

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE BATNA 1 -BATNA-
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES



THESE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière

Sciences Vétérinaires

Option

Maitrise des facteurs de la reproduction chez les herbivores

Présentée Par:

BOUSSAADA Amina

Thème

**IMPACT D'UN BIOFLAVONOÏDE NATUREL SUR
L'ACTIVITE METHANOGENIQUE ET LA COMPOSITION
DU MICROBIOTE RUMINAL**

Soutenue publiquement le 08/01/2019

Jury :

Grade et Université

Président :	Mr. MEZIANE Toufik	Pr. Université Batna 1
Examineur :	Mr. DJABRI Belgacem	Pr. Université De Tébessa
Examinatrice :	Mme. CHACHOUA Ilhem	M.C.A. Université Batna1
Examinatrice :	Mme. DEGHNOUCHE Kahramen	M.C.A. Université Mohamed Khider De Biskra
Directeur de thèse :	Mr. ARHAB Rabah	Pr. Université Larbi Ben Mhidi- Oum El bouaghi
Co-directeur de thèse :	Mr. TLIDJANE Madjid	Pr. Université Batna 1

Année Universitaire: 2018-2019

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

**« Toute certitude est par essence contradictoire
avec la philosophie de la recherche »**

**« Le chercheur doit être libre de tenter des
expériences audacieuses, de soutenir des théories
révolutionnaires, voire paradoxales. Il doit disposer
du droit à l'erreur ».**

Pierre Joliot, La Recherche Passionnément

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations.....	I
Liste des tableaux	II
Liste des figures	III
Introduction	1

Première partie : Revue bibliographique

Chapitre I : Rappels sur l'alimentation et la physiologie digestive des ruminants

I. Alimentation des ruminants	3
I.1. La paroi végétale	3
I.2. Constituants des parois végétales.....	4
I.2.1. La cellulose.....	4
I.2.2. Les hémicelluloses	5
I.2.3. La lignine.....	6
I.2.4. Les pectines	7
I.2.5. Les tannins.....	7
I.2.6. Autres constituants.....	9
II. Particularités digestives du rumen-réseau chez les ruminants.....	9
III. Ecosystème microbien ruminal.....	10
III.1. Paramètres physico-chimiques du rumen	11
III.1.1. La teneur en eau	11
III.1.2. La température	11
III.1.3. L'anaérobiose.....	11
III.1.4. Le pH et le pouvoir tampon	12
III.1.5. Le potentiel d'oxydo-réduction.....	12

III.1.6. Les métabolites	12
III.2. Le microbiote digestif	13
III.2.1. Les bactéries.....	13
III.2.2. Les protozoaires	16
III.2.3. Les champignons.....	17
III.2.4. Les <i>Archaeaméthanogènes</i>	18
III.2.5. Les bactériophages	19
III.3. Rôle des différents microorganismes du rumen dans la digestion	19
III.3.1. Digestion des matières glucidiques	20
III.3.2. Digestion des matières azotées	23
III.3.3. Digestion des lipides	26

Chapitre II : Effet de serre, méthanogénèse ruminale et ses stratégies de réduction

I. L'Effet de serre.....	28
II. Les mécanismes de la méthanogénèse ruminale	30
III. Moyens de réduire la production digestive de méthane des ruminants	31
III.1. Emploi d'additifs ou de manipulations biotechnologiques.....	32
III.1.1. Les additifs.....	32
3.1.1. a. Les antibiotiques ionophores	32
III.1.1. b. Les additifs chimiques	32
III.1.1.c. Les extraits de plante.....	33
III.1.2 Manipulations biotechnologiques de l'écosystème microbien ruminal	34
III.1.2.a. La défaunation (élimination des protozoaires) du rumen.....	34
III.1.2.b. Modification du système d'élevage	34
III.1.2.b.1. Au niveau de la ration.....	34
III.1.2.b.2. Sélection génétique des animaux	37

III.1.2.b.3. Modulation du nombre d'animaux ou du mode de production..... 38
III.1.2.b.4. Intensification du système d'élevage..... 40

Chapitre III : Principales caractéristiques d'*Eucalyptus globulus* et *Olea europaea*

I. *Eucalyptus globulus*..... 42
I.1. Historique 42
I.2. Classification dans la systématique botanique..... 43
I.3. Description d'*Eucalyptus globulus* 43
I.3.1. Aspect général 43
I.3.2. L'écorce..... 45
I.3.3. Feuilles 45
I.3.4. Fleurs..... 46
I.3.5. Fruits et Graine 46
I.3.6. Racines 47
I.4. Les différents composés de l'*Eucalyptus globulus* 48
I.5. Intérêts et utilisations des feuilles d'*Eucalyptus globulus*..... 49
II. *Olea europaea*..... 50
II.1. Historique 50
II.2. Classification dans la systématique botanique De l'olivier (*Olea europaea*) 51
II.3. Description De l'olivier (*Olea europaea*) 51
II.3.1. Aspect général..... 51
II.3.2. Feuilles..... 52
II.3.3. Fleurs 53
II.3.4. Fruits 53
II.3.5. Racines..... 54
II.4. Les différents composés des feuilles d'*Olea europaea*..... 54

II.5. Intérêts et utilisations des feuilles d'*Olea europaea*..... 55

Deuxième partie : Partie expérimentale

Chapitre I: Matériels et Méthodes

I. Avant propos et rappel des objectifs..... 57

II. Matériel végétal..... 57

II.1. Echantillonnage et préparation du matériel végétal..... 57

III. Préparation des extraits 58

 III.1. Procédé d'extraction 58

 III.2. Rendement des extractions 60

IV. Analyses phytochimiques des extraits 60

 IV.1. Analyse qualitative 60

 IV.1.1. Mise en évidence des saponines 60

 IV.1.2. Mise en évidence des phénols totaux 61

 IV.1.3. Mise en évidence des stéroïdes 61

 IV.2. Analyse quantitative des composés phénoliques 61

 IV.2.1. Analyse des phénols totaux 61

 IV.2.2. Dosage des flavonoïdes 62

 IV.2.3. Dosage des tanins totaux 63

V. Caractérisation chimique des substrats..... 64

 V.1. Détermination de la teneur en matière sèche (MS) 64

 V.2. Détermination de la teneur en cendres (MM) et en matière organique (MO)..... 64

 V.3. Détermination de la teneur en matières azotées totales (MAT) 65

 V.4. Détermination de la teneur en matières grasses (MG)..... 65

 V.5. Détermination des composés de la paroi végétale 66

 V.5.1. Estimation de la fraction NDF (NeutralDetergent Fibre)..... 66

V.5.2. Estimation de la fraction ADF (Acid Detergent Fibre)	67
V.5.3. Estimation de la fraction ADL (Acid Detergent Lignin).....	67
VI. Fermentations <i>in vitro</i> en présence des extraits.....	68
VI.1. Technique de production de gaz <i>in vitro</i>	68
VI.2. Conduction de la fermentation <i>in vitro</i>	69
VI.2.1. Inoculum.....	69
VI.2.2. Eléments constitutifs du milieu de culture	70
VI.3. Fermentation <i>in vitro</i>	70
VII. Détermination des différents paramètres fermentaires	72
VII.1. Mesure du pH.....	72
VII.2. Analyse qualitative des gaz	72
VII.3. Analyse quantitative de la phase gazeuse	73
VII.4. Analyse qualitative et quantitative des acides gras volatils (AGV).....	73
VII.5. Analyse du méthane et de gaz et de gaz carbonique	75
VII.6. Dosage de l'azote ammoniacal (N-NH ₃).....	75
VII.7. Etude de la digestibilité des substrats.....	76
VII.7.1. Digestibilité apparente de la matière sèche (DMS)	76
VII.7.2. Digestibilité apparente de la matière organique (DMO).....	77
VII.8. Estimation de l'énergie métabolisable (EM)	77
VIII. Caractérisation du profil microbien après fermentation <i>in vitro</i>	78
VIII.1. Dénombrement des protozoaires (comptage direct)	78
VIII.1.1. Echantillonnage	79
VIII.1.2. Comptage et calcul	79
IX. Stœchiométrie des fermentations.....	80
X. Calcul et analyses statistiques.....	81

I. Aspects chimiques des plantes étudiées et du substrat de référence	83
I.1. Constituants cellulaires.....	83
I.1.1. Teneur en matière sèche.....	83
I.1.2. Teneur en matières minérales.....	83
I.1.3. Teneur en matières azotées totales.....	83
I.1.4. Teneur en lipides.....	85
I.2. Teneur en constituants pariétaux et en carbohydrates non fibreux (NFC)	85
II. Analyse phytochimique des substrats étudiés	87
II.1. Détermination du rendement des extractions	87
II.2. Teneurs en métabolites secondaires	87
II.2.1. Analyse qualitative des extraits	87
II.2.2. Analyse quantitative des extraits	88
III. L'effet des extraits d' <i>Eucalyptus globulus. L</i> sur les caractéristiques de la fermentation <i>in vitro</i>	92
III.1. Production de gaz total (GP24)	92
III.2. Production de méthane (CH ₄).....	94
III.3. Facteur de partition (PF)	96
III.4. Digestibilité apparente <i>in vitro</i> de la matière sèche (DMS) et de la matière organique (DMO) et estimation de l'énergie métabolisable.....	96
IV. L'effet des extraits d' <i>Eucalyptus globulus. L</i> sur les produits finaux de fermentation <i>in vitro</i>	99
IV.1. Le pH.....	99
IV.2. L'azote ammoniacal (N-NH ₃).....	101
IV.3. Rendement de la biomasse microbienne (BM)	102
IV.4. La production des acides gras volatils (AGV)	102
V. L'effet des extraits d' <i>Eucalyptus globulus. L</i> sur la population des protozoaires	105
VI. Stœchiométrie des fermentations après addition des extraits d' <i>Eucalyptus globulus.L</i>	106

VII. L'effet des extraits de feuilles d'olive (<i>Olea europaea. L</i>) sur les caractéristiques de la fermentation <i>in vitro</i>	111
VII.1. Production de gaz total (GP24).....	111
VII.2. Production de méthane (CH ₄).....	111
VII.3. Facteur de partition (PF).....	113
VII.4. Digestibilité apparente de la matière sèche (DMS) et de la matière organique (OMD) et de l'énergie métabolisable	113
VIII. L'effet des extraits de feuilles d'olive (<i>Olea europaea. L</i>) sur les produits finaux de fermentation <i>in vitro</i>	115
VIII.1. Le pH.....	115
VIII.2. L'azote ammoniacal (N-NH ₃)	115
VIII.3. Rendement de la biomasse microbienne (BM).....	117
VIII.4. Production des acides gras volatils (AGV)	117
IX. L'effet des extraits de feuilles d'olive (<i>Olea europaea. L</i>) sur la population des protozoaires	120
X. L'effet de la quercétine « Témoin positif » sur les caractéristiques de la fermentation <i>in vitro</i>	121
XI. L'effet de la quercétine sur les produits finaux de la fermentation <i>in vitro</i>	124
XII. Effet de la quercétine sur la population des protozoaires	127
Conclusion et perspectives	129
Références bibliographiques..	132

Annexes

Résumés

C'est autant de plaisir qu'un devoir de présenter tous ceux qui, chacun dans son domaine, m'ont aidé afin que je puisse mener à bien ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes remerciements les plus respectueux.

Ce travail a été réalisé en grande partie en Italie (Naples) au laboratoire - Analyses des aliments - Département de médecine vétérinaire et de production animale (DMVPA) Université de Naples Federico II (Italie).

Au terme de ce travail, Je remercie tout d'abord mon Directeur de thèse Monsieur ARHAB Rabah, Professeur en biotechnologie microbienne à l'Université d'Oum El Bouaghi, pour m'avoir proposé ce sujet sur la valorisation des extraits végétaux sur la méthanogenèse ruminale et pour m'avoir dirigée tout au long de la réalisation de ce travail, pour son esprit scientifique, ses précieux conseils et ses encouragements.

C'est avec un grand honneur et un grand plaisir que je remercie Madame Serena Calabrò, Professeur en nutrition animale au Département de médecine vétérinaire et de production animale (DMVPA) Université de Naples Federico II (Italie), qui m'a ouvert les portes de son laboratoire et m'a fait profiter de ses nombreuses idées et précieux conseils. Je la remercie pour l'accueil qu'elle m'a réservé, sa disponibilité sans faille durant mes stages et son aide pour la correction de mes articles.

J'exprime mes vifs remerciements à mon co-promoteur de thèse Monsieur Tlidjane Madjid professeur à l'Université Batna 1 pour ses conseils pertinents et ses encouragements depuis le début de ma thèse, et qui me fait le plaisir et l'honneur de juger ce travail. Sa contribution me sera très bénéfique.

Je remercie les membres du jury; à commencer par mon enseignant Monsieur Meziane Toufik Professeur à l'Université Batna 1, pour avoir accepté de juger ce travail et pour l'insigne honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de ma thèse. Qu'il trouve l'expression de ma sincère reconnaissance et de ma profonde considération.

Que Monsieur le Professeur Djabri Belgacem, Professeur à l'Université de Tébessa, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour son amabilité d'avoir accepté de nous honorer et faire partie du jury d'évaluation de cette thèse.

Je remercie Madame Daghnoche Kahramane MCA à l'Université de Biskra d'avoir accepté de nous honorer et faire partie du jury d'évaluation de cette thèse.

Je remercie également Madame Chachoua Ilham MCA à l'Université Batna 1, d'avoir accepté d'être examinatrice de mon manuscrit de thèse.

Je tiens également à témoigner ma profonde gratitude à Monsieur Abdeddaim Mohamed professeur à l'Université Batna 1 qui m'a ouvert les portes de son laboratoire de technologie alimentaire pour réaliser mes extraits durant une période très délicate.

Il m'est agréable aussi de remercier tous les professeurs, docteurs chercheurs et doctorants du Laboratoire - analyses des aliments - département de médecine vétérinaire et de production animale (DMVPA)- Université de Naples- Federico II (Italie) : Cutrignelli Monica Isabella, Tudisco Raffaella, Infascelli Federico, Musco Nadia, Grazioli Raffaella, Ferrara Maria Giulia pour l'ambiance amicale et agréable du travail.

A tous mes enseignants, depuis l'école primaire, qui m'ont bénéficié de leur savoir et leur compétence. Qu'ils trouvent dans ce travail le témoignage de mon grand respect.

Enfin, je ne saurais oublier mes parents, ma famille et mes amis pour leur soutien continu et inconditionnel, qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

BOUSSAADA Amina

À mes chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer ma reconnaissance et ma profonde gratitude pour les sacrifices consentis pour mon éducation et mon instruction.

C'est avec un plaisir et une immense joie que je vous dédie ce présent travail afin de vous exprimer tout mon amour et toute ma reconnaissance pour votre soutien et votre encouragement.

Que ce travail soit pour vous une source de fierté et un témoignage de mon affection et de ma reconnaissance.

Que Dieu vous procure santé, bonheur et longue vie.

A mon frère, mes sœurs,

Mes beaux frères et ma belle sœur, pour leur affection et leur soutien.

A mes adorables neveux et nièces

Pour toutes les joies qu'ils m'ont apportées

A l'ensemble de ma famille

A toutes les personnes qui me sont chères.

A tous Mes Collègues Du Département Vétérinaire-Université Batna 1

*Que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de ma profonde reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi
Que Dieu le tout puissant vous procure continuellement santé, bonheur et tranquillité.*

BOUSSAADA Amina

- AcOEt** : Acétate d'éthyle
- ADF**: Acid detergent fiber
- ADL**: Acid detergent lignin
- AGPI** : Acide gras polyinsaturé
- AGV_t** : Acides gras volatils totaux.
- ATP** : Adénosine triphosphate
- BCP** : Acides gras branchés
- BH%** : bilan d'hydrogène
- BM**: Biomasse microbienne
- BuOH** : n-butanol
- C** : Cellulose
- C2/ C3** : Acétate propionate ratio
- C2**: Acétate
- C3**: Propionate
- C4** : Butyrate
- CE** : Commission européenne
- CH₄** : Méthane
- CO₂** : Dioxyde de carbone ou gaz carbonique
- CO₂/CH₄** : Dioxyde de carbone et méthane ratio
- CP** : Crude protein
- CPG** : Chromatographie en phase gazeuse
- CTR** : contrôle
- D0** : Témoin
- D0** : Témoin ou contrôle
- D100** : Dose 100 mg
- D150** : Dose 150 mg
- D175** : Dose 175 mg

- D200** : Dose 200 mg
- D50** : Dose 50mg
- D75** : Dose 75mg
- DMO** : Digestibilité apparente de la matière organique
- DMS** : Digestibilité apparente de la matière sèche
- dOM**: Digestibilité apparente de la matière organique
- DSO** : Digestibilité apparente de la substance organique
- EAG** : Equivalents acide gallique
- EAT** : Equivalent acide tannique
- EE** : Extrait Ethéré
- Eh** : Le potentiel redox
- EM** : Energie métabolisable
- EQ** : Equivalent quercetine
- FT** : Flavonoïdes totaux
- GES** : Gaz à effet de serre
- GP** : Gaz produit
- GP24** : Gaz produit à 24h de fermentation
- H2** : l'hydrogène moléculaire
- HC**: Hémicellulose
- IOM** : La matière organique incubée
- IVGPT** : *in vitro* gaz production technique
- M** : Méthane
- MAT** : Matières azotées totales
- MFS** : Methyl formalin saline
- MM** : Matière Minérale
- MO** : Matières organique
- MOD** : Matière organique dégradée

MOI : Matière organique incubée

MS : Matière sèche

N: azote

N₂O : Protoxyde d'azote

ND : Non déterminé

NDF: Neutral detergent fiber

NDS: Neutral Detergent Solution

NFC : Non fibrous carbohydrates

N-NH₃: ammoniac

P : Propionate

PE : Prise d'essai

PF : Poids frais

PF ratio : Facteur de partition

PM : Poids moléculaire

PS: Poids sec

PT : phénols totaux

PVPP : Polyvinylpyrrolidone

Rpm : Rotation par minute

TCs : Les tannins condensés

THs : Les tannins hydrolysables

TR H₂: taux de récupération de l'hydrogène

TSR : Temps de séjour des aliments dans le rumen

TT : Tanins totaux

UFL : Unité fourragère lait

VC_{SO} : Volume cumulatif de gaz lié à la substance organique.

