

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

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



N° d'ordre: 005/Mag/2011

N° de Série : 005/SN/2011

*Mémoire
Pour l'obtention du Diplôme de Magister en
Microbiologie appliquée
Option : Biotechnologie microbienne*

Thème

*La valorisation nutritionnelle des margines et de leur
impact sur la réduction de la méthanogénèse ruminale chez
l'ovin*

Préparé par :

LEULMI Nassima

Soutenue le : 16/01/2011

Devant le jury :

| | | |
|--------------|-------------------|-----------------------------------|
| Président : | Mme. MERAIHI Z. | Prof. Univ. Mentouri Constantine. |
| Rapporteur : | Mr. ARHAB R. | M.C. Univ. de Tébessa. |
| Examineurs : | Mr. BOUSSEBOUA H. | Prof. Univ. Mentouri Constantine. |
| | Mr. JABRI B. | M.C. Univ. de Tébessa. |

Année Universitaire: 2010–2011.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Génie Microbiologique et applications de l'université Mentouri Constantine.

Je remercie très respectueusement le Directeur Mr. BOUSSEBOUA H. Professeur à l'université Mentouri Constantine. Son savoir et ses conseils m'ont été très précieux tout au long de la réalisation de ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude et mes vifs remerciements à mon Directeur de mémoire Mr. ARHAB R. Maître de conférences à l'université de Tébessa pour son aide, sa disponibilité, son dévouement et sa patience.

Je remercie M^{me} MERAIHI Z. pour l'honneur qu'elle me fait en présidant le jury.

Mr.DJABRI B. Maître de conférences à l'université de Tébessa n'a pas hésité à accepté l'examen de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance.

Merci à Mr. BOUSSEBOUA H. professeur à l'université Mentouri Constantine qui me fait l'honneur d'évaluer ce travail.

Enfin, mes sincères remerciements s'adressent à toutes les personnes qui m'ont aidé, encouragé et permis de persévérer dans mon travail.

LEULMI Nassima

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

La mémoire de mon père qui aurait été si fier de moi

La mémoire de mon frère Karim disparu trop tôt

Mon adorable mère pour son soutien et ses encouragements : Merci mamam

Ma sœur Nadia (je t'aime beaucoup), son mari et leurs enfants (Wassim , Anis)

Mes frères (Nori, Walid, Khalil, Imed)

Ma précieuse Zineb

Tous mes proches

Mes amis et camarades de promotion

Tous mes collègues de laboratoire

Mes amies de DES (Safia, Mouna, Hafida, Nadjat, Amina, Zohor)

À tous ceux que j'aime.

Nassima

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|----|
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Liste des abréviations | |
| Introduction | 01 |
| Revue bibliographique | |
| 1. Secteur oléicole en Algérie | 02 |
| 1-1 Système d'extraction d'huile d'olive | 02 |
| 1.2. Sous produits de l'oléiculture | 02 |
| 1.3. Les margines | 04 |
| 1.3.1. Fraction minérale | 04 |
| 1.3.2. Fraction organique | 04 |
| 2. Traitement et valorisation des margines | 06 |
| 2.1. Pouvoir polluant des margines | 06 |
| 2.2. Technologies de traitement des margines | 08 |
| 2.3. Procédés de valorisations des margines | 08 |
| 2.3.1. Principales voies de valorisation des margines | 08 |
| 2.3.2. Facteurs affectant la valorisation nutritionnelle des margines | 12 |
| 3. Digestion anaérobie des margines par le microbiote ruminal | 12 |
| 3.1. Aspects microbiologiques de la digestion ruminale des margines | 12 |
| 3.1.1. Bactéries | 13 |
| 3.1.2. <i>Archaea</i> méthanogènes | 13 |
| 3.1.3. Protozoaires | 14 |
| 3.1.4. Champignons | 14 |
| 3.2. Aspects biochimiques de la digestion ruminale des margines | 15 |
| 3.2.1. Voies de dégradation des composés nutritifs | 15 |
| 3.2.2. Voies de dégradations des composés antinutritifs (composés phénoliques) | 16 |
| 4. Mode d'Action des polyphénols sur le microbiote ruminal | 20 |
| 5. Mécanismes de résistance et d'adaptation microbienne aux composés phénoliques | 20 |
| 6. Possibilités d'amélioration de la dégradation et de la valeur nutritive des margines | 21 |

Matériel et méthodes

| | |
|---|----|
| 1. Echantillonnage | 24 |
| 2. Analyse chimique des substrats | 24 |
| 2.1. Matière sèche (MS) | 24 |
| 2.2. Matière organique et minérale | 24 |
| 2.3. Dosage des sucres totaux | 24 |
| 2.4. Extraction des polyphénols totaux | 26 |
| - Délipidation des margines | 26 |
| - Extraction à l'acétate d'éthyle | 26 |
| 2.5. Dosage des polyphénols totaux | 26 |
| 2.6. Dosage des tanins totaux | 27 |
| 2.7. Dosage des tanins condensés | 27 |
| 3. Etude de la digestibilité <i>in vitro</i> des margines | 27 |
| 3.1. Technique de production de gaz <i>in vitro</i> | 27 |
| 3.2. Description du système fermentaire | 27 |
| 3.3. L'inoculum | 27 |
| 3.3.1. Préparation de l'inoculum | 28 |
| 3.3.2. Inoculation | 28 |
| 4. Incubation et mesure des gaz produits | 28 |
| 4.1. Analyse qualitative des gaz | 30 |
| 4.2. Détermination des paramètres caractéristiques de la production de gaz <i>in vitro</i> | 30 |
| 4.3. Evolution du pH | 30 |
| 4.4. Dénombrements protozoaires | 30 |
| 4.5. Dosage de l'azote ammoniacal | 32 |
| 5. La dégradation des composés phénoliques des margines en anaérobiose <i>in vitro</i> | 32 |
| 5.1. L'inoculation | 32 |
| 5.2. Cinétique de biodégradation et dosage des polyphénols | 33 |
| 6. Analyse statistique | 33 |

1. Analyse chimique

1.1. Composition en macronutriments

1.1.1. Matière sèche

1.1.2. Matière organique

1.1.3. Matière minérale

1.1.4. Sucres totaux

1.2. Composition en phytonutriments

2. Fermentation *in vitro* des margines par le microbiote ruminal

2.1. Cinétique de la production de gaz

2.2. Volume de gaz produit

2.2.3. Paramètres cinétiques à la production de gaz *in vitro*

2.2. Profil fermentaires

2.3. Paramètres fermentaires

- pH
- Production d'ammoniaque
- Protozoaires

3. Influence du contenu phénoliques des margines sur l'activité ruminale

3.1. Effet des tanins

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

3.1.2. Paramètres cinétiques modélisés

3.1.3. Profil fermentaire

3.1.3. Paramètres fermentaires

- pH
- Production d'ammoniaque
- Protozoaires

4. Cinétique de biodégradation de contenue phénoliques des margines par le microbiote ruminal

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

| | |
|-----------------|-------------------------------------|
| ACLG | Acides gras à longues chaînes |
| CH ₄ | Méthane |
| CO ₂ | Dioxyde de carbone |
| E.P.S | Exopolysaccharides |
| g | Gravité |
| h | Heure |
| M.F.S. | Methylgreen-formalin-saline |
| MES | Matière en suspension |
| mg | Milligramme |
| min | Minute |
| ml | Millilitre |
| MM | Matière minérale |
| MO | Matière organique |
| MS | Matière sèche |
| N | Normalité |
| P.O.U | Protéines d'origines unicellulaires |
| PEG | Polyéthylène glycol |
| PS | Phénols simples |
| PT | Phénols totaux |
| PVPP | Polyvinyl polypurrolidone |
| SA | Solution A |
| ST | Sucre totaux |
| TC | Tanins condensés |
| tr/min | Tour pas minute |
| TT | Tanins totaux |
| V _b | Volume de gaz du blanc |

Liste des figures

| Figures | Titres | Pages |
|------------------|---|--------------|
| Figure 1 | Processus d'extraction de l'huile d'olive. | 03 |
| Figure 2 | Conséquences environnementales des rejets de margines dans le milieu nature. | 07 |
| Figure 3 | Principaux voies de valorisation et de traitement des margines. | 10 |
| Figure 4 | Conversion biologique des composants de la margine en anaérobiose. | 11 |
| Figure 5 | Dégradation anaérobie des composés phénoliques via la voie de benzoyl-CoA. | 17 |
| Figure 6 | Conversion de gallate en phloroglucinol par la microflore ruminale. | 19 |
| Figure 7 | Méthode d'extraction des polyphénols des margines. | 25 |
| Figure 8 | La chambre de comptage de la cellule de Malassez. | 29 |
| Figure 9 | Schéma descriptif de la cellule de Malassez. | 31 |
| Figure 10 | Cinétique modélisée de production de gaz due à la fermentation <i>in vitro</i> des margines et du foin de vesce-avoine. | 37 |
| Figure 11 | Cinétique de production de dioxyde de carbone et du méthane dus à la fermentation <i>in vitro</i> des margines et du foin de vesce-avoine. | 41 |
| Figure 12 | Photographies des protozoaires observés par microscope optique (Gx50) (Résolution 12 millions pixels – Sony cyber shot T900) | 45 |
| Figure 13 | Cinétique modélisés de la production de gaz des margines et du foin de vesce-avoine en présence et en absence de PEG | 47 |
| Figure 14 | Influence des tanins totaux sur la cinétique de production de CO ₂ et de CH ₄ des margines et de foin de vesce-avoine | 49 |
| Figure 15 | Cinétique de biodégradation anaérobie par le microbiote ruminal d'ovins des phénols totaux (a) et des phénols simples (b) présents dans les margines. | 53 |

Liste des tableaux

| Tableaux | Titres | Pages |
|-------------------|--|-------|
| Tableau 1 | Les principaux composés phénoliques des margines. | 05 |
| Tableau 2 | Technologies de traitement appliquées sur les margines. | 09 |
| Tableau 3 | Composition chimique de la pâte des margines obtenue par le procédé Dalmolive. | 22 |
| Tableau 4. | Composition en macronutriments et en micronutriments (% de MS) des margines et du foin de vesce-avoine. | 34 |
| Tableau 5 | Production cumulative de gaz (ml) et paramètres cinétiques modélisés des margines et du foin de vesce-avoine. | 37 |
| Tableau 6 | Analyse qualitative et quantitative du pool gazeux (productions de méthane et du dioxyde de carbone) engendré par la fermentation <i>in vitro</i> de la margine et du foin de vesce-avoine. | 41 |
| Tableau 7 | Paramètres fermentaires (pH, N-NH ₃ (mg/ml) et nombre de protozoaires (cellules/ml) de la dégradation <i>in vitro</i> des margines et du foin de vesce-avoine. | 43 |
| Tableau 8 | Effet des tanins totaux sur la production cumulative de gaz (ml) et les paramètres cinétiques modélisés des margines et du foin de vesce-avoine. | 47 |
| Tableau 9 | Influence des tanins totaux sur le profil fermentaire (productions de méthane et du dioxyde de carbone) des margines et du foin de vesce-avoine. | 49 |
| Tableau 10 | Effet des tanins totaux sur les paramètres fermentaires (pH, N-NH ₃ (mg/ml) et nombre de protozoaires (cellules/ml)) de la dégradation <i>in vitro</i> des margines et du foin de vesce-avoine. | 51 |

INTRODUCTION

L'industrie oléicole est une activité économique importante, concentrée principalement dans les pays méditerranéens qui tiennent environ 95% de la production mondiale, dont 1% pour l'Algérie en 2001 [1]. Comme toutes les industries agro-alimentaires, l'opération d'extraction nécessite de grandes quantités d'eau, par conséquent cette industrie engendre d'importantes quantités d'effluents liquides (les margines). Les margines, ou eaux de végétation, sont des rejets liquides très riches en matières organiques (composés phénoliques, lipides), souvent répandues en l'état dans la nature, de manière incontrôlée sur les sols agricoles ou parfois stockées provisoirement dans des cuves, exposant ainsi les systèmes eau-sol-plante, à une pollution inéluctable. Différents traitements d'épuration leurs sont appliqués : biologiques, physiques chimiques. Coûteux et encore insuffisants, ces traitements consistent tous à réduire leur impact sur l'environnement [2,3].

Dans le souci de réduire les coûts des différents traitements appliqués aux margines et de rationaliser la gestion de leurs rejets ou de les valoriser, des recherches sont orientées sur la valorisation de leurs effluents dans divers domaines : compostage, agriculture et même dans l'industrie pharmaceutique [4].

Dans ce contexte, cette étude a pour objectif d'évaluer le potentiel nutritionnel de ce substrat dans l'alimentation ovine, ainsi que ses capacités anti-nutritionnelles présumées liées à sa richesse avérée en composés phénoliques. Par rapport au foin de vesce-avoine, retenu comme témoin, le profil de métabolisation des margines par le microbiote ruminal d'ovins est déterminé *in vitro* sous anaérobiose. De même que divers essais sont menés pour permettre l'évaluation de leur digestibilité ainsi que l'effet spécifique de leurs tanins, tour à tour masqués en présence de polyéthylène glycol (PEG) ou testés en l'état dans le milieu. Dans tous ces cas l'impact sur la méthanogénèse ruminale est établi.

Revue bibliographique

1. Secteur oléicole en Algérie

Le patrimoine oléicole mondial compte actuellement environ 750 millions d'oliviers cultivés sur une superficie de 9,23 millions d'hectares. Les pays méditerranéens comptent 715 millions d'oliviers sur une superficie d'environ 8.16 millions d'hectares, soit 95 % du patrimoine oléicole mondial [5, 6,7].

L'Algérie fait partie des principaux pays méditerranéens dont le climat est des plus propices à la culture de l'olivier. Elle se positionne après l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Tunisie qui sont par ordre d'importance, les plus gros producteurs d'huile d'olive [7]. Le patrimoine oléicole algérien est estimé à 32 millions d'oliviers, ce qui représente 4,26% du patrimoine mondial. La production annuelle en huile a atteint 35.000 tonnes et celle de l'olive de table 80.000 tonnes [8].

1-1 Système d'extraction l'huile d'olive

Avec le développement du secteur oléicole, les systèmes traditionnels discontinus (lavage des olives, broyage mécanique, malaxage) sont actuellement remplacés par des équipements modernes. Ce perfectionnement, moins onéreux, permet d'extraire l'huile en continue à travers des phases successives et la séparation par centrifugation de l'huile des eaux de végétation [9]. Trois systèmes d'extraction sont à présent utilisés (fig. 1) : procédés discontinus ou systèmes à presses et procédés continus ou systèmes à centrifugation. Ce dernier se déroule soit selon un procédé continu à trois phases ou en un procédé continu à deux phases (procédé écologique) [10].

1.2. Sous produits de l'oléiculture

L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile (l'huile d'olive vierge et l'huile de grignon), engendre la production de deux résidus : un liquide et l'autre solide [11].

- Margines ou eaux de végétation : sont des effluents liquides, parfois nommés alpechine [12]. Le pressage de 1 tonne d'olives produit en moyenne 1,5 tonnes de margines avec les modes de production modernes [13].

- Grignons ou tourteaux d'olive : sont des résidus solides issus de la première pression ou centrifugation, ils sont formés des pulpes et des noyaux d'olives. Ce produit peut être transformé en un produit destiné à l'alimentation animale ou en huile dite : grignons d'olive après extraction chimique [14,15].

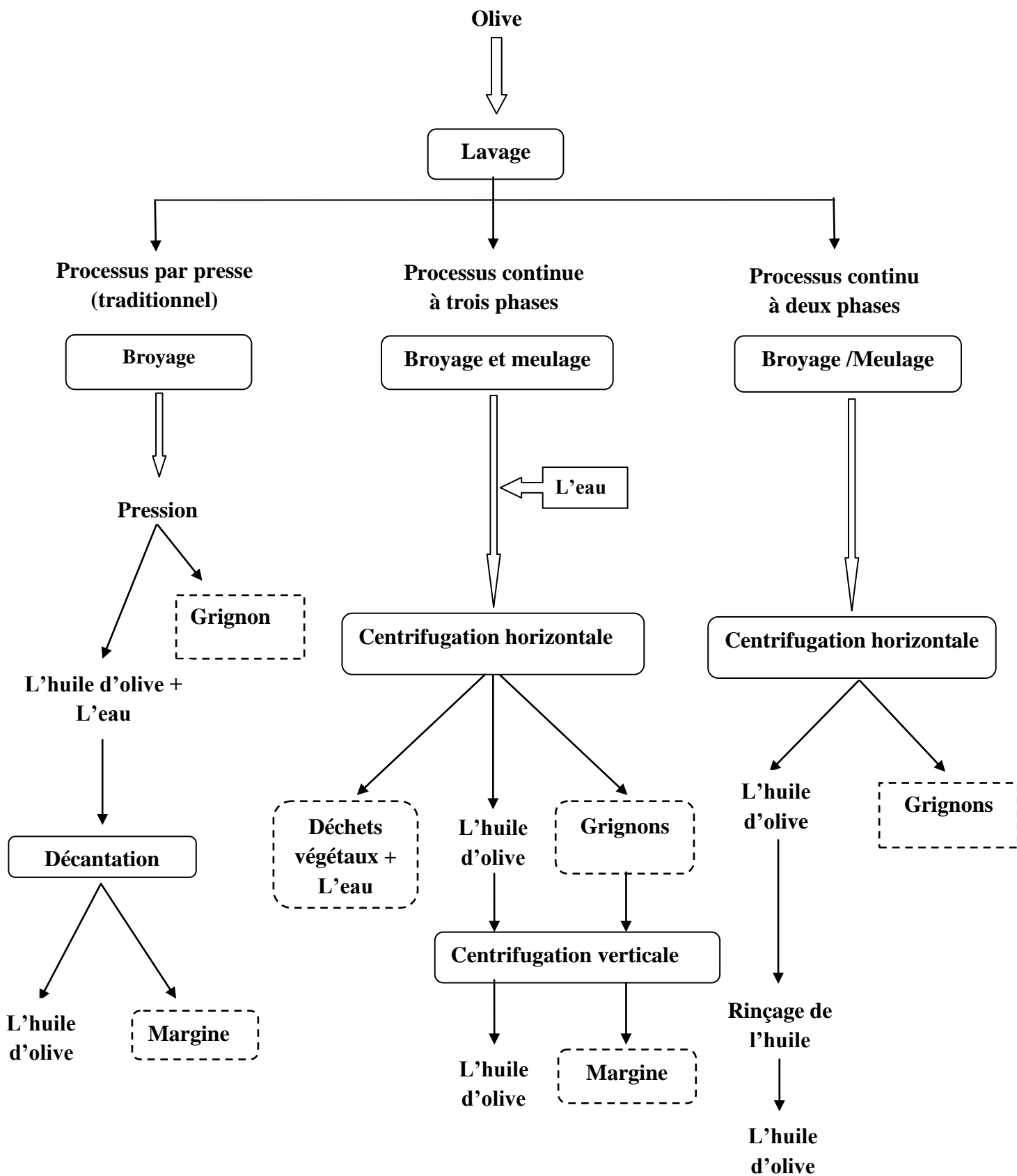


Figure 1. Processus d'extraction de l'huile d'olive [10].

1.3. Les margines

A l'origine, Les margines se présentent comme un liquide résiduel aqueux, de couleur brune rougeâtre, qui se transforme en margine de couleur noir, nauséabond, d'aspect trouble et une odeur spécifique d'huile d'olive. Elles sont caractérisées par un pH acide de 4 à 5 [16, 17,18] et une très grande conductivité électrique due surtout aux ions potassium (4 g/l), chlorure, calcium et magnésium [7,19]. Sa couleur noire résulte de la présence de polyphénols [20,21].

La caractérisation physico-chimique des margines est généralement tributaire des techniques et des systèmes d'extraction de l'huile d'olives, elle diffère d'un pays à l'autre [22]. En général, les margines contiennent une variété de composés organiques et minéraux, de nature et de concentration très différentes.

1.3.1. Fraction minérale

Les margines contiennent des quantités significatives de sels minéraux [23], dont 80% sont solubles (phosphates, sulfates et chlorures) et 20% insolubles (carbonates et silicates). Les éléments les plus représentatifs sont le potassium (47%), les carbonates (21%), les phosphates (14%) et le sodium (7%) [24,7].

1.3.2. Fraction organique

Les margines comportent deux fractions organiques : une fraction insoluble constituée essentiellement de pulpes d'olives qui représente la matière en suspension et colloïdale [25] et une fraction soluble dans la phase aqueuse qui contient les sucres, les lipides, les composés azotés, les vitamines, les acides organiques et les composés phénoliques [25,26].

Les glucides sont essentiellement représentés par les composants pariétaux, en particulier la cellulose et les pectines, ces dernières jouent un rôle important dans la texture des olives où ils représentent environ 0,6 % du poids de la pulpe fraîche [26,27]. Récemment, de nombreux travaux ont montré que les margines sont très riches en sucres simples [28, 29,30]. Les sucres simples les plus fréquents dans les margines sont, en particulier, le raffinose, le saccharose, l'arabinose, le xylose, le glucose, le mannose, le fructose.

Tableau 1. Les principaux composés phénoliques des margines

| Les différents types des polyphénols | | | |
|--|--|--|--|
| Monomères aromatiques | | Composés phénoliques a haut poids moléculaires principalement les Tanins | |
| Acides phénoliques | Alcools phénoliques | Tanins hydrolysables | Tanins condensés (flavotanin) |
| <ul style="list-style-type: none"> - Acide caféique - Acide p-coumarique - Acide protocatéchuique - Acide vanillique - Acide 4-hydroxyphénylacétique - Acide syringique - Acide p-hydroxybenzoïque - Acide vétratrique | <ul style="list-style-type: none"> - 4-Hydroxyphényléthanol - 3,4-dihydroxyphényléthanol - Syringaldéhyde | <ul style="list-style-type: none"> - Esters d'acides phénoliques - Esters d'acides phénoliques et sucres - Glucosides | <ul style="list-style-type: none"> - Le catécholmélaninique |

La fraction azotée est principalement représentée par les protéines. Tous les acides aminés contenus dans les margines ont été identifiés. Les plus abondants sont l'acide aspartique, l'acide glutamique, la proline et la glycine [31,32].

Plusieurs vitamines sont également présentes. Les plus fréquentes sont les vitamines du groupe D, les vitamines du groupe B et en particulier la vitamine PP avec une concentration moyenne de 124 mg/kg de margines [33].

La concentration en matière grasse des margines peut atteindre 10,78 g/l [23]. Les principaux acides organiques rencontrés sont les acides fumarique, glycérique, lactique, malique, oléique, palmitiques, linoléiques, maslinique et malonique [34, 7,11].

Les composés phénoliques sont une vaste classe de substances organiques cycliques très variées. Dans les margines, ces composés ont une structure variable. Ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction. Leur solubilisation dans l'huile est cependant bien inférieure à celle dans les eaux de végétation, ce qui explique leur concentration élevée dans les margines [23]. En général, La teneur en composés phénoliques varie entre 2 et 6 g/l [24, 35, 36,37] et elle peut même dépasser les 9g/l [38,39]. Plus de 50 composés phénoliques et plusieurs alcools phénoliques ont été identifiés. Il s'agit de monomères aromatiques et de composés phénoliques à haut poids moléculaire [18, 40, 41,42].

Les acides et les alcools phénoliques sont le groupe le plus vaste et le plus répandu dans les margines. Les composés phénoliques à haut poids moléculaire sont essentiellement des tanins dont la concentration peut atteindre 12 g/l [43]. Le catécholmélanique est un flavotanin, il est le plus répandu et en quantité la plus élevée dans les margines [33] (tableau 1).

En ce qui concerne la lignine, aucun auteur n'a cité la présence de ce polymère dans les margines, bien que les pulpes d'olives contiennent au moins 3% de composés lignocellulosiques [33].

2. Traitement et valorisation des margines

2.1. Pouvoir polluant des margines

Les margines sont des eaux considérées très polluantes car fortement chargées en matières organiques, elles affectent particulièrement la qualité des eaux dans lesquelles elles sont déversées [43]. Ces rejets liquides causent de sérieux dégâts environnementaux.

Les mauvaises odeurs, introduites par les margines, provoquent une pollution considérable de l'air par les gaz produits surtout lors du traitement [44]. Ainsi la teneur élevée en polyphénols dans les margines participe fortement à la pollution de l'environnement.

