pp. 10–28.
- Osuga, I.M., Abdulrazak, S.A., Ichinohe, T., Fujihara, T., 2005. Chemical composition, degradation characteristics and effect of tannin on digestibility of some browse species from Kenya harvested during the wet season. *Asian-Aust J. Anim. Sci.* 18, 54–60.
- Osuga, I.M., Abdulrazak, S.A., Nishino, N., Ichinohe, T., Fujihara, T., 2006. Potential nutritive value of selected browse species from Kenya using in vitro gas production technique and polyethylene glycol. *Livest. Res. Rural Dev.* 18, 12.
- Osuga, I.M., Maindi, C.N., Abdulrazak, S.A., Nishino, N., Ichinohe, T., Fujihara, T., 2007. Potential nutritive value and tannin bioassay of selected *Acacia* species from Kenya. *J. Sci. Food Agric.* 87, 1533–1538.
- Osuji, P.O., Odenyo, A.A., 1997. The role of legume forages as supplements to low quality roughages—ILRI experience. *Anim. Feed Sci. Technol.* 69, 27–38.

- Otsyina, R.M., Norton, B.W., Djimde, M., 1999. Fodder trees and shrubs in arid and semi-arid livestock production systems, in: XVIII International Grassland Congress. pp. 429–438.
- Ozutsumi, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Itabashi, H., 2006. Real-time PCR detection of the effects of protozoa on rumen bacteria in cattle. *Curr. Microbiol.* 52, 158–162.
- Palo, R.T., Robbins, C.T., 1991. Plant defenses against mammalian herbivory. CRC Press.
- Papanastasis, V.P., Yiakoulaki, M.D., Decandia, M., Dini-Papanastasi, O., Lloveras, J., González-Rodríguez, A., Vázquez-Yañez, O., Piñeiro, J., Santamaría, O., Olea, L., 2006. Potential of fodder trees and shrubs as animal feeds in the Mediterranean areas of Europe. *Lloveras J Gonzalez-Rodriguez Vazquez-Yanea O Pineiro J* 186.
- Patel, P.S., Alagundagi, S.C., Salakinkop, S.R., others, 2013. The anti-nutritional factors in forages-a review. *Curr. Biot.* 6, 516–526.
- Paterson, J., Cohran, R., Klopfenstein, T., 1996. Degradable and undegradable protein responses of cattle consuming forage-based diets. Presented at the Proceedings of the Third Grazing Livestock Nutrition Conference, Iudkins M.B., Mc Collum III F.T. Proc. West. Sec. Am. Soc. Anim. Sci, pp. 94–103.
- Paterson, R.T., Karanja, G.M., Nyaata, O.Z., Kariuki, I.W., Roothaert, R.L., 1998. A review of tree fodder production and utilization within smallholder agroforestry systems in Kenya. *Agrofor. Syst.* 41, 181–199.
- Patra, A.K., Kamra, D.N., Agarwal, N., 2006. Effect of plant extracts on in vitro methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Anim. Feed Sci. Technol.* 128, 276–291.
- Patra, A.K., Saxena, J., 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71, 1198–1222.
- Patra, A.K., Saxena, J., 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96, 363–375.
- Paya, H., Taghizadeh, A., Janmohammadi, H., Moghadam G., A., 2007. Nutrient digestibility and gas production of some tropical feeds used in ruminant diets estimated by the in vivo and in vitro gas production techniques. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 2, 108.
- 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.
- Pellikaan, W.F., Stringano, E., Leenaars, J., Bongers, D.J., Schuppen, S. van L., Plant, J., Mueller-Harvey, I., 2011. Evaluating effects of tannins on extent and rate of in vitro gas and CH₄ production using an automated pressure evaluation system (APES). *Anim. Feed Sci. Technol.* 166, 377–390.
- Perevolotsky, A., 1994. Tannins in Mediterranean woodland species: lack of response to browsing and thinning. *Oikos* 333–340.
- Pinos-Rodríguez, J.M., Velázquez, J.C., González, S.S., González, S.S., Aguirre, J.R., García, J.C., García, J.C., Álvarez, G., Jasso, Y., 2010. Effects of cladode age on biomass yield and nutritional value of intensively produced spineless cactus for ruminants. *South Afr. J. Anim. Sci.* 40, 245–250.
- Plumed, P., 2014. Effect of carbohydrate source of diet in CH₄ and CO₂ production from dairy goats. Universitat Politècnica de València. Servicio de Alumnado - Servei d'Alumnat, Espagne.
- Plumlee, K.H., Johnson, B., Galey, F.D., 1998. Comparison of disease in calves dosed orally with oak or commercial tannic acid. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10, 263–267.
- Poitras, E., Houde, A., 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev. Biol. Biotechnol.* 2, 2–11.

- Poncet-Legrand, C., Edelmann, A., Putaux, J.-L., Cartalade, D., Sarni-Manchado, P., Vernhet, A., 2006. Poly (L-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocoll.* 20, 687–697.
- 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.
- Popova, M., Morgavi, D.P., Doreau, M., Martin, C., 2011. Production de méthane et interactions microbiennes dans le rumen. *Prod. Anim.* 24, 447.
- Porter, L.J., Hrstich, L.N., Chan, B.G., 1985. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25, 223–230.
- Rahim, I., Sultan, J.I., Sharif, M., Bilal, M.Q., others, 2013. Chemical composition, mineral profile, palatability and in vitro digestibility of shrubs. *JAPS J. Anim. Plant Sci.* 23, 45–49.
- Rahman, M.M., Abdullah, R.B., Wan Khadijah, W.E., 2013. A review of oxalate poisoning in domestic animals: tolerance and performance aspects. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97, 605–614.
- Rahman, M.M., Ishii, Y., Niimi, M., Kawamura, O., 2008. Effects of levels of nitrogen fertilizer on oxalate and some mineral contents in napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach). *Grassl. Sci.* 54, 146–150.
- Rahman, M.M., Ishii, Y., Niimi, M., Kawamura, O., others, 2009. Effect of clipping interval and nitrogen fertilisation on oxalate content in pot-grown napier grass (*Pennisetum purpureum*). *TG Trop. Grassl.* 43, 73.
- Rahman, M.M., Kawamura, O., 2011. Oxalate accumulation in forage plants: some agronomic, climatic and genetic aspects. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 24, 439–448.
- Rahman, M.M., Niimi, M., Ishii, Y., Kawamura, O., 2006. Effects of season, variety and botanical fractions on oxalate content of napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach). *Grassl. Sci.* 52, 161–166.
- Ramirez-Restrepo, C.A., Barry, T.N., 2005. Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 120, 179–201.
- Rana, K.K., Wadhwa, M., Bakshi, M.P.S., 2006. Seasonal Variations in Tannin Profile of Tree Leaves. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 19, 1134–1138.
- Reddy, D.V., Elanchezian, N., 2008. Evaluation of tropical tree leaves as ruminant feedstuff based on cell contents, cell wall fractions and polyphenolic compounds. *Cellul. ADF-ADL* 14, 17–52.
- Redjel, N., Boukheloua, J., Gintzburger, G., Bounejmate, M., Nefzaoui, A., others, 2000. Algerian experience with fodder shrub plantation., in: *Fodder Shrub Development in Arid and Semi-Arid Zones. Volume 1. Proceedings of the Workshop on Native and Exotic Fodder Shrubs in Arid and Semi-Arid Zones, 27 October-2 November 1996, Hammamet, Tunisia. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA)*, pp. 203–209.
- Reed, J.D., 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Anim. Sci.* 73, 1516–1528.
- Reed, J.D., 1986. Relationships among Soluble Phenolics, Insoluble Proanthocyanidins and Fiber in East African Browse Species. *J. Range Manag.* 39, 5. doi:10.2307/3899675
- Reeve, J.N., Nölling, J., Morgan, R.M., Smith, D.R., 1997. Methanogenesis: genes, genomes, and who's on first? *J. Bacteriol.* 179, 5975.
- Remond, B., Brugere, H., Poncet, C., Baumont, R., 1995. Le contenu du réticulo-rumen, in: *Nutrition Des Ruminants Domestiques: Ingestion et Digestion. INRA Editions*, pp. 253–298.

- Robin, M.-M., 2011. Notre poison quotidien: la responsabilité de l'industrie chimique dans l'épidémie des maladies chroniques. La Découverte.
- Robinson, P.H., Getachew, G., Cone, 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. Technol.* 150, 9–17.
- Robles, A., Ruiz-Mirazo, J., Ramos, M., González-Rebollar, J., 2008. Role of livestock grazing in sustainable use, naturalness promotion in naturalization of marginal ecosystems of southeastern Spain (Andalusia), in: *Agroforestry in Europe, Current Status and Future Prospects*. Adv Agroforestry. (Rigueiro-Rodríguez A, McAdam J, Mosquera-Losada MR, ed), Netherlands, pp. 211–231.
- Rochfort, S., Parker, A.J., Dunshea, F.R., 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry* 69, 299–322.
- Roger, V., Fonty, G., Komisarczuk-Bony, S., Gouet, P., 1990. Effects of physicochemical factors on the adhesion to cellulose avicel of the ruminal bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3081–3087.
- Rosales, M., 1996. IN VITRO ASSESSMENT OF THE NUTRITIVE VALUE OF MIXTURES OF LEAVES FROM TROPICAL FODDER TREES. Department of Plant Sciences, Oxford University, Oxford, UK.
- Rosales, M., Gill, M., 1997. Tree mixtures within integrated farming systems. *Livest. Res. Rural Dev.* 9.
- Rouissi, H., Guesmi, A., 2004. Etude comparée de la population des protozoaires ciliés dans le rumen des ovins et caprins. *Option Méditerranéenne Ser. A* 59, 57–59.
- 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., 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production in vitro. *J. Dairy Sci.* 81, 3222–3230.
- Russell, J.B., Wilson, D.B., 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J. Dairy Sci.* 79, 1503–1509.
- Sadaghian, M., Hassanpour, S., Maheri-Sis, N., Eshratkhah, B., Gorbani, A., Chaichi-Semsari, M., 2011. Effects of different levels of wattle tannin drenches on faecal egg counts during naturally acquired mixed nematode infections in Moghani sheep. *Ann. Biol Res* 2, 226–230.
- Sadet, S., 2008. Etude de la diversité spécifique des bactéries attachées à la paroi du rumen: effet du régime alimentaire. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.
- Sadet, S., Martin, C., Meunier, B., Morgavi, D.P., 2007. PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal* 1, 939–944.
- Saïdi, S., Gintzburger, G., 2013. A spatial desertification indicator for Mediterranean arid rangelands: a case study in Algeria. *Rangel. J.* 35, 47–62.
- Salaj, J., Kormutak, A., 1995. Structural changes in mesophyll cells of *Abies alba* MILL. during the autumn-spring period. *Biol. Bratisl.* 50, 93–98.
- Salem, A.Z.M., Robinson, P.H., El-Adawy, M.M., Hassan, A.A., 2007. In vitro fermentation and microbial protein synthesis of some browse tree leaves with or without addition of polyethylene glycol. *Anim. Feed Sci. Technol.* 138, 318–330.
- Salem, H.B., Makkar, H.P.S., Nefzaoui, A., 2004. Towards better utilisation of non-conventional feed sources by sheep and goats in some African and Asian countries. *Options Méditerranéennes Sér. A* 59, 177–187.