VC_{SS}: volume cumulatif de gaz lié à la matière sèche incubée.

Tableau n°1 : Principales espèces bactériennes du rumen, leurs substrats et produits de fermentation.....	14
Tableau n°2 : Abondance relative des protozoaires du rumen chez des vaches recevant deux rations différentes.....	17
Tableau n°3 : Substrats dégradés et fermentés par les principales espèces bactériennes du rumen (Fonty <i>et al.</i> , 1995).....	22
Tableau n°4 : Principales bactéries protéolytiques du rumen (Mackie et White, 1990).	24
Tableau n°5 : Classification d' <i>Eucalyptus globulus</i> (Guignard, 2001)....	43
Tableau n°6 : Classification d' <i>Olea europaea</i> (Cronquist, 1981).....	51
Tableau n°7 : Composition chimique des ingrédients du substrat de référence	71
Tableau n°8 : Composition des solutions pour le dosage de l'azote ammoniacal	76
Tableau n°9 : Composition de la solution MFS (Ogimoto et Imai,1981)	78
Tableau n°10 : Teneurs en matière sèche (g/Kg), Composition chimique du substrat témoin, <i>Eucalyptus globulus.L</i> et <i>Olea europaea.L</i> (g Kg-1 MS).	84
Tableau n°11 : Rendements et caractéristiques des extraits d' <i>Eucalyptus globulus.L</i> et <i>Olea europaea.L</i>	87
Tableau n°12 : Analyse qualitative des composés secondaires.....	88
Tableau n°13 : Effet des extraits d' <i>Eucalyptus</i> à différentes doses sur la production du gaz cumulative (VCSS, VCSO), le CH ₄ , CO ₂ et le facteur de partition (PF) après 24 heures de fermentation <i>in vitro</i>	93
Tableau n°14 : Effet des extraits d' <i>Eucalyptus</i> à différentes doses sur la digestibilité apparente de la matière sèche et de la matière organique et de l'énergie métabolisable après 24 heures fermentation <i>in vitro</i>	98
Tableau n°15 : Effet des extraits d' <i>Eucalyptus</i> à différentes doses sur le pH, l'azote ammoniacal (N-NH ₃) et l'estimation de la biomasse microbienne (BM) après 24 heures fermentation <i>in vitro</i>	100
Tableau n°16 : Effet des extraits d' <i>Eucalyptus</i> à différentes doses sur le profil des acides gras volatils totaux (mmoles/L), les proportions molaires des AGV (%), le ratio molaire et les BCP après 24 heures de fermentation <i>in vitro</i>	103

Tableau n°17 : Stœchiométrie de la fermentation <i>in vitro</i> (mmoles/ g MS) et le taux de récupération d'hydrogène (%) après addition des différentes doses des extraits d' <i>Eucalyptus globulus. L</i> au substrat de référence en comparaison avec le contrôle.	110
Tableau n°18: Effet des extraits de feuilles d'olive à différentes doses sur la production du gaz cumulative (VCSS, VCSO), le CH ₄ , CO ₂ et le facteur de partition (PF) après 24 heures de fermentation <i>in vitro</i>	112
Tableau n°19 : Effet des extraits de feuilles d'olive à différentes doses sur la digestibilité apparente de la matière sèche et de la matière organique et de l'énergie métabolisable après 24 heures fermentation <i>in vitro</i>	114
Tableau n°20: Effet des extraits de feuilles d'olive à différentes doses sur le pH, l'azote ammoniacal (N-NH ₃) et l'estimation de la biomasse microbienne (BM) après 24 heures fermentation <i>in vitro</i>	116
Tableau n°21: Effet des extraits de feuilles d'olive à différentes doses sur le profil des acides gras volatils totaux (mmoles/L), les proportions molaires des AGV (%), le ratio molaire et les BCP après 24 heures de fermentation <i>in vitro</i>	119
Tableau n°22: Résultats des analyses de contraste pour les principaux paramètres déterminés pour la fermentation de la quercétine après 24 h d'incubation.	122
Tableau n°23 : Effet des différentes doses de la quercétine sur les différents paramètres de fermentation <i>in vitro</i> après 24 h d'incubation.	122
Tableau n°24: Effet de différentes doses de quercétine sur les produits finaux de fermentation après 24 h d'incubation <i>in vitro</i>	126

Figure n°1: Organisation de la paroi végétale (Béguin et Aubert, 1994)	04
Figure n°2: Structure de la molécule cellulose (Christophe, 2007)	05
Figure n°3: Molécules de xyloqglucane (Christophe, 2007).	06
Figure n°4: Les trois monomères principaux de la lignine (Roger, 2012).....	07
Figure n°5 : Tube digestif des ruminants (Site internet N : 1).....	10
Figure n°6: Résumé des principales voies des fermentations ruminales des polymères glucidiques. (Serment, 2012).....	21
Figure n°7: Dégradation des composés azotés dans le rumen (Jouany, 1994)	25
Figure n°8: Principales voies connues ou probables de la biohydrogénationruminale des acides linoléique linoléinique (Chilliard <i>et al.</i> , 2007).....	26
Figure n°9: Biohydrogénationruminale de l'acide linoléique: détail des voies du trans-11 et dutrans-10 (Shingfield et Griinari, 2007).	27
Figure n°10 : <i>Eucalyptus globulus</i> (Albert, 2015).	45
Figure n°11 : Feurs d' <i>Eucalyptus globolus</i> (Albert, 2015).....	46
Figure n°12 : Fruits et les graines de l' <i>Eucalyptus globolus</i> (Albert, 2015).....	47
Figure n°13 : Racines d' <i>Eucalyptus globolus</i> (Albert, 2015)	48
Figure n°14 : Olivier âgé de 1.500 ans en Grèce (Channel, 2006).....	52
Figure n°15 : Feuilles d' <i>Olea europaea</i> (Site 2).	52
Figure n°16: Fleurs d' <i>Olea europaea</i> (Site 2).....	53
Figure n°17: Fruit d' <i>Olea europaea</i> (Site 2).....	54
Figure n°18 : Protocole d'extraction des flavonoïdes (Cetkovic <i>et al.</i> , 2007).....	59
Figure n°19: Prélèvement du liquide ruminal.....	69
Figure n°20: Préparation de la salive artificielle.	70
Figure n°21: Système de fermentation en batch.....	72
Figure n°22: Analyse de la phase gazeuse méthane (CH ₄) et de gaz carbonique (CO ₂) par chromatographie en phase gazeuse.	75
Figure n°23: Schéma descriptif de la cellule de malassez.	78
Figure n°24 : Quadrillage de dénombrement de la cellule de Malassez.....	79

Figure n°25: Comparaison de la teneur des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins des extraits d' <i>O. europaea. L.</i>	89
Figure n°26: Comparaison de la teneur des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins des extraits d' <i>E. globulus. L.</i>	89
Figure n°27: Effet des extraits d' <i>Eucalyptus globulus. L.</i> à différentes doses sur la population des protozoaires après 24 h d'incubation <i>in vitro</i>	106
Figure n°28 : Effet des extraits de feuilles d'olive (<i>Olea europaea. L.</i>) à différentes doses sur la population des protozoaires après 24 h d'incubation <i>in vitro</i>	120
Figure n°29: Caractéristiques de la fermentation <i>in vitro</i> avec les différentes doses de quercetine.	123
Figure n°30 : Production de méthane après 24 h d'incubation.	123
Figure n°31 : Effet de la quercetine sur la population des protozoaires.....	128

Résumé

L'objectif de ce travail de thèse est d'évaluer l'effet de trois extraits de deux plantes *Eucalyptus globulus* et *Olea europaea* riches en composés phénoliques sur les caractéristiques de la fermentation ruminale en utilisant la technique de production de gaz *in vitro* (IVGPT), quatre niveaux (D0, D50, D75 et D100 mg) de trois extraits d'*Eucalyptus* et des feuilles d'olive (AcOEt, BuOH et aqueux), dans les mêmes conditions des doses croissantes de quercétine (D0, D150, D175 et D200 mg) ont été ajoutées à un régime alimentaire formulé pour ruminants (fourrage/concentré: 60/40) et incubées à 39 °C en anaérobiose avec du liquide ruminal tamponné mélangé à la salive artificielle et les principaux paramètres de fermentation *in vitro* (pH, production de gaz total *in vitro* (GP24), concentration de CH₄, concentration de CO₂, la digestibilité apparente de la matière sèche et de la matière organique (DMS, DMO), estimation de l'énergie métabolisable (EM), concentration en ammoniacque (N-NH₃), les acides gras volatils totaux (AGV_t), AGV individuels et la population des protozoaires ont été déterminés après 24 h d'incubation.

Pour les extraits d'*E. globulus*, la production de CH₄ est significativement plus faible pour l'extrait AcOEt (P <0,01) mais comparable au témoin pour les extraits BuOH et aqueux. La production de N-NH₃ est réduite pour tous les extraits d'*eucalyptus* (P <0,01). Une légère diminution de la concentration en acétate pour l'extrait AcOEt qui corrobore avec une légère augmentation de la production du propionate pour tous les extraits, alors qu'aucun effet significatif n'a été enregistré pour le gaz total (GP24) et les AGV_t pour tous les extraits d'*E. globulus*. Le pH est affecté uniquement par l'extrait aqueux (P <0,05). L'extrait AcOEt diminue la digestibilité apparente de la matière sèche et de la matière organique *in vitro* (P <0,01) alors que pour les extraits BuOH et aqueux ce paramètre reste comparable au témoin. La quantification des protozoaires par comptage direct indique que la population de protozoaires est diminuée (P <0,01) pour tous les extraits d'*E. globulus* comparativement au témoin.

Pour les extraits d'*O. europaea*, l'ajout de l'extrait AcOEt a stimulé la GP24 qui coïncide avec une dépression de la concentration de CH₄ par rapport au témoin (P <0,01), cependant pour les extraits BuOH et aqueux la GP24 et le CH₄ restent comparables au témoin. La production de N-NH₃ est augmentée pour tous les extraits d'olives (P <0,01), la même tendance est observée pour la concentration en propionate pour tous les extraits même si elle n'est pas statistiquement significative, seul l'extrait AcOEt affecte le pH (P <0,01) alors qu'aucun effet n'est enregistré pour la production des AGV_t. L'extrait AcOEt diminue aussi la digestibilité de la matière sèche et de la matière organique (P <0,01) mais ce paramètre reste comparable au témoin pour les extraits BuOH et aqueux. La population de protozoaires est diminué pour tous les extraits d'olive comparativement au témoin mais spécialement pour l'extrait AcOEt (P <0,01).

L'addition de la quercétine affecte la majorité des paramètres étudiés compris, le pH, le N-NH₃, la digestibilité de la matière sèche et de la matière organique et la production de méthane (P <0,05), alors qu'elle a augmenté significativement la GP24 (P <0,01), tandis que la production des AGV_t n'est pas affectée par l'addition de la quercétine.

En conclusion les extraits AcOEt d'*Eucalyptus* et des feuilles d'olive ont exercé des effets bénéfiques sur certains paramètres de fermentation, qui pourraient être prometteurs comme des puissants additifs anti-méthanogènes. De plus, l'évaluation du bon dosage semble être critique pour contenir l'impact environnemental, sans pour autant réduire la valeur nutritive des aliments. La quercétine a également démontré un effet dose-dépendant sur les caractéristiques de fermentation *in vitro* dans le rumen. Cependant, les résultats sont contradictoires de point de vue nutritionnel (réduction de la digestibilité) et environnemental (réduction du méthane).

Mots clés: Extraits de feuilles d'*Eucalyptus*, extraits de feuilles d'olive, composés phénoliques, quercétine, fermentation *in vitro*, production de méthane, population des protozoaires.

Introduction

Depuis quelques années, le réchauffement progressif de notre planète, provoqué par l'effet de serre, est devenu une réalité aussi bien politique que scientifique. Cet effet est dû à l'augmentation de la concentration atmosphérique des gaz à effet de serre. Parmi le pool de ces gaz à effet de serre, le dioxyde de carbone représente 69% et le méthane 13%. Mais le méthane exerce, à même concentration, un effet de serre 25 fois supérieur au dioxyde de carbone. Parallèlement, la rémanence atmosphérique du dioxyde de carbone (>100 ans), largement supérieure à celle du méthane (≈ 12 ans), ce qui indique un impact plus décisif d'action sur le méthane que sur le dioxyde de carbone. Il a ainsi été estimé qu'il suffirait de réduire de 10% les émissions de méthane pour stabiliser sa concentration atmosphérique, alors qu'il faudrait réduire de 60% celle du dioxyde de carbone pour le même effet (GIEC, 2013 ; Rira, 2015).

Les émissions de méthane d'origine agricole résultent en grande partie de l'élevage de bétail, de la digestion anaérobie de la biomasse et de la production de riz. Les ruminants sont les seuls animaux capables de valoriser l'énergie des végétaux, mobilisée dans leurs composés celluloseux alimentaires. Pour cela, ils dépendent entièrement de l'activité métabolique du microbiote ruminal, implanté essentiellement dans leur rumen, car à l'instar des autres mammifères ils ne possèdent pas d'enzymes digestives capables de digérer la cellulose. Ainsi, le rôle du microbiote digestif dans la fonction de nutrition est singulier et capital, puisque tous les aliments ingérés sont soumis à une digestion microbienne préalable dans le rumen. Cependant, les fermentations ruminales engendrent des produits métaboliques non valorisables par l'animal. Principalement, le méthane, qui est éliminé par éructation par exhalaison ou par flatulence et qui constitue une perte en énergie pour le ruminant, estimée de 6 à 10% de l'énergie brute ingérée pour des rations riches en fourrages (Martin *et al.*, 2006 ; Rira, 2015). Donc toute orientation fermentaire qui augmente l'utilisation du H₂ métabolique ou qui en diminue la production est utile pour réduire la méthanogénèse. Cette évolution peut être obtenue soit par une action globale, au niveau de la ration et de l'animal, ou spécifique par le contrôle des populations microbiennes (spécialement les archées méthanogènes) à l'aide d'additifs.

Dans les systèmes de production animale, les antibiotiques sont couramment utilisés pour prévenir les maladies et les problèmes métaboliques, ainsi que pour améliorer l'efficacité alimentaire. Un certain nombre d'additifs chimiques tels que «antibiotiques», «ionophores», «inhibiteurs de méthane» et « Agents défaunateurs» ont été développés pour améliorer l'efficacité de la fermentation ruminale en diminuant la quantité totale de

méthane ou d'ammoniaque produite (Patra et Saxena, 2009). Cependant, la plupart de ces additifs ne sont plus utilisés couramment en raison des problèmes de toxicité pour les animaux, ainsi que les résidus de ces produits chimiques dans le lait et la viande avec leurs effets négatifs sur la santé humaine, de plus, la plupart d'entre eux sont interdits en Europe depuis 2006 [Règlement EC 1831/2003]. En conséquence, Différentes stratégies ont été déployées pour minimiser son émission. Elles s'intéressent essentiellement à la modification des conditions fermentaires et/ou à un changement de l'équilibre de la population du microbiote ruminal. Actuellement, de nombreuses études ont tenté d'exploiter les métabolites secondaires des végétaux (extraits végétaux, saponines, tannins et huiles essentielles). Ces composés, utilisés comme additifs alimentaires naturels, parce qu'ils constituent une alternative naturelle aux antibiotiques et aux facteurs de croissance et, d'autre part, en raison de leurs effets sur les performances de production, la qualité des produits, la santé et le bien-être des animaux (McIntosh *et al.*, 2003 ; Bayourthe *et al.*, 2014).