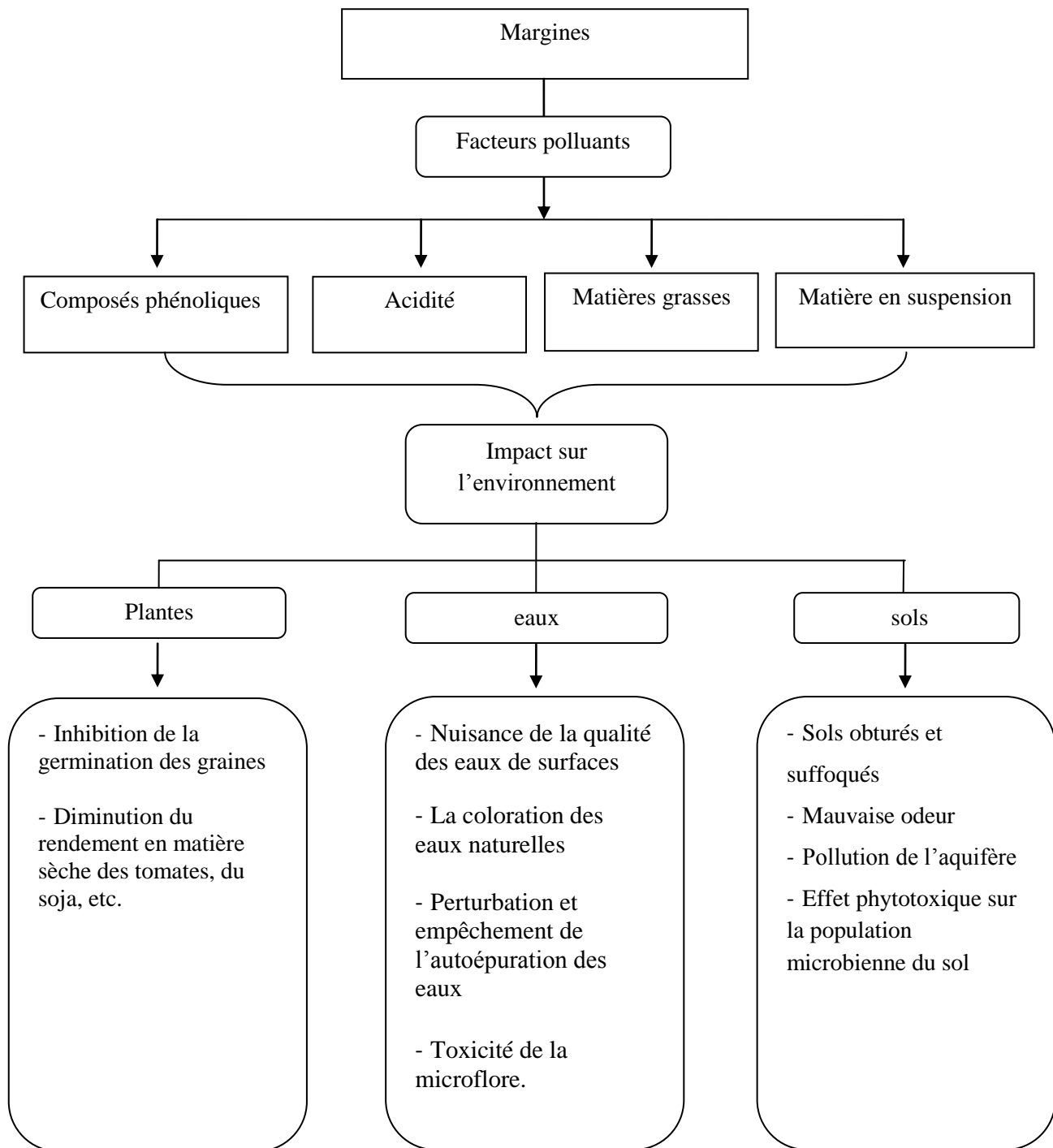


Figure 2. Conséquences environnementales des rejets de margines dans le milieu naturel.

Elle équivaut à une pollution produite par 6 millions d'habitants (moyenne de 60 g/l de DBO₅ par jour et par personne) [45] (fig. 2).

2.2. Technologies de traitement des margines

A partir des années soixante-dix, ces effluents ont été l'objet d'une grande attention de la part des institutions scientifiques, des entreprises et des organismes publics. Le but commun est d'étudier et de proposer les meilleures stratégies et technologies de minimisation, de bonne valorisation ou d'élimination de l'effet polluant des ces effluents.

Il existe plus de 20 procédés applicables au traitement des margines. Il s'agit dans la plupart des cas d'opérations élémentaires ou combinées, testées en laboratoire ou dans une installation pilote sans projection industrielle ultérieure [46]. Leur valorisation a fait l'objet de plusieurs études, certaines d'entre elles sont encore au stade d'expérimentation [47] (tableau 2). Le choix du système de traitement approprié est lié à plusieurs facteurs, à savoir le système utilisé pour l'extraction d'huile, la charge produite par les huileries et la voie de valorisation des margines.

2.3. Procédés de valorisations des margines

2.3.1. Principales voies de valorisation des margines

Un sous-produit est considéré comme un produit résidu qui apparaît durant la fabrication ou la distribution d'un produit fini. Il est non intentionnel, non prévisible et accidentel. Il peut être utilisé directement ou bien constituer un ingrédient d'un autre processus de production en vue de la fabrication d'un autre produit fini [61]. Ainsi, la valorisation des margines consiste dans le réemploi, le recyclage ou toute autre action visant à obtenir, à partir des déchets, des matériaux réutilisables ou de l'énergie [62].

Les dix dernières années ont vu se multiplier les nombres de recherches qui travaillent sur l'utilisation des margines dans les domaines de la biotechnologie, de la chimie, de l'agriculture et voire même du génie civile [63]. Certains d'entre eux sont très récents, il s'agit, en particulier de la récupération des composants aromatiques et phénoliques tels que l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol qui ont un pouvoir antioxydant très élevé [64]. Ainsi, les effluents d'huileries d'olive ont été utilisés directement comme boisson pour les ruminants. Ces expériences ont montré un abaissement du taux de mortalité de ces animaux et une diminution de leur coût par kg de viande produite. Cependant, l'apport des effluents d'huileries d'olive déshydratés aux ruminants provoque des diarrhées.

Tableau 2. Technologies de traitement appliquées sur les margines

| Type de traitement | Le procédé | Références |
|--------------------------------------|--|-------------------|
| Thermique | Evaporation naturelle | [44] |
| | Evaporation forcée | |
| Biologique | Lagunage | [3] |
| | Aérobie | [45] |
| | Anaérobie | [46] |
| | Aérobie anaérobie | [47] |
| | Enzymatique : laccase | [48] |
| Physique | Précèdes membranaires | [3] |
| | Neutralisation, Précipitation / flocculation | |
| | Procédés d'adsorption | [49] |
| | Biofiltration | [44] |
| Physicochimique | L'électrocoagulation | [50] |
| | La coagulation –flocculation | [51] |
| Traitement d'oxydation avancé | Oxydation humide | [52] |
| | Ozonation | [53] |
| | Procédés électrochimiques | [54] |
| | Procédés Fenton | [3] |
| Traitement combines | Ultrafiltration-oxydation avancé | [55] |
| | Oxydation avancée -traitement biologique | [56] |
| | Coagulation-oxydation avancée | [57] |

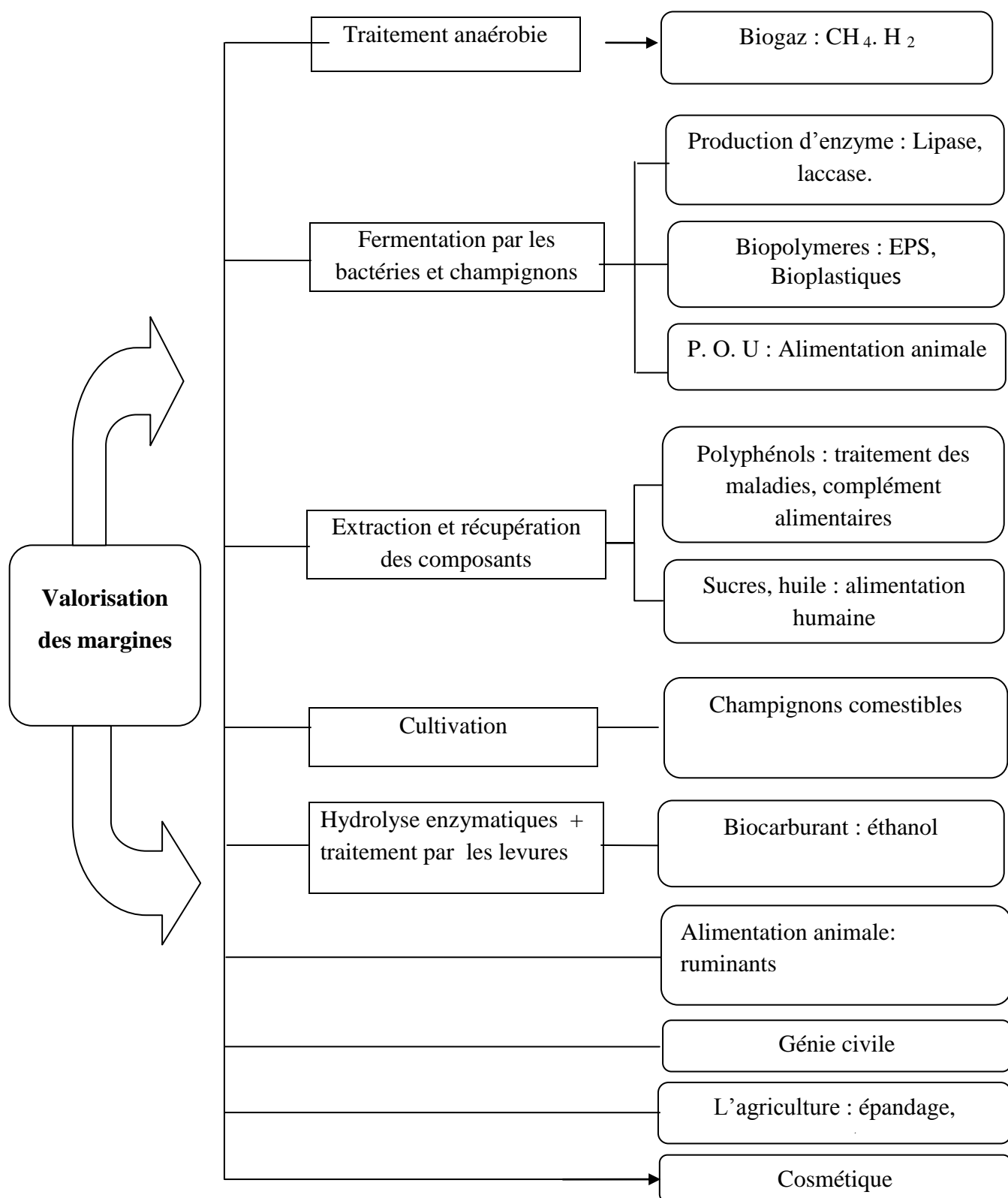


Figure 3. Principaux voies de valorisation et de traitement des margines [6].

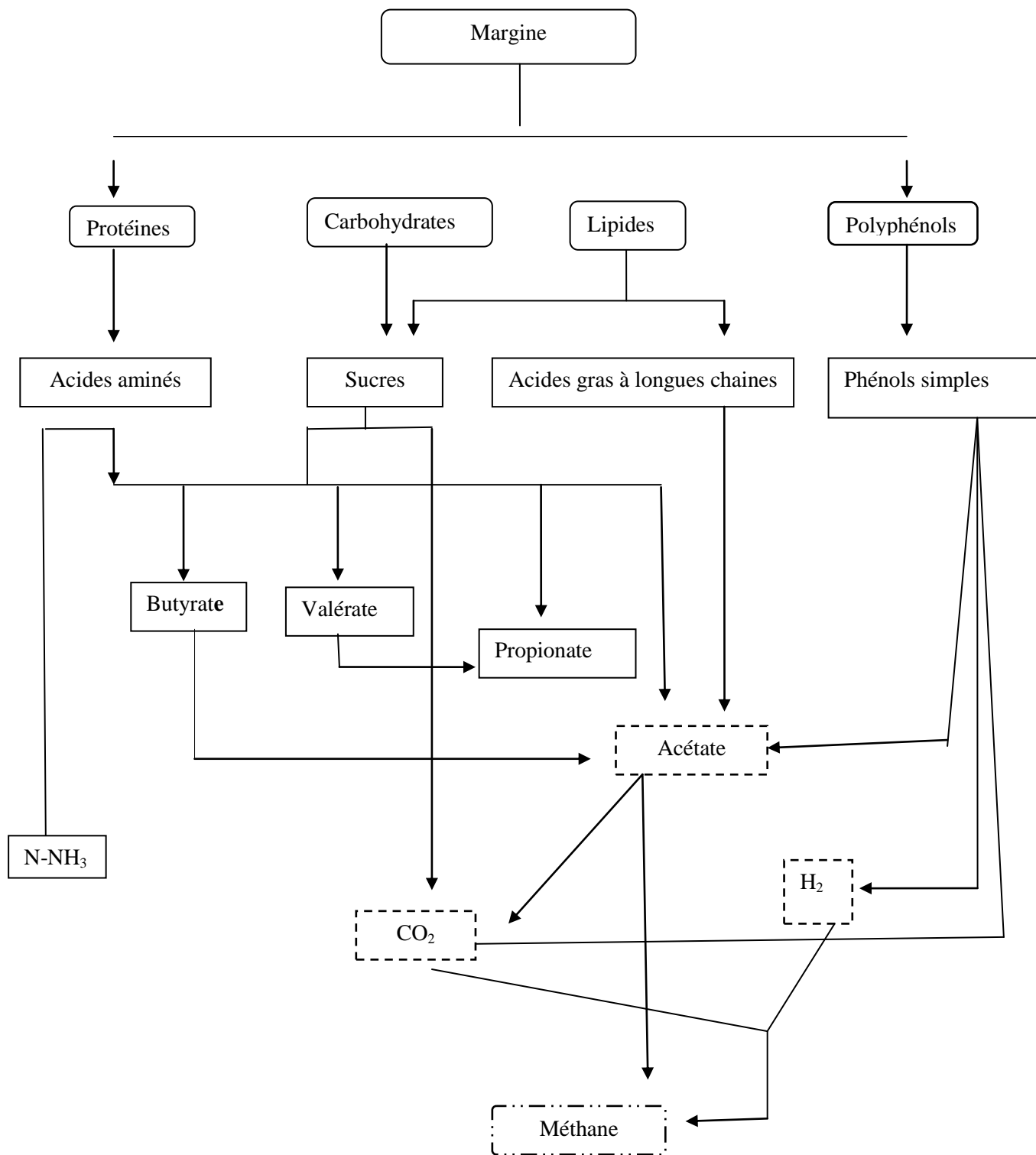


Figure 4. Conversion biologique des composants de la margine en anaérobiose [26].

De ce fait une application directe des effluents d'huileries d'olive aux ruminants semble avoir des limites [5]. Cependant, l'importance quantitative de ces effluents reflète la diversité des domaines de leur valorisation (fig. 3).

2.3.2. Facteurs affectant la valorisation nutritionnelle des margines

Plusieurs facteurs limitent l'usage des margines dans la nutrition du cheptel des ruminants, parmi lesquels on peut citer :

- La présence des composés phénoliques : Les différentes populations bactériennes impliquées dans le processus de la digestion chez les ruminants peuvent être affectées par les polyphénols présents dans les margines. Ces derniers exercent une action inhibitrice sur la croissance des microorganismes du rumen. Le degré de toxicité des polyphénols dépend de leur nature et de leur degré de polymérisation [65].

- La présence des acides gras à longues chaînes : La présence d'acides oléique et linoléique dans les margines inhibe fortement la digestion anaérobie. Leur seuil de toxicité est variable selon le type de microorganismes mis à leur contact et de leur degré d'insaturation, les acides gras polyinsaturés étant plus actifs que les acides gras saturés ou monoinsaturés [65]. Ils peuvent aussi agir comme inhibiteurs de la méthanogénèse ruminale, notamment, en inhibant l'adhésion des bactéries cellulolytiques à la cellulose [66,67].

De plus, les margines sont caractérisées par leur faible teneur en azote, indispensable à la croissance microbienne, alors que leur acidité élevée peut perturber la stabilité de l'écosystème anaérobie [68].

3. Digestion anaérobie des margines par le microbiote ruminal

La digestion anaérobie des margines est un procédé biologique se déroulant en absence d'oxygène et au cours duquel la matière organique est convertie en biogaz, composé principalement de méthane, dioxyde de carbone et de l'hydrogène, et en acides organiques (acétate, propionate, butyrate) et de l'eau (fig. 4). La totalité de ces transformations est réalisée par un ensemble de microorganismes dans le rumen.

3.1. Aspects microbiologiques de la digestion ruminale des margines

Le rumen est un biotope ouvert, dont les conditions de milieu favorisent le développement d'un microbiote anaérobie extrêmement important et diversifié. Les communautés microbiennes qui peuplent ce biotope appartiennent aux trois domaines du vivant : *Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya* [69]. Des représentants du monde viral sont également

présents. En effet, une activité lytique a été mise en évidence à l'égard de *Streptococcus bovis*, *Bifidobacterium thermophilum* [70].

3.1.1. Bactéries

La population bactérienne est de loin la plus complexe (plus de 350 espèces identifiées à ce jour), la plus dense (de l'ordre de 10^{10} de bactéries par millilitre du contenu du rumen), elles représentent aussi la moitié de la biomasse microbienne [71].

La majorité des bactéries est anaérobie stricte mais il existe également des anaérobies facultatifs qui représentent 10^7 - 10^8 cellules/g du contenu du rumen [72].

Les bactéries ruminales sont classifiées en quatre groupes, en fonction de leur localisation dans le rumen [73] :

- **Les bactéries libres, associées à la phase liquide ruminale** : c'est le cas de nombreuses espèces bactériennes fermentaires qui consomment des substrats solubles et de nombreux protozoaires qui ingèrent des particules alimentaires.
- **Les bactéries associées avec les particules alimentaires** : à la surface des particules alimentaires se forme ainsi un **consortium microbien** (biofilm) au sein duquel cohabitent plusieurs espèces de bactéries, de protozoaires et de champignons.
- **Les bactéries associées à l'épithélium ruminal** : sont principalement des bactéries anaérobies facultatives, Gram⁺, immobiles et utilisant l'oxygène qui arrive dans le rumen via la circulation sanguine.
- **Les bactéries et archaebactéries attachées à la surface des protozoaires** : ces bactéries adhérentes représentent 1-10 % de la flore totale du rumen. Le nombre des bactéries fixées sur chaque protozoaire dépend de la taille de ce dernier.

En outre, les bactéries sont classées selon leur aptitude à dégrader et à fermenter les substrats en : Les bactéries cellulolytiques, les bactéries amylolytiques, les bactéries utilisatrices de glucides simples, les bactéries utilisatrices d'acides, les bactéries protéolytiques et les bactéries lipolytiques.

3.1.2. *Archaea* méthanogènes

Il s'agit d'archaebactéries anaérobies strictes, représentant environ 4% des microorganismes du rumen [74]. Des études, basées sur la culture ou sur l'analyse moléculaire, ont montré que les *Archaea* méthanogènes du rumen

les plus communément 13 isolés appartiennent à la famille des *Methanobacteriaceae* [75]. Il s'agit fréquemment d'espèces appartenant au genre *Methanobrevibacter*. D'autres *Archaea*

méthanogènes appartenant à la famille *Methanomicrobiaceae* ont été isolées chez des bovins et des ovins. Tandis que des *Archaea* méthanogènes de la famille *Methanosarcinaceae* ont été trouvées chez les caprins et les ovins. Il s'agit de *Methanosarcina barkeri* [74].

Les *Archaea* occupent différentes localisations dans le rumen. On les trouve dans la phase liquide du contenu digestif mais beaucoup sont fixées sur les protozoaires ciliés, sur les particules alimentaires, ainsi que sur l'épithélium ruminal [75].

3.1.3. Protozoaires

Les protozoaires sont des organismes eucaryotes unicellulaires, mobiles, dont on distingue deux types : les flagellés et les ciliés. Les protozoaires ciliés représentent environ la moitié de la biomasse microbienne avec une concentration variant de 10^4 à 10^6 cellules/ml. La concentration des flagellés est plus faible (10^3 à 10^4 /ml) et leur rôle reste mal connu [76].

Les protozoaires ciliés, dont la taille est importante (50 à 300 μm) [72], sont divisés en deux groupes : Les holotriches, des genres *Isotricha* et *Dasytricha*, et les entodiniomorphes. Les protozoaires ciliés sont 20 à 100 fois plus grands en taille que les bactéries mais ils sont 10^4 fois moins nombreux. Ils sont soit fixés sur les particules alimentaires soit libres.

Les holotriches utilisent essentiellement les glucides solubles, tandis que peu d'entodiniomorphes en sont capables. Parmi les protozoaires ciliés modérément cellulolytiques, on note : *Eudiplodinium maggu*, *Epidinium eaudatum*, *Ostracodinium bovis*, *Orphrysolex caudatus* et *Polyplastron multivisculatum*. *Diplodinium pentacanthum* est considéré comme faiblement cellulolytique [77].

Le type et la composition de la ration conditionnent fortement les populations de protozoaires [72]. La population des entodiniomorphes (*Entodinium* $1,2 \times 10^6$ protozoaires / ml) augmente quand le pourcentage d'amidon de la ration augmente jusqu'à 60%. En ce qui concerne la population des holotriches, elle augmente (7×10^4 protozoaires / ml) quand le pourcentage de sucres solubles de la ration augmente jusqu'à 40 % [72].

3.1.4. Champignons

Leur concentration est estimée à 10^3 et 10^5 zoospores /ml, soit environ 10% de la biomasse microbienne [78]. Ce sont des zoospores flagellés qui sont soit monoflagellés (*Neocallimastix* et *Piromyces*) soit pluriflagellés (*Caecomycetes*). Les Champignons possèdent des activités hydrolytiques à l'égard de nombreux polymères structuraux (cellulose, hémicelluloses, pectine). Les champignons semblent, en outre, capable

de solubiliser *in vitro* une petite partie de la lignine des composés lignocellulosiques mais ils n'utilisent pas ces composés comme source d'énergie [79].

3.2. Aspects biochimiques de la digestion ruminale des margines

3.2.1. Voies de dégradation des composés nutritifs

La digestion anaérobie des composés nutritifs présents dans les margines se déroule, généralement, en 4 étapes :

- **Hydrolyse** : cette phase concerne la dégradation de molécules organiques complexes en monomères. Cette transformation est assurée par des enzymes microbiennes hydrolytiques extracellulaires [80].

La dégradation des glucides aboutit à la formation des molécules glucidiques simples ou oses qui sont le glucose (principal sucre), fructose, xylose et des acides uroniques (provenant de pectine et des hémicelluloses) et qui sont convertis en xylose. Les oses libérés sont rapidement absorbés par les bactéries, de sorte qu'ils sont rarement détectés dans le rumen. Ce processus de dégradation est lent pour les glucides des parois végétales (2 à 10 % dégradé/heure contre 5 à 10 % dégradé/ minute pour les sucres solubles).

La digestion des protéines dans le rumen débute par une hydrolyse qui aboutit à la libération de peptides, se poursuit par la dégradation de ce dernier par les exopeptidases en acides aminés. Qui sont, pour certains, directement incorporés dans les protéines microbiennes, mais la plupart sont désaminés par des espèces bactériennes spécifiques avec production d'ammoniaque qui est essentielle pour la nutrition azoté des microorganismes du rumen [81]. Presque 82% des bactéries du rumen peuvent se développer uniquement avec l'ammoniaque comme source d'azote [82].

Comme pour les glucides et les protéines, les lipides sont dégradés à leur tour par les microorganismes du rumen en glycérol et en acides gras.

- **Acidogénèse**: cette phase, également appelée phase fermentative, transforme les différents monomères issus de l'hydrolyse en acides organiques à courtes chaînes (2 à 6 carbones) ; les principaux acides produits sont l'acide acétique, l'acide propionique et l'acide butyrique. Comme son nom le suggère, la phase d'acidogénèse se traduit donc souvent par une acidification du milieu. Elle est généralement rapide en raison du fort taux de croissance des bactéries mises en jeu. D'autres co-produits sont également générés, comme le dioxyde de carbone et l'hydrogène, ainsi que de l'azote ammoniacal (sous forme NH_4^+ ou NH_3) dans le cas de l'hydrolyse des protéines [80].

- **Acétogénèse** : la voie de l'acétogénèse a été mise en évidence dans le gros intestin du ruminant mais n'intervient qu'à un niveau faible dans le rumen [81]. L'étape d'acétogénèse recouvre la transformation d'un petit nombre de composés simples en acétate, bicarbonate et hydrogène. Les bactéries qui réalisent cette étape sont désignées comme les bactéries productrices obligées d'hydrogène (Obligate Hydrogen Producing Bacteria). Cependant, l'accumulation d'hydrogène bloque leur développement et il doit donc être éliminé. Cette élimination est réalisée par les organismes méthanogènes consommant l'hydrogène. Le groupe des bactéries acétogènes est souvent désigné sous le nom de bactéries syntrophes (de syn : ensemble et trophéin : manger), parce qu'elles fournissent à leurs partenaires métaboliques leur source de carbone ou leur énergie (hydrogène, bicarbonate ou acétate). Les relations de syntrophie entre les espèces sont souvent considérées comme une clef de voûte de la réaction. Les bactéries monoacétogènes ont une production exclusive d'acétate, soit à partir du bicarbonate et de l'hydrogène, soit en hydrolysant des composés à chaîne plus longue. Elles contribuent à la régulation de l'hydrogène dans le milieu, notamment en utilisant l'hydrogène des bactéries productrices obligées [80].

- **Méthanogénèse** : La méthanogénèse est l'étape finale du processus de la digestion anaérobie. Elle est réalisée par des archaébactéries à spectre nutritionnel très limité qui appartiennent au domaine des *Archaea*. Les espèces méthanogènes utilisent principalement comme substrats l'acétate, le dioxyde de carbone et l'hydrogène. Leur taux de croissance est plus faible que celui des bactéries acidogènes. Elles produisent toutes du méthane comme principal produit de fermentation [80].