- Sallam, S., Bueno, I.C. da S., Godoy, P.B., Nozella, E.F., Vitti, D.M., Abdalla, A.L., 2010. Ruminant fermentation and tannins bioactivity of some browses using a semi-automated gas production technique. *Trop. Subtrop. Agroecosystems*. 12, 1–10.
- Sallam, S.M.A., 2005. Nutritive value assessment of the alternative feed resources by gas production and rumen fermentation in vitro. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 1, 200–209.
- Saminathan, M., Tan, H.Y., Sieo, C.C., Abdullah, N., Wong, C.M.V.L., Abdulmalek, E., Ho, Y.W., 2014. Polymerization Degrees, Molecular Weights and Protein-Binding Affinities of Condensed Tannin Fractions from a *Leucaena leucocephala* Hybrid. *Molecules* 19, 7990–8010.
- SAS Institute, 2000. SAS/STAT® user's guide Int Vol. 1, version 6, Fourth Edition, Cary, NC. ed. USA.
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, 2007. Empirical modelling by meta-analysis of digestive interactions and CH₄ production in ruminants. *EAAP Publ.* 124, 561–562.
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., 2009. Les variations du bilan carbone des ruminants d'élevage. *Renc Rech Rumin.* 16.
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Serment, A., Broudiscou, L., others, 2011. Influences des régimes et de leur fermentation dans le rumen sur la production de méthane par les ruminants. *Prod. Anim.* 24, 433.
- Sauvant, D., Martin, O., Berthelot, V., Mertens, D., 2001. Influence de la digestion dans le rumen sur la composition des produits. *Renc Rech Rum* 71–74.
- Scheppach, W.M., Fabian, C.E., Kasper, H.W., 1987. Fecal short-chain fatty acid (SCFA) analysis by capillary gas-liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.* 46, 641–646.
- Schmidek, A., Takahashi, R., De Medeiros, A., De Resende, K., 2000. Bromatological Composition and Degradation Rate of Mulberry in Goats. Presented at the FAO Electronic Conference on Mulberry for Animal Production (Morus1-L).
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91, 21–40.
- Schroeder, J., 2004. Silage Fermentation and Preservation, in: NDSU. www.ag.ndsu.edu.
- Scupham, A.J., 2007. Succession in the intestinal microbiota of preadolescent turkeys. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 136–147. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00245.x
- Sefa-Dedeh, S., Agyir-Sackey, E.K., 2004. Chemical composition and the effect of processing on oxalate content of cocoyam *Xanthosoma sagittifolium* and *Colocasia esculenta* cormels. *Food Chem.* 85, 479–487.
- Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R., Dore, J., 2003. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 52, 237–242.
- SELMI, H., Abdelwahed, Z., Amraoui, M., Rouissi, H., 2013. Composition chimique, valeur alimentaire et digestibilité de quelques arbustes fourragers du Nord Tunisien. *Rencontres Autour Rech. Sur Rumin.*
- Shedbalkar, U.U., Adki, V.S., Jadhav, J.P., Bapat, V.A., 2010. *Opuntia* and other cacti: applications and biotechnological insights. *Trop. Plant Biol.* 3, 136–150.
- Shin, E.C., Choi, B.R., Lim, W.J., Hong, S.Y., An, C.L., Cho, K.M., Kim, Y.K., An, J.M., Kang, J.M., Lee, S.S., others, 2004. Phylogenetic analysis of archaea in three fractions of cow rumen based on the 16S rDNA sequence. *Anaerobe* 10, 313–319.
- Silanikove, N., Gilboa, N., Nir, I., Perevolotsky, A., Nitsan, Z., 1996. Effect of a daily supplementation of polyethylene glycol on intake and digestion of tannin-containing leaves (*Quercus calliprinos*, *Pistacia lentiscus*, and *Ceratonia siliqua*) by goats. *J. Agric. Food Chem.* 44, 199–205.
- Singh, B., Bhat, T.K., Sharma, O.P., 2001. Biodegradation of tannic acid in an in vitro ruminal system. *Livest. Prod. Sci.* 68, 259–262.

- Singh, B., Chaudhary, L.C., Agarwal, N., 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, 810–817.
- Singh, B., Gautam, S.K., Verma, V., Kumar, M., Singh, B., 2008. Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: Potential biotechnological prospects. *Anaerobe* 14, 138–144.
- Singh, B., Sahoo, A., Sharma, R., Bhat, T.K., 2005. Effect of polyethylene glycol on gas production parameters and nitrogen disappearance of some tree forages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123, 351–364.
- Skillman, L.C., Evans, P.N., Naylor, G.E., Morvan, B., Jarvis, G.N., Joblin, K.N., 2004. 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe* 10, 277–285.
- Skillman, L.C., Evans, P.N., Strömpl, C., Joblin, K.N., 2006. 16S rDNA directed PCR primers and detection of methanogens in the bovine rumen. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 222–228.
- Skillman, L., Toovey, A.F., Williams, A.J., Wright, A.-D.G., 2006. Development and validation of a real-time PCR method to quantify rumen protozoa and examination of variability between *Entodinium* populations in sheep offered a hay-based diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 200–206.
- Śliwiński, B.J., Soliva, C.R., Machmüller, A., Kreuzer, M., 2002a. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 101, 101–114.
- Śliwiński, B.J., Soliva, C.R., Machmüller, A., Kreuzer, M., 2002b. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 101, 101–114.
- Smith, A.H., Zoetendal, E., Mackie, R.I., 2005. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microb. Ecol.* 50, 197–205.
- Soares, P.C., Martinele, I., D’Agosto, M., Maruta, C.A., Sucupira, M.C.A., Antonelli, A.C., Mori, C.S., Ortolani, E.L., 2008. Effect of an energy-deficient diet on populations of ciliate protozoans in bovine rumen. *Arq. Bras. Med. Veterinária E Zootec.* 60, 148–155.
- Soltan, Y.A., Morsy, A.S., Sallam, S.M.A., Louvandini, H., Abdalla, A.L., others, 2012. Comparative in vitro evaluation of forage legumes (prosopis, acacia, atriplex, and leucaena) on ruminal fermentation and methanogenesis. *J. Anim. Feed Sci.* 21, 759–772.
- Souza, E.J., Guim, A., Batista, Â., Santos, K.L., Silva, J.R., Morais, N.A.P., Mustafa, A.F., 2009. Effects of soybean hulls inclusion on intake, total tract nutrient utilization and ruminal fermentation of goats fed spineless cactus (*Opuntia ficus-indica* Mill) based diets. *Small Rumin. Res.* 85, 63–69.
- Spear, J., 1994. Mineral in forages. In: *Forage Quality, Evaluation, and Utilisation*, in: National Conference on Forage Quality, Lincoln, Faher J.R. (Eds.), pp. 281–317.
- Speedy, A., Pugliese, P.-L., 1992. Legume trees and other fodder trees as protein sources for livestock. *FAO*.
- Stevenson, D.M., Weimer, P.J., 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 165–174.
- Stewart, C.S., Bryant, M.P., 1988. The rumen microbial ecosystem, in: *The Rumen Bacteria*. Elsevier Science Publisher, New York.

- Stienezen, M., Waghorn, G.C., Douglas, G.B., 1996. Digestibility and effects of condensed tannins on digestion of sulla (*Hedysarum coronarium*) when fed to sheep, *NEW ZEAL J AGR RES.* 39, 215-221.
- Stumm, C.K., Gijzen, H.J., Vogels, G.D., 1982. Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *Br. J. Nutr.* 47, 95-99.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D., Doré, J., 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4799-4807.
- Subba, D., Gurung, B., Tamang, B., 1996. Seasonality of polyphenolic compounds in nine important tree fodders in the eastern hills of Nepal. *Vet. Rev. Kathmandu* 11, 8-10.
- Suen, G., Weimer, P.J., Stevenson, D.M., Aylward, F.O., Boyum, J., Deneke, J., Drinkwater, C., Ivanova, N.N., Mikhailova, N., Chertkov, O., 2011. The complete genome sequence of *Fibrobacter succinogenes* S85 reveals a cellulolytic and metabolic specialist. *PloS One* 6, e18814.
- Sultan, S., Gupta, P., Kundu, S., Hari, S., Lodhi, G., 2006. Relative digestion, metabolism and microbial activity in sheep and goat on grass-concentrate diet. *Range Manag. Agrofor.* 27.
- Szumacher-Strabel, M., Cieslak, A., 2012. Dietary possibilities to mitigate rumen methane and ammonia production, in: *Greenhouse Gases Capturing, Utilization and Reduction*. Intech, Rijeka, Croatia.
- 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.
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Ogata, K., Nakamura, M., Matsui, H., Benno, Y., 1999. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29, 159-169.
- TAKENAKA, A., ITABASHI, H., 1995. Changes in the population of some functional groups of rumen bacteria including methanogenic bacteria by changing the rumen ciliates in calves. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 41, 377-387.
- Tan, H.Y., Sieo, C.C., Abdullah, N., Liang, J.B., Huang, X.D., Ho, Y.W., 2011. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 169, 185-193.
- Taniguchi, M., Penner, G.B., Beauchemin, K.A., Oba, M., Guan, L.L., 2010. Comparative analysis of gene expression profiles in ruminal tissue from Holstein dairy cows fed high or low concentrate diets. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 5, 274-279.
- Tavendale, M.H., Meagher, L.P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G.T., Sivakumaran, S., 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123, 403-419.
- Tegegne, F., Kijora, C., Peters, K.J., 2007. Study on the optimal level of cactus pear (*Opuntia ficus indica*) supplementation to sheep and its contribution as source of water. *Small Rumin. Res.* 72, 157-164.
- Terrill, T.H., Rowan, A.M., Douglas, G.B., Barry, T.N., 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *J. Sci. Food Agric.* 58, 321-329.

- Theodoridou, K., 2010. Les effets des tannins condensés du sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) sur digestion et sa valeur nutritive. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.
- Theodoridou, K., Aufrère, J., Andueza, D., Le Morvan, A., Picard, F., Stringano, E., Pourrat, J., Mueller-Harvey, I., Baumont, R., 2011. Effect of plant development during first and second growth cycle on chemical composition, condensed tannins and nutritive value of three sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) varieties and lucerne. *Grass Forage Sci.* 66, 402–414.
- Tilley, J.M.A., Terry, R.A., 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass Forage Sci.* 18, 104–111.
- Tiret, L., 2001. Physiologie de la digestion. Polycopié. Alfort Ecole Natl. Vét. Unité Pédagogique Physiol. Thérapeutique-69 P.
- Tokura, M., Chagan, I., Ushida, K., Kojima, Y., 1999. Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. *Curr. Microbiol.* 39, 123–128.
- Tolera, A., Khazaal, K., Ørskov, E.R., 1997. Nutritive evaluation of some browse species. *Anim. Feed Sci. Technol.* 67, 181–195.
- Topps, J.H., 1997. Nutritive value of indigenous browse in Africa in relation to the needs of wild ungulates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 69, 143–154.
- Tylutki, T.P., Fox, D.G., Durbal, V.M., Tedeschi, L.O., Russell, J.B., Van Amburgh, M.E., Overton, T.R., Chase, L.E., Pell, A.N., 2008. Cornell Net Carbohydrate and Protein System: A model for precision feeding of dairy cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 143, 174–202.
- Tymensen, L., Barkley, C., McAllister, T.A., 2012. Relative diversity and community structure analysis of rumen protozoa according to T-RFLP and microscopic methods. *J. Microbiol. Methods* 88, 1–6.
- Tymensen, L.D., Beauchemin, K.A., McAllister, T.A., 2012. Structures of free-living and protozoa-associated methanogen communities in the bovine rumen differ according to comparative analysis of 16S rRNA and *mcrA* genes. *Microbiology* 158, 1808–1817.
- Ungerfeld, E.M., Rust, S.R., Burnett, R., others, 2003. Use of some novel alternative electron sinks to inhibit ruminal methanogenesis. *Reprod Nutr Dev* 43, 189–202.
- Ushida, K., Jouany, J.P., Thivend, P., 1986. Role of rumen protozoa in nitrogen digestion in sheep given two isonitrogenous diets. *Br. J. Nutr.* 56, 407–419.
- Van Soest, P., 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2nd eds. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Van Soest, P. van, Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.
- Vérité, R., Michalet Doreau, B., Chapoutot, P., Peyraud, J.L., Poncet, C., 1987. Revision du système des protéines digestibles dans l'intestin (PDI). *Bull. Tech. Cent. Rech. Zootech. Veterinaires Theix*.
- Vermorel, M., 1995. Emissions annuelles de méthane d'origine digestive par les bovins en France. Variations selon le type d'animal et le niveau de production. *INRA Prod. Anim.* 8, 265–272.
- Vieira, E.L., Batista, Â.M.V., Guim, A., Carvalho, F.F., Nascimento, A.C., Araújo, R.F.S., Mustafa, A.F., 2008. Effects of hay inclusion on intake, in vivo nutrient utilization and ruminal fermentation of goats fed spineless cactus (*Opuntia ficus-indica* Mill) based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141, 199–208. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.05.031
- Vinh, N.T., Wanapat, M., Khejornsart, P., Kongmun, P., 2011. Studies of diversity of rumen microorganisms and fermentation in swamp buffalo fed different diets. *J Anim Vet Adv* 10, 406–414.