C'est dans le cadre de cette problématique que s'inscrit notre travail, l'objectif principal de ce travail est la recherche de nouveaux additifs alimentaires à partir d'extraits de plantes riches en métabolites secondaires, susceptibles de modifier favorablement l'activité du microbiote ruminal *in vitro*. Dans un premier volet, nous nous sommes intéressés, principalement, à évaluer la valeur nutritive de deux plantes médicinales (*Eucalyptus globulus* et *Olea europaea*) collectées d'une région semi-aride d'Algérie, qui sont destinées à la préparation des extraits riches en composés secondaires phénoliques principalement (flavonoïdes et tannins), ainsi que à l'analyse phytochimique qualitative et quantitative des composés secondaires de ces extraits. Dans un second volet, nous avons tenté d'explorer l'effet des extraits de ces deux plantes (spécialement la fraction acétate d'éthyle, n-butanol et aqueuse) à différentes concentrations sur l'activité méthanogénique, les paramètres fermentaires du rumen et sur la population de protozoaires. Dans un troisième volet, l'étude de l'impact d'un bioflavonoïde purifié (la quercétine) sur les caractéristiques de la fermentation *in vitro*, la méthanogenèse ruminale, les produits finaux et sur la population de protozoaires associés aux Archaea-bactéries méthanogènes.

Revue bibliographique

Chapitre I :

***Rappels sur l'alimentation
et la physiologie digestive
des ruminants***

I. Alimentation des ruminants

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

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

I.1. La paroi végétale

La paroi est l'enveloppe la plus externe de la cellule végétale. Elle est essentiellement composée de polymères glucidiques, cellulose et pectine, de protéines pariétales et éventuellement d'autres composés de nature phénolique (lignine et subérine). La paroi est composée de trois parties (Figure 1).

La paroi primaire, de nature pecto-cellulosique, n'existe seule que dans les cellules juvéniles; elle est extensible, ce qui permet la croissance cellulaire, La paroi secondaire apparaît lors de la différenciation cellulaire. Elle permet de renforcer la rigidité de la cellule et de l'imperméabiliser. Elle est subdivisée en trois sous-couches : S1 (externe), S2 (médiane) et S3 (interne), La lamelle moyenne est la partie la plus externe de la paroi et elle est commune à deux cellules contiguës (Christophe, 2007).

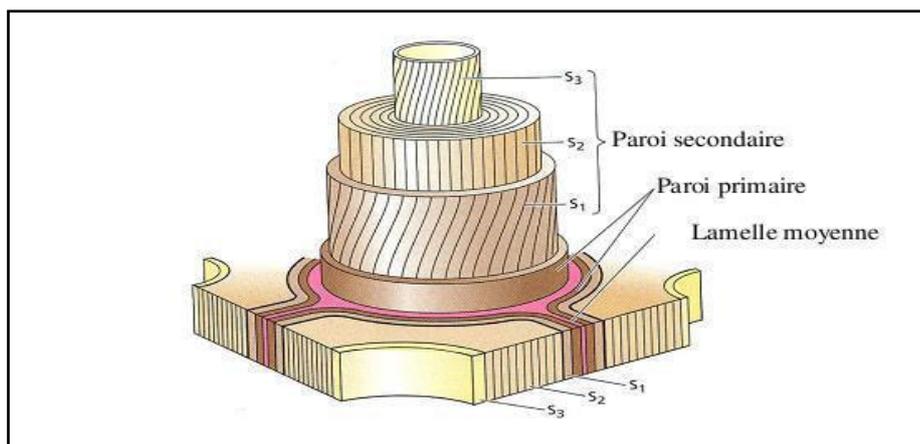


Figure 1: Organisation de la paroi végétale (Béguin et Aubert, 1994)

I.2. Constituants des parois végétales

Les parois contiennent toutes les mêmes constituants de base : eau, cellulose, hémicellulose, lignine, protéines (enzymes, glycoprotéines de structure), substances pectiques, substances inorganiques d'incrustation (CaCO_3 , silicates, oxalates), substances lipophiles d'incrustation (cires, cutine, subérine). Cependant la composition varie selon l'espèce ; dans une même espèce elle est variable selon le tissu et selon l'étape de développement. En effet, la proportion des parois végétales et leur degré de lignification augmentent avec l'âge de la plante.

I.2.1. La cellulose

Structuralement, l'unité élémentaire qui se répète dans la cellulose est le cellobiose (dimère de glucose), l'unité cellobiose mesurant 1.03 nm (Fengel et Wegener, 1984). La cellulose est la molécule renouvelable la plus abondante à la surface de la terre, elle représente plus de la moitié de la biomasse terrestre et est le matériau recyclable le plus exploité dans l'industrie. C'est un homopolymère non ramifié constitué de longues chaînes linéaires d'unités de D-glucose liées entre elles par une liaison glycosidique β -1,4 (Figure 2). Son degré de polymérisation peut monter jusqu'à 15000 molécules de glucose (Breet et Waldron, 1996).

Des liaisons hydrogènes intermoléculaires favorisent l'organisation des chaînes parallèles en domaines cristallins appelés cristallites. La régularité de la structure favorise la formation de réseaux cristallins. Ces régions très cristallines, difficilement dégradables par les organismes cellulolytiques (Chesson *et al.*, 1982) sont séparées par des régions

amorphes que les enzymes hydrolysent plus facilement. Le degré de cristallinité de la cellulose est variable. Il est faible dans les cellules jeunes (parois primaires) et peut atteindre 70% dans les cellules matures (parois secondaires).

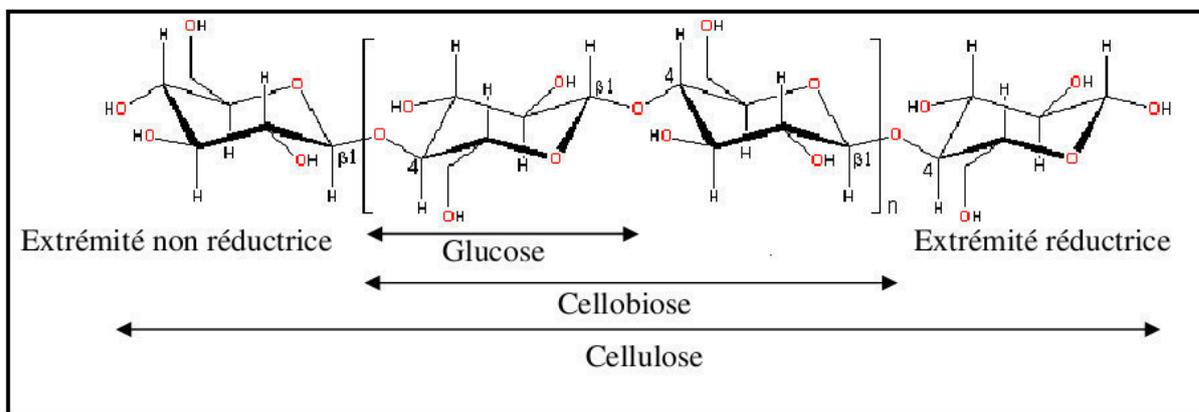


Figure 2 : Structure de la molécule cellulose (Christophe, 2007)

I.2.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses peuvent être de type homopolymère (D-xylane, D-mannane,...etc.) ou hétéropolymère (xyloglucane, glucomannane,...etc.). Les chaînes de ces macromolécules sont relativement courtes. Elles constituent une matrice polysaccharidique souvent associée à des constituants phénoliques qui entourent les fibrilles de la cellulose (Thomson, 1983). La classe la plus fréquente correspond aux xyloglucanes. Ils sont constitués d'une chaîne de glucose (β -1,4) et de courtes chaînes latérales de xylose, galactose et fucose (Figure 3). Les xyloglucanes peuvent contracter des liaisons hydrogènes avec la cellulose. A cause de la présence de chaînes latérales, ils ne sont pas eux-mêmes susceptibles de constituer des fibrilles. Ils peuvent ainsi jouer un rôle fondamental dans le maintien d'une architecture pariétale organisée en liant les fibrilles de cellulose entre elles (Christophe, 2007).

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

se biodégradent rapidement, présentent un taux d'absorption d'humidité élevé, et se dégradent chimiquement à des températures relativement basses.

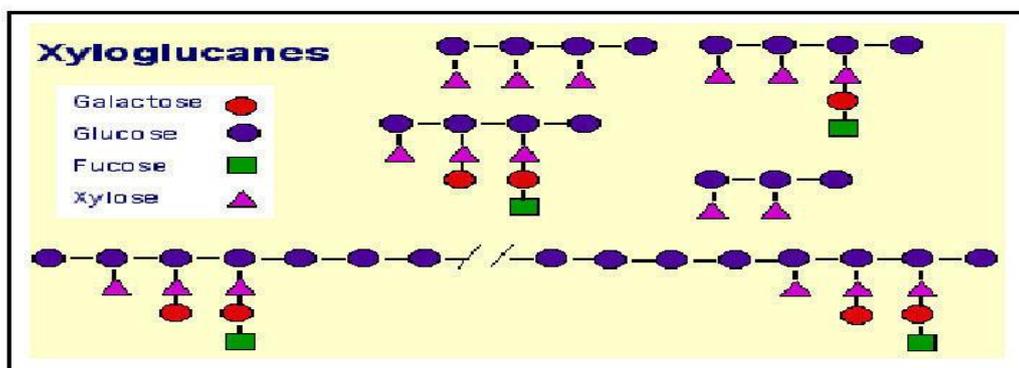


Figure 3: Molécules de xyloglucane (Christophe, 2007).

I.2.3. La lignine

Cette substance est responsable de la rigidité des végétaux, de la conduction des solutés et de la résistance face aux agents pathogènes. Elle a aussi, une action inhibitrice vis-à-vis de la dégradation des polysides pariétaux dans le rumen (Jung et Deetz, 1993). La présence de lignine est une caractéristique rencontrée chez la plupart des végétaux (fougères, gymnospermes et angiospermes). Ce polymère représente 15 à 36% de la masse sèche des angiospermes (Baucher *et al.*, 1998). La lignine est un hétéropolymère phénolique ramifié de haute masse moléculaire, qui résulte de la copolymérisation de trois monomères : alcool coumarylique, alcool coniférylique et alcool sinapylique (Figure 4). Elle est liée aux hémicelluloses mais les liaisons lignine/hémicelluloses ne sont pas connues avec précision. L'organisation s'effectue autour des microfibrilles de cellulose et aboutit à un treillis dense (Angelidaki *et al.*, 2000).

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

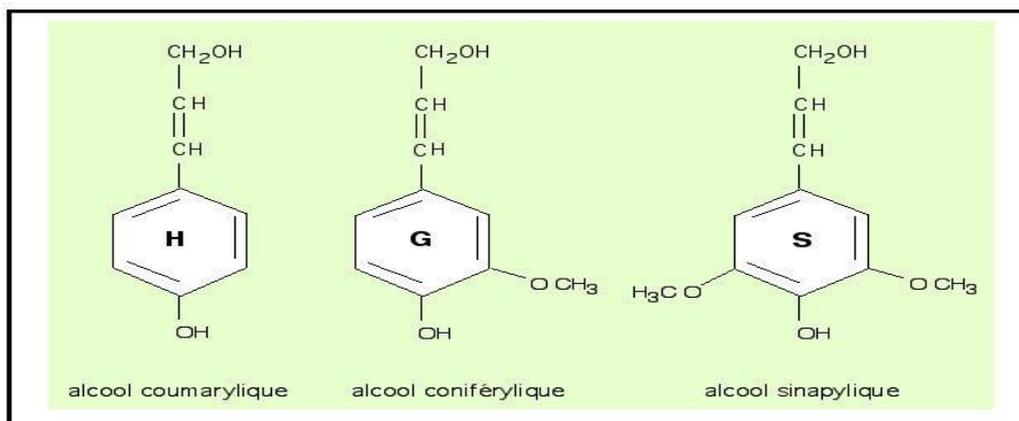


Figure 4: Les trois monomères principaux de la lignine (Roger, 2012).

I.2.4. Les pectines

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

I.2.5. Les tannins

✓ **Généralités et définition :** D'un point de vue biochimique, une première définition des tannins a été proposée par Bate-Smith (1973) : « des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3 000 Da qui présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines ». Les tannins (ou tanins) sont des substances d'origine végétale qui ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible, le cuir (Bruneton, 1999). Cette propriété de tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène de la peau.

Même si cette définition reste valable, elle a été complétée grâce aux méthodes d'analyse récentes qui ont permis d'éclaircir la structure de ces polyphénols. Ainsi, les

tannins sont désormais définis comme des polyphénols de masse moléculaire allant jusqu'à 20 000 Da (Hagerman, 2002). Selon leur structure biochimique, il est usuel de distinguer deux classes de tannins : les tannins hydrolysables (THs) et les tannins condensés (TCs).

✓ **Les propriétés biologiques:** Les propriétés biologiques des tannins découlent de leurs propriétés physicochimiques. L'une des conséquences directes de la capacité des tannins à complexer les protéines est l'inactivation des enzymes soit directement, par fixation aux sites actifs, soit indirectement par l'encombrement stérique créé par la fixation des molécules de tannins sur l'enzyme (Zimmer et Cordesse, 1996). Certaines drogues à tannins présenteraient des effets antifongiques (Baba- Moussa *et al.*, 1999; Bruneton, 1999), antiviraux (Yamaguchi *et al.*, 2002) et antimicrobiens (Hatano *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2006), Néanmoins, les applications actuelles en thérapeutique restent restreintes (Bruneton, 1999).

✓ **Classification biochimique :** Chez les végétaux supérieurs, il est usuel de distinguer deux groupes de tannins selon leur structure biochimique: les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Bruneton, 1999; Hagerman, 2002). Les tannins hydrolysables (THs) sont des oligo- ou poly-esters d'un sucre, en général le glucose, et de molécules d'acide-phénol (Bruneton, 1999; Mueller-Harvey, 2001). En général, les THs ont un faible PM. Cependant, des couplages oxydatifs entre THs peuvent produire des polymères de PM importants (Mueller-Harvey, 2001). Les tannins condensés (TCs) sont appelés proanthocyanidines parce que leur oxydation en milieu alcool-acide entraîne la formation de pigments anthocyanidiques tels que les cyanidines (à partir de procyanidines) et les delphinidines (à partir de prodelphinidines) (Brunet, 2008).

✓ **Rôle des tannins dans les plantes :** Les tannins sont des métabolites secondaires des végétaux (Bruneton, 1999), c'est à dire des substances non-essentiels pour la croissance de la plante. Par contre, les tannins jouent un rôle dans la défense des plantes contre les agressions des prédateurs tels les insectes et les mammifères herbivores (Woodward et Coppock, 1995; Feucht et Treutter, 1999). Il a été montré que l'ingestion de tannins affectait l'intégrité du tube digestif des insectes phytophages (Ayres *et al.*, 1997). Donc la synthèse des tannins est l'un des mécanismes de défense des plantes contre les attaques des phytopathogènes. Par exemple, une accumulation de tannins a été observée dans les zones d'invasion de la plante par des bactéries, des champignons ou par des

nématodes, ce qui en inhiberait le développement (Collingborn *et al.*, 2000). De plus, la présence des tannins rend les plantes moins appétentes pour les mammifères herbivores à cause de la sensation d'astringence résultant de leur consommation. Cette astringence conduit alors à un arrêt de la consommation et protège ainsi les végétaux d'une prédation excessive (Bennick, 2002).

I.2.6. Autres constituants

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

II. Particularités digestives du rumen-réseau chez les ruminants

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

Anatomiquement l'originalité réside dans la présence en amont du tube digestif, d'un estomac volumineux et compartimenté (Figure 5).

Les deux premiers réservoirs, le rumen et le réticulum constituent un vaste réservoir pouvant être comparé à un fermenteur fonctionnant en continu dans lequel se déroule une véritable digestion biologique des aliments.

L'abomasum est le 4^{ème} compartiment, c'est le véritable estomac du ruminant semblable à celui des monogastriques et c'est là que commence la digestion des résidus non hydrolysés dans le rumen (à l'exception des glucides pariétaux enrichis des synthèses

microbiennes).