3.2.2. Voies de dégradations des composés antinutritifs (composés phénoliques)

Il est admis que la stabilité structurale des composés phénoliques est un facteur limitant leur dégradation en anaérobiose. Cette difficulté est due à la stabilité du noyau benzène (importante résonance du cycle >100 kJ/mole), ce qui rend la réduction du noyau benzène en dérivés cyclohexanes non aromatique difficile à atteindre [83]. En effet, il a été montré au

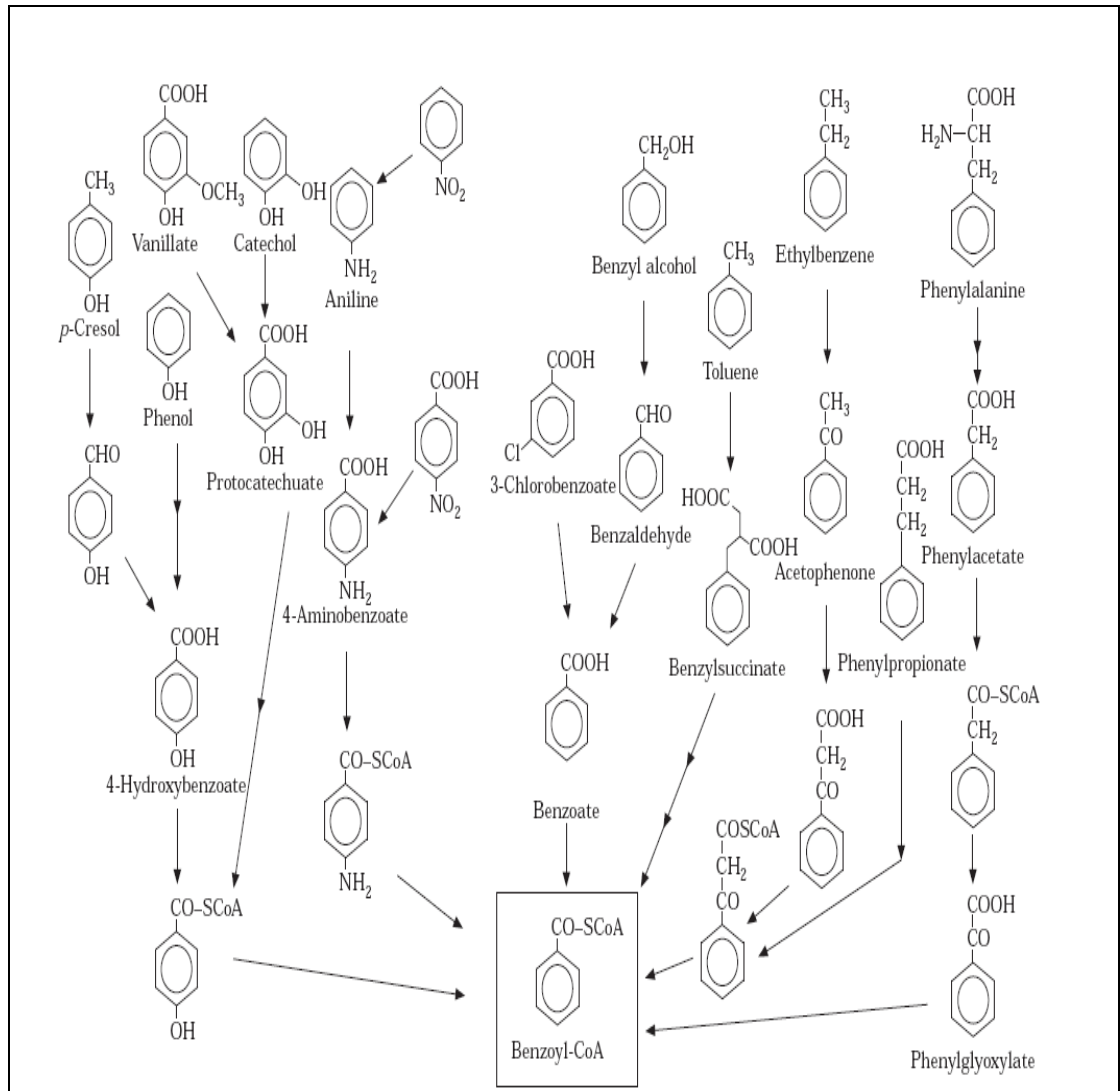
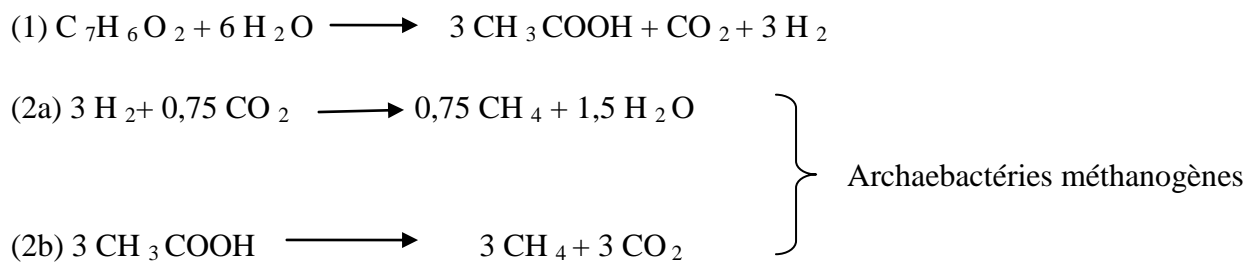


Figure 5. Dégradation anaérobie des composés phénoliques via la voie de benzoyl-CoA [83].

début du XVIII^{ème} siècle l'aptitude des bactéries anaérobies à dégrader les composés phénoliques. comme le benzoate, les phénols et la lignine dont les produits de fermentation sont le CO₂ et le méthane [84].

Les études de la dégradation anaérobie des composés phénoliques ont permis d'illustrer les principales voies de dégradation de ces composés. Il s'avère que la voie du benzoyl-CoA est la voie majeure de dégradation d'une large variété de composés phénoliques : phénols, hydroxybenzoates, phenylacétate, toluène et certains crésols [84] (fig. 5).

Les principales espèces du rumen qui ont la capacité à dégrader les composés phénoliques appartiennent au genre : *Streptococcus* (*S.bovis*, *S.caprinus*, *S.gallolyticus*, *S.macedonicus*) En réalité, ces microorganismes sont équipés d'un système enzymatique approprié dit tannase [85]. Certains composés phénoliques simples des margines : Bactéries acétogènes ment, c'est le cas du benzoate. La minéralisation complète du benzoate de la méthanisation est répartie en deux étapes [86].



Parfois, la dégradation des composés phénoliques n'est pas complète, elle aboutit à l'apparition d'intermédiaires. Par exemple dans le cas de l'oleuropeine, composé phénolique abondant dans les margines, une hydrolyse enzymatique par la β-glucosidase libère de l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine aglycone [87]. De même, il apparaît que l'acide 3-phenyl est aussi un produit intermédiaire de la transformation microbienne de l'acide cinnamique en anaérobiose [88]. D'autres composés phénoliques à haut poids moléculaires, cas des tanins hydrolysables, peuvent être également métabolisés par un ensemble d'archaeobactéries méthanogènes. C'est le cas aussi de l'acide gallique qui est métabolisé par *Streptococcus gallolyticus* en pyrogallol et en suite en phloroglucinol par la voie de décarboxylation [85,89] (fig. 6). Cependant, d'autres travaux ont mentionnés que le catéchol et le protocatéchuate, présents dans les margines, ne sont pratiquement pas métabolisés dans les conditions d'anaérobiose régnants dans le rumen où ils constituent de puissants facteurs d'inhibition de la méthanogénèse ruminale.

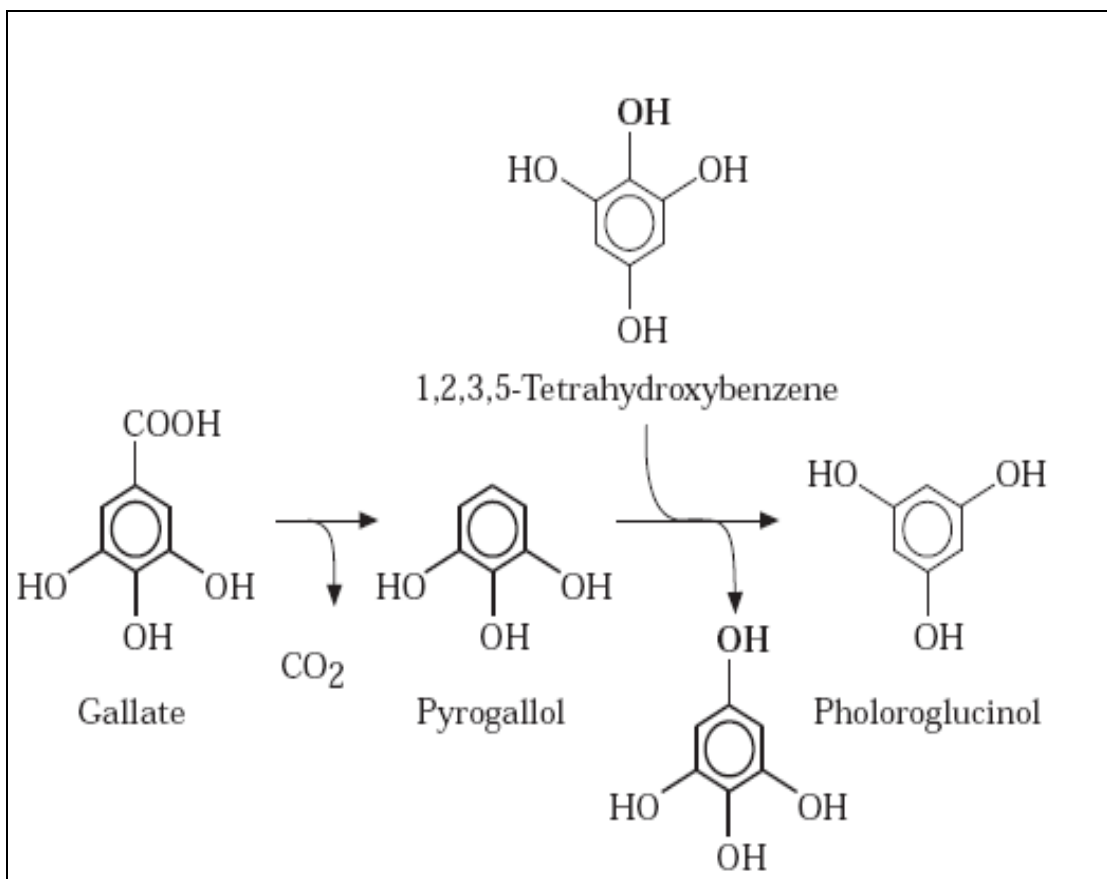


Figure 6. Conversion de gallate en phloroglucinol par la microflore ruminale [89].

4. Mode d'Action des polyphénols sur le microbiote ruminal

Un nombre important de travaux montre que les polyphénols peuvent exercer une action sur la microflore ruminale. Cette action concerne aussi bien la flore totale que des espèces bactériennes pures, telles que *Streptococcus bovis*, *Butyvirbio fibrosolvans*, *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, et *Ruminobacter amylophilis*. Différents mécanismes d'action sont identifiés :

- **Inhibition des enzymes digestives et privation des substrats** : les polyphénols ont la capacité d'inhiber les enzymes extracellulaires sécrétées par les bactéries ou d'affecter leurs activités enzymatiques. Il a été noté, par exemple, une concentration inhibitrice de 0,1 à 2 g/l. Cette activité dépend du type d'enzyme et de la nature et de la structure chimique des composés phénoliques. L'effet direct de cette inhibition résulte en un trouble dans l'activité du tube digestif et, par conséquent, une diminution dans la quantité des aliments ingérés [90]. Les principales enzymes inhibées par les composés phénoliques sont : la carboxyméthylase, la cellulase, la xylanase, l'endoglucanase [91]. Cet effet inhibiteur est encore plus prononcé sur les enzymes protéolytiques responsables de la production d'ammoniaque, source majeure de croissance de la majorité des microorganismes hébergés dans le rumen [82].

- **Effet chélateur des composés polyphénoliques** : les polyphénols ont la capacité de se lier aux ions, en particulier aux ions de calcium (Ca^{2+}) impliqués dans la structure des bactéries à Gram négatif et dans leur fixation aux fibres alimentaires et au soufre indispensable à la croissance microbienne [92].

- **Inhibition de la perméabilité membranaire** : L'effet antibactérien des composés phénoliques est dû à leurs liaisons aux protéines membranaires, ce qui altère les mécanismes de transport passif et actif des molécules (transport des électrons ou la phosphorylation oxydatif). Ils peuvent également traverser la paroi bactérienne (phénols de faible PM) et engendrer l'inactivation des perméases impliquées dans le transport des acides aminés et des glucides [91].

5. Mécanismes de résistance et d'adaptation microbienne aux composés phénoliques

L'une des caractéristiques des ruminants, nourris d'aliments riches en composés phénoliques, réside dans leur capacité à acquérir une tolérance vis-à-vis de ces substances. L'acquisition de cette tolérance résulte dans la capacité des microorganismes du rumen soit à dégrader ces composés et/ou à subir des mutations génétiques adaptatives. Effectivement, des bactéries résistantes ont été isolées, c'est le cas de *Streptococcus caprinus*, qui peut se développer dans un milieu contenant 2,5% d'acide tannique [93]. En plus de *Streptococcus*

caprinus, d'autres espèces résistantes ont été identifiées au cours de différentes études : *Streptococcus gallolyticus*, *Selenomonas ruminantium*, *Butyrivibrio sp*, *Lactobacillus sp* [72].

Cette adaptation est multiple et en relation avec la concentration, la nature et la structure chimique des composés phénoliques. Par exemple, l'activité de l'enzyme gallate décarboxylase de l'espèce *Streptococcus.gallolyticus* est élevée en présence d'acide tannique ou d'acide gallique [89]. En outre, cette tolérance est variable même selon l'espèce microbienne : *Streptococcus gallolyticus* est plus tolérant à la présence des monomères phénoliques simples que *Streptococcus bovis* [89].

Cette tolérance est également assurée par une adaptation chimique. En effet, les ruminants (espèces herbivores) possèdent des protéines salivaires riches en proline (PRPs). Ces protéines, appelées également mucines, constituent la première ligne de défense contre les phénols diététiques. Elles ont une très grande affinité pour les tanins auxquels elles se combinent pour prévenir la précipitation des protéines diététiques [94,95].

Certains microorganismes du rumen, incapables de dégrader les composés phénoliques (tanins hydrolysables) ou de diminuer leurs effets par la méthylation [94], développent un mécanisme adaptatif par la protection des protéines membranaires par une stratégie de déploiement des lipides [91] ou par la sécrétion d'exopolysaccharides [95]. Ces molécules ont une grande affinité d'association avec les composés phénoliques et, par conséquent, inactivent leur effet inhibiteur sur la microflore ruminale [94].

6. Possibilités d'amélioration de la dégradation et de la valeur nutritive des margines

Plusieurs stratégies sont appliquées pour améliorer la digestion des margines en anaérobiose (chez les ruminants), elles reposent essentiellement sur :

- la dilution des margines afin de réduire leur charge élevée en matière organique [68].
- un prétraitement, soit par l'addition de NaOH, NaHCO₃ et Ca(OH)₂ [68], pour corriger leur faible alcalinité et/ou par ozonation. Ce dernier prétraitement engendre une réduction de 50% des phénols totaux et des acides gras à longue chaîne après 3 heures. Parfois, les métabolites secondaires résultants sont plus toxiques que les produits d'origine. En effet, une grande partie des lipides et des polyphénols est éliminée après une étape finale d'ultrafiltration [68]. Ainsi l'effet inhibiteur des AGLC peut être atténué par l'addition de calcium qui en précipite une bonne proportion par leur solubilisation au fur et à mesure de leur dégradation.

Tableau 3. Composition chimique de la pâte des margines obtenue par le procédé Dalmolive

| Les composants de la pate de margine | Valeur (% de la matière sèche totale) |
|---|--|
| Matière azotée totale | 21,6 |
| Matière grasse | 4,0 |
| Cellulose brute | 13,1 |
| Matière minérale | 8,9 |
| Extrait non azoté | 52,5 |
| Matière azotée digestible | 17,2 |

- Addition des substrats facilement biodégradable : la codigestion des margines avec le glucose active la dégradation des polyphénols et des lipides [68,88]. D'autres travaux ont montré que la codigestion des margines avec d'autres résidus facilite leur digestion ; c'est le cas du fumier, ce dernier se caractérise par son alcalinité et sa teneur élevée en ammoniac, source important d'azote pour la croissance microbienne qui l'utilise pour synthétiser ses propres acides amines constitutifs [68]. Ainsi, le procédé Dalmolive décrit par Martillotti [96] semble remédier la difficulté de la digestion des margines. Il consiste à mélanger 50 kg de margines avec 20 kg de grignons et 12,6 kg de divers résidus et sous produits agricoles pour réduire l'effet inhibiteur des composés phénoliques. Ceci produit 29 kg d'aliments en pellettes dont la composition est indiquée dans le tableau 3.

- L'incorporation des polymères synthétiques, comme le PEG (polyéthylène glycol) ou le PVPP (polyvinyl polypyrrolidone), pour atténuer l'effet inhibiteur des tanins. Ces polymères se caractérisent aussi par leur capacité à rompre les complexes tanins-protéines, parce que leur affinité pour les tanins est plus grande que pour les protéines. Le PEG est plus efficace que le PVPP dans l'inactivation des tanins diététiques à cause de sa très forte capacité à se combiner aux tanins et sa résistance aux variations de pH. C'est pourquoi il permet une meilleure protection des protéines alimentaires de l'action inhibitrice des tanins. L'inclusion du PEG dans le régime alimentaire des herbivores est sans danger, les animaux tolèrent bien sa présence [97].

Materiel et methodes

1. Echantillonnage

Les margines de cette étude sont obtenues à partir d'olives de couleur mi-noire. Ces olives sont pressées dans une huilerie automatique selon un processus d'extraction à trois phases. Cette huilerie est située dans la région de Sidi Maarouf dans le chef lieu de la [Wilaya de Jijel](#), Algérie.

La collecte a été réalisée pendant la période de cueillette hivernale (Décembre 2009). L'échantillon est introduit dans des bidons en polypropylène et, une fois au laboratoire, il est stocké à l'obscurité dans un environnement non oxygéné à 4°C.

L'évaluation de la valeur nutritive des margines est réalisée par rapport au foin de la vesce-avoine retenu comme substrat standard de référence (témoin). Il a été collecté à l'I.T.G.C. d'El Baraouia, El Khroub, Constantine.

2. Analyse chimique des substrats

2.1. Matière sèche (MS)

Les margines sont un sous-produit liquide de couleur brune. La détermination de leur MS consiste à évaporer un échantillon de 5 ml dans une capsule en porcelaine à 105°C jusqu'à poids constant [33]. La détermination de la MS du foin de vesce-avoine est effectuée suivant le même principe par dessiccation de 1g d'échantillon [98]. Pour chaque substrat l'analyse est effectuée en triple

2.2. Matière organique et minérale

Les cendres (matières minérales) sont déterminées par incinération d'1g d'échantillon sec dans un four à moufle à 550°C pendant 5 heures [98]. La matière organique correspond à la différence entre la prise d'essai et les cendres qui en résultent

2.3. Dosage des sucres totaux

Les sucres totaux sont déterminés par spectrophotométrie, selon la méthode de Dubois [99]. Pour les margines, 1ml de l'échantillon est mélangé à 1 ml d'une solution phénolique (5%) et 3ml d'acide sulfurique concentré (97%). Après agitation, les tubes sont conservés à l'obscurité pendant 10 min puis transférés dans un bain marie à 30 °C pendant 30 min. Les sucres réagissent avec le phénol et l'acide sulfurique concentré et donnent une coloration jaune-orange. La densité optique est mesurée à 488 nm. Les valeurs obtenues sont traduites en concentration par référence à une courbe étalon de D-glucose préalablement établie (annexe 01). Le foin de vesce-avoine subit d'abord une extraction qui permet la solubilisation des sucres totaux. Cette dernière consiste à mélanger 30 mg d'échantillon avec 97 ml d'eau distillée et 3 ml

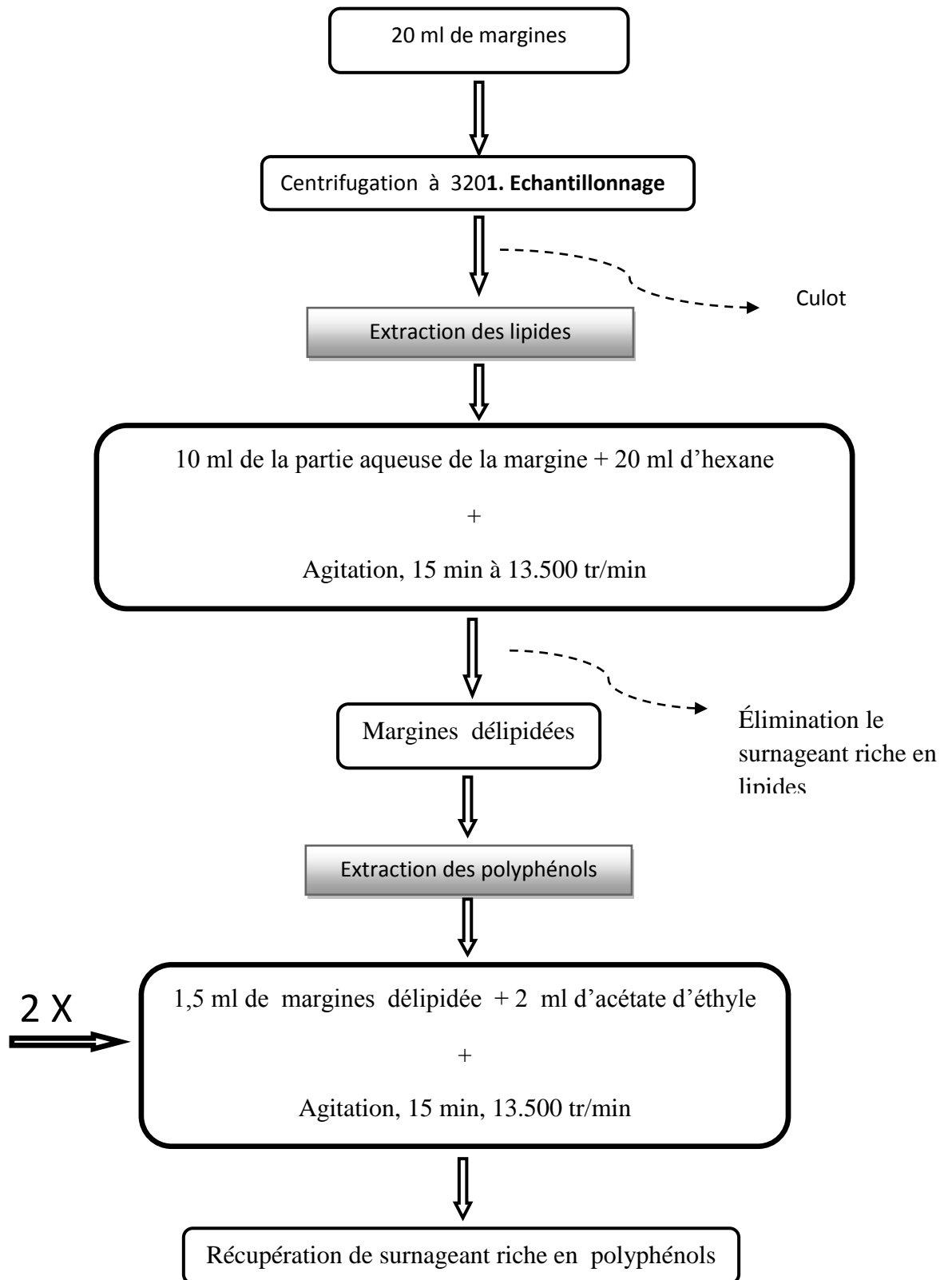


Figure 7. Méthode d'extraction des polyphénols des margines.

l'acide sulfurique concentré (97%). Le mélange est agité à 60°C pendant 3h, il subit alors le protocole de dosage déjà présenté.

2.4. Extraction des polyphénols totaux

Les composés phénoliques contenus dans les margines sont déterminés en utilisant de l'acétate d'éthyle [100,101]. Les margines doivent, au préalable, subir un prétraitement par l'hexane pour éliminer les lipides.

- Délipidation des margines

20 ml de margines sont centrifugées pendant 10 min à 3200 g. Deux phases sont obtenues : une phase aqueuse et un culot précipité. 10 ml de la partie aqueuse sont ajoutées à 20 ml d'hexane. La solution est mélangée à l'aide d'un mixer électrique (Ultra-Turax), pendant 3 min à une vitesse de 13.500 tr/min. Après 15 min, les margines sont recueillies après séparation complète en deux phases : l'hexane (surnageant) et les margines délipidées (culot) prêtes à une extraction liquide-liquide.

- Extraction à l'acétate d'éthyle

1,5ml d'acétate d'éthyle sont additionnés à 2ml de margines délipidées, l'ensemble est homogénéisé à l'aide d'un mixer électrique (Ultra-Turax) pendant 3 min à une vitesse de 13.500 tr/min. Après 15 min, le mélange est complètement séparé en deux phases : l'acétate d'éthyle riche en polyphénols (surnageant) et les margines (culot) (fig.7).

Les composés phénoliques contenus dans le foin de vesce-avoine sont extraits par une solution aqueuse d'acétone (70%). Il s'agit d'une double extraction dans laquelle 0,2g de l'échantillon sont dilués dans 10 ml d'acétone (70%) puis centrifugés à 3000 g pendant 10 min, à 4°C. Le surnageant (S1), qui en résulte, est recueilli et conservé dans la glace à 4°C. Le culot est remis en suspension dans 10 ml d'acétone (70%) et il est, à nouveau, centrifugé comme précédemment. Le culot est alors éliminé, l'extrait final est obtenu en mélangeant les surnageants (S1) et (S2) [102].

2.5. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols sont dosés par la technique colorimétrique de Folin ciocalteu [103]. Un aliquote de 50 µl de l'extrait phénolique est mélangé à : 950 µl d'eau distillée, 500 µl de solution de Folin Ciocalteu (1N) et 2,5 ml de carbonate de sodium (Na₂CO₃ 20%). Le développement d'une couleur bleue est obtenu après incubation à l'obscurité et à température ambiante pendant 40 min. L'absorbance est mesurée à 725 nm. Les résultats sont rapportés à une courbe étalon standard, ils sont exprimés en équivalent d'acide tannique (Annexe 02).

2.6. Dosage des tanins totaux

Les tanins totaux sont estimés en mélangeant 100 mg de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) avec 2ml d'eau distillé et 2 ml de l'extrait initial. L'ensemble est agité et maintenu à 4°C pendant 15 min, ensuite il est centrifugé à 3000g et à 4°C. Le surnageant est utilisé pour la détermination des tanins totaux qui correspondent à la différence entre les phénols totaux (mesuré par le procédé de Folin Ciocalteu), avant et après traitement avec le PVPP [103].

2.7. Dosage des tanins condensés

Les tanins condensés sont dosés par la méthode au Butanol-HCl [104]. Le milieu réactionnel est composé de 0,5 ml de l'extrait, 3 ml de butanol-HCl (95/5) et 0,1 ml d'une solution ferrique (sulfate d'ammonium ferrique 2%, dilué dans HCl à 2N). Les échantillons sont incubés dans un bain marie bouillant pendant 60 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm et les résultats sont exprimés en se référant à une courbe étalon de quebracho tanin (annexe 03).