- Vitti, D., Nozella, E.F., Abdalla, A.L., Bueno, I.C.S., Costa, C., Bueno, M.S., Longo, C., Vieira, M.E.Q., Godoy, P.B., Mueller-Harvey, I., others, 2005. The effect of drying and urea treatment on nutritional and anti-nutritional components of browses collected during wet and dry seasons. *Anim. Feed Sci. Technol.* 122, 123–133.
- Vossenberg, 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., 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147, 116–139.
- Waghorn, G.C., McNabb, W.C., 2003a. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 383–392.
- Waghorn, G.C., McNabb, W.C., 2003b. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 383–392.
- Wallace, R.J., 1991. Rumen proteolysis and its control, in: *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*. INRA Editions.
- Wallace, R.J., Onodera, R., Cotta, M.A., 1997. Metabolism of nitrogen-containing compounds, in: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Springer, pp. 283–328.
- Wang, C.-T., Yang, C.-M.J., Chen, Z.-S., 2012. Rumen microbial volatile fatty acids in relation to oxidation reduction potential and electricity generation from straw in microbial fuel cells. *Biomass Bioenergy* 37, 318–329.
- Wang, D., Fang, J., Xing, F., Yang, L., 2008. Alfalfa as a supplement of dried cornstalk diets: Associative effects on intake, digestibility, nitrogen metabolism, rumen environment and hematological parameters in sheep. *Livest. Sci.* 113, 87–97.
- Wattiaux, M.A., 1995. *Reproduction and nutrition*. Babcock Institute for International Dairy Research and Development.
- Weatherburn, M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39, 971–974.
- Weimer, P.J., Waghorn, G.C., Odt, C.L., Mertens, D.R., 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 122–134.
- Welkie, D.G., Stevenson, D.M., Weimer, P.J., 2010. ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe* 16, 94–100.
- Whitford, M.F., Teather, R.M., Forster, R.J., 2001. Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiol.* 1, 5.
- Williams, A.G., Coleman, G.S., 1992. *The rumen protozoa*. Springer-Verlag, New York.
- Williams, C.M., 2000. Dietary fatty acids and human health, in: *Annales de Zootechnie*. Paris: Institut national de la recherche agronomique, 1960-2000., pp. 165–180.
- Wilson, P.N., Brigstocke, T.D., 1981. *Improved feeding of cattle and sheep : a practical guide to modern concepts of ruminant nutrition*. Granada, St.Albans.
- Wina, E., Muetzel, S., Hoffmann, E., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2005. Saponins containing methanol extract of *Sapindus rarak* affect microbial fermentation, microbial activity and microbial community structure in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 121, 159–174.
- Wolin, M.J., Miller, T.L., Stewart, C.S., 1997. Microbe-microbe interactions, in: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Springer, pp. 467–491.
- 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.
- Yanagita, K., Kamagata, Y., Kawaharasaki, M., Suzuki, T., Nakamura, Y., Minato, H., 2000. Phylogenetic analysis of methanogens in sheep rumen ecosystem and detection of

- Methanomicrobium mobile by fluorescence in situ hybridization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1737–1742.
- Yáñez-Ruiz, D.R., Macías, B., Pinloche, E., Newbold, C.J., 2010. The persistence of bacterial and methanogenic archaeal communities residing in the rumen of young lambs. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72, 272–278.
- Yang, C.-M., 2002. Response of forage fiber degradation by ruminal microorganisms to branched-chain volatile fatty acids, amino acids, and dipeptides. *J. Dairy Sci.* 85, 1183–1190.
- Zened, A., Combes, S., Cauquil, L., Mariette, J., Klopp, C., Bouchez, O., Troegeler-Meynadier, A., Enjalbert, F., 2013. Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83, 504–514.
- ZHANG, X.-D., WANG, J.-K., CHEN, W.-J., LIU, J.-X., 2010. Associative effects of supplementing rice straw-based diet with cornstarch on intake, digestion, rumen microbes and growth performance of Huzhou lambs. *Anim. Sci. J.* 81, 172–179.
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E., others, 2010. Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3776–3786.
- Zhou, M.I., Hernandez-Sanabria, E., others, 2009. Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6524–6533.
- Zhu, J., Filippich, L.J., Alsalami, M.T., 1992. Tannic acid intoxication in sheep and mice. *Res. Vet. Sci.* 53, 280–292.
- Ziani, Y., 2002. Valorisation des sous produits Agricoles et Agro-industriels dans l'alimentation des Ruminants. Guelma, Algérie.
- Zimmer, N., Cordesse, R., 1996. Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA Prod Anim* 9, 167–179.
- 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.
- Zoetendal, E.G., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M., 1998. Temperature Gradient Gel Electrophoresis Analysis of 16S rRNA from Human Fecal Samples Reveals Stable and Host-Specific Communities of Active Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3854–3859.

ANNEXES

Annexe 01 : Extraction et dosage des oxalates totaux

➤ **Extraction :** Dans une fiole de 250ml contenant 200 ml d'eau distillée et 10ml de HCl (6N), sont introduits 2g d'échantillon délipidés. Le mélange est chauffé pendant 1h dans un bain marie bouillant, refroidi, complété au trait de jauge et filtré (filtrat 1). Deux échantillons de 50ml de filtrat sont prélevés dans deux béchers où on ajoute 20ml de HCl 6N. Le mélange est évaporé sur une plaque chauffante et environ la moitié de son volume est filtré (filtrat 2). Le précipité restant sur le papier filtre est lavé plusieurs fois à l'eau distillée bouillante et conservé. Au filtrat 2 (environ 125ml), sont additionnées 3 à 4 gouttes de rouge de méthyle 0,1% (préparé dans de l'éthanol 60%) suivi de l'ammoniac concentré jusqu'au virage de la solution au jaune. Ce mélange est chauffé entre 90 et 100°C, refroidi et ensuite filtré (filtrat 3) pour éliminer les précipités contenant les ions ferreux. Le filtrat 3 est porté à ébullition et 10ml de chlorure de calcium 5% (p/v) sont ajoutés au mélange sous agitation. Puis l'ensemble est laissé au repos pendant 24 h pour permettre la formation de cristaux d'oxalates. Le lendemain, on observe la présence des cristaux dans les solutions qui sont filtré ainsi que l'eau de rinçage du bécher (filtrat 4). Le précipité retenu par le papier filtre et constitué de cristaux d'oxalates est lavé plusieurs fois à l'eau distillée. Tous les papiers filtres utilisés lors des filtrations 2,3 et 4 sont conservés dans un bécher pour le dosage de l'acide oxalique.

➤ **Dosage :** Les papiers filtres utilisés dès la 2ème filtration sont introduits dans les béchers. L'acide sulfurique (1:4 v / v) y est ajouté progressivement jusqu'à dissolution complète du précipité. Le contenu du bécher est amené à la limite de l'ébullition (70 – 80°C) et est titré sous agitation avec le permanganate de potassium (0,09N) jusqu'au virage au rose stable pendant environ 30sec, marquant la fin de la réaction. En présence de l'acide sulfurique et à chaud, l'acide oxalique est oxydé par le permanganate de potassium.

➤ **Expression des résultats :** Le nombre d'équivalent gramme de permanganate ayant réagi est $E_{\text{éqg}} = N \times V \times 10^{-3}$; N le titre de chute du permanganate (0,05N), V le volume de chute du KMnO_4 .

Le nombre de mole correspondant à $0,05E_{\text{éqg}}$ de KMnO_4 est $M = E_{\text{éqg}} / n$; n est le nombre d'électron échangé. Le nombre de moles d'acides oxalique correspondant au nombre de moles de KMnO_4 ayant réagit est $\text{NO}_x : M \times (5/2) = M \times 2,5$. La masse d'oxalates dans 50 ml de

préparation est $MO_X = PMO_X \times NO_X$; PMO_X est le poids molaire moléculaire de l'acide oxalique (126g/mole). La masse d'oxalate pour 250 ml de préparation (2g de prise d'essai) est $M'O_X = (250 \times MO_X) / 50 = 5MO_X$. La teneur en oxalate (Q) des échantillons par rapport à 100g de MS est donc calculée par la formule suivante :

$$Q = ((M'O_X * 100) / m) * (MS / 100) ; m \text{ est la prise d'essai de départ.}$$

Annexe 02 : Protocole d'Extraction d'ADN (QIAamp DNA Stool Mini Kit)

➤ **Remarques préliminaires**

- Mélanger chaque tampon avant utilisation.
- Si nécessaire, dissoudre les précipités présents dans les tampons ASL et AL, en les incubant à 70°C.
- Préchauffer un bain-marie à 70°C pour les étapes 3 et 12.
- Les centrifugations sont réalisées à 20000 x g (~14000 rpm) à température ambiante. Augmentez le temps de centrifugation si la centrifugeuse utilisée ne peut atteindre une vitesse de 20000 x g (par exemple, au lieu de centrifuger 5 min à 20000 x g, centrifuger 10 min à 10000 x g).

➤ **Procédure**

1. Transférer 180 à 220 mg de l'échantillon dans un microtube de 2 ml et garder le tube dans la glace.

Remarque : Pour les échantillons congelés, éviter de les décongeler avant d'y avoir ajouté le tampon ASL (à l'étape 2), l'ADN pouvant se dégrader. Après addition du tampon ASL, toutes les étapes pourront être réalisées à température ambiante.

2. Ajouter 1,4 ml de tampon ASL à chaque échantillon. Vortexer 1 min continuellement jusqu'à homogénéisation complète de l'échantillon.

Remarque : Il est important de mélanger vigoureusement les échantillons afin d'obtenir une concentration maximale en ADN dans l'éluat final.

3. Chauffer 5 min la suspension à 70°C.

Cette étape de chauffage augmente le rendement en ADN total 3 à 5 fois et facilite la lyse de bactéries et d'autres parasites. La température de lyse peut être augmentée à 95°C pour les cellules difficiles à lyser (telles les bactéries gram-positives).

4. Vortexer 15 sec et centrifuger 1 min l'échantillon à vitesse maximale afin de culotter les particules.

5. Déposer 1,2 ml de surnageant dans un nouveau tube de 2 ml (non fourni dans le kit) et jeter le culot.

Remarque : Les tubes de 2 ml doivent être suffisamment larges pour les comprimés d'InhibitEX. Une récupération de petites quantités de culot n'affectera pas la procédure.

6. Ajouter un comprimé d’InhibitEX à chaque échantillon et vortexer immédiatement jusqu’à complète dissolution. Incuber 1 min la suspension à température ambiante afin de permettre aux inhibiteurs de se fixer sur l’InhibitEX.

7. Centrifuger 3 min l’échantillon à vitesse maximale afin de culotter les inhibiteurs fixés sur l’InhibitEX.

8. Transférer tout le surnageant dans un nouveau tube de 1,5 ml et jeter le culot. Centrifuger 3 min l’échantillon à vitesse maximale. Une récupération de petites quantités de culot obtenu à l’étape 7 n’affectera pas la procédure.

9. Déposer 15 µl de Protéinase K dans un nouveau tube de 1,5 ml (non fourni dans le kit).

10. Prélever 200 µl du surnageant obtenu à l’étape 8 et le déposer dans le tube contenant la Protéinase K.

11. Ajouter 200 µl de tampon AL au tube et vortexer 15 sec.

Remarque : Ne jamais ajouter la Protéinase K directement dans le tampon AL. Il est essentiel de bien mélanger l’échantillon et le tampon AL afin d’obtenir une solution homogène.

12. Incuber 10 min à 70°C. Centrifuger brièvement le tube pour récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon (facultatif).

13. Ajouter 200 µl d’éthanol (96–100%) au lysat et mélanger en vortexant.

Facultatif : Centrifuger brièvement le tube pour récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon.

14. Marquer une nouvelle colonne QIAamp placée dans un tube collecteur de 2 ml.

Déposer avec précaution la totalité du lysat obtenu à l’étape 13 dans la colonne sans en mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger 1 min à vitesse maximale. Transférer la colonne QIAamp dans un nouveau tube de 2 ml puis jeter le tube collecteur contenant l’effluent. Fermer chaque colonne afin d’éviter la formation d’aérosols pendant la centrifugation.

Si la totalité de la solution n’est pas passée à travers la colonne à cette étape, centrifuger une deuxième fois jusqu’à ce que la colonne QIAamp soit entièrement vide.

15. Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp et ajouter 500 µl de tampon AW1. Centrifuger 1 min à vitesse maximale. Transférer la colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur de 2 ml puis jeter le tube contenant l’effluent.

16. Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp et ajouter 500 µl de tampon AW2. Centrifuger 3 min à vitesse maximale. Jeter le tube collecteur contenant l’effluent.

17. Placer la colonne QIAamp dans un nouveau tube de 2 ml et Centrifuger 1 min à vitesse maximale. Cette étape permet l’élimination du risque de récupération du tampon AW2.