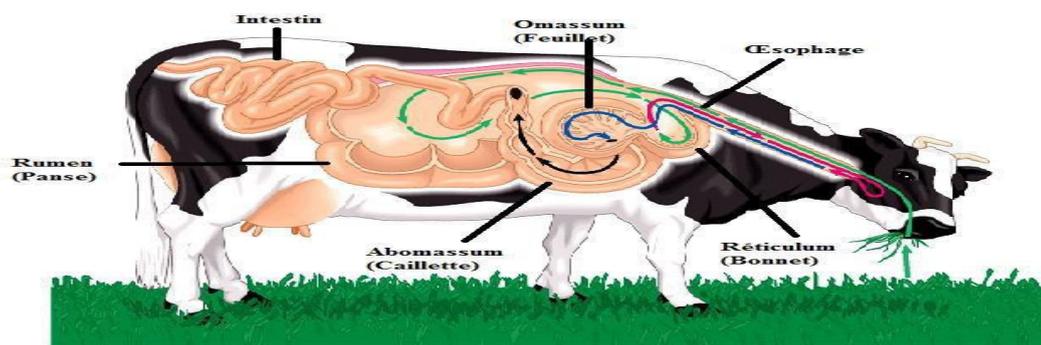


Figure 1 : Tube digestif des ruminants

Figure 5: Tube digestif des ruminants (Anonyme 1).

Le rumen, encore appelé panse ou réticuo-rumen, est de loin le plus volumineux des réservoirs gastriques des ruminants. Le réticulo-rumen est similaire à une grande cuve de fermentation d'une capacité d'environ 200 L chez les bovins et 20 L chez et les ovins de race tempérée. Il contient les aliments ingérés, de l'eau, une population microbienne variée et très active et de l'urée salivaire recyclée. L'ensemble est soumis aux mouvements péristaltiques et tamponné par la salive qui maintient un pH voisin de 6,5 à une température de 39° C.

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

III. Ecosystème microbien ruminal

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

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

III.1. Paramètres physico-chimiques du rumen

Le contenu ruminal peut être caractérisé par quelques paramètres physico-chimiques:

III.1.1. La teneur en eau

La teneur en eau du contenu ruminal est comprise entre 85 et 90%. L'eau, apportée par les aliments, l'eau de boisson et la salive, est le support des molécules en solution et des particules en suspension avec lesquelles elle constitue la phase liquide du rumen. Celle-ci est caractérisée par une pression osmotique comparable à celle du sang et comprise entre 200 et 300 mOsm/L chez l'animal sain. L'eau du rumen représente une masse importante en quantité et elle peut être utilisée, le cas échéant, comme réserve pour l'organisme (Brugère, 1983).

III.1.2. La température

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

III.1.3. L'anaérobiose

Le milieu ruminal est caractérisé par des conditions d'anaérobiose vraie. Les espèces bactériennes diffèrent selon leur sensibilité à l'oxygène. Les espèces reconnues pour être anaérobies strictes sont *Selenomonas ruminatum*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Lachnospira multiparus*, *Clostridium haemolyticum* et quelques espèces du genre *Treponema* (Loesche, 1969). Les espèces anaérobies modérées incluraient celles qui sont capables de croître en présence d'un pourcentage d'oxygène allant de 2 à 8%

(Loesche, 1969). Les apports d'oxygène dans le rumen sont généralement faibles (déglutition, diffusion à partir des vaisseaux des parois) mais des souches de bactéries aérobies facultatives le font vite disparaître (Zened, 2011 ; Bouazza, 2014; Medjekal, 2016).

III.1.4. Le pH et le pouvoir tampon

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

III.1.5. Le potentiel d'oxydo-réduction

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

III.1.6. Les métabolites

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

Chez les bovins, les AGV produits sont, soit absorbés au niveau de la paroi du rumen, mais de manière différentielle selon le type d'AGV (Dijkstra *et al.*, 1993), soit ils

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

L'ammoniaque produit est issu de l'activité protéolytique, uréolytique et de désamination (acides aminés) des microorganismes. Le NH₃ peut être absorbé au niveau de la paroi du rumen pour être ensuite transformé en urée au niveau du foie. Il est majoritairement prélevé par les microorganismes du rumen comme substrat à leur croissance (Sauvant *et al.*, 2011).

III.2. Le microbiote digestif

Les ruminants sont les meilleurs transformateurs de la biomasse végétale parmi les animaux domestiques. Ils utilisent très efficacement les glucides des parois végétales grâce à la présence d'un écosystème microbien ruminal performant. Le rumen constitue un écosystème anaérobie strict, dont les conditions de milieu favorisent le développement d'un microbiote extrêmement important et diversifié (Hungate, 1966; Medjekal, 2016). On y trouve des bactéries, des protozoaires, des champignons, des *Archea* et des bactériophages (Jouany, 1994).

III.2.1. Les bactéries

Les bactéries sont les microorganismes les plus nombreux du rumen. Elles représentent 50 % de la biomasse microbienne et leur concentration peut atteindre 10¹¹ cellules vivantes / ml de contenu ruminal (Hungate, 1966). Comparé aux protozoaires, aux champignons et aux bactériophages, les bactéries ont un rôle primordial au sein du rumen. Leur présence est essentielle pour la dégradation des aliments ingérés par les ruminants et pour le maintien des conditions physico-chimiques optimales au fonctionnement du rumen.

Dans le contenu ruminal, Les bactéries associées à la phase solide du rumen et qui adhèrent solidement aux particules alimentaires, représentent de 50 à 75% du total et sont donc plus abondantes que les bactéries libres de la phase liquide ou faiblement associées aux petites particules (Cheng et Costerton, 1980). Donc la distribution des bactéries est très

hétérogène et fortement influencée par la stratification des digesta que l'on observe malgré le brassage continu du contenu (Michalet-Doreau *et al.*, 2001).

La flore ruminale se caractérise par son extrême diversité liée autant au nombre d'espèces bactériennes colonisant le rumen qu'aux activités enzymatiques présentes (Koike *et al.*, 2010 ; Welkie *et al.*, 2010). Les bactéries ruminales peuvent être classées selon des critères morphologiques (forme et groupement des bactéries, présence ou absence de flagelle, nature de la paroi, type de mobilité, etc.) ou selon des critères physiologiques (voies métaboliques, types de substrats utilisés, etc.). Cette dernière classification conduit aux groupes fonctionnels suivants : fibrolytiques (cellulolytiques et hemicellulolytiques), amylolytiques, saccharolytiques, pectinolytiques, protéolytiques, lipolytiques, et bactéries utilisant les produits formés par d'autres microbes (tableau 01) (Fonty *et al.*, 1995).

Tableau 1 : Principales espèces bactériennes du rumen, leurs substrats et produits de fermentation (Fonty *et al.*, 1995).

Espèces bactériennes	substrat						Produits
	Cellulose	Hemicellulose	Dextrines	Amidon	Pectines	Sucres	
<i>Fibrobactersuccinogenes</i>	+	+	-	-	+	-	S,F,A
<i>Ruminococcusalbus</i>	+	+	-	-	-	-	A,F,E,H
<i>Ruminococcusflavefaciens</i>	+	+	-	-	-	-	S,F,A,H
<i>Butyviribriofibrisolvens</i>	+	+	-	+	+	+	B,F,A,H
<i>Prevotellaruminicola</i>	-	+	-	+	+	+	S,F,A,P
<i>Streptococcusbovis</i>	-	-	-	+	+	+	L,A,P,B,F,H
<i>Ruminobacteramylophilus</i>	-	-	-	+	-	-	L,A,F,E
<i>Succinomonasamylolutica</i>	-	-	-	-	+	-	S,F,A,E
<i>Succinivibriodextrinosolvens</i>	-	-	+	-	+	+	S,A,P
<i>Eubacteriumruminantium</i>	-	+	+	-	-	+	A,S,P
<i>Megasphaeraelsedni</i>	-	-	-	-	-	+	A,F,B,L

A : acétate, B : butyrate, E : éthanol, F : fumarate, L : lactate, P : propionate, H : hydrogène

Les trois principales espèces bactériennes cellulolytiques sont: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens*. Elles sont présentes à des concentrations variant de 10^8 à 10^9 cellules/ml (Coleman, 1975). Des observations ont été faites par Tajima *et al.*, (2000) : un mois après la transition entre un régime à base de foin et un régime riche en concentré, le nombre de bactéries fibrolytiques (cellulolytiques et hemicellulolytiques) a diminué, au profit des amylolytiques. De même, Mosoni *et al.*, (2011) ont rapporté que bactéries cellulolytiques représentent 10 % de la flore avec une ration fourrage et leur nombre diminue 4,5 fois après l'inclusion du concentré.

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

D'autres espèces encore plus spécialisées telles que *Selenomonas ruminantium* et *Megasphaera elsdenii*, jouent par exemple un rôle déterminant sur le maintien d'un pH optimal dans le rumen. De par leur capacité à fermenter le lactate entre autres, ce sont deux bactéries anaérobies strictes. Représentante majoritaire dans certaines conditions et surtout lorsque le pH est très bas (état d'acidose), la bactérie *S. ruminantium* fermente l'acide lactique en succinate puis en propionate dont les intermédiaires clés sont le malate et le fumarate, la bactérie peut fermenter jusqu'à 97% du lactate présent dans le rumen particulièrement lorsque le régime alimentaire induit une forte acidité dans le milieu ruminal (Elsden *et al.*, 1956 ; Sokatch, 1969). La bactérie *M. elsdenii* utilise préférentiellement au glucose, le lactate comme substrat, elle le fermente grâce aux enzymes lactate déshydrogénase et lactate racemase qu'elle transforme en propionate par la voie de l'acrylate (Counotte *et al.*, 1982 ; Hino et Kuroda, 1993 ; Hino *et al.*, 1994).

En outre, les bactéries ruminales sont classées aussi en quatre groupes, en fonction de leur localisation dans le rumen (Guillaume, 2007; Medjekal, 2016) :

- ✓ **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 archaébactéries 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.

III.2.2. Les protozoaires

Les protozoaires sont des organismes eucaryotes unicellulaires, dont on distingue deux types : les flagellés et les ciliés. Dans le rumen, les protozoaires flagellés sont peu nombreux. Quatre espèces ont été mises en évidence : *Chilomastix sp.*, *Monocercomonas sp.*, *Pentatrichomonas sp.* Et *Tetratrichomonas sp.* (De Puytorac *et al.*, 1987) mais leur rôle est peu connu. Donc la majorité des protozoaires retrouvés dans le rumen appartiennent à l'embranchement des ciliés, anaérobies stricts et sont évalués entre 103 à 106 protozoaires / g de contenu ruminal par dénombrement sur cellule de comptage (Jouany, 1988; Williams et Coleman, 1997). Les protozoaires ciliés du rumen appartiennent aux deux grands groupes: les entodiniomorphes et les holotriches. Dans le rumen chez l'adulte, on observe 9 genres de protozoaires appartenant au groupe des entodiniomorphes (*Entodinium*, *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Metadinium*, *Enoploplastron*, *Polyplastron*, *Epidinium* et *Ophryoscolex*). Le groupe des holotriches est majoritairement représenté dans le rumen par la famille Isotrichidaea avec deux genres prépondérants : *Isotricha* et *Dasytricha* (Williams et Coleman, 1997 ; Karnati *et al.*, 2003). Au sein de la phase liquide du rumen, deux genres sont identifiés *Entodinium* (69,6% des clones) et *Epidinium* (31,4% des clones), un certain nombre de clones n'étaient pas identifiables (30,4%) (Shin *et al.*, 2004a). Au niveau de la phase solide du rumen, le genre *Entodinium* est majoritaire et aucun *Epidinium* n'a été observé. Au niveau de l'épithélium ruminal, aucun protozoaire n'a été détecté (Shin *et al.*, 2004a).

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

glucosamine (Jouany et Ushida, 1998). *Isotricha* possède une forte activité amylolytique (Gouet *et al.*, 1986) et la dégradation de l'amidon conduit à la formation d'acide butyrique, H₂, et CO₂ majoritairement et un peu d'acides propioniques et lactiques.

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

Tableau 2 : Abondance relative des protozoaires du rumen chez des vaches recevant deux rations différentes (Karnati *et al.*, 2003).

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

Sous-famille, comprenant les genres *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Metadinium*, *Enoploplastron*, et *Polyplastron*. ND : non détecté.

III.2.3. Les champignons

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

Les champignons du rumen sont difficiles à dénombrer car les résultats sont largement influencés par la méthode utilisée (nombre de sporanges ou de zoospores). Malgré cette incertitude, Chez le ruminant adulte, la densité de champignons est comprise entre 103 et 104 champignons / ml de contenu ruminal (Mcallister et Cheng, 1996). Des densités similaires ont été observées via des techniques de biologie moléculaire (Lwin *et al.*, 2011). Les champignons du rumen sont totalement anaérobies, ce qui est tout à fait exceptionnel dans le groupe des champignons, ils ne possèdent pas de mitochondries, pas de cytochromes et assurent uniquement la fermentation de tissus cellulosiques. (Mcallister et Cheng, 1996).

Trois genres ont été bien identifiés : *Neocallimastix*, *Piromyces* et *Caecomyces*. *Neocallimastix* est pluri-flagellé, alors que les deux autres sont uniflagellés (Jouany, 1994).

La colonisation des tissus végétaux débute peu après l'ingestion des aliments par les animaux (15-30 minutes). Les champignons produisent de grandes quantités d'enzymes impliquées dans la digestion des glucides de la paroi végétale (exocellulases, endocelluloses, cellodextrinases) pour former du cellobiose qui est ensuite fermenté (Popova, 2011a).

III.2.4. Les *Archaeaméthano*gènes

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

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

phylogénie des archées et révèlent l'existence de nouveaux groupes d'archées appartenant au phylum *Euryarchaeota* (Tajima *et al.*, 2001 ; Whitford *et al.*, 2001).

Stumm *et al.*, (1982) ont suggéré que pas moins de 20% des méthanogènes du rumen vivent en association avec les protozoaires. De plus, Finlay *et al.*, (1994) ont mis en évidence des *Archaea* en associations endosymbiotiques avec les protozoaires ciliés *Entodinium* spp. Et *Dasytricha ruminantium* et ont estimé que les méthanogènes peuvent occuper jusqu'à 1% du volume cellulaire de ces eucaryotes. Les *Archaeaméthanogènes* associées aux protozoaires seraient responsable de 9 à 25% du CH₄ produit dans le rumen (Newbold *et al.*, 1995). Donc les *Archaea* méthanogènes peuvent occuper les quatre différentes niches : libres dans le liquide ruminal, attachées aux particules alimentaires solides, attachées à l'épithélium ruminal ou en ecto- ou endo-symbiose avec les protozoaires (Janssen et Kirs, 2008).

III.2.5. Les bactériophages

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

III.3. Rôle des différents microorganismes du rumen dans la digestion

Les trois principales populations microbiennes possèdent l'équipement enzymatique nécessaire à la dégradation de l'ensemble des constituants de la ration, notamment des parois cellulaires des végétaux. Cependant, plusieurs facteurs conditionnent la dégradation ruminale des parois végétales : l'accessibilité des substrats aux microorganismes, leur adhésion aux particules et leur activité enzymatique (Cheng *et al.*, 1991; Medjekal, 2016).

III.3.1. Digestion des matières glucidiques

Les glucides constituent la source essentielle d'énergie : 70-75% de l'énergie pour une ration à base de fourrages contre 64-68% à base de fourrages et concentrés (Vermorel, 1988). La fermentation microbienne produit des gaz et des acides gras volatils (AGV) : mélange d'acétate (C2), de butyrate (C4) et de propionate (C3). La proportion entre les différents AGV est fonction de la nature de l'alimentation qui détermine l'orientation des fermentations microbiennes : 70% de C2, 20% de C3 et 10% de C4 pour une ration à base de fourrages ; augmentation du pourcentage de C3 pour tout apport de céréales dans la ration. L'acétate est directement utilisé comme source d'énergie par les muscles dont le tube digestif (30%), il permet la synthèse des lipides de réserves ou du lait. Le butyrate (C4) est en partie transformé par l'épithélium du rumen en β hydroxybutyrate : molécules appartenant aux corps cétoniques qui servent de molécules énergétiques pour le cœur et les muscles squelettiques, cette synthèse explique un taux basal de 5-12 mg/L de corps cétoniques dans le sang. Le propionate est transformé jusqu'à 20% en lactate au niveau de la paroi du rumen. Puis le foie capte le reste du C3 et le lactate pour les transformer en glucose donc le propionate est le principal précurseur du glucose, ce dernier est considéré comme étant la molécule énergétique qualitativement la plus importante. Or la quantité absorbée est très faible de l'ordre de 1%, mais elle peut augmenter si la ration est riche en céréales et surtout en amidon de maïs. Le glucose est indispensable comme source d'énergie pour le cerveau, le fœtus et la synthèse de lactose de la production laitière et il est en majorité disponible grâce à la néoglucogénèse (Brunet, 2002).

La fraction pariétale non digérée dans le milieu ruminal est aussi fermentée en AGV et absorbée au niveau du gros intestin (cæcum, colon), et la fraction indigestible est éliminée ensuite par les fèces (Brunet, 2002).