3. Etude de la digestibilité *in vitro* des margines

3.1. Technique de production de gaz *in vitro*

La fermentation des margines est étudiée par la technique de production de gaz *in vitro*. Cette technique est une simulation de la digestion des aliments dans le rumen. Elle permet d'étudier la cinétique des fermentations ruminales. C'est une méthode rapide, simple, fiable et peu coûteuse, De ce fait, cette technique est préconisée comme un outil fiable pour la détermination de la digestibilité et de la dégradation des différents substrats [105].

3. 2. Description du système fermentaire

La fermentation est réalisée dans des seringues en polypropylène de 60 ml de capacité. Le bout de la seringue est connecté de manière étanche à un tuyau en téflon de 5 cm de longueur, fermé avec une pince de MOHR pour éviter toute fuite de gaz produits lors de la fermentation. Les pistons des seringues sont préalablement lubrifiés avec du silicone pour faciliter leurs mouvements et prévenir l'échappement de gaz.

3. 3. Inoculum

L'inoculum est constitué de jus de rumen prélevé à partir de moutons sacrifiés aux abattoirs de BOUSSOUF (CONSTANTINE). Ces animaux sont choisis aléatoirement, d'âge et de sexe différents et ont reçu un régime alimentaire libre et non défini.

Le contenu du rumen de trois animaux est collecté juste après l'abattage, filtré à travers 4 couches de gaze chirurgicale et introduit dans des Thermos préalablement chauffés et saturés avec du CO₂ dans le but d'assurer une atmosphère anaérobie. Ces derniers sont hermétiquement fermés, puis transférés directement au laboratoire où ils sont traités, au plus tard, dans les 2 heures qui suivent la collecte.

3.3.1. Préparation de l'inoculum

L'inoculum est un mélange de jus du rumen et d'une salive artificielle au ratio ½ [101,102]. La salive artificielle est mélangée de cinq solutions, la solution A (solution de micro-éléments), la solution B (solution tampon), la solution C (solution de macro-éléments), la solution D (indicateur du potentiel redox) et la solution E (solution réductrice) (annexe 04).

Le brassage du milieu est maintenu à 39 °C avec un barbotage en profondeur par un flux continu de CO₂ jusqu'au virage de la coloration bleu vers le rose qui devient à la fin incolore, indiquant ainsi la réduction convenable du milieu. Un barbotage en surface est effectué pendant 15 min pour maintenir une atmosphère totalement anaérobie dans l'aire d'essai.

3.3.2. Inoculation

200 mg de pâte de margines, obtenues en mettant les margines dans une étuve à une température de 40°C jusqu'à complète évaporation de l'eau, sont introduites dans des seringues en absence et en présence de 1g de polyéthylène glycol (PEG, PM : 4000 Da, Prolabo). Elles sont ensuite inoculées avec 30 ml de milieu de culture. Dans les mêmes conditions, un témoin standard, le foin de vesce-avoine, est incubé en absence et en présence de PEG. Pour chaque substrat (sans et avec PEG), 9 seringues sont réalisées, (3 pour la cinétique de production de gaz, 3 pour le dosage d'ammoniaque et 3 pour le dénombrement des protozoaires). Des seringues témoins, sans substrat (jus de rumen + salive artificielle), sont simultanément incubées en présence et en absence de PEG.

4. Incubation et mesure des gaz produits

Les seringues inoculées sont horizontalement incubées dans une étuve à agitation rotatoire (type GFL 3033) à 9 tr/min et à 39 °C pendant 96 h.

Le suivi de la cinétique de fermentation est réalisé par la mesure du volume total des gaz produits lors de la fermentation. Il est indiqué par le déplacement du piston sous la pression des gaz libérés à différents intervalles de temps: 3, 6,9, 24, 48,72 et 96 h. Le gaz produit est mesuré par une lecture visuelle des graduations présentes sur la seringue.

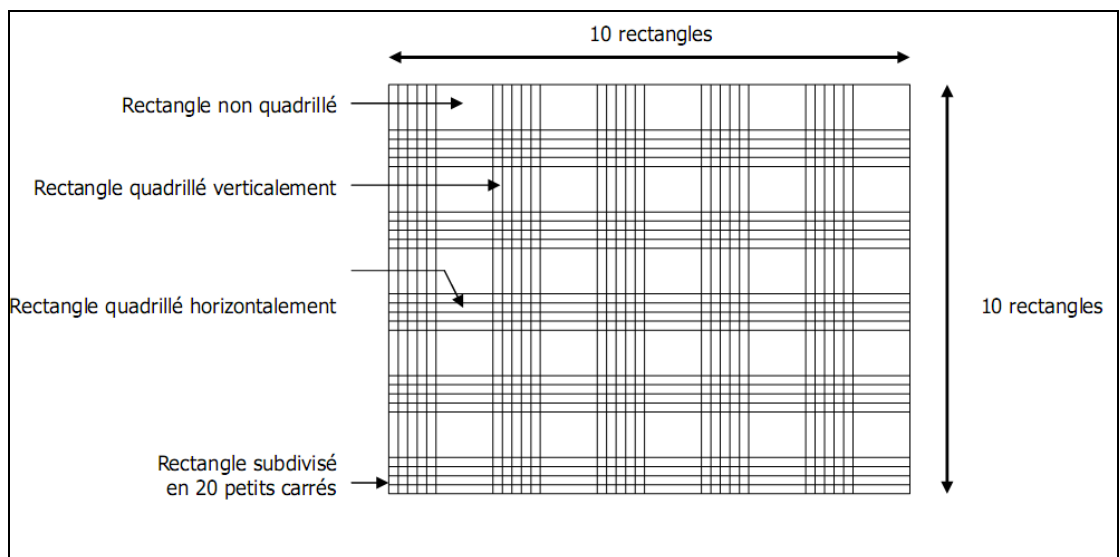


Figure 8. La chambre de comptage de la cellule de Malassez.

La production réelle de gaz dans chaque seringue correspond à la production de gaz après 96 h, soustraite du volume de gaz enregistré à t_0 et du volume de gaz moyen produit par le blanc, soit : $GP \text{ (ml)} = V_t - V_0 - V_b$

GP : Production de gaz a chaque temps d'incubation

V_t : Volume enregistré à chaque heures d'incubation

V_0 : Volume initial

V_b : Volume du blanc

4.1. Analyse qualitative des gaz

Le volume des gaz produits (CH_4 , CO_2), est déterminé par un traitement à la soude (NaOH, 10N). Les gaz produits à chaque intervalle de temps sont transférés dans des seringues vides. Ces dernières sont injectées de manière étanche par la soude qui réagit avec le CO_2 par absorption, entraînant le déplacement du piston d'un volume correspondant au volume de CH_4 . Le volume de CO_2 est déterminé par soustraction du volume net de CH_4 enregistré, par rapport au volume de gaz total produit.

3.3.5. Détermination des paramètres caractéristiques de la production de gaz *in vitro*

Les paramètres caractéristiques modélisés de la fermentation des substrats sont déduits du modèle exponentiel proposé par Ørskov et Mc Donald [105] et modélisé à la production de gaz par Blümmel et Ørskov [106].

$$y = a + b(1 - e^{-c*t})$$

y : Production de gaz après chaque temps d'incubation.

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

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

c : Vitesse de fermentation des substrats.

4.2. Evolution du pH

Après 24 h de fermentation, le contenu de chaque seringue est vérifié pour son pH, à l'aide d'un pH mètre portable à électrode en verre préalablement étalonnée.

Dénombrement des protozoaires : Après 24 heures de fermentation, 100 μ l du contenu de chaque seringue est mélangé avec 100 μ l de la solution MFS (Metylgreen- Formalin-Saline) (annexe 05). Ce mélange bien homogénéisé est conservé à l'obscurité pendant 30 minutes [107]. Le dénombrement des protozoaires est réalisé sur une cellule de Malassez (fig.8).

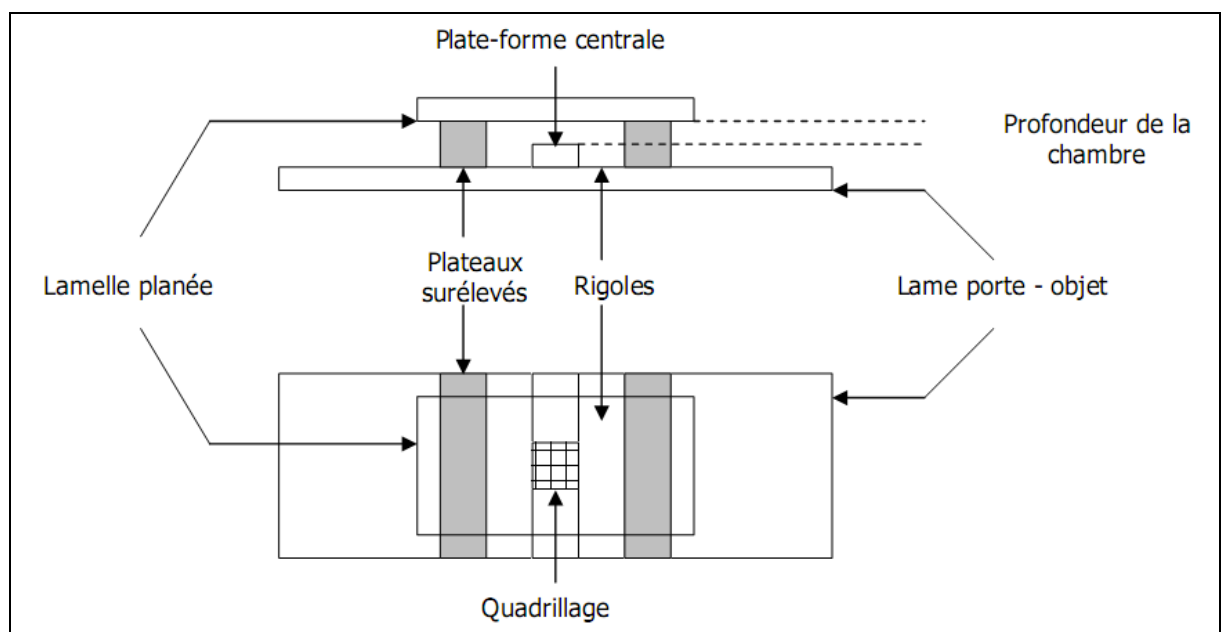


Figure 9. Schéma descriptif de la cellule de malassez.

La chambre de comptage couverte par une lamelle, bien fixée, est remplie par capillarité à l'aide d'une pipette pasteur. Le comptage est ensuite réalisé sous microscope en utilisant l'objectif x40, de façon que juste les cellules contenues dans les 25 rectangles subdivisés en 20 petits carrés sont comptés (fig.9).

Le nombre de protozoaires est exprimé selon la formule suivante : $N = n_1 \cdot v \cdot n_2 \cdot f$

- N : nombre de cellules par ml
- n_1 : nombre de cellules comptées
- v : volume d'un rectangle en ml
- n_2 : nombre de rectangles comptés
- F : facteur de dilution.

4.3. Dosage de l'azote ammoniacal

- Principe

L'azote ammoniacal (N-NH₃) est dosé par une technique colorimétrique [108], dont le principe est le suivant :

L'ion ammonium (NH₃) se fixe sur une molécule de phénol en présence du chlore. La réaction est catalysée par le nitroprosside de sodium. Il se forme un complexe de type indophénol qui donne une coloration bleue. La densité optique est mesurée à 660 nm. Les résultats sont rapportés à une courbe étalon standard et exprimés en équivalent de chlorure d'ammonium (NH₄ - Cl) (annexe 06).

- Echantonnage

Après 24 h d'incubation, Les échantillons (le contenu de chaque seringue) sont bloqués par une solution d'acide orthophosphorique (H₃PO₄, 50 g/L) à raison de 2 ml pour 10 ml de contenu de chaque seringue. Les échantillons sont centrifugés à 11.000 tr/min pendant 30 min, ensuite sont conservés à -20 °C jusqu'à le dosage chimique.

- Dosage

- 5 ml de solution A (annexe 07) est mélangée avec 2 µl de l'échantillon (contenue de chaque rumen + H₃PO₄). Après une bonne homogénéisation, 5 ml de solution B (annexe 07) sont ajoutés. Ce mélange homogénéisé est maintenue dans un bain marie à 37 °C pendant 20 min.

5. Dégradation des composés phénoliques des margines en anaérobiose *in vitro*

5.1. L'inoculation : Les seringues contenant 200 mg de margines, sans et avec 1g de PEG, sont inoculées avec 30 ml de milieu de culture (jus de rumen + la salive artificielle). Des

seringues témoins de référence, sans substrat, sont incubées dans les mêmes conditions. Il s'agit d'un test à blanc qui indique la concentration des polyphénols (sans PEG) et des phénols simples (avec PEG) déjà présents dans le contenu du liquide ruminal. Ces seringues sont incubées dans une étuve à agitation rotatoire à 9 tr/min et à 39 °C.

5.2. Cinétique de biodégradation et dosage des polyphénols

Le suivi cinétique de la biodégradation de composés phénoliques des margines est déterminé à chaque intervalle de temps (0, 8, 24, 48, 72, 96 h), par une centrifugation du contenu de chaque seringue à 3200 g, pendant 10 min. Le surnageant est récupéré et la concentration des composés phénoliques est dosée par la technique spectrophotométrique de folin ciocalteu. Les résultats sont exprimés par rapport à une courbe étalon d'acide tannique (même principe que précédemment).

6. Analyse statistique

L'étude de la digestibilité *in vitro* des margines et la dégradation des composés phénoliques, sont traités par le logiciel statistique STATIT-CF version 4. Elles sont soumises à une analyse de la variance ANOVA à deux facteurs (substrat et temps d'incubation). Les différences sont considérées significatives au seuil de 5%. Les moyennes sont classées selon la classification de Newmann-Keuls ($\alpha = 5\%$).

Les paramètres cinétiques sont déduits du modèle exponentiel de Mc Donald et Orskov [105] :

$$Y=A+B (1-\exp^{-c*t})$$

Le calcul est effectué par le logiciel informatique DEG.

Résultats et discussion

Tableau 4. Composition en macronutriments et en micronutriments (% de MS) des margines et du foin de vesce-avoine.

| Substrats | Macronutriments | | | | Micronutriments | | |
|-----------------------------|------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|------------------------|-------------------|-------------------|
| | MS | MO | MM | ST | PT | TT | TC |
| Margines | 7,84 ^b | 98,01 ^a | 1,99 ^b | 39,91 ^a | 7,2 ^a | 4,5 ^a | 0,89 ^b |
| Foin de vesce-avoine | 35,97 ^a | 91,63 ^b | 8,17 ^a | 24,43 ^b | 2,75 ^b | 2,05 ^b | 1,84 ^a |
| S.E.M. | 1,86 | 0,17 | 0,20 | 1,76 | 0,02 | 0,01 | 0,02 |
| Pr. | <3 ‰ | <1 ‰ | <1 ‰ | <1 ‰ | < 5 ‰ | < 1 ‰ | < 3 ‰ |

Les moyennes affectées de lettres différentes dans la même colonne sont significativement différentes ($P < 0,05$), **S.E.M.** : erreur standard des moyennes, **Pr.** : probabilité, **MS** : matière sèche, **MO** : matière organique, **MM** : matière minérale, **ST** : Sucres totaux, **PT** : phénols totaux, **TT** : tanins totaux, **TC** : tanins condensés.

1. Analyse chimique

1.1. Composition en macronutriments

1.1.1. Matière sèche

Les teneurs en macronutriments (MS, MO, MM, ST) des margines et du substrat standard sont consignées dans le tableau 4. Il ressort que les taux en matière sèche (MS) des margines et du foin de vesce-avoine sont de 7,84% et 35,97%, respectivement. La teneur en MS des margines, enregistrée dans notre étude, est comparable à celle notée dans d'autres travaux qui donnent des teneurs comprises entre 7,1 et 7,19% [109,110]. En revanche, des teneurs en MS supérieures sont également mentionnées (10%) [111]. Les taux d'humidité élevés des margines peuvent s'expliquer par l'eau existant habituellement dans les olives d'une part et d'autre part par l'eau ajoutée au cours du processus d'extraction de l'huile d'olive [112]. Pour le foin de vesce-avoine, un pourcentage de MS plus élevé est rapporté par plusieurs auteurs soit 88,5% et 65,8% [113,114]. Toutefois, ces variations de la MS du substrat standard pourraient s'expliquer par la différence de stade végétatif et par la saison de récolte de ce substrat.

1.1.2. Matière organique

Le contenu des deux échantillons en matière organique est représenté dans le tableau 4. Les deux substrats étudiés contiennent un taux relativement élevé en matière organique (MO). La teneur la plus élevée est observée pour les margines (98,01%). Cette teneur est supérieure à celle rapportée par plusieurs auteurs qui notent des valeurs de 78,57 et 90% [111,33]. Les différences notées peuvent être dues aux conditions climatiques, aux méthodes d'extraction de l'huile d'olive ainsi qu'au temps de stockage des olives avant leur maturation. En ce qui concerne le foin de vesce-avoine, son taux de MO de 91,63% diffère de celui indiqué par certains auteurs. Ces derniers ont enregistré des valeurs de 88,5% et de 93,1% [112,113]. Cette variation est due probablement aux conditions climatiques, particulièrement, la température et la pluviométrie. Le stade végétatif au moment de la récolte semble aussi avoir une influence sur la teneur en matière organique de foin de vesce-avoine [115].

1.1.3. Matière minérale

Comme la matière minérale (MM) est le complément à 100 de la matière organique après incinération, il est logique que les teneurs en MM soient l'inverse par rapport aux teneurs en MO (Tableau 4). Il apparaît clairement que les deux substrats renferment des teneurs en matière minérale très variable soit 1,99% et 8,17%, respectivement pour les margines et le foin de vesce-avoine. Malgré la teneur faible en MM des margines

algériennes, ce taux reste considérable comparativement à ceux détectés pour des margines de Turquie [116]. Cependant, Hachicha *et al.* [111] indiquent un taux relativement élevé (21,42%) par rapport à nos margines et à ceux notés par la littérature [33]. Cette différence notée peut être expliquée par le degré de maturation et la variété des olives. Cette dernière est rarement mentionnée dans la littérature. De plus, la méthode d'extraction de l'huile d'olive semble être un facteur influençant la teneur en matière minérale des margines [33].

Le foin de vesce-avoine contient une teneur élevée par rapport aux margines. Toutefois, notre valeur reste inférieure à celles obtenues par plusieurs auteurs [113, 117,118]. Des facteurs tels que le changement de la zone géographique, les méthodes de la récolte et la saison contribuent à faire varier fortement la concentration des éléments minéraux du foin de vesce-avoine [119, 120].

1.1.3. Sucres totaux

Les concentrations en sucre totaux (ST) des deux substrats étudiés sont respectivement de 39,91% et de 24,43% pour les margines et le foin de vesce-avoine (Tableau 4). Cette teneur élevée en ST dans les margines représente une source énergétique pour les ruminants et rend sa valeur nutritive plus importante. Nos résultats sont supérieurs à ceux rapportés par plusieurs auteurs [22,33]. D'autres travaux estiment une moyenne en sucres totaux dans les margines entre 1 à 8% [112]. Cette teneur élevée en ST obtenue dans notre étude pourrait être expliquée par l'état de fraîcheur de nos margines. En effet, un stockage pendant quelques mois des margines peut conduire à une diminution de leur teneur en sucres par leur dégradation en acide organiques [121]. Pour le foin de vesce-avoine, les valeurs obtenues sont très proches de celles rapportées par d'autres auteurs [122].

1.2. Composition en micronutriments

L'analyse quantitative des phytomicronutriments présents dans les margines et le foin de vesce-avoine est représentée dans le tableau 4. Les teneurs en phénols totaux (PT) mesurées sont respectivement de 2,75% et 7,2% pour le foin de vesce-avoine et les margines. Le résultat obtenu pour ces dernières montre leur richesse en substances phénoliques. De même, La concentration en tanins totaux (TT) des margines est supérieure à celle du foin de vesce-avoine. Elle est de 4,5%. En ce qui concerne la teneur en tanins condensés (TC), le foin de vesce-avoine semble être plus riche (1,84%) par rapport aux margines (0,89%). Cette

Tableau 5. Production cumulative de gaz (ml) et paramètres cinétiques modélisés des des margines et du foin de vesce-avoine.

| Production de gaz (ml) | Substrats | | S.E.M. | P.r. |
|----------------------------------|--------------------|----------------------|--------|--------|
| | Margine | Foin de vesce-avoine | | |
| 3 | 14,67 ^h | 14,17 ⁱ | 0,35 | 0,01 |
| 6 | 17,34 ^g | 24,01 ^f | 4,71 | 0,01 |
| 9 | 20,85 ^f | 29,68 ^e | 6 | 0,01 |
| 24 | 31,98 ^d | 55,73 ^b | 0,90 | 0,01 |
| 48 | 50,33 ^c | 68,24 ^a | 0,90 | 0,01 |
| 72 | 50,33 ^c | 68,24 ^a | 0,90 | 0,01 |
| 96 | 50,33 ^c | 68,24 ^a | 0,90 | 0,01 |
| Les paramètres cinétiques | | | | |
| a (ml) | 8,64 ^a | 3,04 ^b | 0,26 | 0,0002 |
| b (ml) | 44,83 ^b | 68,36 ^a | 1,12 | 0,0002 |
| c (%.h⁻¹) | 3,68 ^b | 6,5 ^a | 0,2 | 0,0002 |

a : gaz produit à partir de la fraction soluble (ml), **b** : gaz produit à partir de la fraction insoluble mais potentiellement fermentescible (ml), **c** : vitesse de production de gaz (%.h⁻¹). Les moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$), **S.E.M.** : erreur standard des moyennes, **Pr.** : Probabilité.

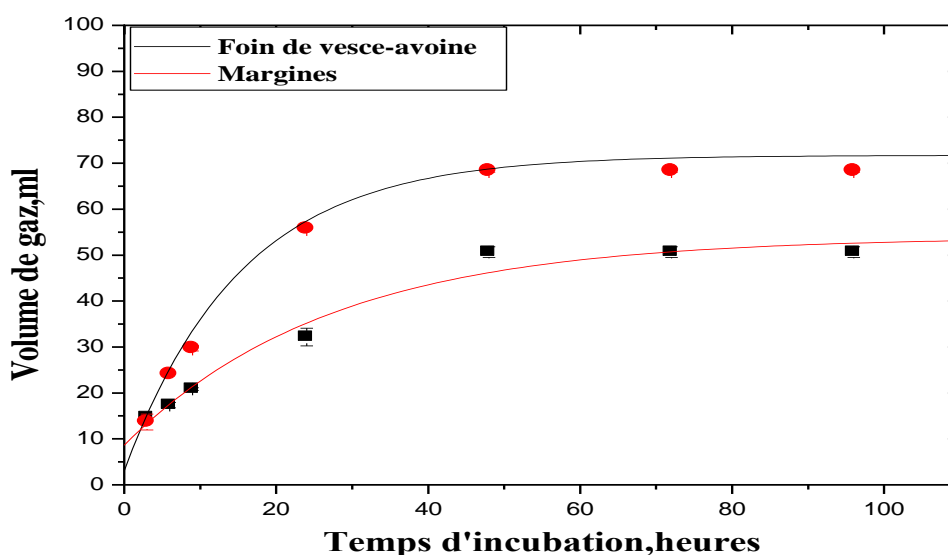


Figure 10. Cinétique modélisée de production de gaz due à la fermentation *in vitro* des margines et du foin de vesce-avoine.

concentration faible en TC montre la richesse des margines en tanins hydrolysables (TH). En effet, l'analyse quantitative en composés phénoliques des margines, en particulier les tanins, n'a pas fait l'objet de nombreux travaux. C'est pourquoi nous n'avons pas pu recueillir de données bibliographiques satisfaisantes. Pour ce substrat non conventionnel, la teneur en PT est supérieure à celle citée dans la littérature [123,124]. Par ailleurs, nos résultats concernant les teneurs en TT et en TC sont inférieurs à ceux indiqués par d'autres auteurs [125]. Ces différences peuvent être dues à la variété des olives, aux systèmes d'extraction de l'huile d'olive (à savoir par pression ou continue) et à la quantité d'eau ajoutée lors du processus d'extraction.

Les teneurs élevées en composés phénoliques et des tanins dans les margines pourraient avoir un effet sur la disponibilité et la digestibilité des nutriments par le microbiote ruminal. Plusieurs types de phénols incluant les phénols simples et les polyphénols affectent la valeur nutritive des aliments [117]. Cependant, certaines publications rapportent des effets bénéfiques des composés phénoliques et particulièrement des tanins dans les aliments [94]. La présence des tanins semble accroître la production de laine et protègent également les protéines de la dégradation microbienne. Ce qui améliore leur absorption intestinale.

2. Fermentation *in vitro* des margines par le microbiote ruminal

2.1. Cinétique de la production de gaz

La cinétique de la production de gaz des margines et du foin de vesce-avoine est illustrée par le tableau 5 et la figure 10. Les deux substrats manifestent une cinétique de dégradation proche l'une à l'autre. Elle est caractérisée par trois phases distinctes. La première phase correspond à une phase dite exponentielle ou phase de croissance rapide entre 10 et 24h, elle est caractérisée par une production élevée de gaz. La deuxième phase correspond à une phase de ralentissement où la production de gaz commence à diminuer à partir de 24h pour les deux substrats puis elle se stabilise après 48h. A partir de ce moment, la troisième phase dite stationnaire débute et elle correspond à l'épuisement du milieu de fermentation (dégradation complète du substrat) et des conditions défavorables engendrées dans le milieu par l'acidité résultant de l'accumulation des acides gras volatils (AGV). Le profil cinétique des margines (phase stationnaire après 48h) est distinct de celui observé dans d'autres travaux où la fermentation se stabilise au bout de 24h pour des sous-produits agroalimentaires tel que : les grignons d'olive, les déchets d'oranges et les déchets des dattes [126,127]. Alors que d'autres auteurs ayant travaillé sur des substrats plus fibreux (fractions de palmier dattier), trouvent que le plateau de production de gaz est atteint après 72h d'incubation [117].