18. Mettre la colonne QIAamp dans un nouveau tube de 1,5 ml et déposer directement au centre de la colonne 200 µl de tampon AE. Incuber 1 min à température ambiante et centrifuger 1 min à vitesse maximale pour éluer l'ADN. Pour une conservation prolongée, il est recommandé de conserver l'éluat à -20°C .



ISSN NO. 2320-5407

Journal homepage: <http://www.journalijar.com>

INTERNATIONAL JOURNAL
OF ADVANCED RESEARCH

RESEARCH ARTICLE

Effects of secondary compounds from cactus and acacias trees on rumen microbial profile changes performed by Real- Time PCR

*Chentli Amira¹, Gillmann Louisa², Bouazza Lyas¹, Medjkal Samir¹, Limami Anis Mohamed³, Le Paven Marie-Christine Morère³, Bousseboua Hacène¹

1. Ecole Nationale Supérieure des Biotechnologies, Ali Mendjli BP.E66 25100, Constantine, Algeria.

2. University of Angers, Laboratoire Angevin des Sciences Biotechnologiques et Agroalimentaire – IUT, 4 Boulevard Lavoisier, F-49016 Angers – France

3. University of Angers, Institut de Recherche en Horticulture et Semences UMR 1345, SFR 4207 QUASAV, 2 Boulevard Lavoisier, F-49045 Angers - France

Manuscript Info

Manuscript History:

Received: 14 December 2013

Final Accepted: 19 January 2014

Published Online: February 2014

Key words:

Rumen fermentation, Microbial profile, Real time PCR, Plant secondary compounds, Tannins, Oxalates.

*Corresponding Author

Chentli Amira

Abstract

Plant rich secondary compounds had antimicrobial effects by acting against different rumen microbial populations. The current study investigated the influence of spineless cactus (*Opuntia ficus indica f. inermis*), *Acacia nilotica* and *A. saligna* on rumen microbial fermentation, using in vitro gas production technique, and microbial population profile changes, using a molecular-based technique (Real-Time PCR). The acacias and *Opuntia* reduced significantly total gas production ($p < 0.01$), rumen CH₄ production ($p < 0.01$) and ammonia concentration ($p < 0.001$). At 24h of incubation, Fungi population was 0.30- and 0.03 -fold reduced with *A. nilotica* and *Opuntia* as compared to 0h, but 2- and 1.24- fold higher with *A. cyanophylla*. Increases in the abundance of *F. succinogenes* were observed in all substrates; however, the tanniferous plants and *Opuntia* reduced the relative abundance of *R. flavefaciens*. Methanogenic population was increased with all substrates, except for *Opuntia* (0.90- fold lower than the control). There was a significant reduction ($p < 0.05$) in rumen protozoa count with *A. cyanophylla*, *Opuntia* and *A. nilotica* (3.68; 5.59 and 5.34 times, respectively). Results suggested that tannin sources from *A. nilotica* and *A. cyanophylla* had an indirect effect on methanogenesis. This study showed an antimicrobial activity of oxalates content of *O. ficus indica*.

Copy Right, IJAR, 2013., All rights reserved

Introduction

An interesting challenge for scientists in the field of animal nutrition is the introduction of alternative feedstuffs that could overcome the problems of environmental harshness and production costs. At the same time, the preservation of animal health, production yield and product quality is essential (Vasta et al., 2008). Some indigenous browse species are useful sources of animal feeds, they provide green forage for animals at times when grass and herbaceous species are of low nutritional value (Aregawi et al., 2008). One potential way for increasing the quality and availability of feed resources for livestock in the arid areas and to preserve the rangelands may be through the use of fodder trees and shrubs. These plants have also a potential to prevent desertification, mitigating the effects of droughts, allowing soil fixation and enhancing the restoration of the vegetation and the recuperation of rangelands (Robles et al., 2008; Mulas and Mulas, 2009).

Acacia saligna, *Acacia nilotica* and *Opuntia ficus indica f. inermis* (spineless cactus) are present in large areas of Algeria and are generally considered to be valuable as fodder reserve during drought. These species are adapted to a low moisture environment, thus they can offer a reliable source of feedstuff in the form of leaves and fruits (Mlambo et al., 2009; Ben Salem and Nefzaoui, 2002). The high water level in cactus represents an important alternative to supply water requirement of animals in arid and semi-arid regions, where water may be a limiting factor for animal production (Costa et al., 2009). On the other hand, it is an excellent energy source, rich in non

fibrous carbohydrates and presents high dry matter digestibility coefficient (Wanderley et al., 2002). Under African conditions, *A. saligna* and *A. nilotica*, leguminous trees are present in sufficient quantities to contribute to ruminant diets (Degen et al., 1995, Mlambo et al., 2008). Their foliage may be used as a protein and energy supplement when animals are given low quality roughage (Krebs, 2007). Interest devoted to this species is partly related to their high protein content, abundant biomass and evergreen habit (Aganga et al., 1998).

However, the presence of anti-nutritional secondary compounds (e.g. tannins, oxalates...), with potential adverse effects on rumen microbial fermentation, feed digestibility and animal performance, could restrict nutrient utilization of shrubby vegetation (Waghorn and McNabb, 2003; Mueller-Harvey, 2006). Plant secondary compounds had antimicrobial effects by acting against bacteria, protozoa and fungi. Phenolic compounds are the main active components (Burt, 2004). The antimicrobial mode of action, either microcidal or microstatic, is considered to come mainly from the potential of their intruding into the bacterial cell membrane to disintegrate membrane structures which causes ion leakage (Bodas et al., 2012). The objective of this study was to evaluate the influence of secondary compound on rumen fermentation, using *in vitro* gas production technique, and microbial population profile changes using a molecular-based technique (Real- Time PCR).

Material and Methods

Plant material

Cladodes of wild spineless cactus (*Opuntia ficus indica* f. *inermis*) growing on marginal lands were randomly harvested in winter from an area of Constantine. This area is located at 36.17 North and 6.37 East and at an elevation of about 693 meters above sea level in the North Eastern part of Algeria. It is characterized by a semi-arid climate with irregular and low precipitations of 350-700 mm per year. The mean temperature of the coldest period ranges between -0.3°C and 3.2 C while the hottest one is ranging between 33.3 and 37.3 °C.

The *Opuntia* cladodes were cut by hand with a single-machete into small cubes of approximately 50 mm x 30 mm and dried at 50 °C (Makkar, 2003) in a ventilated oven. The vetch-oat hay was collected from the Technical Institute of Great crops (I.T.G.C. of Constantine), and dried in the same conditions as for *Opuntia* pads. Foliage from two browses species (*Acacia nilotica* (L.) Willd. ex Delile and *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. f. (formerly *Acacia cyanophylla* Lindl.) was also collected from a semi-arid area of Constantine, in the early autumn. Between six and ten specimens of each plant species were sampled to obtain a representative aliquot of the edible biomass. Leaves were clipped with scissors from the aerial part of the plants, and taken immediately to the laboratory where the samples from the different specimens of the same species were mixed and air dried in the shadow. All dried plant material were then ground in a laboratory mill to pass through a 1mm sieve and stored in tightly sealed plastic bottles for later analysis.

Chemical analysis

Dry matter (DM), Organic matter (OM), Ether extract (EE) (AOAC, 1990) and crude protein (AOAC, 2000) were determined in the forage samples. Neutral and acid detergent fiber (NDF and ADF, respectively) and acid detergent lignin (ADL) were performed by the method of Van Soest et al. (1991). Non-fiber carbohydrates (NFC) were calculated by difference whereby the sum of NDF, CP, EE and ash in percentage subtracted from 100 (Mertens, 1997). Phenolic compounds were extracted following the procedures described by Makkar (2003). Total extractable phenols (TEP) were determined using the Folin-Ciocalteu reagent and tannic acid as the standard. The concentration of total condensed tannins (TCT) was measured in the extract using the butanol-HCl assay, with the modifications of Makkar (2003). Feeds were also analyzed for total oxalates (AOAC, 1990). All chemical analyses were performed in triplicate.

Rumen inocula

Ruminal content was supplied from “The experimental center of Agro Evolution- Euro nutrition, Saint Symphorien-France”. It was recovered before the morning feeding from two fistulated dried Holstein, housed according to European guidelines for animal welfare and fed, at maintenance on a roughage-concentrate diet (70-30 w/w, 9.8% crude protein on DM basis) twice daily at 8.00A.M and 4.30 P.M (7kg DM/day), with free access to clean drinking water. Rumen fluid was withdrawn through a four layer of muslin cloth into pre-warmed thermos flasks previously flushed with CO₂ gas and taken immediately to the laboratory, where sample of rumen content was kept at 39°C under a constant flow of CO₂.

In vitro gas production measurements

In vitro gas production test was done according to Menke et al. (1979). A culture medium containing macro- and micro-mineral solutions, a bicarbonate buffer solution, resazurin and reducing solution was prepared as described by

Menke and Steingass (1988). The medium was maintained at 39°C and saturated with CO₂. Rumen fluid was then added to the buffered mineral solution in the proportion 1:2 (v/v). Each sample of plant material (200 mg) was weighed and placed into a 100ml glass syringe (Fortuna, Poulten and Graf GmbH, Wertheim, Germany) equipped with a luer lock valve. The pistons were pushed until 10 ml of gas remained. The headspace of the syringes was flushed 3 times with CO₂. 30 ml of incubation medium was dispensed through the valve of the preheated (39°C) and anaerobic syringe with the help of a peristaltic pump. All syringes were placed for 24h at 39°C in an incubator shaker (KS 4000i control, IKA Werke, Staufen, Germany) at 50 rpm. Each substrate was run in duplicate, with two syringes without substrate (blanks).

The carbon dioxide and methane productions (CO₂ and CH₄, respectively) were evaluated at the end of incubation by injection in each syringe, 4ml of sodium hydroxide (NaOH, 10N) (Jouany, 1994).

The metabolizable energy (ME) content and the organic matter digestibility (OMD) of samples were estimated according to Menke et al. (1979).

Fermentation parameters (rumen pH, ammonia nitrogen and VFA analysis)

At the end of fermentation, the pH was determined immediately in culture fluid with a pH meter. For ammonia-N (N-NH₃) determination; a 5ml sample of the incubated fluid was preserved with 0.5 ml 5% orthophosphoric acid at -20°C. Samples were centrifuged at 12,000×g for 20min, and the supernatant was analyzed by spectrophotometry, for N-NH₃ content according to the waterburn technique (1967). For analysis of Volatile fatty acid (VFA) composition, 1ml of 10% hydroxide sodium was added to 10 ml of the incubated fluid and stored at -20°C until analyzed. The mixture was centrifuged at 5000×g for 10 min at 4°C, after filtration, supernatant was analyzed by gas chromatography (BP21, SGE, Europe Ltd., Buckinghamshire, UK) with a capillary column (length: 30m, inner diameter: 530 µm film :1 µm) and flame-ionization detection. The temperatures of the injector and detector were 280°C, 240°C, respectively.

Enumeration of rumen Protozoa

Samples from the incubated fluid were homogenized and mixed with a methyl green-formalin-saline solution (50-50, V/V) for protozoa enumeration according to Ogimoto and Imai (1981). The mixture was pipetted into a 10 microlitre Agass Lafont counting chamber (Preciss, France) before and after incubation. Protozoa were counted microscopically under 10 x magnifications. Each sample was counted twice, and if the average of duplicates differed by more than 10%, the counts were repeated.

Analysis of microbial population

Extraction of genomic DNA. For quantification of microbial populations, an aliquot (1.8ml) of the incubated liquid from each syringe was sampled at 0h and after 24h of incubation, and then stored at -20°C immediately. The procedure of total DNA extraction was performed according to the QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit (purchased from QIAGEN France S.A.S) and used according to the manufacturer's instructions (Singh and al., 2011). Briefly, rumen samples were homogenized in buffer ASL and heated at 95 °C for 5min to lyse microbial cells. After removal of potential inhibitors by incubation with an InhibitEx tablet, the lysates were treated with proteinase K and buffer AL at 70 °C for 10 min to remove protein and polysaccharides. DNA was precipitated by ethanol, applied to a column provided in the kit followed by washes with buffers AW1 and AW2, and then dissolved in buffer AE. The concentration and quality of DNA were determined at A260 nm and A280 nm using a Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

Real-Time PCR technique. The relative quantification of different microbial groups: total bacteria, total anaerobic fungi, two predominant cellulolytic bacteria (*Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*) and total methanogens, were determined in the samples.