Grâce à un équipement enzymatique très large mais spécifique des groupes bactériens concernés, les microorganismes du rumen sont capables de dégrader tous les constituants glucidiques contenus dans les végétaux (Hungate, 1966 ; ; Medjekal, 2016). Cette dégradation qui réduit la taille des molécules alimentaires aboutit à libérer dans le milieu ruminal des oses (hexoses ou pentoses). Les bactéries cellulolytiques participent activement à la dégradation des polymères des plantes (Figure 6). Cette dégradation nécessite l'action d'enzymes spécialisées qui sont distribuées parmi les différents microorganismes

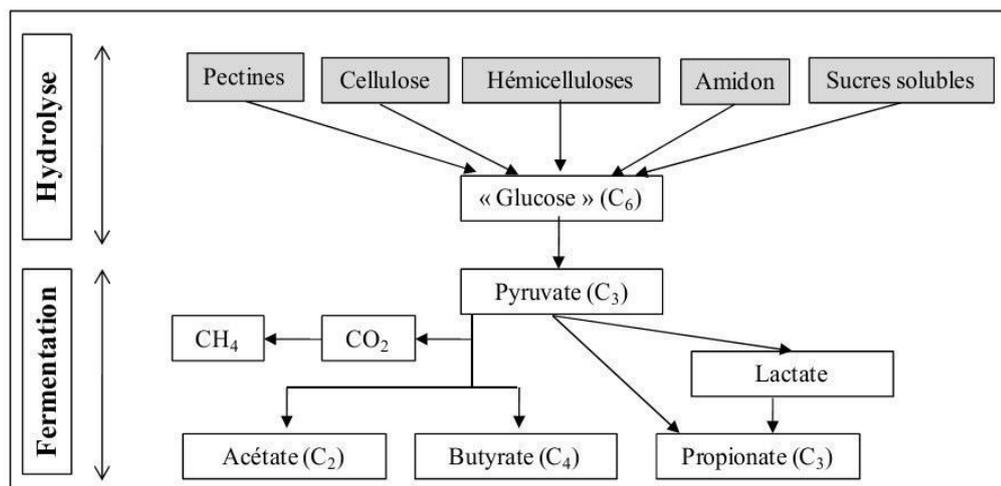


Figure 6: Résumé des principales voies des fermentations ruminales des polymères glucidiques. (Serment, 2012)

fibrolytiques (Doré et Gouet, 1991). Ces différentes enzymes sont souvent regroupées au sein de complexes de hauts poids moléculaires (cellulosome) qui leur permettent sûrement d'être plus efficaces, l'hydrolyse de la cellulose se fait par l'action de cellulases classées en trois groupes: les endoglucanases, les exoglucanases et les bêta-glucosidases. De même, les hémicelluloses sont hydrolysées par trois groupes d'enzymes: des endoxylanases, des exoxylanases et des bêtaxylosidases (Forano *et al.*, 1996 ; Fonty et Forano, 1999).

Les protozoaires ciliés et les champignons possèdent aussi ce potentiel enzymatique (Jouany et Ushida, 1990 ; Fonty et Joblin, 1991). Les ciliés (larges entodiniomorphes) peuvent ingérer des particules alimentaires et les digérer à l'intérieur de vacuoles (Ushida et Jouany, 1994). Ils possèdent une plus grande activité cellulasique que les ciliés *Entodinium*.

L'activité cellulasique est associée à la fraction cytoplasmique des protozoaires. Leur activité cellulasique semblerait plus élevée que celle des bactéries (Conchie, 1954). Cependant, il est difficile de distinguer la contribution des bactéries fixées aux particules ingérées, de celle des protozoaires dans la dégradation de la cellulose (Fonty *et al.*, 1995). Les hémicelluloses sont aussi activement dégradés par les larges entodiniomorphes, tandis que les holotriches ont un rôle mineur dans la cellulolyse. Ce sont les trois principales bactéries cellulolytiques, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* et *Fibrobacter succinogenes* qui contribuent le plus à l'activité cellulolytique des microorganismes adhérant aux particules du rumen (Fonty *et al.*, 1995) (Tableau 3).

Tableau 3 : Substrats dégradés et fermentés par les principales espèces bactériennes du rumen (Fonty *et al.*, 1995).

	Métabolites fermentaires											
	Formate	Acétate	Propion	Butyrate	Valérate	Caproat	Ethanol	Succinat	Lactate	H ₂	CO ₂	CH ₄
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	+	+						+				
<i>Ruminococcus albus</i>	+	+					+			+	+	
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	+	+						+		+	+	
<i>Butyivibrio fibrisolvens</i>	+	+		+							+	
<i>Prevotella ruminicola</i>	+	+	+					+				
<i>Selenomonas ruminantium</i>		+	+						+			
<i>Streptococcus bovis</i>		+	-						+			
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	+	+						+				
<i>Succinomonas amyloputica</i>		+	+					+				
<i>Eubacterium ruminantium</i>	+	+		+								
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	+	+						+	+			
<i>Megasphaera elsedni</i>		+		+		+				+	+	
<i>Lachnospira multiparus</i>	+	+					+		+	+	+	
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>		+	+					+				
<i>Veillonella alcalesens</i>			+									
<i>Methanobacterium ruminantium</i>												+
<i>Wolinella succinogenes</i>								+				
<i>Eubacterium limosum</i>		+		+								

La majorité des souches peuvent assurer cette fonction (+) ou (-)

Les produits de la dégradation des polyholosides sont des oligosaccharides solubles et des sucres, qui sont ensuite fermentés pour générer des molécules d'ATP utilisées par les différents microorganismes. La plupart des holotriches fermentent les sucres solubles, tandis que peu d'entodiniomorphes en sont capables (Jouany et Ushida, 1998). Cependant, certains sucres solubles ne sont pas fermentés par les holotriches (mannose, glucosamine).

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

III.3.2. Digestion des matières azotées

Dans la cellule végétale, les constituants azotés se trouvent sous forme protéique, essentiellement dans les cellules chlorophylliennes et sous forme non protéique dans les vacuoles (Demarquilly, 1986).

- Les constituants azotés protéiques : Ils représentent de 75 à 85% de l'azote total et ils proviennent en grande partie des chloroplastes (55 à 65%) et du cytoplasme (15 à 35%). Les protéines insolubles peuvent constituer jusqu'à 50% des protéines des feuilles.
- Les constituants azotés non protéiques : Ils sont essentiellement abondants dans les vacuoles, les tissus conducteurs de l'appareil végétatif et les racines. Sur le plan chimique, ils représentent les fractions solubles dans l'éthanol (Jarrige, 1980). Ils regroupent les acides aminés libres non indispensables, les nucléotides, les amides et les peptides de faible poids moléculaire. Les constituants azotés non protéiques représentent 15 à 25% de l'azote des fourrages verts. Ils diffusent très vite dans le rumen où ils sont rapidement dégradés en ammoniac (NH₃) et ne sont utilisables par les ruminants qu'une fois transformés en protéines microbiennes (Jouany, 1994).

Les protéines ingérées par l'animal sont dégradées par le microbiote ruminal et plus particulièrement par les bactéries et les protozoaires. Les bactéries ruminales ont une forte activité protéolytique par rapport aux protozoaires car cette activité est présente au niveau de leur paroi cellulaire à l'inverse des protozoaires dont l'activité protéolytique est intracellulaire (Nugent et Mangan, 1981 ; Coleman, 1983). Les champignons anaérobies ont une très faible activité protéolytique (Wallace et Joblin, 1985; Bonnemoy *et al.*, 1993). Les principales bactéries protéolytiques sont présentées dans le tableau 4.

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

Gram négative	Gram positive
<i>Prevotella ruminicola</i>	<i>Butyvirio fibrisolvens</i>
<i>Bacteroides samylophilus</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
<i>Megasphaera elsedni</i>	<i>Lachnospira sp</i>
<i>Selenomonas ruminantium</i>	<i>Eubacterium sp</i>
<i>Succinivibrio sp</i>	<i>Clostridium sp</i>
	<i>Propionibacterium sp</i>

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

Les peptides produits sont plus rapidement utilisés que les acides aminés libres correspondants. Ce sont principalement les bactéries du rumen qui les dégradent. Les produits de dégradation des peptides sont principalement extracellulaires, bien que la plupart des enzymes soient associées à la cellule (Wright, 1967). Les oligopeptides de faibles poids moléculaires sont préférentiellement intégrés aux protéines bactériennes, après avoir été hydrolysés en acides aminés au sein de la cellule bactérienne. Les acides aminés produits sont en faible concentration dans le rumen. Ils sont désaminés pour produire de l'ammoniaque et des acides gras volatils (AGVs) (Mackie et White, 1990) (Figure 7).

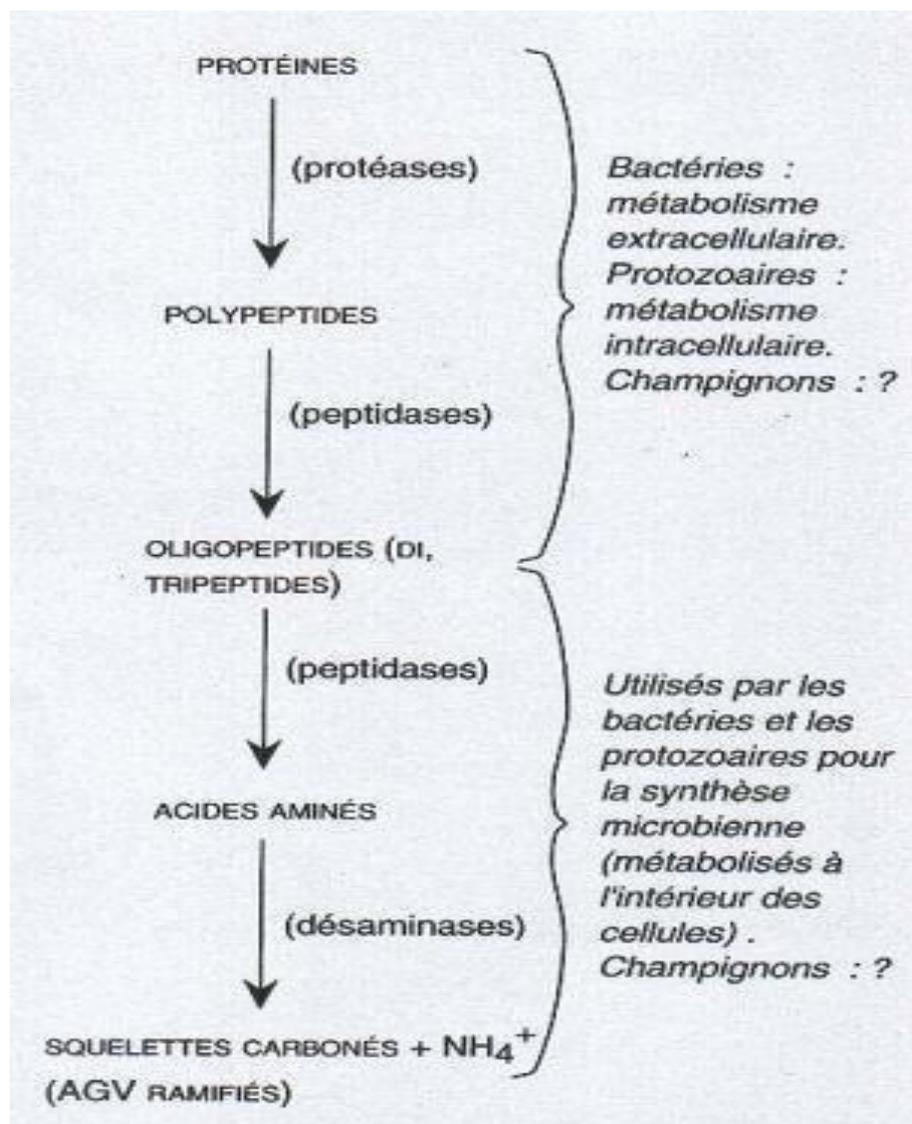


Figure 7: Dégradation des composés azotés dans le rumen (Jouany, 1994)

Les protozoaires jouent un rôle primordial dans la mesure où leur activité spécifique de désamination des acides aminés est 3 fois supérieure à celle des bactéries (Hino et Russel, 1985).

L'ammoniaque produit est issu de l'activité protéolytique, uréolytique et de désamination (acides aminés) des microorganismes (Fonty *et al.*, 1995). Le recyclage de l'ammoniaque via l'urée dans le rumen est très important. De même, *in vitro*, le recyclage de l'azote bactérien, issu de la prédation des bactéries par les protozoaires peut représenter 90g de matière sèche / j chez le mouton (Coleman, 1975). L'ammoniaque est essentielle pour la croissance de nombreuses espèces bactériennes. La très forte affinité des bactéries, vis à vis de l'ammoniaque, leur confère la capacité de se développer à partir d'une

concentration ruminale de NH₃ minimale, variable selon les auteurs, d'environ N-NH₃=50 mg / ml (Satter et Slyter, 1974) et qui l'assimilent grâce à une NAD/NADP glutamate déshydrogénase dans les conditions normales du rumen (Wallace et Cotta, 1988).

III.3.3. Digestion des lipides

Les lipides de la ration sont principalement composés de galactolipides, phospholipides (pour les fourrages) et de triglycérides (pour les aliments concentrés). Ces lipides subissent tout d'abord une lipolyse libérant les AG des triglycérides. *Anaerovibrio lipolytica* est la principale bactérie impliquée dans cette lipolyse (Lourenço *et al.*, 2010). Les AG libres insaturés peuvent alors subir des réactions d'isomérisation et de biohydrogénation. Les isomérases transforment les liaisons cis en liaison trans. Les réductases saturent quant à elles les doubles liaisons. Les principales voies connues ou probables de la biohydrogénation ruminale des acides linoléique (cis-9, cis-12 C18:2), linoléique (cis-9, cis-12, cis-15 C18:3) et oléique (cis-9 C18:1) sont décrites dans la Figure 8.

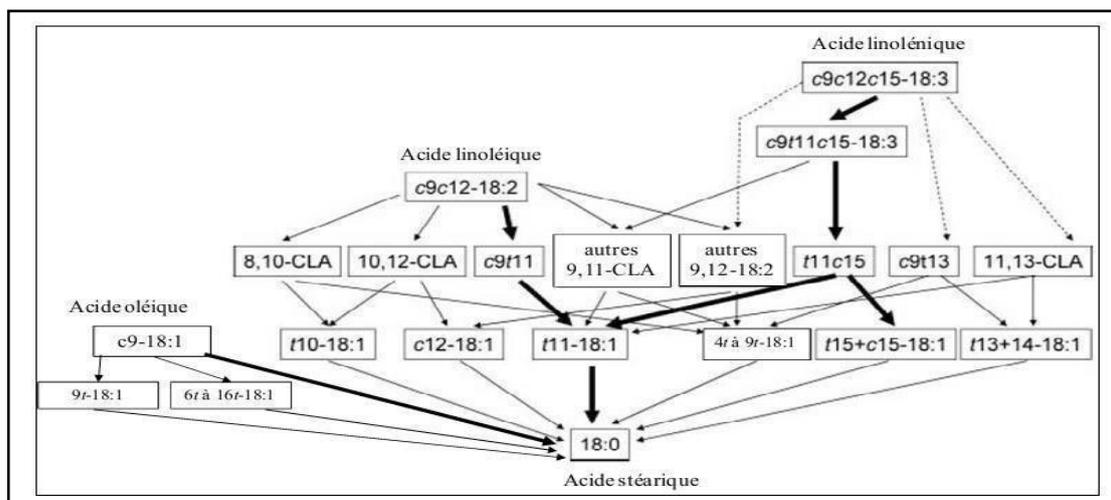


Figure 8 : Principales voies connues ou probables de la biohydrogénation ruminale des acides linoléique linoléique (Chilliard *et al.*, 2007).

La biohydrogénation du cis-9, cis-12 C18:2 et du cis-9, cis-12, cis-15 C18:3 conduit à la formation d'acide stéarique (C18:0) suite à une isomérisation et une série de réductions. Les vitesses de réactions sont différentes, notamment la dernière réduction est plus lente et fonction du pH. Ainsi, les flux digestifs sortant du rumen contiennent plus de C18:1 trans que de C18:2 et C18:3 trans. Parmi les différentes voies métaboliques de

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

Les bactéries responsables de la biohydrogénation peuvent être classées selon 2 groupes : les bactéries dont la croissance est inhibée par l'acide linoléique (dose inférieure à 200 µg / ml) et ayant une activité butyrate-kinase supérieure à 600 U / mg de protéines (*Butyrivibrio proteoclasticus* et *Butyrivibrio hungatei*) et les bactéries non inhibées par l'acide linoléique et ayant une activité butyrate-kinase inférieure à 40 U / mg de protéines (*Butyrivibrio fibrisolvens* et *Pseudobutyrvibrio spp.*) (Lourenço *et al.*, 2010). Les bactéries *Butyrivibrio spp* ne sont pas responsables de l'hydrogénation de l'acide linoléique en trans-10, cis-12 C18:2 (Figure 9), qui est certainement due à *Propionibacterium acnes* et dans une moindre mesure à *Megasphaera elsdenii* (Lourenço *et al.*, 2010).