2.1.1. Volume de gaz produit

La production de gaz engendrée par la fermentation *in vitro* des margines et du foin de vesce-avoine et les paramètres cinétiques modélisés sont présentés dans le tableau 5. La production de gaz *in vitro* est significativement différente entre les deux substrats aux différents temps d'incubation ($P < 0,05$). Après 96 h d'incubation, le foin de vesce-avoine engendre la plus grande production de gaz (68,24ml) que les margines (50,33ml). Cette différence est certainement associée à la composition chimique différente des deux substrats (Tableau 4). La haute fermentescibilité du foin de vesce-avoine est due certainement au fait que c'est un substrat hybride formé par l'association d'une légumineuse (la vesce : *Vicia Sativa*) riche en protéines (15 à 23 %) et d'une graminée (l'avoine : *Avena Sativa*) riche en fibres [128,129]. Ce qui permet une intensification et une stimulation de l'activité fermentaire du microbiote ruminal [130]. Il faut également signaler que le foin de vesce-avoine est un aliment le plus couramment donné aux animaux, par conséquent le microbiote ruminal est adapté à sa dégradation.

La faible biodégradation des margines comparativement au témoin pourrait être due à leur contenu phénolique contenant à la fois des phénols simples et complexes (tanins), difficiles à dégrader par le microbite ruminal. De plus, ces composés phénoliques ont la propriété de se lier aux protéines et aux fibres alimentaires avec lesquels ils forment des complexes résistants à la dégradation microbienne [92]. Ce qui conduit par conséquent à une réduction dans la production de gaz. Par ailleurs, les composés phénoliques sont également connus par leur action inhibitrice de l'activité fermentaire de la flore ruminale. D'après la littérature, certains phénols simples à faible poids moléculaires comme les acides p-coumarique, ferrulique et vaniline agissent aussi bien sur les microorganismes du rumen et également sur les enzymes impliquées dans les processus de la digestion, particulièrement, la β -glucosidase et la carboxyméthylcellulase [131].

En plus des composés phénoliques, la présence dans les margines d'acides gras à longues chaînes peut également influencer négativement leur biodégradation par le microbiote ruminal. En effet, les margines sont riches en acide oléique et linoléique qui sont caractérisés par leur activité antimicrobienne par cytotoxicité et/ou par inhibition de la croissance microbienne ruminale. Ces acides gras agissent aussi par un effet de barrière limitant l'accessibilité de microorganismes aux fibres alimentaires en minimisant le contact entre les enzymes et les polysaccharides de la paroi [131]. La très faible teneur de certains composants dans les margines, notamment les éléments minéraux, peut affecter également leur dégradation anaérobie par le microbiote ruminal. En effet, il faut également noter que la production de gaz issue de la fermentation des margines est importante malgré qu'elle est

inférieure à celle du témoin. Ceci nous permet de penser que la détoxification biologique des margines pourrait se faire via une biodégradation anaérobie par le microbiote ruminal. En outre, cette production de gaz pourrait être due à une assimilation des tanins hydrolysables par ce même microbiote. En effet, ces derniers sont facilement dégradés en anaérobiose par le microbiote ruminal [92]. De même, ces auteurs ont signalé également qu'ils existent des bactéries anaérobies capables de dissocier le complexe TH-protéines [92].

2.1.2. Paramètres cinétiques modélisés à la production de gaz *in vitro*

Les paramètres cinétiques de la production de gaz *in vitro* des margines et du foin de vesce-avoine, déduits du modèle d'Orskov et Mc Donald [105] sont mentionnés dans le tableau 5. Généralement, il est à constater que les valeurs de la production de gaz issues de la fraction soluble (a) des margines (8,64 ml) sont significativement supérieures à celles observées pour le foin de vesce-avoine (3,04 ml). Cette différence pourrait être expliquée par l'importance en sucres solubles déterminée dans les margines (39,91%) (Tableau 4).

Les valeurs positives de la production de gaz engendrée par la fraction soluble (a) pour le foin de vesce-avoine sont également signalées par d'autres auteurs [132]. Ils sont synonymes d'une absence de phase de latence due à la colonisation et à la dégradation de la fraction pariétale. La moyenne enregistrée est, cependant, inférieure à celle rapportée par Rira [133] qui note une valeur de 4,09 ml et ayant travaillé dans les mêmes conditions.

La production de gaz à partir de la fraction insoluble mais potentiellement fermentescible (b) est statistiquement différente ($P < 0,0002$) entre les deux substrats. La valeur la plus élevée est notée pour le foin de vesce-avoine (68,36 ml) et la plus faible est enregistrée pour les margines (44,83 ml). La différence observée dans les volumes de gaz produits à partir de la fraction insoluble (b) des deux substrats résulte probablement de leur composition chimique différente. En effet, la faible production de gaz à partir de la fraction (b) des margines peut être due à leur teneur en fraction soluble élevée (sucres totaux et composés phénoliques). En plus, il a été montré que ces composés phénoliques peuvent réduire la dégradation des fibres soit directement par la formation de complexe avec la fraction lignocellulosique en empêchant l'adhésion des microorganismes [92] ou indirectement en inhibant les cellulases impliquées dans leur dégradation. Il a été aussi signalé que ces composés phénoliques sont des chélateurs des ions métalliques nécessaires à la croissance des bactéries cellulolytiques [134]. De même, ces composés phénoliques exercent un effet inhibiteur sur les enzymes extracellulaires sécrétées par les bactéries. Ainsi l'activité de l'enzyme endoglucanase de *Fibrobacter succinogenes* (principale bactérie cellulolytique ruminale) est inhibé *in vitro* par les tanins de *Lotus corniculatus*. L'effet antimicrobien des composés phénoliques peut être dû également à leur liaison aux protéines des pores de la paroi.

Tableau 6. Analyse qualitative et quantitative du pool gazeux (productions de méthane et du dioxyde de carbone) engendré par la fermentation *in vitro* des margines et du foin de vesce-avoine.

| | Production de dioxyde de carbone (ml) | | | | Production de méthane (ml) | | | |
|------------|---------------------------------------|----------------------|-------|-------|----------------------------|----------------------|--------|------|
| | Margine | Foin de vesce-avoine | S.E.M | Pr. | Margine | Foin de vesce-avoine | S.E.M. | Pr. |
| 3h | 13,17 ^g | 11,84 ^h | 0,98 | 0,004 | 1,50 ^e | 2,33 ^e | 0,30 | 0,05 |
| 9h | 18,98 ^f | 25,68 ^e | 0,98 | 0,004 | 1,93 ^e | 4,0 ^c | 0,30 | 0,03 |
| 24h | 28,81 ^d | 49,48 ^b | 0,98 | 0,004 | 3,17 ^d | 6,25 ^b | 0,30 | 0,03 |
| 72h | 46,33 ^c | 58,57 ^a | 0,98 | 0,004 | 4,0 ^c | 9,67 ^a | 0,30 | 0,03 |
| 96h | 46,33 ^c | 58,57 ^a | 0,98 | 0,004 | 4,0 ^c | 9,67 ^a | 0,30 | 0,03 |

Les moyennes dans la même ligne affectées des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$). **S.E.M.** : erreur standard des moyennes, **Pr.** : Probabilité.

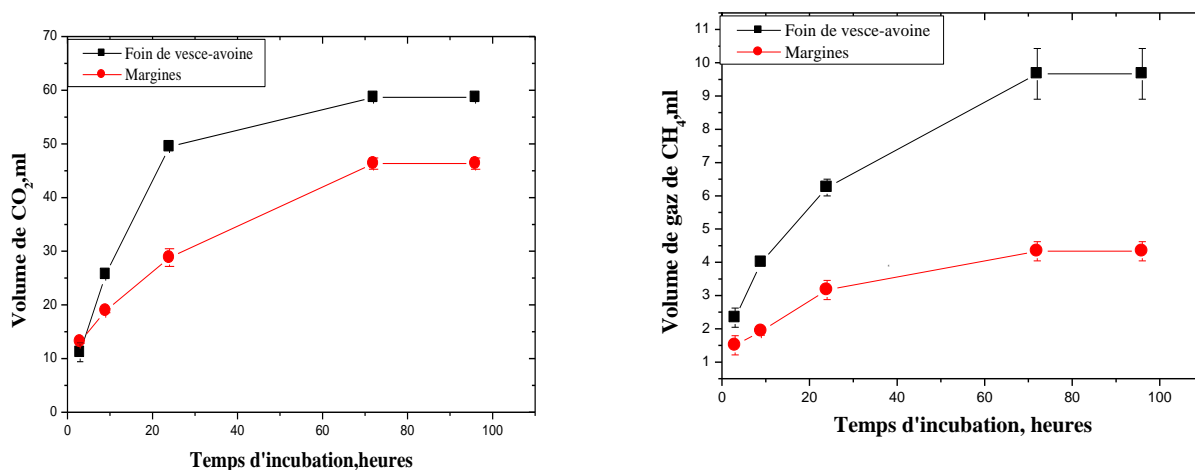


Figure 11. Cinétique de production de dioxyde de carbone et du méthane due à la fermentation *in vitro* des margines et du foin de vesce-avoine.

cellulaire, altérant de ce fait les mécanismes de transport de nombreux substrats essentiels tels que le glucose, les acides aminés et l'ammoniaque.

Les vitesses de production de gaz (c) des margines et de foin de vesce-avoine à partir de la fraction (b) sont significativement différentes ($P < 0,0002$). Le foin de vesce-avoine est plus rapidement dégradé ($6,5 \text{ \%} \cdot \text{h}^{-1}$) que les margines ($3,68 \text{ \%} \cdot \text{h}^{-1}$). En effet, 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. La vitesse de dégradation des margines concorde avec celle estimée par plusieurs auteurs travaillant sur des substrats ayant une composition chimique rapprochée à celle des margine [135,136]. Concernant le foin de vesce-avoine, la vitesse moyenne calculée est proche à celle publiée par plusieurs auteurs ($5,72 \text{ \%} \cdot \text{h}^{-1}$ et $6,17 \text{ \%} \cdot \text{h}^{-1}$) [133,117].

2.2. Profil fermentaire

Les cinétiques de production de dioxyde de carbone (CO_2) et du méthane (CH_4) au cours de la fermentation des deux substrats sont illustrées par le tableau 6 et la figure 11. Il ressort que les productions de CO_2 et de CH_4 sont statistiquement différents ($P < 0,05$). En général, la fermentation des deux substrats engendre un profil fermentaire orienté principalement vers une production accrue en CO_2 . Ce gaz est produit soit directement de la dégradation des carbohydrates des substrats ingérés et/ou indirectement à partir du système tampon (HCO_3) lors de la neutralisation des acides gras volatils (AGV) générés [137].

Les volumes de méthane produits sont de 9,67 ml et 4 ml, respectivement pour le foin de vesce-avoine et les margines. La production de méthane est synergique à celle de la production du CO_2 . Ce résultat est corroboré à celui observé *in vivo* par Chouinard *et al.* [138] mais différent de celui mentionné par Arhab *et al.* [139]. Ces derniers auteurs notent pour la fermentation *in vitro* de rebus de dattes (riches en sucres totaux) un antagonisme dans les productions du CO_2 et du CH_4 . Cette faible production du CH_4 notée pour les margines est probablement liée à sa composition chimique. Celle-ci est principalement constituée de sucres solubles fermentescibles (39,91%) dont la dégradation conduit théoriquement selon l'équation chimique de Wolin à une production accrue d'acides propionique et butyrique. Par ailleurs, celle de l'acide acétique est associée à une production importante d'hydrogène dont l'élimination engendre une production accrue de gaz sous forme de CH_4 [140].

Il faut également signaler que la margine est un sous-produit riche en composés phénoliques. Ces entités chimiques sont connues par leur effet antagoniste vis-à-vis de la production de méthane. Elles agissent soit directement sur les archaebactéries méthanogènes du rumen et/ou

Tableau 7. Paramètres fermentaires (**pH**, **N-NH₃** (**mg/ml**) et nombre de protozoaires (cellules/ml) de la dégradation *in vitro* des margines et du foin de vesce-avoine.

| Substrats | pH | N-NH₃ | Protozoaires |
|-----------------------------|-------------------|-------------------------|----------------------------------|
| Margine | 7,05 ^b | 3,81 ^b | 2 ^b x 10 ⁴ |
| Foin de vesce-avoine | 7,11 ^a | 4,16 ^a | 3 ^a x 10 ⁴ |
| S.E.M. | 0,01 | 0,18 | 1,29 |
| Pr. | 0,0007 | 0,01 | 0,0005 |

Les moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$), **S.E.M.** : erreur standard des moyennes, **Pr.** : Probabilité.

indirectement en limitant l'accessibilité des microorganismes aux substrats. D'autres études rapportent que les phénols simples tels que les acides p-coumarique et cinnamique diminuent fortement la production de méthane [141].

La présence des acides gras polyinsaturés dans les margines peut représenter également un facteur limitant la production de méthane. Ces molécules réduisent la digestibilité des constituants alimentaires, en particulier, les glucides structuraux en empêchant l'attachement des bactéries cellulolytiques sur les particules alimentaires. Les acides gras polyinsaturés pourraient également exercer un effet toxique directement sur les populations bactériennes. Ces inhibitions s'accompagnent principalement d'un accroissement du pourcentage d'acide propionique dans le contenu ruminal et d'une réduction des émissions de CH₄ [142]. Ces auteurs signalent dans une étude réalisée chez le mouton qu'une augmentation d'un point du pourcentage de matières grasses dans la ration s'accompagnait d'une diminution de 2,6% dans la production de CH₄ [142].

2.3. Paramètres fermentaires

- **pH**

Les paramètres fermentaires (pH, ammoniacque et nombre de protozoaires) sont présentés dans le tableau 7. Il indique que les valeurs de pH enregistrées après 24h d'incubation des deux substrats sont statistiquement distinctes ($P < 0,05$). Pour les margines, le pH est de 7,05 et celui du foin de vesce-avoine est de 7,11. Malgré cette différence notée entre les deux substrats testés, le pH reste dans la zone de neutralité. Ceci est dû à l'efficacité de la solution tampon utilisée [143].

- **Production d'ammoniacque**

La concentration en azote ammoniacal (N-NH₃) mesurée dans le surnageant après 24h d'incubation est significativement distincte entre les deux substrats ($P < 0,05$) (Tableau 7). La concentration la plus élevée est enregistrée pour le foin de vesce-avoine (4,16mg/ml) et la plus faible est notée pour les margines (3,81mg/ml). Selon la littérature, la dégradation de la masse protéique alimentaire conduit essentiellement à la production d'ammoniacque et de la biomasse bactérienne. De plus, de nombreux auteurs préconisent une concentration en azote ammoniacal de 80mg/100ml pour assurer une activité métabolique maximale du microbiote ruminal *in vitro* [117]. En effet, la teneur inférieure en azote ammoniacal issue de la dégradation des margines est probablement due au déséquilibre observé dans leur faune ruminale (nombre de protozoaires). Ces derniers jouent un rôle primordial dans la protéolyse

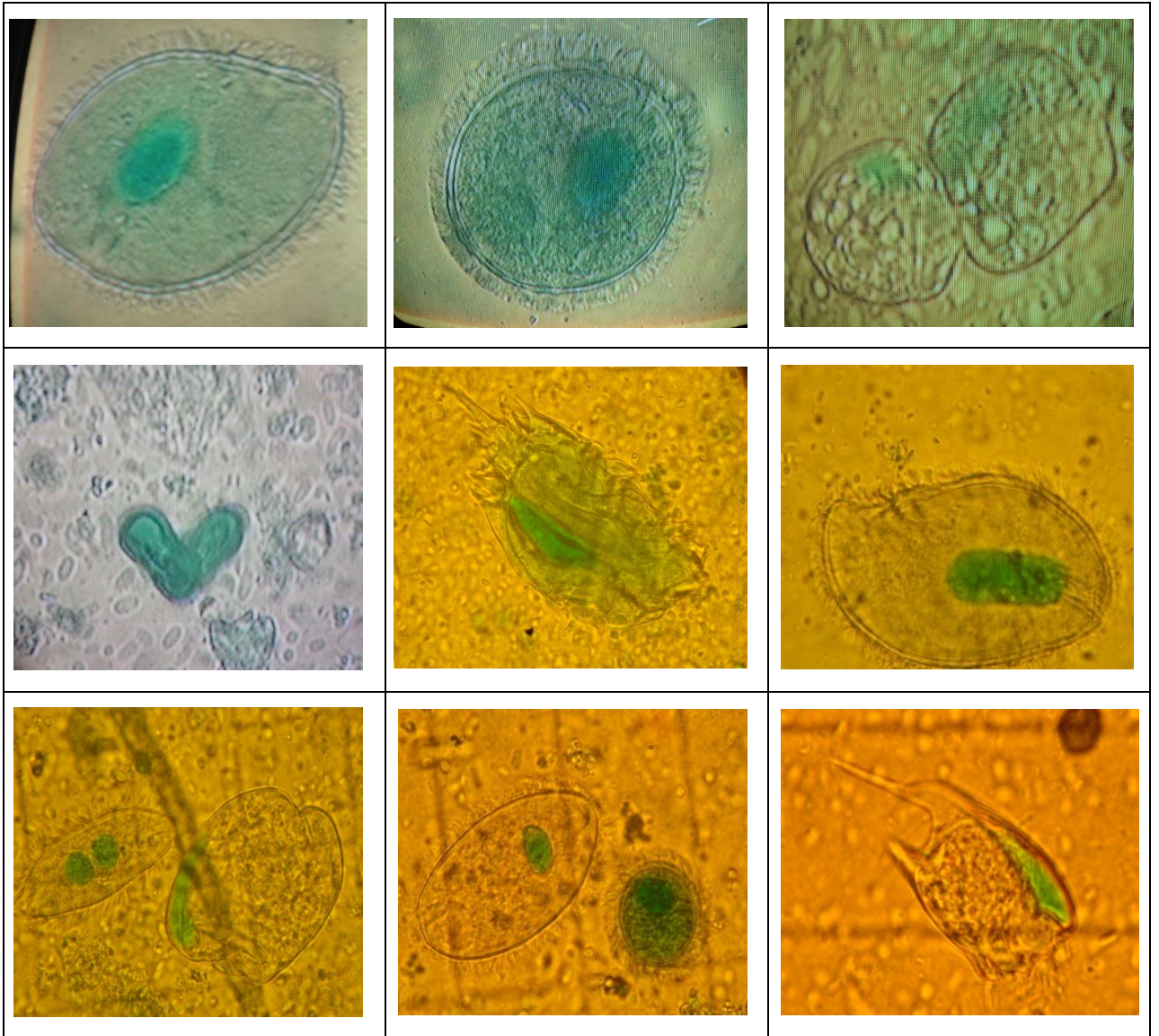


Figure 12. Photographies des protozoaires observés par microscope optique (Gx50)
(Résolution 12 millions pixels – Sony cyber shot T900)

où leur activité spécifique de désamination des acides aminés est trois fois supérieure à celle des bactéries [144].

Il est également possible que cette faible concentration en ammoniacque observée soit due à une bonne assimilation et incorporation de l'azote par le microbiote ruminal [117].

- **Protozoaires**

Dans notre étude, le dénombrement des protozoaires est effectué après 24h de fermentation. Les deux substrats étudiés atteignent des valeurs moyennes en protozoaires de 3×10^4 cellules/ml et de 2×10^4 cellules/ml, respectivement pour le foin de vesce-avoine et les margines (Tableau 7). En effet, le nombre de protozoaires est étroitement relié avec le régime alimentaire consommé. Les méthodes d'échantillonnages et l'espèce animale (donneur de jus de rumen) représentent également un des principaux facteurs qui peuvent influencer le nombre des protozoaires [145]. Le développement des protozoaires en présence du foin de la vesce-avoine peut être expliqué par une meilleure utilisation digestive des glucides pariétaux [146]. En ce qui concerne le nombre en protozoaires détecté après fermentation des margines, le résultat obtenu est probablement dû à leur contenu phénolique élevé. Ce dernier peut affecter négativement le métabolisme ou la croissance des protozoaires. En outre, ces composés phénoliques ont une action indirecte sur les protozoaires par leurs propriétés antiméthanogéniques. En effet, entre 9 et 25% des archaebactéries méthanogènes sont associées aux protozoaires ciliés qui leurs fournissent de l'hydrogène moléculaire (H_2) comme substrats énergétique. De même, il semble que les protozoaires sont très sensibles à la présence des acides gras polyinsaturés, notamment, les acides linoléique et oléique car ces microorganismes n'ont pas l'amplitude de les métaboliser [147].

3. Influence du contenu phénolique des margines sur l'activité ruminale

3.1. Effet des tanins

3.1.1. Cinétique de production de gaz *in vitro*

La cinétique de la production de gaz des margines et du foin de vesce-avoine en présence et en absence d'un chélateur des tanins le PEG est illustrée par le tableau 8 et la figure 13. Le PEG est un polymère synthétique possédant une grande affinité pour les tanins, il les rend inertes par la formation de complexes PEG-tanins [148]. Il a également la capacité de prévenir la formation de complexe protéines-tanins [148] et de libérer ces complexes déjà présents dans le milieu [149]. En raison de sa grande affinité pour les tanins, le PEG est utilisé dans le but de discriminer leur effet négatif sur la fermentation ruminale et d'améliorer les performances animales vis à vis des fourrages riches en tanins [148].

Tableau 8. Effet des tanins totaux sur la production cumulative de gaz (ml) et les paramètres cinétiques modélisés des margines et du foin de vesce-avoine.

| Substrats | Production de gaz (ml) | | | | | | | Paramètres cinétiques | | |
|-----------------------|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|------------------------|
| | 3h | 6h | 9h | 24h | 48h | 72h | 96h | a (ml) | b (ml) | c (%.h ⁻¹) |
| Margine | 14,67 ⁱ | 17,34 ^h | 20,85 ^f | 31,98 ^d | 50,33 ^b | 50,33 ^b | 50,33 ^b | 8,64 ^b | 44,83 ^b | 3,68 |
| Margines + PEG | 12,25 ⁱ | 21,01 ^g | 24,23 ^e | 32,5 ^c | 51,67 ^a | 51,67 ^a | 51,67 ^a | 9,45 ^a | 46,94 ^a | 3,69 |
| Foin | 14,17 ^j | 24,01 ^h | 29,68 ^f | 55,73 ^d | 68,24 ^b | 68,24 ^b | 68,24 ^b | 3,04 ^a | 68,36 ^b | 6,5 ^b |
| Foin + PEG | 14,56 ⁱ | 25,01 ^g | 29,70 ^e | 57,67 ^c | 71,00 ^a | 71,00 ^a | 71,00 ^a | 1,14 ^b | 71,09 ^a | 7,01 ^a |

a : gaz produit à partir de la fraction soluble (ml), **b** : gaz produit à partir de la fraction insoluble mais potentiellement fermentescible (ml), **c** : vitesse de production de gaz (%.h⁻¹). Les moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement différentes (p<0,05).

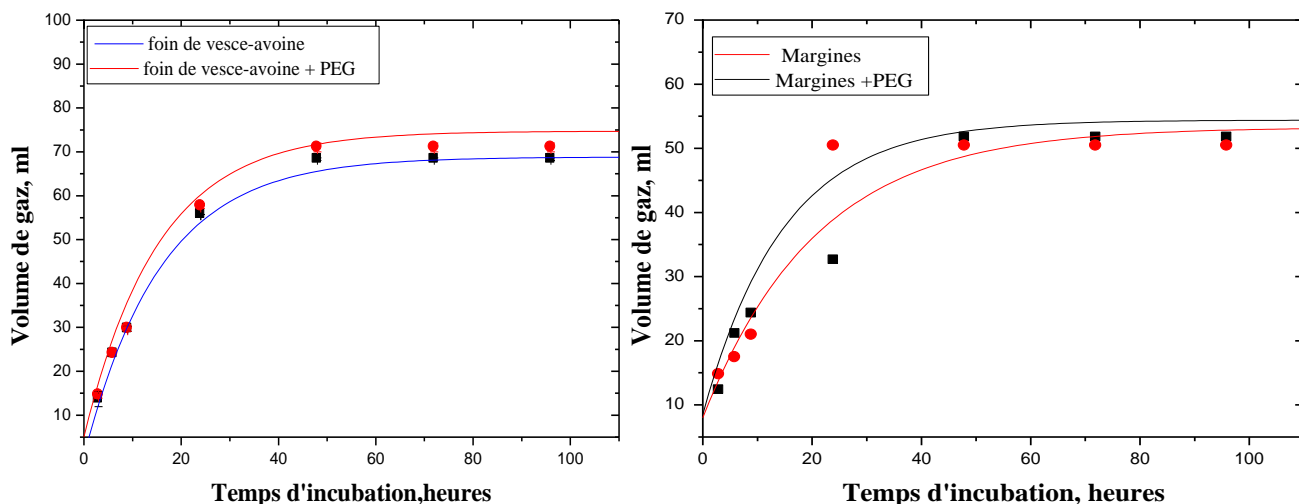


Figure 13. Cinétique modélisée de la production de gaz des margines et du foin de vesce-avoine en présence et en absence de PEG.

L'addition du polyéthylène glycol (PEG) à un effet significatif sur la production de gaz ($P < 0,05$). Son inclusion dans le milieu réactionnel améliore la production de gaz des deux substrats étudiés. Ainsi, les volumes de gaz sont augmentés de 2,6% et de 4% respectivement pour les margines et le foin de vesce-avoine (Tableau 8). Ces résultats montrent que les deux substrats se comportent de manière différente vis à vis du PEG. Cette variabilité peut être interprétée par l'hétérogénéité de la composition en tanins. En fait, l'amplitude de la réponse au traitement est dépendante de la concentration, la structure, l'activité biologique et la nature des tanins contenus dans chaque substrat [130].