Real-time PCR assays were performed on a Rotorgene-6000 Thermocycler (Corbett Research, Sydney, Australia). Assays were set up using the Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (2X) (Life technologies). The specific primers targeting different microbial groups, used in this study are listed in table 1. These primers were chosen from previously published sequences that demonstrated species-specific amplification. The microbial sample DNA was diluted to 5.3 ng/ul prior to use in the quantitative PCR assays to reduce inhibition. The assay was conducted under the following cycle conditions: 95°C for 15 s for denaturation, followed by 45 cycles of 60 sec each for annealing at 60°C and extension at 72°C. Fluorescence detection was performed at the end of each denaturation and extension steps. Specificity of amplified products was confirmed by melting temperatures and dissociation curves after each amplification. Amplification efficiencies for each primer pair were investigated by examining dilution series of total rumen microbial DNA template on the same plate in triplicate. A negative blank (without the DNA template) was also run for each primer pair. The relative abundance of different groups was quantified using the relative

quantification ΔC_T (Livak and schmittgen, 2001). The results were presented as changes in microbial population relative to control (0h), taken as one.

Table 1. Primers for Real- time PCR assay.

Target species /genes	Forward primer/Reverse primer Sequence (5' to 3')	References
General bacteria 16S rRNA	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	Nadkarni et al. (2002)
Anaerobic fungi *MAF(18S & ITS1)	GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT	Denman &McSweeney (2006)
<i>F.succinogenes</i> 16S rRNA	GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA CGCCTGCCCTGAACTATC	
<i>R. flavefaciens</i> 16S rRNA	CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC	
Methanogens <i>mcrA</i>	TTCGGTGGATCDCARAGRGC GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC	Vinh et al. (2011)

*MAF (18S & ITS1): Multiple alignments of fungal 18S ribosomal and ITS1 gene sequences

Statistical analysis

One-way analysis of variance was performed on gas production fermentation parameters and real time PCR data, with browse species as the only source of variation (fixed effect) and source of inoculum (random effect) as a blocking factor. Tukey's multiple comparison test was used to determine which means differed from the rest ($P < 0.05$). Pearson linear correlation coefficients (r) were determined pairwise between the variables studied. Analysis of variance (PROC GLM) and correlation (PROC CORR) were performed using the SAS software package (SAS, 2000).

RESULTS

Spineless cactus cladodes were relatively high in oxalates (148.27 g/kg DM) and had the highest ash content (296.413 g/kg DM). However, *A. nilotica* and to a less extent *A. saligna* exhibited a high content of CP (243 and 157 g/kg DM, respectively). The NDF and ADF contents ranged respectively from 290 to 585 g /kg DM and from 120 to 317 g /kg DM, with the highest values for vetch- oat hay. CT was highest in *A.nilotica* and *A.saligna* with 726.3 and 631. 23 g/kgDM, respectively, whereas, not detected in *Opuntia* pads (table 2).

pH, N-NH₃, Total VFA concentrations (millimolar/l) and molar percentages of individual VFA are presented in Table 3. There was no significant difference ($p > 0.05$) in the rumen liquor pH between the studied plants. Concentration of NH₃-N was lower ($p < 0.05$) in all substrates, relatively to vetch-oat hay. The production of VFA was statistically different among feedstuffs ($p < 0.05$). The lowest value was noted in *Opuntia* (59.8mmol/l). *A.saligna* had the highest molar proportion of acetate but the highest value of propionate was obtained in *A.nilotica* ($p < 0.05$), (72.084 and 22.24 mol/100ml, respectively). However, molar proportion of butyrate was significantly higher ($p < 0.05$) in vetch oat- hay and to a less extent in *Opuntia*.

Table 4 shows the gas production data for the investigated plants incubated in vitro for 24 h. Significant ($P < 0.05$) differences across all substrates were recorded in total gas, CH₄ productions and in the predicted parameters. The gas production, ME and OMD were highest ($P < 0.05$) for vetch- oat hay and to a less extent for cactus, while the *A. nilotica* and *A.saligna* leaves recorded the lowest productions. The same trend was observed for methane emission.

The microbial population determined by Real- Time PCR showed significant changes ($p < 0.05$) in the population number of total bacteria, fungi, *R. flavefaciens*, *F. succinogenes* and methanogens (Table 5). At 24h of incubation, the tanniferous plants and *Opuntia* reduced the relative abundance of *R.flavefaciens*, compared to the control 0h, with the highest reduction for *Opuntia* (0.085- fold). Increases in the abundance of *F.succinogenes* varying between 3.07 for *A.nilotica* to 19. 9 for vetch- oat hay were observed in all substrates. Compared to 0h, the

relative abundance of fungal population was reduced 0.30- fold with *A.nilotica* and 0.031- fold with *Opuntia*, at 24h of incubation. However, *A.saligna* and vetch-oat hay resulted in a 2-and 1.24- fold increases of the relative abundance of fungi, respectively. After 24h of incubation, only *Opuntia* inhibited methanogenic population by 0.90-fold. However, *A.nilotica* resulted in the highest increase (6.48- fold), *A.saligna* and vetch- oat hay presented lower increase of methanogens population compared to 0h (1. 73 –and 1.34- fold, respectively). There was a significant reduction ($p<0.05$) in rumen protozoa count with *A.saligna*, *Opuntia* and *A.nilotica* (3. 68; 5. 59 and 5.34 times, respectively).

Table 2. Chemical composition (g/kg dry matter) of experimental substrates.

	Plant species			
	<i>O. ficus indica</i>	Vetch-oat hay	<i>A.nilotica</i>	<i>A.saligna</i>
Dry matter (DM) (g / Kg)	961.18	935.09	900	913.36
Organic matter (OM)	703.58	941.85	920.47	899
ASH	296.41	58.14	80	101
Crude protein (CP)	77.84	108.3	243	157
Neutral detergent fiber (NDF)	325.25	585.19	290	447
Acid detergent fiber (ADF)	119.60	316.82	198	255.13
Lignin (ADL)	19.11	45.20	126.41	148
Ether extracts (EE)	18.59	17.53	17.08	15.88
Non-fiber carbohydrates (NFC)	281.88	235.32	369.92	279.11
Total oxalates	148.27	48.62	nd	nd
TEP	8.59	5.06	213.4	204.8
TCT	nd	57.99	726.3	631. 2

nd =no detected

TEP= Total Extractable Phenols; TCT= Total Condensed Tannins (g /kg DM, standard equivalent).

Table 3. Effect of substrates on rumen fermentation characteristic in Holstein cow, after 24h of incubation

Item	<i>O. ficus indica</i>	Vetch-Oat hay	<i>A.nilotica</i>	<i>A.saligna</i>	S.E.M
Ruminal pH	7.29a	7.075a	7.01a	6.970a	0.054
NH3-N (mg/100ml)	25b	26.5a	14.41c	10.76d	0.619
Total VFAs (mmol/l)	59.8d	120.9a	73.84b	70.44c	0.422
VFAs, mol/100ml					
Acetate,C2	70.17c	70d	71.45b	72.08a	0.330
Propionate,C3	21.78b	20.04d	22.24a	20.24c	0.359
Butyrate,C4	8.05b	9.96a	6.30d	7.675c	0.493
C2 :C3 ratio	3.22c	3.49b	3.21d	3.561a	0.0592

VFAs: Volatile fatty acids; a, b, c, d: means in a row with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$); SEM=Standard error of the mean; P=Probability.

Table4. Effect of substrates on total gas production, methane emission (ml/200mgDM), estimated metabolisable energy and organic matter digestibility, after 24 h of incubation

Item	<i>O. ficus indica</i>	Vetch-Oat hay	<i>A.nilotica</i>	<i>A.cyanophylla</i>	S.E.M
GT ,ml	25.50b	29.00a	15. 00c	13.00d	2.561
CH ₄ ,ml	5.00b	8.00a	3.50c	3.00d	0.736
ME(MJ/KgDM)	6.11b	6.73a	5.62c	4.86d	0.259
OMD%	41.05b	45.33a	39.15c	33.50d	1.606

GT= gas total; OMD (%) = $14, 88+0,889*Gv+0,45*CP$; ME (MJ/KgDM) = $2,20+0,136*Gv+0,057*CP$ Where, OMD is organic matter digestibility (%); ME: metabolizable energy; CP: crude protein in percent; and Gv: the net gas production in ml from 200mg dry sample, after 24 h incubation (Menke et al., 1979); a, b, c, d: means in a row with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$); SEM=Standard error of the mean; P=Probability.

Table 5. Effect of substrates on relative quantification of different microbial groups by Real- Time PCR and on protozoa by direct count, after 24h against 0h (control) of incubation.

Species	Control	<i>O. ficus indica</i>	Vetch-Oat hay	<i>A.nilotica</i>	<i>A.cyanophylla</i>	S.E.M
Total bacteria	1.0a	0.03e	0.03d	0.10b	0.06c	0.126
Methanogens	1.0d	0.90e	1.34c	6.48a	1,73b	0.705
Anaerobic fungi	1.0c	0.03e	1.24b	0.30d	2.0a	0.232
<i>R. flavefaciens</i>	1.0b	0.08e	1. 17a	0.38c	0.33d	0.139
<i>F.succinogenes</i>	1.0e	4.86c	19.79a	3.07d	8.5b	2.215
Direct count (*10⁴Cell /ml)						
Protozoa	1.94e	5.59b	12.12a	5.34c	3.68d	1.15

a, b, c, d, e : means in a row with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$); SEM=Standard error of the mean; P=Probability

Discussion

In vitro gas production has been widely used to assess the nutritive value of diverse classes of feeds (Bakhashwain et al., 2010; Allam et al., 2012). In the current study, the higher gas production of vetch- oat hay as compared with *Opuntia* could be due to its highest content in OM. Besides, oxalates in cactus might have hampered microbial activity in the rumen as suggested by the reduced gas production (Ben salem et al., 2002). The low gas production of Acacia species might be attributed to their highest levels in lignin and phenolic compounds, particularly CT (Mohammadabadi et al., 2010; Edwards et al., 2012). The CT form complexes with carbohydrates, rendering them undegradable, and then inhibits the microbial enzymes or microorganisms, complexing with lignocellulose, thus preventing the microbial digestion (Griffiths, 1986). Moreover, the low gas production from fermentation of Acacia species was also observed in other studies (Bakhashwain et al., 2010 and Allam et al., 2012). The OMD and ME were negatively correlated to CT content ($r=-0.39$; $p < 0.01$ and $r=-0.42$; $p < 0.01$, respectively). Adverse effects of CT on ME and OMD of Acacia spp are consistent with in vitro and in sacco studies (Hervás et

al., 2003; Getachew et al., 2008). The low ME content of *O. ficus indica* as compared to that of vetch-oat hay, could probably be due to the higher ash content of cactus (Ben salem et al., 2010).

Rumen digestion of feed components by the microbiota (bacteria, archaea, protozoa and fungi) under anaerobic conditions results in the production of VFA, CO₂ and CH₄ (Martin et al., 2010). The highest total CH₄ generated after 24h of incubation by vetch -oat hay might be due to its higher digestible fiber content (Agarwal et al., 2008). The lower methane emission from degradation of Acacia species could be due to their high tannin content. These results are consistent with Soltan et al. (2012), who found a pronounced methane reduction with *A. saligna*, associated to their high CT content. Many others, *in vitro* and *in vivo*, studies have demonstrated the antimethanogenic activity of tannins (Tavendale et al., 2005; Hess et al., 2006; Goel and Makkar, 2012). However, the mode of action of tannins has not been completely described (Bodas et al., 2012). In general, inhibition of CH₄ production entails an alteration in VFA profile because of alternative electron sinks to dispose of reducing power (Cieslak et al., 2012). In our study, an increase in the concentration of propionic acid occurred with *A. nilotica* and relatively with *Opuntia*, explained probably by their chemical composition. Our results are consistent with Cieslak et al. (2012), who stated that propionate production and methanogenesis are competitive. During fermentation, the conversion of starch to propionic acid, may disturb horizontal hydrogen transfer and thus leading to limitation of methanogenesis process (Szumacher-Strabel and Cieslak, 2012), According to Tavendale et al. (2005), the strong inverse relationship between the molar proportion of propionate and CH₄ may depend on interactions among rumen microbial population, and compounds that promote higher production of C₃ in the rumen. Our results are similar to those obtained by Wang et al. (2012); The relative increase in propionate and decrease in butyrate proportions may be also associated to the reduction in protozoa population. Variations in protozoa numbers in the rumen could lead to changes in VFA production and composition (Wang et al., 2012).