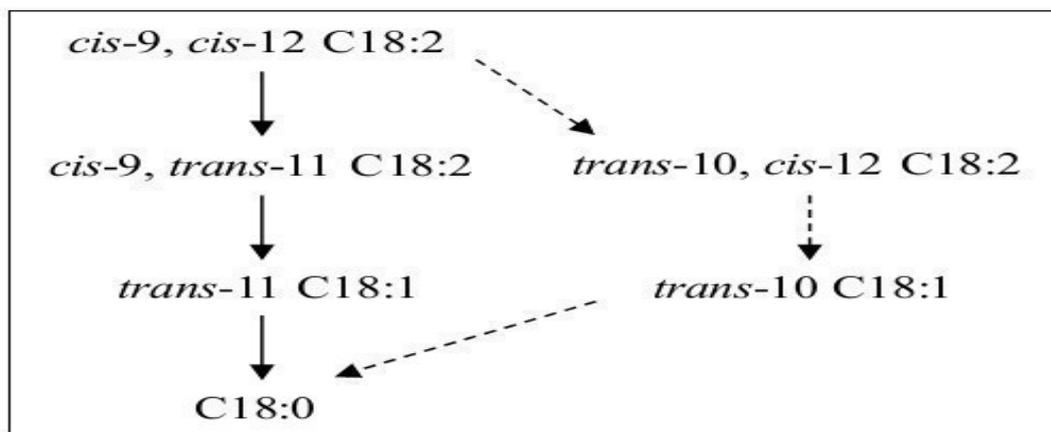


Figure 9: Biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique: détail des voies du trans-11 et du trans-10 (Shingfield et Griinari, 2007).

En gras : voies majeures ; en traits pleins : voies probables suggérées par les études *in vitro* ; en pointillés : voies probables avec des intermédiaires à préciser. Lorsque les configurations cis ou trans ne sont pas indiquées, toutes les combinaisons peuvent exister.

Chapitre II :

***Effet de serre, méthanogénèse
ruminale et ses stratégies de
réduction***

I. L'effet de serre

L'effet de serre désigne un phénomène d'échauffement de la surface de la terre et des couches basses de l'atmosphère, dû au fait que certains gaz de l'atmosphère absorbent et renvoient une partie du rayonnement infrarouge émis par la terre, ce dernier compensant le rayonnement solaire qu'elle absorbe elle-même. Les gaz qui provoquent ce phénomène, tels que le dioxyde de carbone ou le méthane, sont appelés « gaz à effet de serre » (GES). On estime que sans GES, la température à la surface du globe serait de -18°C.

L'expression « effet de serre » est employée usuellement dans le sens d'« effet de serre anthropique », qui désigne le réchauffement global du climat attribué à l'augmentation de la concentration des GES, résultant de l'accroissement de leurs émissions dues aux activités humaines et aux combustibles fossiles. Cependant, l'effet de serre existait indépendamment des activités humaines, et était dû essentiellement à la vapeur d'eau et au gaz carbonique et à un degré moindre au méthane. Néanmoins les activités humaines ont fortement accru l'effet de serre, dès le début de l'époque industrielle ; cet accroissement n'est toutefois devenu très important que depuis une trentaine d'années.

Plus d'une quarantaine de GES ont été recensés parmi lesquels figurent :

- ❖ La vapeur d'eau (H₂O), le dioxyde de carbone ou gaz carbonique (CO₂), le méthane (CH₄), l'ozone (O₃), l'oxyde nitreux ou protoxyde d'azote (N₂O), les hydrofluorocarbures (HFC), les perfluorocarbures (PFC) et l'hexafluorure de soufre (SF₆).
- ❖ Le CO₂ représente près de 69% des émissions de GES d'origine anthropique. Il est principalement issu de la combustion des énergies fossiles (pétrole, charbon) et de la biomasse.
- ❖ Le N₂O représente 16% des émissions. Il provient des activités agricoles, de la combustion de la biomasse et des produits chimiques comme l'acide nitrique.
- ❖ Le CH₄ représente 13% des émissions. Il est essentiellement généré par l'agriculture (rizières, élevage). Une partie mineure des émissions provient de la production et de la distribution de gaz et de pétrole, de l'extraction du charbon, de leur combustion et des décharges.
- ❖ Les gaz fluorés (HFC, PFC, SF₆) représentent 2% des émissions. Ces gaz sont utilisés dans les systèmes de réfrigération et employés dans les aérosols

et les mousses isolantes. Les PFC et le SF₆ sont utilisés dans l'industrie des semi-conducteurs.

La contribution d'un GES est habituellement caractérisée par un indice appelé le potentiel de réchauffement global (PRG). Il est calculé par rapport à une référence qui est le CO₂. Certes, les émissions de CO₂ sont bien plus importantes en quantité que celles du CH₄ mais eu égard au potentiel de réchauffement, le CH₄ contribue fortement à l'effet de serre. Sur une période de 100 ans, il est estimé qu'une molécule de CH₄ a un potentiel de réchauffement global 25 fois supérieur à celui du CO₂ (IPCC, 1992 ; Rira, 2015).

Une autre importance du CH₄ tient au fait que l'on pourrait stabiliser sa concentration dans l'atmosphère en réduisant les émissions anthropogéniques de 10% seulement, alors qu'il faudrait réduire de 60% les émissions de CO₂ pour un même résultat. En effet, les molécules de CH₄ persistent environ 12 ans dans l'atmosphère avant leur récupération dans les puits de carbone tels que les océans, le sol et les plantes. Alors que les molécules de CO₂ y séjournent 10 fois plus longtemps, c'est pourquoi une stratégie de réduction des émissions de CH₄ aurait un impact beaucoup plus immédiat sur l'effet de serre qu'une action sur le CO₂, qui ne se ferait sentir qu'à bien plus long terme et impliquerait des efforts autrement plus importants.

La part relative de l'agriculture dans les émissions de CH₄ a eu tendance à augmenter au cours de ces dernières années, notamment parce que celle d'origine industrielle a diminué. Si à l'échelle mondiale les rizières sont une source importante de CH₄ issu de l'agriculture, en Europe, la quasi-totalité des émissions de CH₄ d'origine agricole provient de l'activité d'élevage, et plus précisément des fermentations digestives des herbivores (70%) et des déjections animales (30%). Comparée au méthane, la quantité de CO₂ rejetée dans l'atmosphère par les ruminants (20% d'origine fermentaire et 80% d'origine métabolique) est en moyenne 11 fois plus importante en volume et 30 fois en poids. Mais la contribution des ruminants à l'effet de serre *via* leur production en CO₂ est considérée comme négligeable, ce gaz étant recyclé lors de la photosynthèse par les végétaux que les animaux consomment, donc les ruminants participent avec 3% au réchauffement de la planète.

Chez le ruminant, le CH₄ est un produit formé naturellement pendant le processus de fermentation microbienne des aliments dans le rumen, situé au début du tube digestif. Le méthane ainsi produit est rejeté dans l'atmosphère par voie orale (95%), au cours

d'éruclations régulières et par les poumons après passage dans le sang, mais très peu par flatulences (5%) (Kepler *et al.*, 2006).

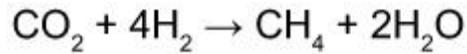
Outre l'aspect environnemental, le méthane éruclé constitue pour le ruminant une perte en énergie sous forme gazeuse estimée à environ 6-10% de l'énergie brute ingérée. La réduction de la méthanogénèse présente donc non seulement un intérêt environnemental pour l'homme et la planète, mais aussi un intérêt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

II. Les mécanismes de la méthanogénèse ruminale

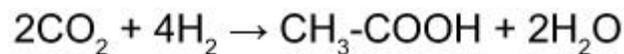
Les aliments ingérés par les ruminants séjournent pendant 20 à 70 heures dans le rumen où vit une population microbienne anaérobie dense ($> 10^{10}$ cellules/ml) et variée (plusieurs milliers d'espèces de bactéries, de protozoaires et de champignons). Environ 70% de la digestion totale a lieu dans le rumen, ce qui donne à cet organe un rôle majeur dans l'utilisation des aliments par le ruminant. Les micro-organismes colonisent les particules alimentaires en quelques minutes et, grâce à leurs dépolymérase, dégradent les polysides végétaux (cellulose, hémicelluloses, pectines, et amidon) en oses (glucose, xylose) qui sont ensuite fermentés pour produire des acides gras volatils (acétate, propionate, butyrate), du CO_2 et de l'hydrogène. Dès sa formation, l'hydrogène est rapidement utilisé par des micro-organismes hydrogénotrophes appelés archae-bactéries qui appartiennent à une branche particulière dans la classification systématique des bactéries, pour former du CH_4 . L'orientation des fermentations microbiennes joue un rôle déterminant sur le métabolisme de l'hydrogène dans le rumen. La formation d'acétate s'accompagne d'une production d'hydrogène et donc de méthane alors que celle du propionate est consommatrice d'hydrogène. La production du butyrate à partir de l'acétate utilise également de l'hydrogène (Martin *et al.*, 2006).

Les acides gras volatils sont absorbés dans la circulation sanguine et fournissent environ 70% des besoins énergétiques des ruminants. Les gaz sont éliminés par voie orale. En outre, l'énergie produite sous forme d'ATP au cours des réactions de fermentation est utilisée par les micro-organismes pour synthétiser leurs éléments cellulaires qui seront ensuite digérés dans l'intestin grêle et contribueront à hauteur de 50 à 90% à la fourniture totale des acides aminés à l'animal hôte. En milieu anaérobie comme le rumen, les réactions d'oxydation nécessaires à la genèse de l'ATP conduisent à la production d'hydrogène métabolique (2H). Ce dernier doit être éliminé au fur et à mesure de sa production car une élévation de la pression partielle en hydrogène dans le milieu inhiberait

l'action des déshydrogénases dans le processus d'oxydation (Miller, 1995). L'utilisation continue de l'hydrogène dans le rumen est assurée par les microorganismes hydrogénotrophes (archae-bactéries) pour réduire une partie du CO₂ en méthane, selon la réaction suivante.



On peut donc considérer que la méthanogénèse est une voie métabolique essentielle dans l'élimination de l'hydrogène ruminal. Il est admis qu'une réduction de 20% du méthane digestif ne perturbe pas les fonctions digestives ou fermentaires essentielles du rumen. Au-delà, une réduction de la méthanogénèse ne peut être envisagée que si l'hydrogène est métabolisé par d'autres voies, conduisant par exemple à la synthèse de propionate ou de butyrate. Bien qu'anaérobies, les fermentations lactique et alcoolique, qui nécessitent également l'utilisation d'hydrogène métabolique, sont normalement peu actives dans le rumen. Toutefois, des rations riches en glucides facilement fermentescibles peuvent conduire à une production anormalement élevée d'acide lactique à l'origine d'une pathologie digestive appelée "acidose ruminale". Les pH bas observés avec ce type de régime inhibent la croissance (Hegarty, 1999 ; Martin *et al.*, 2006) et l'activité des microorganismes méthanogènes (Lana *et al.*, 1998 ; Martin *et al.*, 2006). Comme la méthanogénèse, la production d'acétate par la voie de l'acétogénèse réductrice correspond à une réduction du CO₂ selon la réaction suivante:



Elle a été mise en évidence dans le gros intestin du ruminant mais n'intervient qu'à un niveau faible dans le rumen. En revanche, elle est dominante dans le tube digestif de l'homme, du rat, des hamsters et des lapins.

III. Moyens de réduire la production digestive de méthane des ruminants

Toute orientation fermentaire qui augmentera l'utilisation de l'hydrogène métabolique ou qui en diminuera la production sera utile pour réduire la méthanogénèse. Cette évolution pourra être obtenue en agissant de manière spécifique par le contrôle de la population microbienne à l'aide d'additifs ou de manière plus globale au niveau de la ration et de l'animal.

III.1. Emploi d'additifs ou de manipulations biotechnologiques

Les moyens proposés pour diminuer la méthanogénèse ruminale ont été classés en additifs de type antibiotique, chimique ou naturel d'une part, et en manipulations biotechnologiques de l'écosystème microbien d'autre part.

III.1.1. Les additifs

III.1.1. a. Les antibiotiques ionophores

Les antibiotiques ionophores font partie des nombreux additifs alimentaires utilisés en production bovine. Le Monensin est l'un des ionophores les plus utilisés. Des études ont montré que ce dernier inhibe significativement la production de CH₄ dans le rumen (Sauer *et al.*, 1998). Cette inhibition est le résultat indirect d'une diminution de la production d'ionshydrogène. Cependant, une certaine adaptation des microorganismes méthanogènes aux ionophores a déjà été rapportée dans la littérature. En effet, une reprise totale de la production de CH₄ a été observée après deux semaines de traitement aux ionophores chez des bovins recevant une ration riche en concentrés (Rumpler *et al.*, 1986).

Les antibiotiques (monensine, lasalocide, salinomycine, avoparcine) ont une action inhibitrice significative sur les bactéries à Gram positif (Stewart *et al.*, 1983) qui produisent des quantités importantes d'hydrogène. La sélection microbienne qui en résulte favorise la formation du propionate et diminue celle du méthane (Bogaert *et al.*, 1989). L'effet inhibiteur des antibiotiques sur la méthanogénèse se maintient habituellement pendant plusieurs mois (Jouany et Lassalas, 1997). La mise en évidence d'une résistance à la vancomycine, antibiotique utilisé en milieu hospitalier pour lutter contre des pathogènes résistants aux antibiotiques traditionnels, a été attribuée à l'utilisation abusive de l'avoparcine comme facteur de croissance en production animale. Ce constat a conduit les autorités sanitaires de l'Europe à interdire la totalité des antibiotiques comme additif (alimentaire à partir du 1er janvier 2006, ce qui condamne définitivement l'utilisation de ces produits en alimentation animale.

III.1.1. b. Les additifs chimiques

Les diacides organiques (aspartate, malate ou fumarate) sont des précurseurs potentiels de succinate et de propionate qui peuvent donc être utilisés pour diminuer la méthanogénèse lorsqu'ils sont ajoutés à la ration des ruminants (Callaway et martin, 1996).

Si l'on admet une efficacité de fixation de l'hydrogène de 60% par les diacides organiques, il serait nécessaire de supplémenter les rations avec plus de 2 kg d'acide pour réduire de 10% la production de méthane chez une vache laitière rejetant 500 litres de méthane par jour (Newbold et Rode, 2006), ce qui est inapplicable en raison des conséquences sur le pH ruminal et du coût du traitement. Différentes solutions sont en cours d'étude pour pallier ce problème. Récemment, Wallace *et al.*, (2006) ont étudié l'effet d'une encapsulation de l'acide fumarique. Comparé au lot témoin d'agneaux, le produit encapsulé distribué à hauteur de 10% de l'ingéré a entraîné une diminution de 75% de la production de CH₄ et une augmentation de l'efficacité alimentaire de 20% (gain de poids (g) par kg ingéré). Sur le plan réglementaire, bien que ces acides soient largement employés en alimentation humaine et chez les animaux monogastriques, leur utilisation comme additif en alimentation des ruminants devra faire l'objet d'une autorisation délivrée par l'autorité européenne EFSA (*cf.* directive N°1831/2003).

De nombreux autres additifs chimiques ont été testés comme par exemple les peptides riches en acides aminés soufrés (thiopeptine, thiopeptide A, le 9,10 anthraquinone, l'acide 2-bromoethanesulfonique (BES), les analogues halogénés du méthane (chloroforme, hydrate de chloral, bromochlorométhane, bromure de méthylène) ou encore les sulfates et nitrates. Mais ces différents additifs sont peu prometteurs en termes d'utilisation sur le terrain pour le moment, car leur efficacité *in vivo* est mal connue, limitée et/ou transitoire, et le risque de toxicité qu'ils présentent est potentiel ou prouvé.

III.1.1.c. Les extraits de plante

De nombreux essais sont actuellement conduits dans le monde sur les extraits des métabolites secondaires des plantes, utilisés comme moyen de manipuler la fonction digestive des ruminants. Certaines plantes ou extraits de plantes peuvent en effet modifier l'orientation des fermentations ruminales par leurs propriétés bactéricides et avoir des effets voisins de ceux obtenus avec les antibiotiques (Busquet *et al.*, 2005). Contrairement aux antibiotiques et aux additifs chimiques, ce type de produit bénéficie d'une bonne image en raison d'une origine naturelle. Les études sur les extraits végétaux ont été réalisées essentiellement *in vitro*. Ainsi, les extraits d'ail, de piment, de yucca et de cannelle (Cardozo *et al.*, 2004), le sérum de luzerne obtenu après pressage de luzerne fraîche et élimination des protéines par floculation (Jouany *et al.*, 2005), et les extraits de

rhubarbe et de bourdaine (Garcia-gonzalez *et al.*, 2006) ont provoqué une diminution de la méthanogénèse.