La fixation du PEG aux sites où devraient se fixer les protéines libère ces dernières et les rend utilisables par le microbiote ruminal. Par conséquent, les nutriments deviennent disponibles (azote) et la dégradabilité des substrats est améliorée et se traduit par une augmentation dans la production de gaz [130]. Malgré que le foin de vesce-avoine est faible en tanins totaux (TT) par rapport aux margines. Cette augmentation est due spécifiquement à leur teneur en tanins condensés (TC). Ces derniers ayant une grande capacité de précipiter les protéines. Tandis que la faible augmentation dans la production de gaz observée dans le cas des margines après l'addition de PEG pourrait être expliqué par sa teneur faible en TC. Un résultat analogue est rapporté pour *Cajanus cajan* (légumineuse tropicale très riche en tanins) dont les tanins se montrent moins actifs que ceux du foin de vesce-avoine [113].

3.1.2. Paramètres cinétiques modélisés

L'addition du PEG au système batch influence différemment les paramètres cinétiques modélisés de la production de gaz des margines et du foin de vesce-avoine (Tableau 8). Dans les deux substrats, elle engendre une augmentation significative dans la production de gaz à partir de la fraction insoluble (b) ($P < 0,05$). En revanche, l'inclusion du PEG ne modifie pas la vitesse de production de gaz (c) à partir des margines ($P > 0,05$). A l'inverse, cette vitesse est significativement augmentée ($P < 0,05$) pour le foin de vesce-avoine. En ce qui concerne la production de gaz à partir de la fraction soluble (a), le PEG augmente significativement la production de gaz à partir de la fraction soluble des margines ($P < 0,05$). Cependant, ce même paramètre pour le foin de vesce-avoine est négativement influencé. Les résultats concordent parfaitement avec ceux de la bibliographie qui signalent des discordances dans l'influence du PEG sur les paramètres cinétiques de la production de gaz. Ainsi, certains auteurs indiquent que le PEG influence exclusivement et significativement sur la production de gaz à partir de la fraction insoluble (b) et sans aucun effet sur la production de gaz à partir de la fraction

Tableau 9. Influence des tanins totaux sur le profil fermentaire (productions de méthane et du dioxyde de carbone) des margines et du foin de vesce-avoine.

| Substrats | Production de méthane (ml) | | | | | Production de dioxyde de carbone (ml) | | | | |
|----------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 3h | 9h | 24h | 72h | 96h | 3h | 9h | 24h | 72h | 96h |
| Margine | 1,50 ^h | 1,93 ^e | 3,17 ^d | 4 ^b | 4 ^b | 13,17 | 18,98 | 28,81 | 46,33 | 46,33 |
| Margines + PEG | 1,17 ^j | 2,68 ^e | 4 ^c | 4,92 ^a | 4,92 ^a | 11,08 | 21,55 | 28,5 | 46,75 | 46,75 |
| Foin de vesce-avoine | 2,33 ^h | 4 ^f | 6,25 ^d | 9,67 ^b | 9,67 ^b | 11,84 | 25,68 | 49 | 58,57 | 58,57 |
| Foin + PEG | 3,33 ^g | 4,33 ^e | 7,60 ^c | 11,33 ^a | 11,33 ^a | 11,23 | 25,37 | 50,07 | 59,67 | 59,67 |

Les moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes ($p < 0,05$).

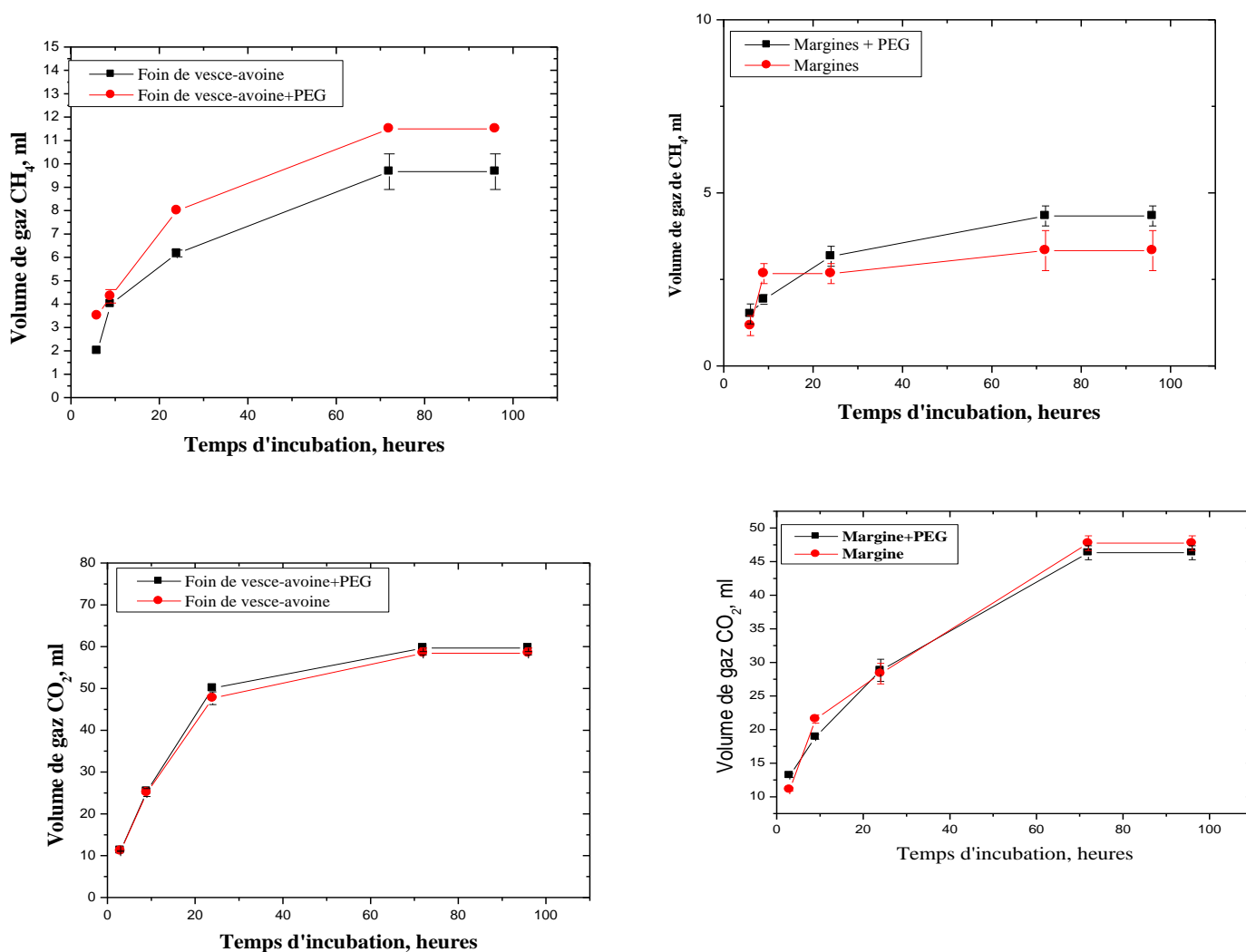


Figure 14. Influence des tanins sur les cinétiques de production de CO₂ et de CH₄ des margines et de foin de vesce-avoine.

tous les paramètres de la production de gaz (a, b et c) [92] ou seulement sur les paramètres (a) et (b) [151]. De même, d'autres travaux indiquent l'absence de corrélation entre la vitesse de production de gaz (c) et le taux de tanins [152,136]. Ainsi, l'influence du PEG sur la fermentation *in vitro* des margines peut s'expliquer par la solubilisation de macronutriments éventuellement liés aux tanins.

3.1.3. Profil fermentaire

L'influence du PEG sur le profil fermentaire des deux substrats est présentée dans le tableau 9 et la figure 14. Il révèle que le PEG induit une augmentation non significative ($P > 0,05$) dans la production du dioxyde de carbone (CO_2) pour les margines et le foin de vesce-avoine. Par contre, pour la production de méthane (CH_4), un accroissement significatif ($P < 0,05$) est observé pour les deux substrats. Ces résultats sont similaires à ceux avancés par d'autres publications qui rapportent que l'incorporation du PEG conduit aussi à une augmentation dans la production du CH_4 [153]. Ces auteurs signalent que l'addition du PEG à *Lotus Pedunculatus* augmente la production de méthane de 20%. Ceci laisse penser que les tanins ont un effet inhibiteur vis à vis des archaebactéries méthanogènes. Cette action peut être soit directe par l'inhibition de la croissance des archaebactéries méthanogènes (mise en évidence par une culture pure de *Methanobrevibacter Ruminantium*) ou indirecte par réduction de la production de l'hydrogène (H_2) [153]. Par contre, d'autres travaux montrent que le PEG n'a aucun effet sur la production de méthane pour *Medicago Sativa* et *Carduus pycnocephalus* [154]. Ces différences de réponse au traitement par PEG peuvent être attribuées à plusieurs facteurs : le taux de tanins présents dans les substrats, leur structure chimique, leur degré de polymérisation et l'interaction structure-activité biologique des tanins [130].

3.1.4. Paramètres fermentaires

• pH

Le tableau 10 représente les valeurs de pH mesuré après 24h d'incubation des deux substrats testés. Après addition de PEG, une augmentation significative de pH est remarquée ($P < 0,05$). Elle de 0,7 et de 0,6 unités respectivement pour les margines et le foin de vesce-avoine. Cette augmentation du pH peut être due à la dégradation des acides phénoliques simples et les acides organiques portant des groupements COO^- et/ou OH^- après désactivation des tanins [33]. Contrairement aux résultats de cette étude, certains auteurs indiquent que le PEG n'a aucun effet significatif sur le pH [153,155], alors que d'autres travaux notent une diminution significative de pH après l'addition de PEG [145]. Ceci est expliqué par la stimulation de la dégradation des carbohydrates.

Tableau 10. Effet des tanins totaux sur les paramètres fermentaires (**pH**, **N-NH₃ (mg/ml)**) et nombre de protozoaires (cellules/ml) de la dégradation *in vitro* des margines et du foin de vesce-avoine.

| Substrats | pH | N-NH₃ | Protozoaires |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| Margine | 7,05 ^b | 3,81 ^a | 2 ^b x 10 ⁴ |
| Margine + PEG | 7,12 ^a | 3,20 ^b | 2,80 ^a x 10 ⁴ |
| S.E.M. | 2 | 0,03 | 1,41 |
| Pr. | 0,04 | 0,0090 | 0,004 |
| Foin de vesce-avoine | 7,11 ^b | 4,16 | 3 ^b x 10 ⁴ |
| Foin de vesce-avoine + PEG | 7,17 ^a | 4,36 | 4 ^a x 10 ⁴ |
| S.E.M. | 1,2 | 0,18 | 1,47 |
| Pr. | 0,03 | 0,246 | 0,04 |

Les moyennes dans la même colonne affectées de lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$). **S.E.M.** : erreur standard des moyennes, **Pr** : Probabilité

Production d'ammoniaque

L'effet du PEG sur la production de l'ammoniaque est très variable pour les deux substrats étudiés. Le PEG n'influence pas significativement la production d'ammoniaque dans le cas du foin de vesce-avoine ($P > 0,05$). Cependant, pour les margines l'addition du PEG conduit à une diminution significative dans la production d'ammoniaque ($P < 0,05$). Ces résultats concordent avec les observations rapportées par plusieurs auteurs travaillant sur des plantes tannifères ; L'incubation de *Medicago sativa* (riche en tanins) en présence de PEG diminue la production de l'ammoniaque [153]. La même tendance est observée pour un maïs incubé en présence de tanins et traité par le PEG [156]. Cette situation peut être expliquée par un bouleversement de l'équilibre dans la population du microbiote ruminal. En effet, la baisse de la concentration en azote ammoniacal indique que les populations dominantes ont probablement été éliminées en présence des complexes PEG-tanins. Parallèlement, il semble que des populations microbiennes sous dominantes ont émergé en présence des mêmes complexes et c'est leur activité métabolique qui serait responsable de l'accroissement de la production de gaz de méthane.

• Protozoaires

Le nombre en protozoaires des deux substrats étudiés en présence de PEG est illustré dans le tableau 10. Il ressort que le PEG augmente significativement le nombre de protozoaires ($P < 0,05$) soit 4×10^4 cellules/ml et $2,80 \times 10^4$ cellules/ml, respectivement pour le foin de vesce-avoine et les margines. Ces résultats montrent clairement l'effet inhibiteur qu'exercent les tanins totaux (TT) sur les protozoaires. En effet, l'effet dépressif des tanins sur les protozoaires est signalé dans la littérature [157]. Cependant, le mécanisme d'action reste non étudié jusqu'à maintenant et des recherches sont nécessaires pour bien apprécier l'effet des métabolites secondaires sur les protozoaires [158]. Ce résultat est conforté par des travaux réalisés sur de plantes tannifères (*Acacia angustissima* et *Bursera simaruba*) incubées en présence de PEG. Ces derniers rapportent également que l'addition du PEG conduit à une augmentation importante du nombre de protozoaires [158].

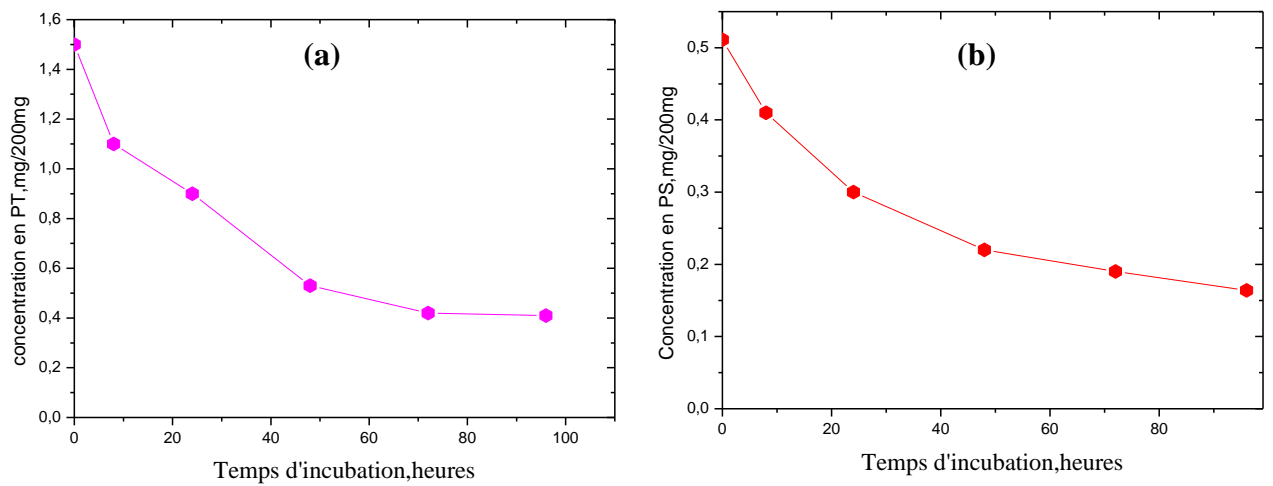


Figure 15. Cinétique de biodégradation anaérobie par le microbiote ruminal d'ovins des phénols totaux (a) et des phénols simples (b) présents dans les margines.

4. Cinétique de biodégradation du contenu phénolique des margines par le microbiote ruminal

Les cinétiques de biodégradation anaérobie des phénols totaux et des phénols simples, présentes dans les margines, par le microbiote ruminal d'ovins sont montrées dans la figure 15. Elle nous permet de constater que les courbes cinétiques de biodégradation des phénols totaux (PT) et des phénols simples (PS) suivent la même allure. Cette dégradation débute dès les premières heures de fermentation ($t=8h$) et elle n'est pas tributaire d'une phase de latence. Cette situation suggère que les microorganismes du rumen sont probablement dotés d'équipement enzymatique nécessaire à la dégradation des substances phénoliques. De plus, cette capacité fermentaire peut être due à une adaptation progressive des microorganismes du rumen aux substances inhibitrices. En effet, ce constat a été également fait pour différentes espèces fourragères contenant un taux élevé en facteurs antinutritionnels [159].

Le taux de biodégradation des phénols totaux est de 72,68% et celui des phénols simples est 67,84%. Il faut également signaler que la majeure partie de ces composés phénoliques est dégradée pendant les premières 48h d'incubation où des taux de biodégradation égales à 63,33% et 56,94% ont été enregistrés, respectivement pour les phénols totaux et les phénols simples. Ce qui représente 87,13% et 83,93% du taux total de biodégradation de ces deux composés. Ceci montre d'une part que la croissance de la microflore ruminale n'est pas inhibé par la présence des composés phénoliques des margines. En outre, il paraît que ce même microbiote est capable de dégrader le contenu phénolique des margines. Ce constat est consolidé par certains travaux qui rapportent la possibilité de croissance des bactéries du rumen en présence de composés phénoliques (flavanol glucoside) comme seule source d'énergie et de carbone [67]. Ce résultat pourrait être aussi expliqué par l'activation du système enzymatique du métabolisme alternatif de certains microorganismes en présence d'une concentration élevée en composés phénoliques. En effet, il a été montré que certaines espèces aérobies sont stimulées par la formation des peroxyosomes de grande taille qui jouent un rôle important dans la dégradation et la métabolisation des composés phénoliques [160].

Chimiquement, les PT correspondent à l'ensemble incluant les phénols simples et les tanins. De leur côté, les tanins totaux englobent les tanins libres (hydrolysables) et les tanins fixés (condensés). Selon l'analyse chimique, le contenu tannoïde des margines est principalement formé de tanins hydrolysables. Ainsi, le taux élevé de biodégradation des phénols totaux pourrait être dû à une dégradation intense de ces tanins hydrolysables. En effet, certains microorganismes du rumen, notamment les *Sterptococcus*, possèdent des enzymes capables de dégrader les composés phénoliques et particulièrement les tanins hydrolysables. C'est l'enzyme tannase ou tanins-acyl hydrolase (E.C. 3.1.1.20) qui intervient dans l'hydrolyse des

liaisons esters des tanins hydrolysables en produisant de l'acide gallique et du glucose. Concernant les composés phénoliques proprement dits, leur assimilation par le microbiote ruminal se fait soit par réduction de leurs noyaux aromatiques ou par leur transformation en sous produits dérivés.

Au-delà de 48h d'incubation, l'activité fermentaire du microbiote vis-à-vis des phénols totaux et des phénols simples baisse d'une manière significative ($P < 0,05$). Durant les dernières 48h de fermentation, des taux de biodégradation de 8% et de 10,9% sont enregistrés, respectivement pour les PT et les PS. Ceci pourrait être attribué à l'épuisement des composés phénoliques biodégradables dans le milieu de culture et/ou à la bioconversion des substrats en composés phénoliques stables et non biodégradables. En effet, des travaux ont montré que les produits de dégradation de certains composés phénoliques peuvent être plus toxiques que les composés initiaux. Il faut également signaler que durant cette période, la biodégradation des phénols simples est plus importante ($P < 0,05$) que celle des phénols totaux. En effet, plusieurs auteurs ont démontré que la dégradation des polyphénols engendre la production de monomères simples qui peuvent être polymérisés et forment des tanins résistants à la biodégradation [161]. Ces derniers sont non biodégradables à cause de leur structure complexe et hétérogène et pourraient présenter un effet très toxique [162].

Discussion générale et conclusion

Les margines sont des effluents liquides de l'industrie oléicole. Leur déversement dans les milieux naturels provoque sérieux problèmes environnementaux. Par conséquent, leur valorisation est devenue une nécessité intense de toutes les entreprises. De ce fait, ce travail a pour but principal d'incorporer les margines dans l'alimentation des ruminants. En évaluant l'aptitude du microbiote ruminal d'ovins à les fermenter. De plus, les margines sont caractérisées par leur contenu phénolique important. Dans cet objectif, cette étude s'est intéressée également à leur biotransformation anaérobie par le microbiote ruminal. L'étude de la fermentation *in vitro* des margines est menée comparativement à un substrat standard ; le foin de vesce-avoine. La fermentation est menée selon le procédé de la production de gaz *in vitro* décrit par Menke *et al.* [163]. Dans le but d'étudier l'influence des composés phénoliques sur l'activité fermentaire du microbiote ruminal, la fermentation est réalisée en présence et en absence d'un agent chélateur des tanins qui est le polyéthylène glycol (PEG).

Les résultats de l'analyse chimique montrent que les margines sont riches en sucres totaux. Ces derniers représentent une source énergétique majeure pour les ruminants, rendant ainsi sa valeur nutritive plus importante. Elles sont, par contre, pauvres en élément minéraux. Ainsi, leur valorisation nécessitera un complément minéral. L'analyse phytochimique révèle la richesse des margines en phénols totaux et en tanins totaux, cependant, elles contiennent une très faible teneur en tanins condensés. Ce qui indique leur contenu élevé en tanins hydrolysables. En ce qui concerne les résultats de la production de gaz *in vitro*, il s'avère que les margines sont dégradées par le microbiote ruminal, mais à un niveau inférieur à celui du foin de vesce-avoine. Cette situation est certainement associée à la composition chimique de margines. En effet, ces dernières sont riches en composés phénoliques (phénols simples, tanins) connus par leur action antagoniste vis-à-vis du nutriment (précipitation des protéines) et du métabolisme microbien. Ces composés phénoliques agissent également sur les enzymes impliquées dans les processus de la digestion, particulièrement, la β -glucosidase et la carboxyméthylcellulase.

Le profil fermentaire de dégradation des margines *in vitro* montre que sa fermentation s'oriente vers une production accrue en dioxyde de carbone. Cette dernière est fortement corrélée à la production des acides propionique et butyrique, source majeure d'énergie pour les ruminants. En revanche, la faible production de méthane peut s'expliquer à la présence des composés phénoliques. Ces entités chimiques sont connues par leur action inhibitrice vis-à-vis de la production de méthane soit en réduisant la digestibilité de la cellulose et/ou en empêchant la fixation des bactéries cellulolytiques aux particules alimentaires. De même, la présence des acides gras polyinsaturés pourraient avoir un effet toxique sur la population

microbienne. En outre, cette diminution est corroborée à une réduction dans le nombre de protozoaires auxquels la flore des *Aarchaea* est principalement associée (bactéries productrices de méthane). Ce résultat ouvre des perspectives intéressantes dans la valorisation environnementale des margines par usage de leur contenu phénolique dans la réduction du méthane.

L'addition du PEG n'améliore pas considérablement la fermentation *in vitro* des margines. Ceci indique l'effet limité des tanins présents dans les margines. En effet, le PEG est un polymère synthétique possédant une grande affinité pour les tanins. Il forme des complexes stables avec ces molécules et permet de prévenir la précipitation des protéines. De plus, l'action des tanins est tributaire de leur taux et de leur structure. Ainsi, cette faible réponse au traitement observée dans notre étude peut s'expliquer par la faible teneur des margines en tanins condensés. Cependant, l'addition du PEG favorise la production de méthane. Cette action est probablement due à l'effet inhibiteur des composés phénoliques appliqués sur les archaebactéries méthanogènes productrices de méthane. De même, cette augmentation s'accompagne d'une élévation dans le nombre de protozoaires.

Dans l'étude de la biodégradation des composés phénoliques, la dégradation des phénols simples a été mise en évidence par l'addition du PEG. Elle a permis de constater que les composés phénoliques (phénols totaux et simples) sont majoritairement dégradés par le microbiote ruminal. Leurs cinétiques de dégradation débute dès les première heures d'incubation et elles s'achèvent qu'en fin de fermentation. Les taux de biodégradation des phénols totaux et des phénols simples enregistrés sont respectivement de 72,68% et 67,84%. Cette situation indique que les microorganismes du rumen disposent soit de l'équipement enzymatique indispensable pour la dégradation de ces substances et/ou d'un système de détoxification approprié. Un ralentissement dans la biodégradation de ces composés est noté au-delà de 48h d'incubation. Ce ci pourraient être attribuées soit à l'épuisement des composés phénoliques biodégradables dans le milieu de culture, leurs bioconversion en composés phénoliques stables et non biodégradables ou à l'accumulation de produits intermédiaires plus toxiques que les produits d'origines.

A la lumière de l'ensemble des résultats obtenus, il paraît que les margines sont dégradées par le microbiote ruminal. Ce qui nous permet de recommander fortement son utilisation comme supplément dans l'alimentation des ruminants, en tenant compte de sa pauvreté en matières minérales. Il reste à établir les rations auxquelles elles devraient être ajoutées et dans quelles proportions. La biodégradation de son contenu phénolique par le microbiote ruminal et son implication probable dans la réduction du méthane permet de proposer son usage comme additif alimentaire lors de la consommation de concentrés (substrats méthanogènes) et de

procédé biologique pour la détoxification des margines. Dans le but de progresser dans ce domaine, il est indispensable d'identifier les différents composants phénoliques présents dans les margines ainsi que leur structure afin d'élucider le rapport structure et activité biologique. Il semble important de conduire un complément d'étude *in vivo* pour déterminer le devenir de ces composés phénoliques dans le rumen en identifiant leurs métabolites terminaux ou intermédiaires puis la recherche de ces mêmes composés dans les produits nobles notamment la viande et le lait.

Références bibliographiques

1. International Olive Oil Council. Site web : <http://www.internationaloliveoil.org/>.
2. Arda Y., Nazli B. P., Semra Y. T. 2010. Performance evaluation on the treatment of olive mill waste water in vertical subsurface flow constructed wetlands. *Desalination*, 262 : 209–214.
3. Kavvadias V., Doula M.K., Komnitsas K., Liakopoulou N. 2010. Disposal of olive oil mill wastes in evaporation ponds: Effects on soil properties. *Journal of Hazardous Materials*, 182 : 144–155.
4. Benhaoun G., Lazzeri Yvette. 2007. L'olivier en Méditerranée: du symbole à l'économie. édition L'harmattan, 33p.
5. El hajjouji H. 2007. Evolution des caractéristiques physico-chimiques, spectroscopiques et écotoxicologiques des effluents d'huileries d'olive au cours de traitements biologique et chimique. Thèse de doctorat. Université de Marrakech. 148p.
6. Fiorentino A., Gentili A., Isidori M., Monaco P., Nardelli A., Parrella A., Temussi F. 2003. Environmental effects caused by olive mill Waste waters : toxicity comparison of low-molecular-weight phenol Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 : 1005–1009.
7. Tsagariki E., Harris N., Lazarides., Konstantinos B. P. 2007. Olive mill waste water treatment. *Springerlink*, 133-157.
8. Bensemmane A. 2009. Le trait d'union des opérateurs économiques pour le Renouveau du Monde Agricole et Rural. 1^{er} forum méditerranéen de l'oléiculture, 1111- 4762.
9. Francesco G.L. 1993. Evaluations économiques sur l'innovation technologique. Les problèmes de l'environnement dans le secteur oléicole en Italie. *Olivae*, 47 : 15-20.
10. Morillo J. A., Antizar-Ladislao B., Monteoliva-Sánchez M., Ramos-Cormenzana A., Russell N. J. 2009. Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Applied Microbiology Biotechnology*, 82 : 25–39.
11. Nefzaoui A. 1991. Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous produits. *Option méditerranéennes*, 16 : 101-108.