The changes in microbial profile in response to the substrates, studied herein were revealed by real time PCR. Tanniferous plants appeared to affect some microbial community. An antiprotozoal effect occurred with acacias tannins, which is consistent with Cieslak et al., (2012), who demonstrated that tannins from *Vaccinium vitis idaea* reduced protozoa numbers in Holstein-Friesian dairy cows' rumen. Tannins can have diverse effects on ruminal protozoa: results obtained *in vitro* and *in vivo* showed that they generally depress ruminal protozoa populations (Monforte-Briceño et al., 2005; Animut et al., 2008). In other instances, some studies report unclear effects (Sliwinski et al., 2002), whilst others report a clear defaunating effect (Bhatta et al., 2009; Monforte-Briceño et al., 2005). Bodas et al., (2012) stated that although the mode of action of tannins on protozoa is not clear, it might be similar to that observed on bacteria. This reduction in protozoal number is associated with the observed decrease in ammonia-N concentration, in acacias and to a less extent in *Opuntia* relatively to vetch-oat hay. This could be due to a reduction in the proteolytic activity of the protozoa (Doreau and Ferlay, 1995) and to deamination processes by CT for acacias (Soltan et al., 2012, Goel and Makkar, 2012).

The increase in the total number of methanogens in the rumen from degradation of acacias was not expected, as tannins generally inhibit methanogens populations (Kamra et al., 2006). A possible explanation may be based on a potential resistance of this population to acacias tannins. This mechanism could be related to microbial extracellular secretions that reduce tannin effect and/or tannin-degrading enzymes. More studies about tannin resistance, tolerance or adaptation to methanogens have to be carried out (Longo et al., 2013). In addition, the relative abundance of total methanogens in the rumen could be related to the origin of tannins or their nature (e.g., hydrolysable versus condensed). The CT appear to decrease CH₄ production more through a reduction in fiber digestion (indirect effect), while hydrolysable tannins (HT) appear to act more through inhibition of the growth and/or activity of methanogens and/or hydrogen producing microbes (direct effect) (Jayanegara et al., 2010). Moreover, Some of the ruminal methanogens can be associated intracellularly or extracellularly with ciliates protozoa (Tokura, et al., 1999). This symbiotic relationship results in 40% of methanogenesis in rumen fluid (Hegarty, 1999). Generally, Defaunation is combined with reduced methane production in the rumen (Nagaraja et al., 1997) as methanogens lose their symbiotic partner, resulting in their reduced biological activity (Kamra et al., 2006). However, in the present study, it appears that methanogenesis is not so influenced by the association between protozoa and methanogenic bacteria. This is in agreement with Machmuller et al. (2003) and Cieslak et al. (2012), who stated that ruminal methanogenesis may not always be correlated with number of methanogens in the rumen. Such results might be related to the finding of Sharp et al., (1998); using a group-specific 16S rRNA probes, he found that most of rumen methanogens are being essentially free living in rumen fluid, since only a negligible hybridization signal was detected with the ruminal protozoal fraction.

Among the quantified cellulolytic bacteria, the population of *F. succinogenes* was most abundant in all substrates. This result supports the previous finding that *F. succinogenes* is one of the most common cellulolytic bacteria in the rumen, contributing ca. 5 to 6% of total prokaryotic 16S rRNA in the rumen contents of cattle (Jun et al., 2007). Some studies reported that *F. succinogenes* was the main cellulolytic species affected by tannins

(McSweeney et al., 2001; Longo et al., 2013). However, in the present study reduction of *F.succinogenes* population size was not observed, but a selective effect of tannins on *R.flavefaciens* occurred. Tannins can be particularly toxic to fibrolytic bacteria (Bhatta et al., 2009), through: (i) bacteriostatic action on microbial enzymes such as endoglucanases (Guimarães-Beelen et al., 2006) (ii) direct effect (Koike and Kobayashi, 2009) or (iii) by reducing nutrient availability (Sallam et al., 2010).

The anaerobic fungi population was relatively increased after 24h of incubation for vetch-oat hay and *A.saligna* as influenced by their high fiber content. In contrast, *O. ficus indica* and *A.nilotica* decreased relatively the fungi population after 24h of fermentation, probably due to their high content in NFC. This finding are in accordance with other study, suggesting that diet can have a significant effect on fungal populations, with high-fiber diets promoting larger fungal population than high-concentrate diets (Bauchop, 1979). Little studies have been carried out on the effect of plant extracts on rumen fungi (Patra and Saxena, 2009). McSweeney et al. (2001) stated that effects of tannins on fungi are more subtle than those on bacteria, and vary with the chemical structure of the tannins and their differing cell-surface receptors.

Utilization of *O. ficus indica* as substrate decreased significantly ($P<0.05$) the relative quantification of methanogens, anaerobic fungi, *R.flavefaciens* and protozoa. This could be related to the high content of *Opuntia* cladodes in Oxalates. Using cultivation-independent molecular techniques, Belenguer et al., (2013) have studied the impact of oxalic acid (OA) on rumen bacterial community in sheep, and found rapid variations in the ruminal microbiota, occurring with OA administration in diets. The administration of OA altered the rumen environment, including the bacterial community. The oxalate has the potential to form a strong chelate with dietary calcium in the form of calcium oxalate crystal (Mcconn and Nakata, 2004; Contreras-Padilla et al., 2011), making this anion less available to animals (Nefzaoui et Ben Salem, 2001). In ruminants, some essential minerals such as calcium and phosphore have been proven to be important modulators of microbial fermentation (Younes et al., 1993; Durand and Komisarczuk, 1998).

The calcium (Ca^{2+}) is the most universal carrier of biological signals: it modulates cell life (carafoli, 2007). This signaling molecule regulates a number of essential processes in eukaryotes (Clapham, 2007). In prokaryotes, Various physiological processes such as spore formation, motility, cell differentiation, transport, virulence and bacterial gene expression are modulated by Ca^{2+} (Domníguez et al., 2011; Guragain et al., 2013). It was recognized that the signaling function of Ca^{2+} had a number of unique properties. A distinctive property of the Ca^{2+} signal is autoregulation; it occurs at the transcriptional and post translational levels (Carafoli, 2007).

The consumption of oxalate-rich feed resources, in sufficient quantity may cause mainly hypocalcemia and renal failure, leading to poisoning in livestock (James, 1972; Cheek, 1995). However, the adaptation of the ruminal microbiota to oxalate can prevent animal poisoning, by microbial detoxification (Allison et al., 1981). Belenguer et al., (2013) observed a rapid adaptation of the ruminal microbiota to the consumption of OA, linked to the rapid estimated increase in the abundance of *Oxalobacter formigenes* (from 0.002 to 0.007% of *oxc* gene in relation to the total bacteria 16S rDNA: $p<0.01$), which is assumed to be responsible for oxalate breakdown.

Conclusion

O.ficus indica and acacias affected negatively rumen microbial fermentation in terms of gas production and total VFA, but reduced methane production, and therefore an increase in efficiency of energy utilization would be expected in the animals. An important shift in microbial profile occurred, but *R.flavefaciens* and protozoa seemed to be sensitive to tannins from Acacia species. Furthermore, tannins had antimethanogenic activities but without, apparently, direct effects on relative abundance of methanogens population. This study showed also an antimicrobial activity of oxalates content of *O.ficus indica*. This mechanism needs evaluation especially, the catalytic potential of *Oxalobacter formigenes* to reduce Oxalates.

References

- Aganga, A.A., Tsopito, C.M. and Adogla-Bessa, T. (1998). Feed potential of Acacia species to ruminants in Botswana. Arch. Zootec. 47: 659-668.
- Agarwal, N., Kamra, D.N., Chatterjee, P.N., Kumar, R. and Chaudhary, L.C. (2008). In vitro Methanogenesis, Microbial Profile and Fermentation of Green Forages with Buffalo Rumen Liquor as Influenced by 2-Bromoethanesulphonic Acid. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 21(6): 818 – 823.
- Allam, A.M., Bakhshwain, A.A., Nagadi S.A. and Sallam S.M.A. (2012). Nutritive value assessment of some sub-tropical browses grown in arid region using in vitro gas production technique. J Food Agr Environ. 10(2): 1339-1343.

- Allison, M.J, Cook, H.M. and Dawson K.A. (1981). Selection of oxalate-degrading rumen bacteria in continuous cultures. *J Anim Sci.* 53: 810.
- Animut, G., Puchala, R., Goetsch, A.L., Patra, A.K., Sahlu, T., Varel, V.H. and Wells, J. (2008). Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. *Anim. Feed Sci. Technol.* 144: 212–227.
- AOAC. (1990). Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Arlington, VA.
- AOAC. (2000). Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis. 17th Edition. Washington, DC.
- Aregawi, T., Melaku, S. and Nigatu, L. (2008). Management and utilization of browse species as livestock feed in semi-arid district of North Ethiopia. *Livest. Res. Rural Dev.* 20(6): 86.
- Bakhashwain, A.A., Sallam, S.M.A. and Allam, A.M. (2010). Nutritive Value Assessment of Some Saudi Arabian Foliages by Gas Production Technique in vitro. *JKAU: Met., Env. & Arid Land Agric. Sci.* 21(1): 65-80.
- Bauchop, T. (1979). Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 148–158.
- Belenguer, A., Ben Bati, M., Hervás G, Toral P.G., Yáñez-Ruiz, D.R. and Frutos, P. (2013). Impact of oxalic acid on rumen function and bacterial community in sheep. *Animal.* 7(6): 940-7.
- Ben Salem, H., Nefzaoui, A. and Ben Salem, L. (2002). Supplementation of *Acacia Cyanophylla* Lindl. Foliage-based diets with barley or shrubs from arid areas (*Opuntia ficus indica* F. *inermis* and *Atriplex nummularia* L.) on growth and digestibility in Lambs. *Anim Feed Sci Technol.* 96 : 15-30.
- Ben Salem, H., Norman, H.C., Nefzaoui, A., Mayberry, D.E., Pearce, K.L. and Revell, D.K. (2010). Potential use of oldman saltbush (*Atriplex nummularia* Lindl.) in sheep and goat feeding. *Small Ruminant Res.* 91: 13-28.
- Bhatta, R., Uyeno, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Yabumoto, Y., Nonaka, I., Enishi, O. and Kurihara, M. (2009). Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *J. Dairy Sci.* 92: 5512–5522.
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F.J. and López S. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176: 78– 93.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94 : 223–253.
- Carafoli, E. (2007). The unusual history and unique properties of the calcium signal. In : Krebs J, Michalak M (eds) "Calcium: A Matter of Life or Death". Elsevier B.V.
- Cheeke, P.R. (1995). Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock. *J Anim Sci.* 73: 909-918.
- Cieslak, A., Zmora P., Pers-Kamczyc., E. and Szumacher-Strabel, M. (2012). Effects of tannins source (*Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation in vivo. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176: 102– 106.
- Clapham, D.E. (2007). Calcium signaling. *Cell.* 131(6): 1047–1058.
- Contreras-Padilla, M., Pérez-Torrero, E., Hernández-Urbiola, M.I., Hernández-Quevedo, G., Del Real, A., Rivera-Muñoz, E.M. and Rodríguez-García, M.E. (2011). Evaluation of oxalates and calcium in nopal pads (*Opuntia ficus-indica* var. *redonda*) at different maturity stages. *J Food Compos Anal.* 24: 38–43.
- Costa, R.G., Filho, E.M.B., Medeiros, A.N.d, Givisiez, P.E.N., Queiroga R.d.C.R.d.E. and Melo, A.A.S. (2009). Effects of increasing levels of cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L. Miller) in the diet of dairy goats and its contribution as a source of water. *Small Ruminant Res.* 82(1): 62–65.
- Degen, A.A., Becker, K., Makkar, H.P.S and Borowy, N. (1995). *Acacia saligna* as a fodder tree for desert livestock and the interaction of its tannins with fibre fractions. *J. Sci. Food Agric.* 68:65-71.
- Denman, S.E. and McSweeney, C.S. (2006). Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol Ecol.* 58: 572–582.
- Domínguez, D.C., Lopes, R., Holland, I.B. and Campbell A.K. (2011). Proteome analysis of *B. subtilis* in response to calcium. *J. Anal. Bioanal. Tech.* S6.
- Doreau, M. and Ferlay, A. (1995). Effect of dietary lipids on the ruminal metabolism in the rumen: a review. *Livest. Prod. Sci.* 43: 97–110.
- Durand, M. and Komisarczuk, S. (1988). Influence of major minerals on rumen microbiota. *J Nutr.* 118(2): 249-60.
- Edwards, A., Mlambo V., Cicero Lallo H.O., Garcia G.W. and Diptee M.D. (2012). In vitro ruminal fermentation of leaves from three tree forages in response to incremental levels of polyethylene glycol. *Open Journal of Animal Sciences.* 2(3): 142-149.
- Frutos, P., Hervàs, G., Ramos, G., Giráldez, F.J. and Montecon, 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.