III.1.2 Manipulations biotechnologiques de l'écosystème microbien ruminal

III.1.2.a. La défaunation (élimination des protozoaires) du rumen

L'élimination des protozoaires du rumen permet à la fois de diminuer la production d'hydrogène et de supprimer la fraction d'archae méthanogènes fixée à la surface et dans les cellules des protozoaires ciliés, ce qui explique la baisse de la méthanogénèse de 30 à 45% généralement observée après défaunation du rumen (Vermorel et Jouany, 1989). Cependant, des études récentes conduites à l'INRA ont montré que l'effet de la défaunation sur la production de méthane disparaît après une longue période (environ 12 mois selon Ranilla *et al.*, (2004). En outre, la défaunation améliore la digestion de l'azote mais diminue celle des parois végétales.

Une technique de vaccination de ruminants contre les méthanogènes a été développée en Australie, elle a permis de réduire de 8% la production de méthane sans effet négatif apparent sur les animaux. Le vaccin ne serait toutefois efficace que sur une fraction des archae-méthanogènes et l'effet à long terme n'est pas connu (Hegarty, 2001; Wright *et al.*, 2004).

III.1.2.b. Modification du système d'élevage

Le méthane étant principalement formé au niveau du rumen, on peut admettre que sa production sera étroitement liée à la quantité de matière organique fermentée dans ce compartiment digestif. Toutefois cette tendance est à moduler en fonction de la composition chimique des régimes. Par ailleurs, l'augmentation du niveau d'ingestion des animaux réduit le temps de séjour des aliments dans le rumen, ainsi que la part de la digestion de la matière organique dans le rumen et, de ce fait, la méthanogénèse (Vermorel, 1995b).

III.1.2.b.1. Au niveau de la ration

- **Les concentrés**

Par opposition aux glucides des parois végétales, l'amidon est à l'origine d'une orientation des fermentations ruminales vers la formation de propionate qui mobilise l'hydrogène métabolique et diminue la production de méthane. En outre, l'addition

importante ou la substitution de concentré à un fourrage entraîne une diminution de la digestion des parois végétales dans le rumen (interaction digestive négative) et donc de la méthanogénèse. Ceci a largement été démontré, par exemple par Webster *et al.*, (1975) qui ont observé que l'émission de méthane par des moutons, rapportée à l'énergie brute ingérée, était réduite de moitié entre une ration de graminées et une ration à 80% d'orge. Les pertes énergétiques sous forme de méthane (exprimées en % de l'énergie brute ou digestible) diminuent de façon curvilinéaire avec la quantité de concentré dans la ration. Elles sont relativement constantes pour des niveaux d'apport de concentré faibles, mais elles chutent au-delà de 40% de concentré dans le régime. Si l'on considère maintenant la nature du concentré, les concentrés riches en amidon (orge, blé, maïs) ont un effet dépressif sur la méthanogénèse plus important que les concentrés riches en parois digestibles (pulpe de betterave). Chez la vache laitière, le remplacement des pulpes de betteraves (70% de la ration) par de l'orge a entraîné une diminution de 34% des pertes d'énergie sous forme de méthane (Beever *et al.*, 1989 ; Vermorel, 1995b).

Les lipides peuvent remplacer partiellement les céréales pour accroître le niveau énergétique de la ration. Ils présentent l'avantage de ne pas modifier le pH ruminal et de pouvoir diminuer la méthanogénèse (Jouany, 1994) mais également, lorsqu'ils sont riches en acides gras polyinsaturés, d'améliorer la valeur santé des produits animaux consommés par l'homme (Chilliard *et al.*, 2001). L'inhibition de la méthanogénèse dépend de la nature et de la quantité de lipides ajoutés, les acides gras étant plus efficaces que les triglycérides, et les acides gras longs polyinsaturés (en particulier l'acide linoléique, ALA) étant plus actifs que les acides gras saturés ou monoinsaturés.

D'un point de vue pratique, la graine de lin peut être utilisée dans l'alimentation des ruminants. Un apport de lin a diminué la production de CH₄ de 38% chez des moutons à l'entretien recevant une ration de foin supplémentée avec 5% d'huile de lin (Czerkawski *et al.*, 1966) et de 10% chez des agneaux supplémentés avec 2,5% de lipides du lin (Machmüller *et al.*, 2000). La quantité d'hydrogène utilisée pour réduire les acides gras insaturés n'intervient que de manière très limitée dans la diminution de la synthèse de méthane. Les lipides limiteraient la méthanogénèse en inhibant les micro-organismes producteurs (protozoaires, bactéries cellulolytiques) et/ou utilisateurs (archae-bactéries) de l'hydrogène ruminal.

Les acides gras saturés à chaîne moyenne comme le C12:0 et le C14:0 présents dans l'huile de coprah ou de palmiste ont aussi des effets négatifs importants sur la population des archae-bactéries et des protozoaires et donc sur la production de méthane *in vivo* (Machmüller *et al.*, 2003) et *in vitro* (Soliva *et al.*, 2004). Des matières grasses peuvent être ajoutées à la ration des ruminants dans le but d'augmenter l'apport en énergie. Dans le rumen, ces matières grasses réduisent la digestibilité des autres constituants de la ration, en particulier les glucides structuraux. Plus spécifiquement, les acides gras alimentaires empêchent l'attachement des bactéries cellulolytiques sur les particules d'aliment, ce qui réduit leur efficacité.

Les acides gras polyinsaturés pourraient également exercer un effet toxique directement sur les populations bactériennes. Ces inhibitions s'accompagnent ainsi d'un accroissement du pourcentage d'acide propionique dans le contenu ruminal et d'une réduction des émissions de CH₄ (Bauchart, 1981). Les lipides ont un effet persistant sur la méthanogénèse mais ils peuvent également avoir une action négative sur la digestion de la matière organique et plus particulièrement de la fraction cellulosique de la ration dans le rumen lorsque ceux-ci sont incorporés à des niveaux importants (> 6% MS ingérée), ce qui peut constituer un facteur limitant à leur utilisation (Ikwuegbu et Sutton, 1982). À titre d'exemple, une étude réalisée chez le mouton a montré qu'une augmentation d'un point du pourcentage de matières grasses ajoutées aux rations s'accompagnait d'une diminution de 2,6 % de la production de CH₄ (Giger-Riverdin *et al.*, 1992). Il faut toutefois veiller à ce que l'effet inhibiteur sur la digestibilité de la ration n'affecte pas de façon trop importante l'efficacité alimentaire des animaux.

- **Les fourrages**

Une herbe pâturée au stade début épiaison entraîne une émission de méthane plus faible de 10% que la même herbe pâturée à un stade avancé, et donc plus riche en parois et moins digestible (Pinares-patiño *et al.*, 2003). L'herbe jeune pâturée contient également des lipides et, bien que sa teneur soit plus faible que celle du lin, les apports en lipides qu'elle représente peuvent être significatifs puisqu'elle peut constituer la totalité de la ration du ruminant. Un ensilage d'herbe récolté en coupe directe est également riche en acide linoléique. De plus, les quantités ingérées élevées et le transit rapide de l'herbe dans le rumen favoriseraient une diminution de la méthanogénèse. Ces fourrages sont donc susceptibles de limiter la méthanogénèse, mais cela n'a pas été démontré. Les résultats

cités ci-dessus vont toutefois dans ce sens, l'effet des lipides et du temps de séjour s'ajoutant à l'effet de la faible teneur en parois dans le cas de l'herbe jeune.

Les variations de digestibilité n'expliquent pas toutes les différences entre fourrages. L'introduction des légumineuses a permis une diminution de 10% de la production de CH₄ par kg de poids sur des bovins viande pâturant une prairie composée de 70% de luzerne et 30% de graminées ou de 100% de graminées (Mccaughey *et al.*, 1999). Cet effet pourrait s'expliquer par un niveau d'ingestion plus élevé et un temps de séjour dans le rumen plus faible avec la luzerne. De plus, certaines légumineuses (sainfoin, lotier, sulla...) ont la propriété d'être riches en tanins condensés qui limitent à la fois la dégradation des protéines alimentaires et la méthanogénèse ruminale. A titre d'exemple, le lotier et le sulla ont diminué, de 50 et 30% respectivement, la méthanogénèse (exprimée en g CH₄/kg gain de poids) chez des agneaux en croissance Ceci s'expliquerait par un effet direct des tanins sur l'activité des archae-méthanogènes et par un effet indirect en diminuant la digestion des parois végétales (Tavendale *et al.*, 2005 ; Waghorn et Clark, 2006).

III.1.2.b.2. Sélection génétique des animaux

La sélection génétique basée sur l'amélioration de l'efficacité alimentaire devrait logiquement aboutir à des animaux qui valorisent mieux l'énergie des rations et qui produisent donc moins de méthane. Une sélection orientée plus spécifiquement sur la capacité des animaux à produire moins de méthane. Différents critères physiologiques peuvent être impliqués dans cet objectif :

✓ Le temps de séjour des aliments

Le temps de séjour des aliments dans le rumen (TSR) est un paramètre connu pour influencer la méthanogénèse. Une diminution du TSR limite le temps de contact des micro-organismes avec les aliments et, par voie de conséquence, les fermentations ruminales et la production de gaz. La digestion des aliments, en particulier des parois végétales, est alors affectée. Le TSR est une caractéristique propre à chaque animal pouvant expliquer jusqu'à 1/3 des variations individuelles de production de méthane (Okine *et al.*, 1989 ; Pinarespatino *et al.*, 2000). Une diminution de 30% de la méthanogénèse a été mesurée lorsque le TSR diminue de 15% (Okine *et al.*, 1989). Ce phénomène est d'autant plus important que le régime est riche en concentré (Vermorel, 1995b). La sélection d'animaux à faible TSR pourrait donc être un moyen de réduire la production de CH₄.

Parallèlement, une diminution du TSR favorise la production de propionate (voie consommatrice d'hydrogène) et la croissance microbienne dans le rumen. La sélection d'animaux sur le TSR présenterait donc de multiples avantages de production.

✓ **Capacité de valorisation d'une ration**

Il existe des variations individuelles entre animaux concernant leur capacité à valoriser une ration (Arthur *et al.*, 2001). L'idéal serait donc d'arriver à sélectionner des animaux qui consomment moins d'aliments (et donc produisent moins de CH₄) que leurs congénères tout en assurant un niveau de production comparable. Okine *et al.*, (2001) ont évalué à 21% la réduction des émissions annuelle de méthane par de tels animaux.. Un tel objectif a été atteint en deux générations sur une race australienne de bovins viande (- 1,2 kg MS ingérée/kg de gain de poids) (Hegarty, 2002).

✓ **Capacité à produire peu de CH₄**

Pour une espèce animale recevant un même régime, des variations individuelles de production de CH₄ par unité d'aliment ingéré de l'ordre de 30 à 60% ont été rapportées (Demeyer, 1991 ; Lassey *et al.*, 1997). Cette variabilité individuelle pourrait être due à un profil microbien ruminal différent entre animaux, en termes de composition et d'activité métabolique, et/ou à des différences d'ordre physiologique (TSR). Si ce phénomène s'avère persistant dans le temps, et donc être une caractéristique propre de l'animal, des recherches orientées sur la sélection d'animaux faiblement producteurs de CH₄ pourront être envisagées. Les données bibliographiques sur ce dernier point sont contradictoires et ne permettent pas de conclure si cette différence individuelle de production de CH₄ est un phénomène transitoire (Pinares-patiño *et al.*, 2006b) ou permanent (Goopy et Hegarty, 2006).

En conclusion, il est important de souligner que les critères de sélection des bovins sont multiples, et qu'à l'heure actuelle ils sont essentiellement orientés vers des critères de production de lait ou de viande, éventuellement de qualité des produits.

III.1.2.b.3. Modulation du nombre d'animaux ou du mode de production

La réduction de la méthanogénèse n'est certainement pas le facteur décisif qui conduira l'éleveur à un changement radical de ses méthodes de production. Cependant, une modulation du nombre d'animaux dans le troupeau ou du cycle

de production est un moyen de diminuer leurs émissions de méthane lorsque celles-ci sont rapportées à l'unité de produit animal élaboré (lait ou viande).

Diminuer le nombre d'animaux pour une production donnée comme l'énergie perdue sous forme de méthane diminue avec le niveau de production de l'animal, il est préférable, pour une production donnée ou imposée (quotas laitiers par exemple), d'utiliser peu d'animaux à haut niveau de production, plutôt que beaucoup d'animaux à faible niveau (Martin *et al.*, 2006). Sauvart (1993) a estimé les émissions de méthane ramenées au litre de lait produit pour deux troupeaux produisant la même quantité totale de lait. Le premier, composé de 60 vaches à 4 000 litres de lait/an émettrait 109 kg de CH₄/vache/an soit 28 g de CH₄/l de lait. Le deuxième troupeau composé de 24 vaches à 10 000 l de lait/an émettrait 146 kg de CH₄/vache/an soit 15 g/l de lait. La quantité de méthane émise par litre de lait est donc diminuée de moitié par une réduction de 2,5 du nombre d'animaux du troupeau. Ceci entraîne bien sûr une intensification du mode de production, l'augmentation de la productivité des vaches allant de pair avec un accroissement de la proportion de concentré dans la ration.

✓ **Chargement au pâturage**

Le niveau de chargement d'une parcelle (1,2 vs 2,1 bovins de 450 kg par ha) n'a pas modifié significativement la production individuelle de CH₄ mesurée pendant deux saisons consécutives de pâturage. Rapportées au poids de l'animal, les émissions de CH₄ étaient également comparables entre les deux traitements (Pinares-patiño *et al.*, 2006a). Si ces résultats se confirment et que la qualité du couvert végétal exploité extensivement n'est pas altérée sur le long terme, un tel mode de gestion des surfaces herbagères apparaît intéressant car en accord avec la demande sociétale actuelle.

✓ **Moduler le mode de production**

Pour les bovins viande, la quantité de méthane émise par kilogramme de carcasse augmente avec la durée d'engraissement en raison de la diminution de la vitesse de croissance avec l'âge de l'animal. L'engraissement d'un taurillon jusqu'à 19 mois (700 kg) entraîne l'émission de 580 litres CH₄/kg carcasse alors que celui d'un bœuf de 40 mois (690 kg) est à l'origine de 2 fois plus de CH₄ (1040 l/kg carcasse ; Vermorel, 1995a). Cette proposition contribue à améliorer

l'efficacité alimentaire dans son ensemble et va dans le sens d'une intensification de la production de jeunes animaux.

Pour des vaches laitières d'un niveau de production donnée, une diminution de la méthanogénèse par litre de lait passe par une augmentation du nombre de lactations au cours de la carrière de l'animal. Diminuer le taux de réforme des vaches implique pour l'éleveur de diminuer le nombre de génisses de remplacement dans le troupeau. De ce fait, l'impact de la production de CH₄ par les génisses non productrices de lait pendant la période d'élevage est réduite. Johnson *et al.*, (2002) ont calculé qu'une diminution de 10% du taux de réforme diminue de 5% la production de CH₄.

III.1.2.b.4. Intensification du système d'élevage

L'augmentation du niveau d'ingestion et celle du pourcentage de concentré allant dans le sens d'une réduction de la méthanogénèse, il est clair que l'intensification de la production, passant en particulier par une augmentation du niveau de production des animaux, contribue à limiter la quantité de méthane rapportée à l'unité de produit animal (litre de lait ou kg de viande). Johnson *et al.*, (2000) ont comparé deux systèmes de production laitiers (californien et néo-zélandais) se différenciant par le niveau de production des animaux (8 984 vs 3 444 kg lait/an, respectivement), leur niveau d'ingestion (17 vs 11 kg MS ingérée respectivement) ainsi que par la composition de la ration distribuée aux animaux (50% fourrages + 50% concentré vs 100% pâturage, respectivement). Par rapport au système néo-zélandais, les émissions quotidiennes de méthane par animal mesurées dans le système californien sont 1,5 fois plus importantes du fait de la plus grande quantité et qualité d'aliments ingérés. Cependant, la quantité de lait produite par animal avec le système californien est 2,6 fois plus importante. Aussi, rapportée au kg de lait produit, la quantité de méthane émise par les animaux du troupeau californien a été 37% plus faible que celle du troupeau néo-zélandais. La même démarche a été appliquée par MCCRABB (2002) en système de production de viande bovine. Il a estimé que l'incorporation de céréales dans la ration pendant 80 jours après la saison de pâturage serait à l'origine d'une diminution de CH₄ par kg de viande de 34 à 54% sur la période de finition. Estimées sur la base de l'unité de produit, litre de lait ou kg de viande, les

émissions de CH₄ sont donc sensiblement diminuées par une intensification du système de production. L'encouragement à l'intensification des productions pour réduire la méthanogénèse reste toutefois discutable pour les raisons suivantes :

- ✓ L'intensification des productions est en opposition avec la demande de la société qui aspire à une production animale plus "naturelle" et de qualité. En outre, l'alimentation à base d'herbe a un impact positif sur la valeur nutritionnelle (Martin *et al.*, 2004) et sensorielle (Martin *et al.*, 2005) des produits animaux.
- ✓ L'augmentation de la part de concentré dans la ration des ruminants est un objectif difficile à atteindre puisque les teneurs en concentré sont déjà importantes. De plus, ce type de ration hautement énergétique est considéré comme "risqué" pour la santé de l'animal car souvent associé à des pathologies plus ou moins connues d'ordre digestif, métabolique ou autre (acidose, atteinte hépatique, boiterie, mammite, diarrhées...) (Enemark *et al.*, 2002).
- ✓ Enfin, il est important de prendre en compte la demande mondiale accrue en céréales et oléoprotéagineux pour l'alimentation humaine et la production d'énergie renouvelable. A l'avenir, les ruminants devraient d'abord valoriser les surfaces non labourables. Dans le cas contraire, ils seraient encore plus taxés de transformateurs peu efficaces (Martin *et al.*, 2006).