- 12. Ramos-Cormenzana A., Monteoliva-Sanchez M., Lopez M. J. 1995.** Bioremediation of Alpechin. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 249-268.
- 13. Benyahia N., Zein K. 2003.** Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. 2^{ème} Conférence Internationale Swiss Environmental Solution. Lausanne, Suisse.
- 14. Chiofalo B., Liotta L. Zumbo A., Chiofalo V. 2004.** Administration of olive cake for ewe feeding: effect on milk yield and composition. *Small Ruminant Research*, 55: 169–176.
- 15. Martin-Garcia A.I., Moumen A., Yanez-Ruiz D.R., Molina-Alcaide E., 2003.** Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 107 : 61–74.
- 16. Yalcuk A., Baldan Pakdil N., Yaprak Turan S. 2010.** Performance evaluation on the treatment of olive mill waste water in vertical subsurface flow constructed wetlands . *Desalination*, 262 : 209–214.
- 17. Hachicha R., Hachicha S., Trabelsi I., Steve Woodward B., Mechichi T. 2009.** Evolution of the fatty fraction during co-composting of olive oil industry wastes with animal manure: Maturity assessment of the end product. *Chemosphere*, 75 : 1382–1386.
- 18. Yaakoubi A., Chahlaoui A., Rahmani M., Elyachioui M., Oulhote Y. 2009.** Effet de l'épandage des margines sur la microflore du sol. *Agrosolutions*, 20 :1.
- 19. Hafidia M., Amira S., Revel J.C. 2005.** Structural characterization of olive mill wastewater after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and ¹³C NMR. *Process Biochemistry*, 40 : 2615–2622.
- 20. Khoufi S., Feki F., Sayadi S. 2007.** Detoxification of olive mill wastewater by electrocoagulation and sedimentation processes. *Journal of Hazardous Materials*, 142: 58-67.
- 21. Bazoti F.N., Gikas E., Skaltsounis A.L., Tsaibopoulos A. 2006.** Development of a liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC–ESI MS/MS) method for the quantification of bioactive substances present in olive oil mill wastewaters. *Analytica Chimica Acta*, 573–574, 258–266.

- 22. Blika p.s., Stamatelatou K., Kornaros M., Lyberato G. 2009.** Anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Global Nest Journal*, 11 (3) : 364-372.
- 23. Ranalli A. 1991.** The effluent from olive mills : Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*, 37 : 30-39.
- 24. Fiestas Ros de Ursinos J.A., Borja R. 1992.** Use and treatment of olive mill wastewater : Current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites*, 2 : 101-106.
- 25. Hamdi M. 1991.** Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines, effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive. Thèse de l'université de Provence. Marseille, France. 166 p.
- 26. Obied H., Allen M., Bedgood D., Prenzler P., Robards K., Stockmann R. 2005.** Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of agricultural Food Chemistry*, 53 : 823-837.
- 27. Galanakis C. M., Tornberg E., Gekas V. 2010.** A study of the recovery of the dietary fibres from olive mill wastewater and the gelling ability of the soluble fibre fraction. *LWT - Food Science and Technology*, 43 :1009-1017.
- 28. Niaounakis M., Halvdakis C. P. 2004.** Olive mill waste management-Literature Review and patent Survey. Typoshito-George Dardanos, Athens, Greece.
- 29. Fezzni B., Ben Cheikharticle R. 2009.** Extention of the biodegradation odél N0.1 (ADM1) to include phenolic compounds biodegradation process for the simulation of anaerobic co-digestion of olive mill wastes at thermophilic temperature. *Journal of Hazardous Materials*, 162 :1563-1570.
- 30. Garcia-Castello E., Cassano A., Criscuoli A., Conidi C., Drioli E. 2010.** Recovery and concentration of polyphenols from olive mill wastewaters by integrated membrane system. *water reserch*, 44 : 3883-3892.
- 31. Jail A., Boukhoubza F., Nejmeddine A., Sayadi S., Hassani L. 2010.** Co-treatment of olive-mill and urban wastewaters by experimental stabilization ponds. *Journal of Hazardous Materials*, 176 : 893-900.

- 32. Capasso R., De Martino A., Arienzo M. 2002.** Recovery and characterization of the metal polymeric organic fraction (polymerin) from olive oil mill wastewaters. *Journal Agrical Food Chemistry*, 50 : 2846-55.
- 33. Aissam H. 2003.** Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. Thèse de doctorat national. Université sidi mohamed ben abdellah. Fes. 156p.
- 34. Fiestas Ros de Ursinos J.A. 1981.** Différentes utilisations des margines. Actes du Séminaire Internatinal sur la valorisation des sous produits de l'olivier. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), 93-110. Tunisie.
- 35. Fakharedine N., El Hajjouji H., Ait Baddi G., Revel J.C., Hafidi M. 2006** Chemical and spectroscopic analysis of organic matter transformation during aerobic digestion of olive-mill waste-waters. *Process Biochemistry*, 41 : 398–404.
- 36. Casa R., D'Annibale A., Pieruccetti F., Stazi S.R., Giovannozzi Sermanni G., Lo Cascio B. 2003.** Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*, 50(8) : 959-66.
- 37. Tsioulpas A., Dimou D., Iconomou D., Aggelis G. 2002.** Phenolic removal in olive mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. In respect to their phenol Oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology*, 84 : 251-257.
- 38. Sayadi S., Ellouz R. 1993.** Screening of white rot fungi for the treatment of olive mill waste-waters, *Journal Chemical Biotechnology*, 57, 141-146.
- 39. Kissi M., Mountadar M., Assobhei O., Gargiulo E., Palmieri G., Giardina P., et al . 2001.** Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57: 1-2, 221-6.
- 40. Lafka T., Lazou A.E., Sinanoglou V. J., Lazos E. S. 2010.** Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chemistry*, 125 : 92–98.
- 41. Niaounakis M., Halvadakis C.P. 2006.** Olive processing waste management: literature review and patent survey, second ed. Elsevier, Amsterdam.
- 42. Tanchev S., Joncheva N., Genov N., Codounis M. 1980.** Identification of anthocyanins contained in olives. *Georgike Ereuna*, 4 : 5-13.

- 43. Seraphim P., Maria G.P., Stylianos F., Michael K., George A. 2008.** Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresource Technology*, 99 : 2419–2428.
- 44. Lacomelli A. 2000.** Olive mill waste water & SAP adopted by BACRON contracting parties. Work Shop on Agro- industry development in the coastal areas, with special focus on the olive oil industry. Beirut –Lebanon, 4- 6 December.
- 45. Projet SMAP III –Tunisie. 2006-2008.** Stratégie de gestion intégrée de la zone côtière Sud du Grand Sfax. Aménagement paysager des bassins de margine.
- 46. Arda Y., Nazli B. P., Semra Y .T. 2010.** Performance evaluation on the treatment of olive mill waste water in vertical subsurface flow constructed wetlands. *Desalination*, 262 : 209–214.
- 47. Kavvadias V., Doula M.K ., Komnitsas K ., Liakopoulou N. 2010.** Disposal of olive oil mill wastes in evaporation ponds: Effects on soil properties. *Journal of Hazardous Materials*, 182 : 144–155.
- 48. Gonçalves C., Lopes M., Ferreira J. P., Belo I. 2009.** Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. *Bioresource Technology*, 100: 3759–3763.
- 49. Azbar N., Tutuk F., Keskin T. 2009.** Biodegradation performance of an anaerobic hybrid reactor treating olive mill effluent under various organic loading rates. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63 : 690–698.
- 50. Mantzavinos D., Kalogerakis N. 2005.** Treatment of olive mill effluent: Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes. *Environment International*, 31 : 289-295.
- 51. Dias A., Bezerra R., Pereira A. 2004.** Activity and elution profile laccase during biological decolorization and dephenolisation of olive mill waste water. *Bioresource Technology*, 92 :7-13.

- 52. Galiatsatou P., Metaxas M., Arapoglou D., Kasselouri-Rigopoulou V. 2002.** Treatment of olive mill waste water with activated carbons from agricultural by-products. *Waste Management*, 22 : 803-812.
- 53. Khoufi S., Aloui F., Sayadi S. 2008.** Extraction of antioxidants from olive mill wastewater and electrocoagulation of exhausted fraction to reduce its toxicity on anaerobic digestion. *Journal of hazardous materials*, 151 : 531-539.
- 54. Achak A., Ouazzani N., Yaacoubi A., MANDI L. 2008.** Caractérisation des margines issues d'une huilerie moderne et essai de leur traitement par coagulation-floculation par la chaux et le sulfate d'aluminium. *Eau*, 21 : 53-57.
- 55. Pharm Minh D., Gallezot P., Besson M. 2006.** Degradation of olive oil mill effluents by catalytic wet air oxidation. 1. Reactivity of p-coumaric acid over Pt and Ru supported catalysts. *Applied Catalysis Environmental*, 63 : 68-75.
- 56. Chedeville O., Debacq M., Porte C. 2009.** Removal of phenolic compounds present in olive mill wastewaters by ozonation. *Desalination*, 249 : 865-869.
- 57. Canizares P., Lobato J., Paz R., Rodrigo M.A. Saez C. 2007.** Advanced oxidation processes for the treatment of olive-oil mills wastewater. *Chemosphere*, 67 : 832-838.
- 58. Drouiche M., Lemignot V., Lounici H., Belhocine D., Grib H., Pauss A., et al. 2004.** A compact process for the treatment of olive mill wastewater by combining of and UV/H₂O₂ techniques. *Desalination*, 169 : 81-88.
- 59. Khoufi S., Aloui F., Sayadi S. 2006.** Treatment of olive oil mill wastewater by combined process electro-Fenton reaction and anaerobic digestion. *Water Research*, 40 : 2007-2016.
- 60. Kestioglua K., Yonara T., Azbarb N. 2005.** Feasibility of physico-chemical treatment and Advanced Oxidation Processes (AOPs) as a means of pretreatment of olive mill effluent (OME). *Process Biochemistry*, 40 : 2409-2416.

- 61. Ademe. 2000.** Les coproduits d'origine végétale des industries agroalimentaires. Ademe Edition, 76p.
- 62. Proot J. 2002.** Les technologies propres appliquées aux industries agroalimentaires. Aris.T, Bourgone, 12p.
- 63. Tyouri M., Elbouardi A., Manal A., Homari A., Ezbakhe H., Ajzoul T. 2007.** Propriétés thermophysiques du sable émulsion Margineux utilisé dans la réalisation des Pistes agricoles. 13^{èmes} Journées Internationales de Thermique. Albi, France du 28 au 30 Août.
- 64. Benhaoun G., Lazzeri Yvette. 2007.** L'olivier en Méditerranée : du symbole à l'économie : édition L'harmattan, 137p.
- 65. Beccari M., Bonemazzi F., Majone M., Riccardi C. 1996.** Interaction between acidogenesis and methanogenesis in the anaerobic treatment of olive-oil mill effluents. *Water Research* : 30 (1):183–9.
- 66. Zhang C.M., Guo Y.Q., Yuan Z.P., Wu Y.M., Wang J.K., Liu J.X., Zhu W.Y. 2008.** Effect of octadeca carbon fatty acids on microbial fermentation, methanogenesis and microbial flora *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 146 : 259–269.
- 67. Chang-H K., Shin J. L., Jong K. H., Wan Y. K., Sung S. L. 2008.** Effects of emulsified octadecanoic acids on gas production and cellulolysis by the rumen anaerobic fungus, *Piromyces communis* M014. *Anaerobie*, 14 : 19–28.
- 68. Gelegenis J., Georgakakis D., Angelidaki Irini., Christopoulou N., Goumenaki M. 2007.** Optimization of biogas production from olive-oil mill wastewater, by codigesting with diluted poultry-manure. *Applied Energy*, 84 : 646–663.
- 69. Fonty G., Chaucheyras-Durand F. 2007.** Les écosystèmes digestifs. (Eds), *Technique & Documentation*, Paris, 79-94 ; 158-187 ; 204-217 ; 252-265.
- 70. Klieve A.V., Hudman J.F., Bauchop T. 1989.** Inductible bacteriophages from ruminal bacteria. *Applied Environment Microbiology*, 55: 1630-1634.
- 71. Fonty G., Jouany J.P., Forano E., Gouet Ph. 1994.** L'écosystème microbien du reticulo- rumen. In : Nutrition des Ruminants Domestiques, Ingestion et digestion. Jarrige R., Ruckesusch Y., Demarquilly C., Farce M-H., Journet M. (Eds), Paris, France, 299-348p.

- 72. Kamara D.N. 2005.** Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, 89 (1): 124-131.
- 73. Guillaume H.B. 2007.** Flore du Rumen : Origine, Composition, Evolution, Conséquence Physiopathologiques. Thèse doctorat veterinaire. École nationale veterinaire d'Alfort, 140p.
- 74. Demeyer D., Fievez V. 2000.** Ruminants et environnement : la méthanogènes. INRA.EDP science, *Annales de Zootechnie*, 49 : 95-112.
- 75. Tokua M., Chagan T., Ushida K., Kojima I. 1999.** Phylogenetic study of mthanogens associated with rumen ciliates. *Current Microbiology*, 39 : 123-128.
- 76. Jouany J.P., Ushida K. 1988.** The rôle of protozoa in feed digstion. Asian-Australian. *Journal Animal Science*, 12 : 113-128.
- 77. Fonty G., Forano E. 1999.** Ecologie de la dégradation et de la fermentation des **65** polyosides constitutifs des parois végétales dans le rumen. *Cahier Agriculture*, 8 (1) : 21-35.
- 78. Fonty G., Grenet E., Fevre M., Breton A., Gouet Ph. 1988.** Ecologie et fonctions des champignons anaérobies du rumen. *Reproduction Nutrition Développement*, 1 : 1-18.
- 79. Akin D.E., Benner R. 1988.** Degradation of polysaccarides and lignin by ruminal bacteria and fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 1117-1125p.
- 80. Buffiere P., Carrere M., Lemaire O., Vasquez J. 2007.** Guide méthodologique pour l'exploitation d'unités de méthanisation de déchets solides.
- 81. Jouany J.P., Thivend P. 2008.** La production de méthane d'origine digestive chez les ruminants et son impact sur le réchauffement climatique, *Revue management et avenir*, 20 (6) : 259-274.
- 82. Bergen G.W. 1977.** Factors affecting growth yields of micro-organisms in the rumen. *Tropical animal production*, 4-1p.
- 83. Matthias B., Georg F., Johann H. 2002.** Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6 : 604-611.
- 84. Tarvin D., Buswell A. M. 1934.** The methane fermentation of organic acids and carbohydrates. *Journal Amimal Chemestry*, 56 : 1751-1755.

- 85. Hiura T ., Hashidoko Y., Kobayashi Y., Tahara S. 2010.** Effective degradation of tannic acid by immobilized rumen microbes of a sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in winter. *Animal Feed Science and Technology*, 155: 1–8.
- 86. Heider J., Fuchs G. 1997.** Microbial Anaerobic Aromatic Metabolism. *Anaerobie. Mikrobiologie*, 3: 1–22. Institut fur Biologie II, University at Freiburg, Freiburg, Germany.
- 87. Bouaziz M., Hammami H., Bouallagui Z., Jemai H., Sayadi S. 2008.** Production of antioxidants from olive processing by-products. *Electronic journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 7(8):3231-3236.
- 88. Chamkha M., Labat M., Bharat K. C. P., Jean-Louis G. 2001.** Isolation of a cinnamic acid-metabolizing *Clostridium glycolicum* strain from oil mill wastewaters and emendation of the species description. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 2049–2054.
- 89. O'Donovan L., Brooker J.D. 2001.** Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus galolyticus* (*S.caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology*, 147: 1025-1033.
- 90. Tamara E. C. K., Randy A. D., Robert J. Z. 2003.** Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems, a review. *Plant and soil*, 256: 41 - 66, 2003.
- 91. Leinmüller E., Steingass H. and Menke K.H. 1991.** Tannins in Ruminant feed stuff. Institute of Animal Nutrition, University of Hohenheim (Germany).
- 92. McSweeney C.S., Palmer B., McNeill D.M. and Krause D.O. 2001.** Microbial interaction with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 83-93.
- 93. Brooker J.D., O'Donovan L.A., Skene I., Clarke K., Blackall L. and Muslera P. 1994.** *Streptococcus caprinus* sp. A tanin resistant ruminal bacterium from feral goats. *Lett. Applied Microbiology*, 18: 313-318.
- 94. Rochfort S., Parker A. J. P., Dunshea F.R. 2008.** Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*, 69: 299–322.
- 95. Makkar H.P.S. 2008.** Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*, 69: 299–322.
- 96. Martilotti F. 1993.** Use of olive by-products in animal feeding in Italy. Division de la production et de la santé animale. FAO. Rome. 56-62p.

- 97. Makkar H.P.S. 2003.** Effect and fate of tannins in ruminants animals, adaptation to tannins, and strategie to overcome detrimental effects of feeding tannins-rich feeds. *Small Ruminant Researctch* , 49 :241-256.
- 98. AOAC, 1990.** In : S. william (Ed.), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analysis Chemist International, 15th AOAC International, *Arlintong, Virginia, (USA)*.
- 99. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Animal Chemistry*, 28: 350-356.
- 100. Visioli F., Romani A., Mulinacci N., Zarini S., Conte D., Vincieri F. et al. 1999.** Antioxidants and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 : 3397-3401.
- 101. De Marco E., Savarese M., Paduano A., Sacchi R. 2007.** Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil. *Food chemistry*, 104 : 858-867.
- 102. FAO/IAEA . 2000.** Quantification of tannins in tree foliage. A Laboratory Manual. Site web: <http://www.iaea.org/programmes/nafa/d3/index.html>.
- 103. Makkar H.P.S., Blümmel M., Borowy N.K. and Becker K. 1993.** Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal Science Food Agricultur*, 61 : 161–165.
- 104. Makkar H.P.S. 2000.** Recent advances in the *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. Animal Production and Health Section Joint FAO/IAEA Division International Atomic Energy Agency Vienna(Austria).
- 105. Ørskov E. R et Mc Donald P. 1979.** The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. *Journal Ruminant of Agriculture Science*, 92: 499-503.
- 106. Blümmel M et Ørskov E. R. 1993.** Comparison of gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 40: 109-119.
- 107. Ogimoto K., Imai S. 1981.** Atlas of Rumen Microbiology. Japan Scientific Society Press, Tokyo, Japan

- 108. Chaney A. L., Marbach E.P. 1962.** Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*, 8:130–132.
- 109. Filidei S., Masciandaro G., Ceccanti B., 2003.** Anaerobic digestion of olive oil mill effluents: evaluation of wastewater organic load and phytotoxicity reduction. *Water, Air and Soil Pollution*, 145 : 79–94.
- 110. Paredes C., Cegarra J., Roig A., Sa´nchez-Monedero M.A., Bernal M.P. 1999.** Characterization of olive-mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technology*, 67 : 111–115.
- 111. Hachicha S., Sallemi F., Medhioub K ., Hachicha R., Ammar E. 2008.** Quality assessment of composts prepared with olive mill wastewater and agricultural wastes. *Waste Management*, 28 : 2593–26.
- 112. Procida G ., Ceccon L. 2006.** Gas chromatographic determination of free fatty acids in olive mill waste waters. *Analytica Chimica Acta*, 561 : 103–106.
- 113. Vitti D.M.S.S., Abdalla A.L., Bueno I.C.S., Silva Filho J.C., Costa C., Bueno M.S., et al. 2005.** Do all tannins have similar nutritional effects? A comparison of three Brazilian fodder legumes. *Animal Feed Science and Technology*, 119 : 345–361.
- 114. Gihad E.A., El Gallad T.T., Sooud A.E., Abou El –Nasr H.M., Farid M.F.A. 1989.** Feed and water intake, digestibility and nitrogen utilisation by camels compared to sheep and goat fed low protein desert by-products. Série séminaires. *Options méditerranéennes*, 2: 75-80.
- 115. Topps H.J. 1992.** Potential, composition and use of legume shrubs and tree as fodder for livestock in the tropics. *Journal of Agricultur Science*, 118: 1-8.
- 116. Azbar N., Keskin T., Yuruyen A. 2008.** Enhancement of biogas production from olive mill effluent (OME) by co-digestion. *Biomass and bioenergy*, 32 : 1195–1201.
- 117. Arhab R. 2007.** Etude de la fermentescibilité in vitro et de la digestibilité in vivo de végétaux des zones arides et de sous produits de l’agronomie saharienne par l’estimation de l’activité métabolique du microbiote ruminal d’ovins. Thèse de doctorat.

- 118. Orskov E.R., Ryle M. 1990.** Manipulation of rumen microorganisms. In: Energy nutrition in ruminants. Ed: Elsevier Science.
- 119. Spear J.W. 1994.** Mineral in Forages. In: Fahey Jr., G.C. (Ed.), Forage Quality, Evaluation, and utilization. National Conference on Forage quality. 281-317p.
- 120. Le Houerou H.N. 1980.** Browse in Africa. In: Proceeding of International Symposium International Livestock Centre for Africa (ILCA). Addis Ababa, 491(Ithiopia).
- 121. Hamdi M. 1992.** Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion. *Applied Biochemistry Biotechnoogyl*, 37: 155.
- 122. Pedraza Olivera R.M. 1998.** Use of in vitro gas production technique to assess the contribution of both soluble and insoluble fractions on the nutritive value of forages. Université de Camaguey. Cuba.
- 123. Vlyssides A.G., Bouranis D.L., Loizidou M., Karvouni G. 1996.** Study of a plant for demonstration the co-composting of olive-oilprocessing wastewater and solid residue. *Bioresource Technolog*, 56: 187–193.
- 124. Fountoulakis M.S., Dokianakis S.N., Kornaros M.E. Aggelis G.G., Lyberatos. G. 2002.** Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research*, 36: 4735–4744.
- 125. Hamdi M., Garcia J.L. 1991.** Comparison between anaerobic filter and anaerobic contact process for fermented olive mill wastewaters. *Bioreource Technology*, 38, 23-29.
- 126. Adoui M. 2001.** Etude de la digestibilité de résidus agroalimentaires par la microflore ruminale d’ovins. Thèse de magistère. ISN. Université de Constantine, 68p.
- 127. Arhab R.1999.** Etude de la digestiobilité *in vitro* de sous produits agroalimentaires et de la cellulose purifiées par la microflore rumianl de camélidies. Utilisation des gaz fermentaires comme marqueurs de fermentation. Thèse de magistère. ISN. Université de Constantine. 93p.
- 128. Ammar H., Lopez S., Gonzalez J.S., Ranilla M.J. 2004.** Seasonal variation in the chemical composition and *in vitro* digestibility of some Spanish leguminous shrubs species. *Animal Feed Science and Technology*, 115: 327-340.

- 129. Barry T.N. and McNabb W.C. 1999.** The implication of condensed tannins on nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition*, 81 : 263-272
- 130. Tendonkeng P.E., Kana J.R., Tendonkeng F. and Betfiang M.E. 2004.** Digestibilité *in vitro* de *Calliandra calothyrsus* en présence du Polyéthylène glycol et de *Brachiaria ruziziensis*, *Trypsacum laxum* ou *Pennisetum purpureum* au Cameroun. *Livestock Research for Rural Development*, 16 (7).
- 131. Wan Zuhainis S., Norhani A., Abdul Razak A., Ho Yin W. 2008.** Effects of phenolic monomers on the enzymes activities and volatile fatty acids production of *Neocallimastix frontalis* B9. *Anaerobie*, 14 : 118–122.
- 132. Haj-Ayed M., Gonzalez J., Caballero R. and Alvir M.R. 2000.** Nutritive value of on-farm common vetch-oat hays. II. Ruminant degradability of dry matter and crude protein. *Animal Zootechnics.*, 49 : 391-398.
- 133. Rira M. 2006.** Effet des polyphénols et des tanins sur l'activité métabolique du microbiote ruminal d'ovins. Thèse de magistère. ISN. Université de Constantine, 80p.
- 134. Hervas G., Frutos P., Galdez F.J., Mantecon A.R. and Alvarez Del Pino M.C. 2003.** Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology*, 109: 65-78.
- 135. Ammar H., López S. and González J.S. 2005.** Assessment of the digestibility of some Mediterranean shrubs by *in vitro* techniques. *Animal Feed Science and Technology.*, 119: 323–331.
- 136. Ndlovu. L.R and Nherera F.V. 1997.** Chemical composition and relationship to *in vitro* gas production of Zimbabwean browsable indigenous tree species. *Animal Feed Science and Technology*, 69 : 121-129.
- 137. Archimed H., Poncet C., Boval M., Nipeau F., Philibert L., Xande A. and Aumont G. 1999.** Comparison of fresh and dried *Digitaria decumbens* grass intake and digestion by black belly rams. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 133 : 235-240.