- Getachew, G., Pittroff, W., Putnam, D.H., Dandekar, A., Goyal, S. and DePeters, E.J. (2008). The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on in vitro rumen fermentation and microbial protein synthesis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1(140): 444-461.
- Goel, G. and Makkar, H.P.S. (2012). Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Trop. Anim. Health Prod.* 4: 729-739.
- Griffiths, D.W. (1986). The inhibition of the digestive enzymes by polyphenolic compound, In: *Nutritional and Toxicological Significance of Enzymes Inhibitors in Foods*, Plenum press, N.Y., pp: 509-516.
- Guimarães-Beelen, P.M., Berchielli, T.T., Beelen R. and Medeiros, A.N. (2006). Influence of condensed tannins from Brazilian semi-arid legumes on ruminal degradability, microbial colonization and ruminal enzymatic activity in Saanen goats. *Small Ruminant Res.* 61: 35-44.
- Guragain, M., Lenaburg, D.L., Moore, F.S., Reutlinger I., Patrauchan, M.A. (2013). Calcium homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa* requires multiple transporters and modulates swarming motility. *Cell Calcium.* 54: 350-361
- Hegarty, R.S. (1999). Mechanisms for competitively reducing ruminal methanogens. *Aust. J. Agric. Res.* 50: 1299-1305.
- Hervás, G., Frutos, P., Giraldez, F.J., Mantecon, A.R. and Del Pino, M.C.A. (2003). Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 109: 65-78.
- Hess, H.D., Tiemann, T.T., Noto, F., Carulla, J.E. and Kreuzer, M., (2006). Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock. *Int. Congr. Ser.* 1293: 164-167.
- James, L.F. (1972). Oxalate toxicosis. *Clin. Toxicol.* 5: 231-243.
- Jayanegara, A., Goel, G., Makkar H.P.S. and Becker k. (2010). Reduction in Methane Emissions from Ruminants by Plant Secondary Metabolites: Effects of Polyphenols and Saponins. In: Odongo N.E, Garcia M and Viljoen G.J (eds) *Sustainable Improvement of Animal Production and Health*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. pp 151-157.
- Jouany, J.P. (1994). Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA Productions Animales.* 7(3): 207-225.
- Jun, H.S., Qi, M., Ha, J.K. and Forsberg, C.W. (2007). *Fibrobacter succinogenes*, a Dominant Fibrolytic Ruminal Bacterium: Transition to the Post Genomic Era. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20(5): 802 - 810.
- Kamra, D.N., Agarwal, N. and Chaudhary, L.C. (2006). Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *Int Congr Ser.* 1293: 156-163.
- Koike, S. and Kobayashi, Y. (2009). Fibrolytic rumen bacteria: their ecology and functions. *Asian-Austral J. Anim. Sci.* 22: 131-138.
- Krebs, G. L., Howard, D.M. and Dods, K. (2007). The Effects of Feeding *Acacia saligna* on Feed Intake, Nitrogen Balance and Rumen Metabolism in Sheep. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20(9): 1367-1373.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time 401 quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods.* 25 : 402-408.
- Longo, C., Abdalla, A.L., Liebich, J., Janzik, I., Hummel, J. and Correa, P.S. (2006). Südekum K.-H., Burauel P. Evaluation of the effects of tropical tanniferous plants on rumen microbiota using qRT PCR and DGGE analysis. *Czech J. Anim. Sci.* 58(3): 106-116.
- Machmuller, A., Soliva, C.R., Kreuzer, M. (2003). Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep, *Reprod. Nutr. Dev.* 43: 41-55.
- Makkar, H.P.S. (2003). *Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp: 43-54.
- Martin, C., Morgavi, D.P. and Doreau, M. (2010). Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal.* 4:351-365.
- Mcconn, M.M. and Nakata, P.A. (2004). Oxalate Reduces Calcium Availability in the Pads of the Prickly Pear Cactus through Formation of Calcium Oxalate Crystals. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1371-1374.
- McSweeney, C., Palmer, B., Bunch, R. and Krause, D. (2001). Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *J. Appl. Microbiol.* 90: 78-88.
- McSweeney, C.S., Palmer, B., McNeill, D.M. and Krause, D.O. (2001). Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Feed Sci. Technol.* 91: 83-93.
- Menke, K.H. and Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28: 7-55.
- Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. and Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. *J AGR SC, Cambridge.* 97: 217-222.

- Mertens, D.R. (1997). Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80(8): 1463-1469.
- Mlambo, V., Mould, F.L., Sikosana, J.L.N., Smith, T., Owen E. and Mueller-Harvey I. (2008). Chemical composition and *in vitro* fermentation of tannin-rich tree fruits. *Anim. Feed Sci. Technol.* 140: 402-417.
- Mlambo, V., Mould, F.L., Smith, T., Owen, E., Sikosana, J.L.N. and Mueller-Harvey, I. (2009). *In vitro* biological activity of tannins from Acacia and other tree fruits: Correlations with colorimetric and gravimetric phenolic assays. *S Afr J Anim Sci.* 39(2).
- Mohammadabadi, T., Chaji, M. and Tabatabaei, S. (2010). The effect of Tannic Acid on *in vitro* Gas Production and Rumen Fermentation of Sunflower Meal. *J Anim Vet Adv.* 9(2): 277-280.
- Monforte-Briceño, G.E., Sandoval-Castro, C.A., Ramírez-Avilés, L. and Leal, C.M.C. (2005). Defaunating capacity of tropical fodder trees: effects of polyethylene glycol and its relationship to *in vitro* gas production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123: 313-327.
- Mueller-Harvey, I. (2006). Unraveling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J Sci Food Agric.* 86: 2010-2037.
- Mulas, M. and Mulas, G. (2009). The strategic use of atriplex and opuntia to combat desertification. In: Bellavite D, Zucca C, Belkheiri O and Saidi H (eds) *Etudes techniques et scientifiques à l'appui de l'implémentation du projet démonstratif SMAP de Lutte contre la Désertification*. NRD, Université des Etudes de Sassari, Italie.
- Nadkarni, M.A., Martin, F.E., Jacques, N.A. and Hunter, N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology.* 148 : 257-266.
- Nagaraja, T.G., Newbold, C.J., Van Nevel C.J. and Meyer D.I. (1997). Manipulation of ruminal fermentation. In: Hobson P.N, Stewart C.S (eds) *Ruminal Microbial Ecosystem*, Blackie Academic & Professional, London, pp. 523-632.
- Nefzaoui, A. and Ben Salem, H. (2001). *Opuntia* spp: a strategic fodder and efficient tool to combat desertification in the WANA region. In: Mondragon C, Gonzalez S (eds) *Cactus (Opuntia spp.) as forage: FAO Plant Production and protection Paper*, 169: pp.73-90.
- Ogimoto, K. and Imai, S. (1981). *Atlas of Rumen Microbiology*. Japan Scientific Society Press, Tokyo, Japan.
- Patra, A.K. and Saxena, J. (2009). Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Anton. van Leeuwen.* 96: 363-375.
- Robles, A.B., Ruiz-Mirazo, J., Ramos, M.E. and González-Rebollar, J.L. (2008). Role of livestock grazing in sustainable use, naturalness promotion in naturalization of marginal ecosystems of southeastern Spain (Andalusia). In: Rigueiro-Rodríguez A, McAdam J, Mosquera-Losada M.R (eds) *Agroforestry in Europe, Current status and future prospects*. *Adv Agroforestry vol. 6*. Springer, Netherlands. pp. 211-231.
- Sallam, S.M.A., Bueno, I.C.S., Godoy, P.B., Nozella, E.F., Vitti, D.M.S.S. and Abdalla, A.L. (2010). Ruminant fermentation of tannins bioactivity of some browses using a semi-automated gas production technique. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 12: 1-10.
- SAS. (2000). *SAS/STAT® User's Guide, 8.1. 4th Edition*. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Sharp, R., Ziemer C.J., Stem M.D. and Stahl. (1998). Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model system. *FEMS Microbiol Ecol.* 26: 71-78.
- Singh, K.M., Pandya, P.R., Parnerkar, S., Tripathi, A.K., Rank, D.N., Kothari, R.K., Joshi, C.G. and Joshi C.G. (2011). Molecular identification of methanogenic archaea from surti buffaloes (*Bubalus bubalis*), reveals more hydrogenotrophic methanogens phylotypes. *BRAZ J MICROBIOL.* 42: 132-139.
- Sliwinski, B., Soliva, C.R., Machmüller, A. and Kreuzer, M. (2002). Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 101: 101-114.
- Soltan, Y.A., Morsy, A.S., Sallam, S.M.A., Louvandini, H. and Abdalla, A.L. (2012). Comparative *in vitro* evaluation of forage legumes (prosopis, acacia, atriplex, and leucaena) on ruminal fermentation and methanogenesis. *J Anim Feed Sci.* 21: 759-772.
- Szumacher-Strabel, M. and Cieslak, A. (2012). Dietary possibilities to mitigate rumen methane and ammonia production. In: Liu G (Ed.) *Greenhouse Gases Capturing, Utilization and Reduction*. Intech, Rijeka, Croatia.
- Tavendale, M.H., Meagher, L.P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G.T. and Sivakumaran, S. (2005). Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 403-419.
- Tokura, M., Chagan, I., Ushida, K. and Kojima, Y. (1999). Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates, *Curr. Microbiol.* 39: 123-128.
- Van Soest, P.J., Roberston, J.B. and 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.

- Vasta, V., Nudda, A., Cannas, A., Lanza, M. and Priolo, A. (2008). Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. *Anim Feed Sci Technol.* 147: 223–246.
- Vinh, N.T., Wanapat, M., Khjomsart, P. and Kongmun, P. (2011). Studies of diversity of rumen microorganisms and fermentation in Swamp Buffalo fed different diets. *J Anim Vet Adv.* 10(4): 406-414.
- Waghorn, G.C. and McNabb, W.C. (2003). Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminant. *Proc Nutr Soc.* 62: 383-392.
- Wanderley, W.L., Ferreira, M.A., Andrade, D.K.B., Vêras, A.S.C., Farias, I., Lima, L.E. and Dias, A.M.A. (2002). Replacement of forage cactus (*Opuntia ficus indica* Mill) for sorghum silage (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) in the dairy cows feeding. *Rev.Bras.Zootec.* 31 : 273–281.
- Wang, C.T., Yang, C.M.J., Chen, Z.S. (2012). Rumen microbial volatile fatty acids in relation to oxidation reduction potential and electricity generation from straw in microbial fuel cells. *Biomass Bioenerg.* 37: 318-329.
- Weatherburn, M.W. (1967). Phenol hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal.Chem.* 39 : 971–974.

Plant rich secondary compounds have antimicrobial effects by acting against different rumen microbial populations. The current thesis is based on the study of the effects of fodder shrubs (spineless cactus, *Acacia nilotica* and *Acacia cyanophylla*), rich in secondary metabolites, alone or in various mixtures on the metabolic activity of rumen microbiota of cattle. The qualitative and quantitative determination of *in vitro* fermentation gases is used as a marker of fermentation substrates. The Monitoring of quantitative fluctuations in the equilibrium of the major populations of rumen microbiota is performed by a molecular biology technique, the real-time PCR.

Based on the chemical analysis of the studied substrates, Acacias have the advantage of being rich in crude protein but with the disadvantage of being too rich in lignin (indigestible cell wall fraction) and in polyphenols, mainly condensed tannins (TCT) which are anti-nutritional factors. Moreover, cactus cladodes are rich in energy, water and minerals. However, they seem to be poor in crude protein content and high in total oxalates, these compounds are anti-nutritional compounds that are able to bind calcium, making this anion unavailable for the animal. In general, the percentage of shrubs in the mixture negatively affects their *in vitro* digestibility and microbial fermentation ($p < 0,001$). However, the proportion of 30% incorporated cactus stands out positively from other mixtures by synergy in terms of gas production, digestibility and a remarkable fermentation pattern, indicating a balanced combination of energy and nitrogen content of the ration, nutritionally for the animal. The TCT contained in *A.cyanophylla* seem to influence significantly ruminal digestion and their inhibitory effects are more pronounced than those of *A. nilotica*.

Analysis of the methanogenic activity of rumen microbiota shows that the spineless cactus and Acacias significantly reduce the production of CH_4 ($p < 0,0001$). The impact of TCT contained in the Acacias, on reducing CH_4 production is more tangible, however with a higher effect for *A.cyanophylla* relatively to *A.nilotica*. CH_4 production is decreased by up to 62,5% for 60% of *A.cyanophylla*, added to vetch-oat hay. This indicates the use of *Acacia* to reduce energy losses and, in turn, minimize atmospheric emissions of CH_4 and the adverse effects on the environment (greenhouse effect and global warming).

Molecular analysis reveals important changes in the microbial profile of the rumen: a significant imbalance among cellulolytic groups, including, *Fibrobacter succinogenes* population which increases relatively with all the substrates, unlike *Ruminococcus flavefaciens* species which decrease significantly ($p < 0,05$), suggesting a selective effect of tannins on the latter (from 60% of *Acacia* in the mixture). A significant anti protozoan effect ($p < 0,05$) of shrub species is also observed in parallel to the inhibition of the production of ammonia. Furthermore, the tannins content of *A.nilotica* and *A.cyanophylla* have antimethanogenic activities but without, apparently, direct effects on relative abundance of methanogenic *archaea* populations, indicating a potential resistance of this population to tannins of the studied species. This study also showed an antimicrobial activity of oxalates content of spineless cactus cladodes but confirmation would require further investigations.

Key words: Fodder shrubs, *In vitro* fermentescibility, rumen microbiota, Real time PCR, Tannins, Oxalates.

النباتات الغنية بالمركبات الثانوية لها تأثيرات مضادة للميكروبات على مجموعات مختلفة من البطن. تركز هذه الأطروحة على دراسة آثار الشجيرات العلفية (الصبار، *A. nilotica* و *A. cyanophylla*) الغنية بنواتج الأيض الثانوية وحدها أو في خليط مختلف على النشاط الأيضي لجراثيم البطن الماشية. التحديد النوعي والكمي للغاز المتخمر في المختبر يستخدم كمحدد لركائز التخمر. رصد التقلبات الكمية لجراثيم البطن الرئيسية يتحقق من خلال تقنية البيولوجيا الجزيئية، في الوقت الحقيقي.

استنادا إلى التحليل الكيميائي للركائز المدروسة، الـ *Acacia* لديها ميزة الغنى بالبروتين الخام ولكن وجود اللغنين بكثرة (خلية الجدار غير قابل للهضم) والبوليفينول أيضا أساسا، العفص المكثف (TCT)، والتي هي مضادة للتغذية. خلاف ذلك مضارب الصبار غنية بالطاقة، المياه والمعادن ومع ذلك فإنها فقيرة من البروتين الخام و من المستويات العالية من الأوكزالاات. هذه المركبات هي مضادة للتغذية وقادرة على الإرتباط بالكالسيوم مما يجعل هذا الأنيون غير متوفر للحيوان بشكل عام، إن النسبة المئوية من الشجيرات في الخليط يؤثر سلبا على الهضم في المختبر والتخمر الميكروبي ($p < 0,001$) ومع ذلك فإن نسبة 30 % الصبار المضمنة تبرز بشكل إيجابي من مخاليط أخرى بواسطة التآزر من حيث إنتاج الغاز، هضم ونمط التخمر ملحوظا، مما يدل على مزيج متوازن من الطاقة والنيتروجين محتوى التميونية، من الناحية التغذوية لهذا الحيوان و TCT الواردة في *A. cyanophylla* يبدو بشكل كبير تؤثر على الهضم الكرش وتأثيراتها المثبطة هي أكثر وضوحا من تلك التي في *A. nilotica*.

تحليل النشاط الميثان لجراثيم البطن يدل على أن الـ *Acacia* و *cactus inerme* يخفضون بشكل كبير في إنتاج CH_4 ($p < 0,001$). إن تأثير السلبي للعفص المكثف، الموجود في الـ *Acacia*، على خفض إنتاج CH_4 هو الأكثر لموسا، مع وجود تأثير تأثير أعلى عند *A. cyanophylla* نسبة إلى *A. nilotica*. يتم تقليل CH_4 إلى أقل من 62.5% إلى 60% *A. cyanophylla* مضافة لعلف vesce –avoine. مما يشير إلى إمكانية لاستخدام الـ *Acacia* للحد من خسائر الطاقة، وبالتالي التقليل من انبعاثات الـ CH_4 و من آثاره السلبية على البيئة (تأثير الاحتباس الحراري وارتفاع درجة حرارة الأرض).

التحليل الجزيئي يكشف عن تغييرات كبيرة في نشاط ميكروبات البطن. يظهر خلل كبير بين جماعات محللة السيللوز و خصوصا عند *fibrobacter succinogenes* والذي يزيد نسبيا مع جميع الركائز. على عكس أنواع *Ruminococcus flavefaciens* والذي يقلل إلى حد معبر ($p < 0,05$) مما يشير إلى تأثير انتقائي للعفص على هذه الجماعات. النتائج تبين أيضا تأثير معبر للشجيرات المدروسة ($P < 0.05$) ضد الحيوانات الأولية ويلاحظ أيضا بالتوازي مع تثبيط إنتاج الأمونيا، بالإضافة إلى ذلك العفص الموجود في *A. nilotica* و *A. cyanophylla* له أنشطة مكافحة لنسوء الميثان لكن دون آثار مباشرة للتواجد النسبي لـ *Archeae* المنتجة للميثان، مما يشير إلى المقاومة الفعالة لهذه للأخيرة للعفص الموجود في الأنواع المدروسة. كما أظهرت هذه الدراسة نشاط مضاد للميكروبات للأوكزالاات الواردة في *Cactus* ولكن هذه الآلية تتطلب تقييما مكتملا.

كلمات البحث: الشجيرات العلفية، التخمر في المختبر، الجراثيم الكرش، PCR الوقت الحقيقي، المركبات الثانوية، العفص، الأوكزالاات.

Nom : CHENTLI Prénom : AMIRA	Date de soutenance :															
Titre : Valorisation nutritionnelle d'<i>Opuntia</i> et <i>Acacia</i> spp. dans l'alimentation des ruminants. Effets de hautes teneurs en tannins et oxalates sur l'activité du microbiote ruminal																
<p>Résumé</p> <p>Les plantes riches en composés secondaires ont des effets antimicrobiens sur les différentes populations du rumen. Cette thèse est focalisée sur l'étude des effets d'arbustes fourragers (cactus inerme, <i>Acacia nilotica</i> et <i>Acacia cyanophylla</i>) riches en métabolites secondaires, seuls ou en divers mélanges sur l'activité métabolique du microbiote ruminal de bovins. Le dosage qualitatif et quantitatif des gaz fermentaires <i>in vitro</i> est utilisé comme marqueur de fermentation des substrats. Le suivi des fluctuations quantitatives de l'équilibre des populations majeures du microbiote ruminal est réalisé par une technique de biologie moléculaire, la PCR en temps réel.</p> <p>Sur la base de l'analyse chimique des substrats étudiés, les Acacias présentent l'avantage d'être riches en protéines brutes mais l'inconvénient d'une forte teneur en lignine (fraction pariétale indigestible) et en polyphénols, essentiellement des tannins condensés totaux (TCT) qui constituent un facteur antinutritionnel. Par ailleurs, les raquettes de cactus sont riches en énergie, en eau et en minéraux mais elles sont pauvres en protéines brutes et sont aussi riches en oxalates totaux, des composés antinutritionnels susceptibles de se lier au calcium en le rendant ainsi indisponible pour l'animal.</p> <p>En général, le pourcentage d'arbustes dans le mélange influence négativement leur digestibilité <i>in vitro</i> et la fermentation microbienne ($p < 0,001$). Cependant, la proportion 30% de cactus incorporé se distingue positivement des autres mixtures par une synergie en termes de production de gaz, de digestibilité et un profil fermentaire remarquable, indiquant une association équilibrée du contenu énergétique et azoté de cette ration, sur le plan nutritionnel pour l'animal. Les TCT contenus dans <i>A. cyanophylla</i> semblent influencer considérablement la digestion ruminale et leur effets inhibiteurs sont bien plus prononcés que ceux de <i>A. nilotica</i>.</p> <p>L'analyse de l'activité méthanogène du microbiote ruminal montre que le cactus inerme et les Acacias réduisent significativement la production de CH₄ ($p < 0,001$). L'impact antagoniste des TCT contenus dans les Acacias sur la méthanogenèse est plus tangible, avec néanmoins un effet plus élevé pour <i>A. cyanophylla</i> relativement à <i>A. nilotica</i>. Le CH₄ est réduit jusqu'à moins de 62,5% pour 60% d'<i>A. cyanophylla</i> ajoutés au foin de vesce avoine. Ce qui recommanderait l'utilisation des Acacias pour réduire les pertes en énergie et, par ricochet, minimiser les émissions atmosphériques de CH₄ et leurs effets néfastes sur l'environnement (effet de serre et réchauffement climatique).</p> <p>L'analyse moléculaire révèle des changements importants dans le profil microbien du rumen : un déséquilibre notable parmi les groupements cellulolytiques, notamment la population de <i>fibrobacter succinogenes</i> qui augmente relativement en présence de tous les substrats, au contraire de <i>Ruminococcus flavefaciens</i> dont la population diminue significativement ($p < 0,05$), suggérant un effet sélectif des tannins sur ces derniers (à partir de 60% d'<i>Acacia</i> dans le mélange). Un effet anti protozoaires significatif ($p < 0,05$) des espèces arbustives est également observé en parallèle à l'inhibition de la production d'ammoniac. En outre, les Tanins contenus dans <i>A. nilotica</i> et <i>A. cyanophylla</i> ont des activités antiméthanogènes mais sans effets directs avérés sur l'abondance relative de la population des archées méthanogènes, indiquant une résistance potentielle de cette population aux tannins des espèces étudiées.</p> <p>Cette étude montre également une activité antimicrobienne des oxalates contenus dans les raquettes de cactus inerme mais sa confirmation nécessiterait des investigations complémentaires.</p>																
Mots clés : Arbustes fourragers, fermentescibilité <i>in vitro</i> , microbiote ruminal, PCR en temps réel, composés secondaires, tannins, oxalates.																
Laboratoires de recherche : Laboratoire de Génie Microbiologique et Application. Université Constantine 1 / Algérie. Laboratoire des Sciences Biotechnologiques et Agroalimentaires (SONAS). Université d'Angers / France																
Devant le Jury : <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 15%;">Présidente :</td> <td style="width: 35%;">Mme. MERAIHI Z.</td> <td style="width: 50%;">Professeur, université des Frères Mentouri Constantine/Algérie</td> </tr> <tr> <td>Rapporteur :</td> <td>Mr. BOUSSEBOUA H.</td> <td>Professeur, ENSB, Constantine/Algérie</td> </tr> <tr> <td>Examineurs :</td> <td>Mme MECHAKRA A.</td> <td>Professeur, université des Frères Mentouri Constantine /Algérie</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Mr. GHOU L M</td> <td>Professeur, université Sétif 1 /Algérie</td> </tr> <tr> <td>Invitée :</td> <td>Mme. GILLMANN L.</td> <td>Maitre de conférence A, université d'Angers /France</td> </tr> </table>		Présidente :	Mme. MERAIHI Z.	Professeur, université des Frères Mentouri Constantine/Algérie	Rapporteur :	Mr. BOUSSEBOUA H.	Professeur, ENSB, Constantine/Algérie	Examineurs :	Mme MECHAKRA A.	Professeur, université des Frères Mentouri Constantine /Algérie		Mr. GHOU L M	Professeur, université Sétif 1 /Algérie	Invitée :	Mme. GILLMANN L.	Maitre de conférence A, université d'Angers /France
Présidente :	Mme. MERAIHI Z.	Professeur, université des Frères Mentouri Constantine/Algérie														
Rapporteur :	Mr. BOUSSEBOUA H.	Professeur, ENSB, Constantine/Algérie														
Examineurs :	Mme MECHAKRA A.	Professeur, université des Frères Mentouri Constantine /Algérie														
	Mr. GHOU L M	Professeur, université Sétif 1 /Algérie														
Invitée :	Mme. GILLMANN L.	Maitre de conférence A, université d'Angers /France														