- 138. Chouinard Y. 2004.** Production et émission de méthane et du gaz carbonique par les ruminants. 65^e congrès de l'ordre des agronomes du Québec.
- 139. Arhab R., Dehimi A., Dib Y. & Bousseboua H. 2005.** Effect of the nature of the feeding resource on its *in vitro* gas production kinetics. Arab Univ.J.Agric.Sci., *Ain Shams University*, Cairo, 13 (3) : 707-715.
- 140. Mc Allister T.A. Okine E.K ., Mathison G.W., Cheng K. J. 1996.** Dietary environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*, 76: 231-243.
- 141. Patra A.K ., Kamra D.N., Agrawal N. 2006.** Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology.*, 128 : 276–291.
- 142. Giger-riverdin S., Vermorel M et Sauvant D. 1992.** Facteurs de variation de la production de méthane au cours de la digestion des aliments composés chez les ruminants. *Animal Zootechnics*, 41 : 37-38- 46.
- 143. Juul N. 1981.** *In vitro* feed test for evaluation of energetic and productive energy resources for cattle feeding. *Tropical Animals Production*, 6: 287-299- 49.
- 144. Eugene 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. Thèse de doctorat de l'institut national agronomique. paris-grignon. 122p.
- 145. Yanez Ruiz D.R., Moumen A., Martin Garcia I., Molina Alcaide E. 2004.** Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives olive cake : Effect of PEG supply. *Journal anima science.*, 82 :2023-2032.
- 146. Dönmez N., Karlı M.A., Çınar A., Aksu T., Baytok E. 2003.** The effects of different silage additives on rumen protozoan number and volatile fatty acid concentration in sheep fed corn silage. *Small Ruminant Research.*, 48 : 227–231.
- 147. Baaha J.J., Ivan M., Hristov A.N., Koenig K.M., Rode L.M., McAllister T.A. 2007.** Effects of potential dietary antiprotozoal supplements on rumen fermentation and digestibility in heifers. *Animal Feed Science and Technology.*, 137 : 126–137.

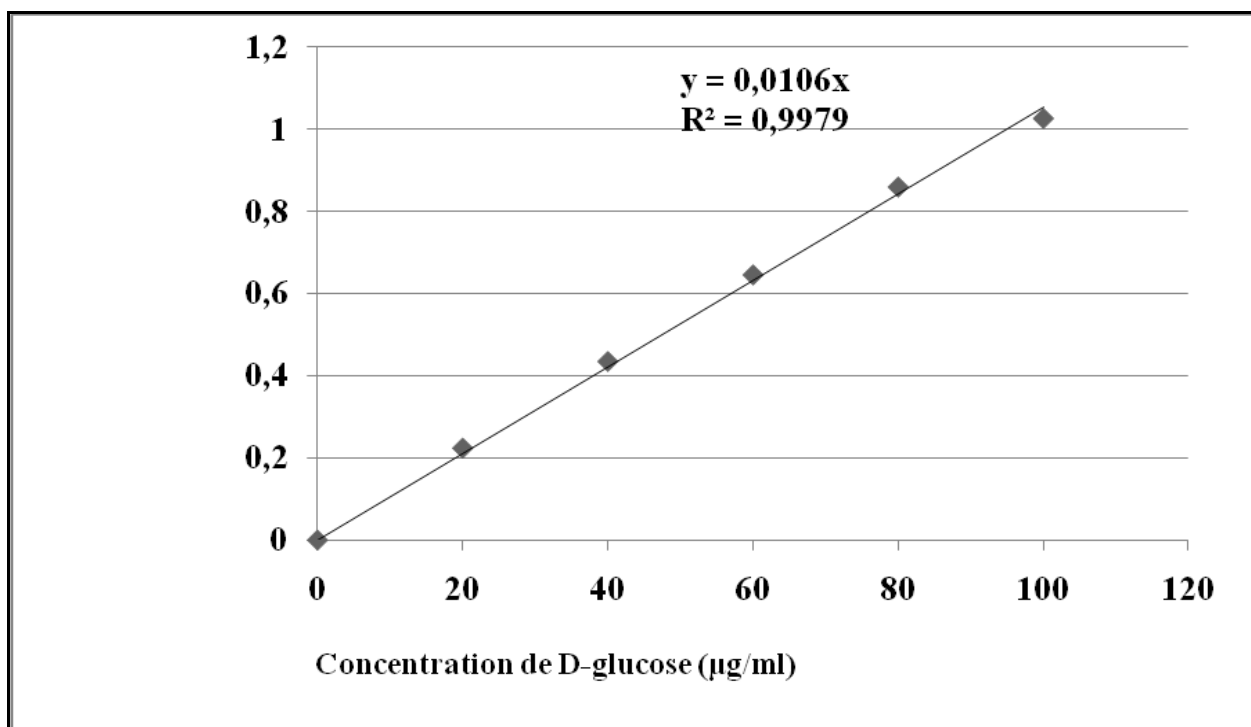
- 148. Seresinhe T. and Iben C. 2003.** *In vitro* quality assessment of two tropical shrub legumes in relation to their extractable tannins content. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 87 : 109-115.
- 149. Rubanza C.D.K., Shem M.N., Otsyina R., Bakengesa S.S., Ichinoche T. and Fujihara T. 2005.** Polyphenolics and tannins effect on *in vitro* digestibility of selected *Acacia* species leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 119 : 129–142.
- 150. Canbolat C., Kamalak A., Ozkose E., Ozkan C.O., Sahin M. and Karabay P. 2005.** Effect of polyethylene glycol on *in vitro* gas production, metabolizable energy and organic matter digestibility of *Quercus cerris* leaves. *Livestock Research for Rural Development*, 4 (17).
- 151. Ahmed. M.M.M and El-Hag. F.M. 2004.** Degradation characteristics of some Sudanese forages and tree pods *in sacco* and gas production techniques. *Small Ruminant Research*, 54: 147-159.
- 152. Kamalak A., Canbolat O., Grubuz Y., Ozay O., Ozkan C.O. and Sakarya M. 2004.** Chemical composition and *in vitro* gas production characteristics of several tannin containing tree leaves. *Livestock Research for Rural Development*, 16(6).
- 153. Michael H. T., Lucy P. M., David P., Nicola W., Graeme T.A., Subathira S. 2005.** Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*, 123–124, 403–419.
- 154. Goel G., Makkar H. P.S., Becker K . 2008.** Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. *Animal Feed Science and Technology* , 147 : 72–89.
- 155. Priolo A., Waghorn G. C., Lanza M., Biondi L., Pennisi P. 2000.** Polyethylene glycol as a means for reducing the impact of condensed tannins in carob pulp: effects on lamb growth performance and meat quality. *Journal Animal Science*, 78:810-816. site web : <http://jas.fass.org>.

- 156. Bento M.H.L., Makkar H.P.S., Acamovic T. 2005.** Effect of mimosa tannin and pectin on microbial protein synthesis and gas production during *in vitro* fermentation of ¹⁵N-labelled maize shoots. *Animal Feed Science and Technology*, 123–124, 365–377.
- 157. Getachew G., Makkar H.P.S. and Becker K . 2000.** Tannins in tropical browses: Effects on *in vitro* microbial fermentation and microbial protein synthesis in media containing different amounts of nitrogen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3581-3588.
- 158. Gregorio E. M-B., Carlos A. S-C., Luis Ra-A., Concepcion M.C.L. 2005.** Defaunating capacity of tropical fodder trees: Effects of polyethylene glycol and its relationship to *in vitro* gas production. *Animal Feed Science and Technology*, 123–124, 313–327.
- 159. Topps J.H. 1998.** Study of protein-rich forages for their nutritional characteristics as supplementary feeds for ruminants in the semi-arid tropics. Summary reports of European Commission supported STD-3 projects (1992-1995). CTA, 6p.
- 160. Horiguchi H., Yurimoto H., Goh T.K., Nakagawa T., Kato N., Sakai Y. 2001.** Peroxisomal Catalase in the Methylotrophic Yeast *Candida boidinii* : Transport Efficiency and Metabolic. *Significance Journal of Bacteriology*, 183 (21), 6372-6383.
- 161. Hamdi M., Ellouz P. 1993.** Treatment of detoxified olive mill wastewater's by anaerobic filter and aerobic fluized bed processes. *Environmental Technology*, 14, 183-188.
- 162. Capasso R. 1997.** The chemistry, biotechnology and ecotoxicology of the polyphenols naturally occurring in vegetable wastes. *Current Tropical Phytochemistry., Resertrsh Trends*, 1:145-156.

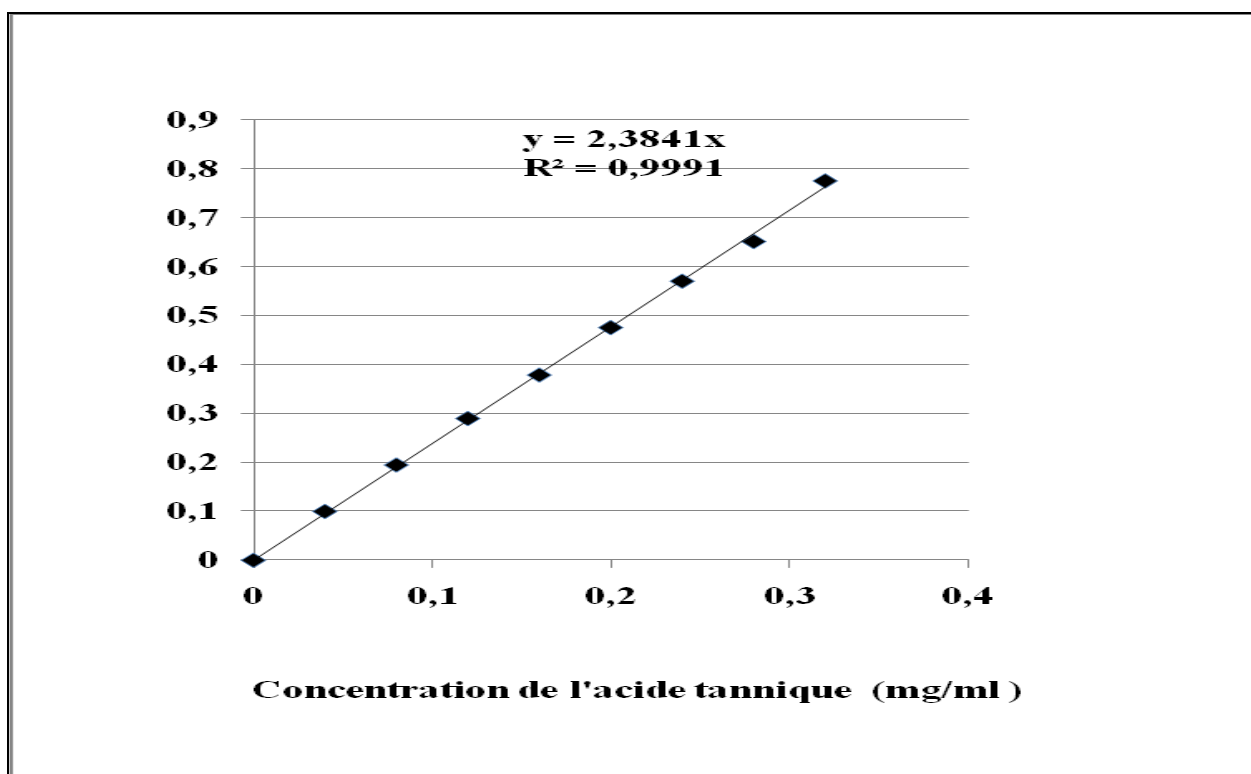
163. Menke K .H ., Raab L., Salewski A., Steingass H., Friz D., Schneider W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolisableenergy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *Journal Agriculture Science. Casab*, 92: 217-222.

Annexes

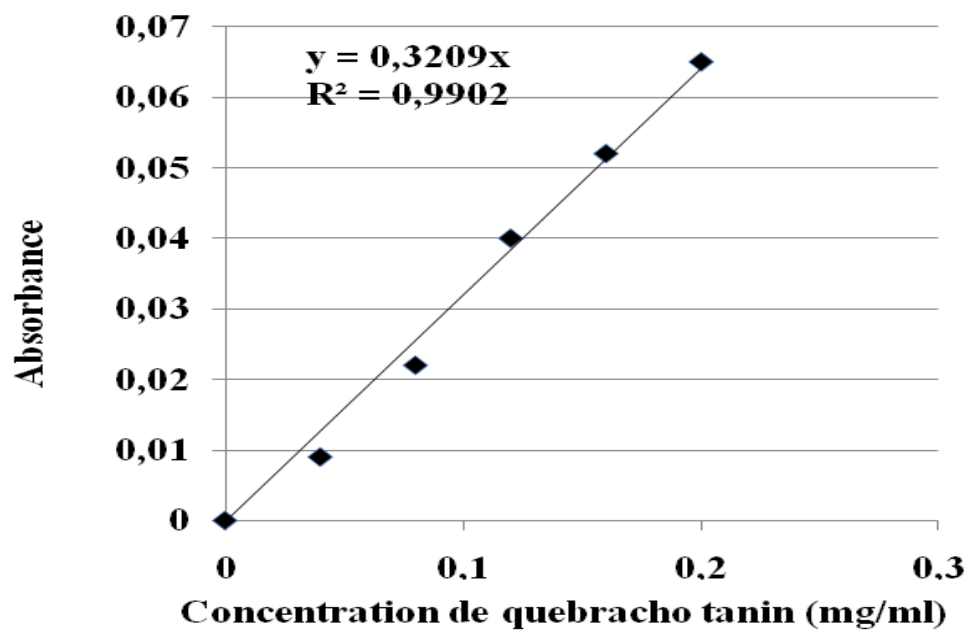
Annexe 01. Courbe étalon des sucres totaux



Annexe 02. Courbe étalon des phénols et des tanins totaux



Annexe 03. Courbe étalon de quebracho tanin



Annexes 04. La composition de la salive artificielle

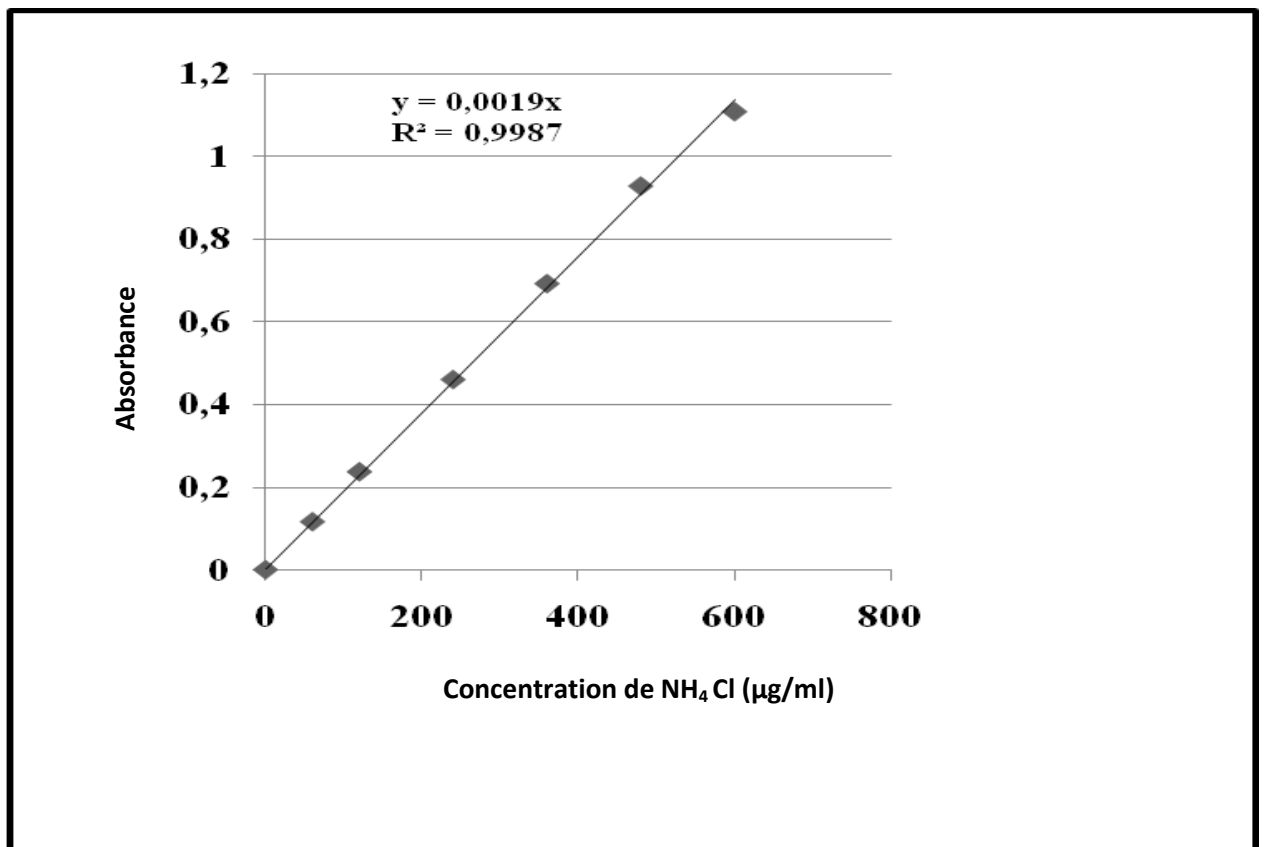
| Solutions | Composition | Quantité (g) |
|--|--|---------------------|
| | CaCl ₂ .2H ₂ O | 13,2 |
| Solution A (g/100ml) | MnCl ₂ .4H ₂ O | 10,0 |
| (Solution des microminéraux) | CoCl ₂ .6H ₂ O | 1,0 |
| | FeCl ₃ .6H ₂ O | 8,0 |
| Solution B (g/l) | NaHCO ₂ | 35,0 |
| (Solution tampon) | NH ₄ HCO ₃ | 4 |
| | Na ₂ HPO ₄ | 5,7 |
| Solution C (g/l) | KH ₂ PO ₄ | 6,2 |
| (Solution des macrominéraux) | MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,6 |
| Solution D (g/100ml) | | |
| (Solution indicatrice du potentiel Redox) | Résazurine (C ₁₂ H ₆ NO ₄) | 0,1 |
| | Na ₂ S.9H ₂ O | 0,625 |
| Solution E (99 ml) | NaOH (1N) | 4ml |
| (Solution réductrice) | Eau distillée | 95 ml |

| Composants | Quantité (ml) pour 1000ml de SA |
|-------------------|--|
| Solution A | 0,1 |
| Solution B | 200 |
| Solution C | 200 |
| Solution D | 1 |
| Solution E | 99 |
| Eau distillée | 400 |

Annexe 05. Préparation de la solution MFS (methylgreen-formalin-saline)

| Composants | Quantités |
|--------------------|-----------|
| Formaldéhyde 35% | 100ml |
| Vert de méthyle | 0,6g |
| Chlorure de sodium | 8g |
| Eau distillée | 900ml |

Annexe 06. Courbe étalon de l'azote ammoniacal (N-NH₃)



Annexe 07. Préparation de la solution A et B.

| Solutions (pour 500 ml de l'eau distillée) | Composition | Quantité |
|--|-------------------------|-----------------|
| Solution A | Phénol | 5 g |
| | Nitroprosside de sodium | 25 g |
| | Hydroxyde de sodium | 2,5 g |
| Solution B | Hypochlorite de sodium | 5 ml |
| | (eau de javel 35 °C) | |

Résumé

Stady of nutritional valorization of olive mill wastes water and their impact on reducing ruminal methanogenesis in sheep

Abstract

In the olive oil production process, the disposal of olive oil mill wastes waters represents the main environmental problem to its ability to inhibit the development of plants and certain microorganisms. The present study consists in to enhance this by-product in animal feed by determining its fermentability by the ruminal microflora, compared to vetch oat hay (standard substrate). The results of chemical analysis show that olive mill wastes water is rich in total sugars (39.91%) and low in essential minerals (1.99%). The phytochemical analysis showed the wealth of olive mill waters in total phenols (7.2%) and total tannins (4.5%). In contrast, they contain a very small amount of condensed tannins (0.89%). The results of *in vitro* gas production shows that olive mill wastes water have a significant nutritional potential. The total gas production of anaerobic degradation of this substrate is significantly lower ($P < 0.05$) than the control (vetch-oat hay). The profile of *in vitro* degradation of olive mill wastes water directed towards increased production of carbon dioxide (CO_2), is favorable to the production of propionic and butyric acids (a major source of energy for ruminant). The kinetics of biodegradation of phenolic content of olive mill wastes water, in the absence and presence of PEG, indicates the ability of the rumen microflora to degrade total phenols and simple phenols of olive mill wastes water. The results of anaerobic biodegradation of olive mill wastes water reveal their significant use by the rumen microbiota, allowing us to strongly recommend its use as a supplement in feed ruminant. In addition, the biodegradation of phenolic content by the rumen microflora can adapt this biological process for the detoxification of olive mill wastes water. In addition, it allows considering using this residue as a feed additive in diets of ruminants for the reduction of ruminal methanogenesis.

Keywords: olive oil mill wastes water, nutritive value, phenolic compounds, ruminal microflora, and anaerobic biodegradation.

دراسة التقييم الغذائي للنفايات السائلة لمعاصر الزيتون وتأثيرها على اختزال غاز الميثان الصادر عن هدم الأغذية في كرش الغنم.

الملخص

تنتج النفايات السائلة لمعاصر الزيتون (margins) عن الطرد المركزي أو الترسيب عند استخلاص زيت الزيتون ويتم رميها في المحيط مما يؤثر سلبا على البيئة. وعليه تهدف هذه الدراسة لتقييم هذه النفايات السائلة وإدراجها كمكمل غذائي للمجترات، بدراسة هضوميتها من طرف الميكروفلورا الاجترارية مقارنة بالجفيف كمادة مرجعية.

كشفت نتائج التحليل الكيميائي بأن النفايات السائلة لمعاصر الزيتون غنية بالسكريات الكلية (39,91%) وفقيرة من العناصر المعدنية (1,99%) ، كما أظهر التحليل النباتي الكيميائي غنى هذه النفايات بالمركبات الفينولية (7,2%) والدبغ (4,5%) ، بينما تحتوي على كمية ضئيلة من الدبغ المكثفة (0,89%) . تملك هذه النفايات السائلة حسب نتائج إنتاج الغاز مخبريا (*in vitro*) هضومية معتبرة غير أنها أقل ($P<0,05$) من الجفيف . يتجه منحى تخمر هدم هذه النفايات مخبريا نحو إنتاج غاز ثاني أكسيد الكربون CO_2 ، قابل لإنتاج حمض البروبيونيك والبيريكتك (مصدر أساسي للطاقة بالنسبة للحيوانات المجتررة). بينت حركية الهدم الحيوي للمحتوى الفينولي للنفايات السائلة (في غياب أو وجود PEG) قدرة الميكروفلورا الاجترارية على هدم الفينول الكلي والبسيط. كما كشفت نتائج الهدم الحيوي اللاهوائي للنفايات السائلة استعمالها الهام من طرف الميكروفلورا الاجترارية الذي يسمح بطلب استعماله بقوة كمكمل لغذاء الحيوانات المجتررة. إضافة الى هذا يسمح الهدم الحيوي لمحتواه الفينولي بواسطة الميكروفلورا الاجترارية بملائمة هذه الطريقة البيولوجية لإزالة سمية هذه النفايات، مما يسمح لنا بالتفكير في استعمال هذه النفايات السائلة كمكمل غذائي في حصص طعام الحيوانات المجتررة لإختزال تكوين غاز الميثان الصادر عن تخمر الأغذية في كرش الغنم.

الكلمات المفتاحية: النفايات السائلة لمعاصر الزيتون (margins) ، القيمة الغذائية، المركبات الفينولية، الميكروفلورا الإجتارية، الهدم الحيوي اللاهوائي.

Thème : *Etude de la valorisation nutritionnelle des margines et de leur impact sur la réduction de la méthanogénèse ruminale chez l'ovine*

***Nature du diplôme : Magister en Microbiologie appliquée
Option : Biotechnologie microbienne***

Résumé

La margine est un sous-produit agricole obtenue par centrifugation ou sédimentation de l'huile après le pressage de l'olive. Elle est généralement déversée dans la nature en l'état. Ce qui engendre un impact négatif sur l'environnement dû à son pouvoir d'inhiber le développement des plantes et de certains microorganismes. Dans ce contexte, cette étude a pour but de valoriser ce sous-produit dans l'alimentation animale en déterminant sa fermentescibilité par le microbiote ruminal, comparativement au foin de vesce avoine (substrat témoin).

Les résultats de l'analyse chimique révèlent que les margines sont riches en sucres totaux (39,91%) et apparaissent pauvres en élément minéraux (1,99%). L'analyse phytochimique montre la richesse des margines en phénols totaux (7,2%) et en tanins totaux (4,5%). Par contre, elles contiennent une très faible quantité en tanins condensés (0,89%). Les résultats de la production de gaz montre que les margines possèdent un potentiel nutritif appréciable. La production de gaz totale, engendrée par la dégradation anaérobie de ce substrat, bien qu'inférieure ($P < 0,05$) à celle du témoin (foin de vesce-avoine). Le profil fermentaire de dégradation des margines *in vitro* s'oriente vers une production accrue en dioxyde de carbone (CO_2), favorable à une production d'acides propionique et butyrique (sources majeures d'énergie pour les ruminants). La cinétique de biodégradation du contenu phénolique des margines, en absence et en présence de PEG, montre la capacité du microbiote ruminal à dégrader les phénols totaux et les phénols simples des margines. Les résultats de la biodégradation anaérobie des margines indiquent un potentiel d'utilisation comme supplément dans l'alimentation des ruminants. De plus, la biodégradation de son contenu phénolique par le microbiote ruminal permet d'adapter ce procédé biologique pour la détoxification des margines. En outre, elle laisse envisager l'utilisation de ce résidu comme additif alimentaire dans les rations des ruminants pour la réduction de la méthanogénèse ruminale.

Mots clés : margines, valeur nutritive, composés phénoliques, microbiote ruminal, biodégradation anaérobie.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Génie Microbiologie et Applications

| | | |
|---------------------|--------------------------|---|
| Président : | Mme. MERAIHI Z. | Prof. Univ. Mentouri Constantine |
| Rapporteur : | Mr. ARHAB R. | M.C. Univ. de Tébessa |
| Examineurs : | Mr. BOUSSEBOUA H. | Prof. Univ. Mentouri Constantine |
| | Mr. DJABRI B. | M.C. Univ. de Tébessa |