Chapitre III :

***Principales caractéristiques
d'Eucalyptus globulus et Olea
europaea***

I. Eucalyptus globulus

I.1. Historique

L'*Eucalyptus globulus* Labill. (Du nom de Labillardière le voyageur français qui le découvrit en 1800 lors d'un voyage en Australie) est une espèce très cultivée, pris rapidement une grande extension en Algérie entre 1860 et 1870 (Boudy, 1952).

L'*Eucalyptus*, comme exotique, a déjà une longue histoire (Métro, 1955). C'est à partir de 1850 que les *Eucalyptus* ont été introduits par les Français en Algérie, avec l'*E. camaldulensis* Dehn. Comme espèce pionnière. Mais, la plantation massive de ces arbres a eu lieu, entre 1865 et 1963, au début. Les *Eucalyptus* ont été plantés à titre exceptionnel pour l'assèchement des marais (Mehani, 2006).

C'est vers les années 1960 et 1970 qu'on commencé le reboisement à base d'*Eucalyptus* à l'Est du pays (EL-Kala, Annaba, Skikda) au centre (Tizi-ouzou et Bainem) et à l'Ouest (Mostaganem), dans le but de répondre aux besoins nationaux en produits ligneux et avec un capital d'environ 130 espèces. La plantation d'*Eucalyptus* a continué jusqu'en 1982 où il a été mis fin à la production des plantes en pépinière et par conséquent à leur plantation (Mehani, 2006).

*** Étymologie**

«**Eu**» est un préfixe d'origine grecque et signifiant «bien» et «**Kalyptos**» veut dire «couverture». Le nom générique signifie donc : «bien couvert», car les pétales et sépales sont soudés.

*** Les noms vernaculaires**

- Calitouss « le nom le plus connue en Algérie ».
- Calibtus, Kafor. Ces noms sont les plus populaires en Algérie qui sont appelés dans plusieurs différentes régions.

*** Le Nom commun**

- Gommier bleu fait allusion à la gomme résineuse qu'ils exsudent quand ils sont blessés.
- Arbre à la fièvre dans les régions où ils sont plantés en prévention du paludisme.

I.2. Classification dans la systématique botanique

Bel arbre des Angiospermes, dicotylédones. L'*Eucalyptus globulus* appartient aux Myrtacées qui constituent la famille la plus importante de l'ordre des Myrtales. Elle est très ancienne et peut être suivie jusque dans le crétacé inférieur.

D'après la classification scientifique APG (Angiospères Phylogeny Group) (Guignard, 2001), le gommier bleu appartient à :

Tableau 5 : Classification d'*Eucalyptus globulus* (Guignard, 2001).

Règne	Végétal
Embranchement	Spermatophytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicotes
Sous –classe	Rosidés
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtacées
Genre	<i>Eucalyptus</i>
Espèce	<i>Eucalyptus globulus</i>

I.3. Description d'*Eucalyptus globulus*

I.3.1. Aspect général

L'*Eucalyptus* est très varié. Pour une même espèce les formes peuvent aller du buisson si les conditions édaphiques et climatiques sont défavorables, au peuplement forestier avec des arbres de hauteur de 30 à 50 mètres en conditions favorables. Certains individus peuvent atteindre 130 mètres de haut et ils constituent également les angiospermes les plus grands du monde. Certaines espèces existent également sous forme de « mallée », terme australien qui désigne un arbre présentant plusieurs tiges partant d'un même lignotuber ou organe souterrain lignifié.

La croissance des *Eucalyptus* est continue car ils n'ont pas d'endormance contrairement à la plupart des espèces ligneuses. Ils sont opportunistes, c'est-à-dire que leur croissance dépend essentiellement de la température moyenne. Elle est maximale en

condition favorable mais ralentie voire nulle en condition de stress abiotique tel que le froid ou la sécheresse. Par contre les *Eucalyptus* sont très réactifs après les stress. D'une part, les bourgeons végétatifs activés très rapidement après blessure donnent de nouvelles tiges. Dans le cas des incendies, la très forte température de l'incendie favorise la germination des graines enfouies dans le sol, permettant une reprise de végétation beaucoup plus rapide que la plupart des autres plantes. Cette réactivité explique la compétitivité des *Eucalyptus* pour l'occupation de l'espace, en particulier après les incendies, qui ont toujours été très fréquents en Australie.

On peut retenir la classification suivante par rapport à la taille adulte

- . Petits *Eucalyptus* si moins de 10 mètres
- . Moyens *Eucalyptus* entre 10 et 30 mètres
- . Grands *Eucalyptus* entre 30 et 60 mètres
- . Très grands *Eucalyptus* de plus de 100 mètres

Les *Eucalyptus* occupent une place très importante dans la ligniculture à l'échelle mondiale en raison de leur rapidité de croissance (plusieurs mètres par an) et de la qualité de leur fibre (Melun et Nguyen, 2012). Les *Eucalyptus* ont des capacités de survie et de croissance exceptionnelles, ce qui leur permet de coloniser des terrains nus dévastés par les feux, les inondations, l'activité volcanique, grâce notamment aux graines petites et nombreuses.

Arbre dont la longévité se situe entre 400 et 700 ans dans son aire naturelle et capable de vivre jusqu'à 150 ans lorsqu'il a été introduit.

La plupart des *Eucalyptus* ont des feuilles persistantes. (Jacob, 1936) insiste sur la durée de vie de ces feuilles qu'il estime remarquablement courte comparée à celle des aiguilles de pins ou de sapins qui peuvent rester actives pendant huit années. Comme les autres membres de la famille des myrtacées, les feuilles d'*Eucalyptus* sont couvertes de glandes à huile. L'abondante production d'huile est une caractéristique importante de ce genre. Une autre caractéristique des *Eucalyptus* réside dans le fait qu'aux divers stades du cycle de développement, les feuilles ont des formes différentes. Penfold et Willis (1961) notent cinq types morphologiques :

- Feuilles cotylédones
- Feuilles de pépinières (5 à 10 paires)
- Feuilles juvéniles
- Feuilles intermédiaires
- Feuilles adultes.

Il semble que l'accumulation de feuilles mortes au pied des arbres soit toxique à toute autre forme de végétation, mais cela serait aussi le résultat d'un assèchement de la surface du sol autour de ces grands arbres gros consommateurs d'eau.



Figure 10 : *Eucalyptus globulus* (Albert, 2015).

I.3.2. L'écorce

L'écorce est de couleur et de texture variable. Souvent elle présente plusieurs couleurs, comme un platane, et se détache en lambeaux qui tombent au sol, mais l'écorce peut être aussi dure, fibreuse, floconneuse, lisse (Ghedira, 2008).

I.3.3. Feuilles

Les *Eucalyptus globulus* ont en majorité des feuilles persistantes et falciformes, couvertes de glandes à huile, dont le parfum caractéristique se répand après une pluie. La plupart des espèces ont la particularité d'avoir deux formes de feuilles selon leur âge : sur l'arbre jeune elles sont ovales, glauques à bleutées et opposées sur la tige, puis elles deviennent alternes, allongées, plutôt vertes sur l'arbre adulte. Certaines espèces gardent toute leur vie les mêmes feuilles, d'autres gardent longtemps les feuilles juvéniles.

Autre caractéristique des feuilles d'*Eucalyptus globulus*, elles sont souvent positionnées à la verticale par rapport aux rayons du soleil. C'est une adaptation pour permettre la photosynthèse sur les deux faces, et pour limiter l'évapotranspiration, car les feuilles possèdent une couche de cellules palissadiques sur chacune de leurs faces ces cellules palissadiques contiennent les chloroplastes permettent la photosynthèse et les stomates sont également présents sur chaque face des feuilles (Ghedira, 2008).

I.3.4. Fleurs

Elles ont de très nombreuses étamines a de couleur blanche. Au départ, les étamines sont enfermées dans un étui fermé par un opercule (d'où le nom d'*Eucalyptus* du grec eu: bien et kaluptos: couvert) formé par la fusion des pétales et, ou, des sépales. Pour un même sujet, les opercules peuvent avoir différentes formes. Lorsque les étamines grandissent, elles soulèvent l'opercule et s'étalent pour former la fleur. La floraison peut survenir à différentes périodes de l'année, selon le climat. La pollinisation des fleurs se fait principalement par les insectes, attirés par le nectar. Les fleurs d'*Eucalyptus* constituent la source de nectar la plus abondante pour la production de miel en Australie (Ghedira, 2008).



Figure 11 : Fleurs d'*Eucalyptus globulus* (Albert, 2015)

I.3.5. Fruits et Graine

Les fruits d'*Eucalyptus globulus* sont formés par le développement du réceptacle ainsi que de l'ovaire qui s'y attache. Ils contiennent un nombre important d'ovules. Une partie de ces ovules seront fécondés par des grains de pollen distincts, lors de la pollinisation, mais ils ne le seront jamais en totalité. Après la fécondation, les graines vont se développer et faire grossir le fruit. Les fruits à maturité ont la forme d'un cône, ils sont

secs, et de couleur brune. Ils ont également des valves qui se soulèvent pour laisser échapper les graines lors de leur chute sur le sol. La plupart des espèces ne fleurissent pas avant l'apparition du feuillage adulte, sauf pour *Eucalyptus cinerea* et *Eucalyptus perriniana*. Un nombre élevé de semences de petites tailles, procure à l'*Eucalyptus* une importante aptitude à coloniser des terrains dénudés, même si les conditions y sont difficiles. Un nombre important des graines va mourir suite à ces conditions, mais quelques-unes vont survivre et perpétuer l'espèce (Ghedira, 2008).



Figure 12 : Fruits et graines d'*Eucalyptus globulus* (Albert, 2015)

I.3.6. Racines

Le système racinaire comprend deux parties :

- Un pivot central important s'enfonçant jusqu'à 2,20 m et mesurant, à 80 cm de profondeur, 35 cm de diamètre. A partir de ce niveau, il se divise en 6 grosses racines ayant de 6 à 12 cm de diamètre chacune, descendant parallèlement. Giordano (1968) signale, en sols sableux, et dans le cas d'*E. globulus* des pivots atteignant 4 m de profondeur.

- Une grande concentration de racines à la base du tronc d'où partent 8 racines latérales. Dans les 40 premiers centimètres du sol, se trouve un réseau latéral dense avec un maximum de racines en surface. Certaines atteignent plus de 3 m de longueur ; il y a de véritables enchevêtrements avec celles des arbres voisins, mais aucune greffe n'a été constatée. Bisset et Shaw, 1964 ; Jacob, 1955).

La plupart des *Eucalyptus* possède également des organes protecteurs souterrains appelés lignotubes. Cet organe est un renflement des racines qui contient des réserves

nutritives comme l'amidon. Cette plante indigène de l'Australie a évolué dans un environnement difficile et aride. Les lignotubes permettent à l'*Eucalyptus* d'engendrer de nouvelles pousses si une perturbation majeure détruit (feu ou de gel par exemple), en partie ou en totalité, les parties aériennes de l'arbre. Les lignotubes favorisent donc la survie des espèces d'*Eucalyptus* qui possèdent cette adaptation.



Figure 13 : Racines d'*Eucalyptus globulus* (Albert, 2015)

I.4. Les différents composés de l'*Eucalyptus globulus*

Eucalyptus globulus contient différents types de composés parmi eux :

- **Huiles essentielles** : elle a de remarquables propriétés antiseptiques et broncho-dilatatrices. Le principe actif est le cineol, ou eucalyptol, mais l'huile essentielle est globalement plus efficace que le principe actif isolé.
- **Flavonoïdes** : se sont des phénols sous forme des métabolites secondaires qui prennent les pigments jaunes, ils sont présents dans toutes les organes de la plante : feuilles, fleurs, graines, racines. Les flavonoïdes de l'*Eucalyptus* se présentent souvent sous forme d'hétérosides, solubles dans l'eau (localisés généralement dans les vacuoles cellulaires) ou solubles dans les solvants apolaires (situés dans le cytoplasme) , ces hétérosides existent sous forme d'un flavonol qui est la quercétine.
- **Tanins** (Padrini et Lucheroni, 1996).

I.5. Intérêts et utilisations des feuilles d'*Eucalyptus globulus*

Les gommiers bleus revêtent une importance considérable à l'échelle de l'économie forestière mondiale. Ils ont bien démontré une capacité de production assez supérieure à celle enregistrée en Australie (Métro, 1963 ; Lanier, 1986). Des plantations de bios dur d'intensité très élevée ont été établies avec succès au Brésil, en Californie et bien ailleurs. Les gommiers bleus présentent, incontestablement, les plus importantes plantations du bios dur dans le monde (Turnbull, 1991). Doté d'une grande adaptabilité et d'une croissance rapide, le gommier bleu présente un large éventail d'utilisation. A Madagascar, la litière de feuilles d'*Eucalyptus globulus* décomposées constitue une source de revenus non négligeable pour les femmes et les enfants (Bertrand, 1992). Puisque ceci se récolte et se vend comme engrais de complément (Rakotavao, 1995).

Du point de vue écologique, les gommiers bleus sont plantés le long des vergers dans les régions productrices de fruits. Leurs fleurs attirent les abeilles et la pollinisation est nettement améliorée. En plus, ceci favorise la production de miel de très bonne qualité. Au Soudan, les *Eucalyptus globulus* plantés pour protéger les récoltes contre les vents de sable. Cet arbre a servi l'humanité grâce aux puissantes émanations de ses feuilles et à sa capacité de pomper d'impressionnantes quantités d'eau. Assainissant de ce fait les marais, les sites de reproduction des insectes ont été fortement réduits. On outre, cet arbre a été choisi pour répondre à plusieurs fins :

- Production destinée à l'industrie papetière en Algérie (Villagran et Kadic, 1981) et dans d'autres pays.
- Fourniture de la matière première à l'industrie du bois (Anonyme, 1986).
- Approvisionnement énergétique en bois de feu et en charbon (Charries, 1980 ; Bertrand, 1989) et approvisionnement de chemin de fer (Bertrand et Le Roy, 1991).

On utilise les feuilles en infusion, en inhalation, fumigation et sous forme de cigarettes L'*Eucalyptus globulus* est un antiseptique et un antispasmodique des voies respiratoires, sédatif, hypoglycémiant, antirhumatismal, stimulant et vermifuge (Sijelmassi, 1991).

L'extraction d'huile essentielle est réalisée à partir des feuilles et rameaux (Padrini et Lucheroni, 1996), on l'utilise donc pour soigner les maladies de refroidissement, le

diabète, les douleurs rhumatismales, certaines affections des voies urinaires, les migraines, les sinusites et les vers intestinaux (Perroti *et al.*, 1999).

II. *Olea europaea*

II.1. Historique

Selon Henry (2003) les historiens et les Archéologues ne soient pas unanimes sur le pays d'origine de l'olivier, cet arbre a incontestablement trouvé en Méditerranée, les conditions naturelles, la contrainte climatique, auxquelles il s'est parfaitement adapté donc l'expansion de l'olivier est liée à l'installation du climat méditerranéen. Le climat Méditerranéen est apparu progressivement depuis 10.000 ans avant notre ère, l'olivier s'installant d'abord en Méditerranée orientale, après s'étendre, durant plusieurs millénaires à l'Ouest et au Nord du bassin Méditerranéen (Amouretti et Comet, 2000). On en trouve des témoignages dès le quatrième millénaire avant notre ère, et même selon certain depuis 10.000 ans (Artaud, 2008).

Cette essence originaire d'Asie Mineure ou la Crète. Les premières traces que l'on a de cet arbre datent de 37.000 ans avant Jésus Christ, sur des feuilles fossilisées découvertes dans les îles de Santorini en Grèce (Henry, 2003).

Des études biologiques montrent que l'olivier sauvage existait au Sahara environ 11.000 ans avant notre ère. Les dernières analyses des pollens de différents arbres à feuillages caducs et dominants semblent montrer que ce changement climatique s'est développé environ 8.000 ans avant notre ère, au Sud-Est de l'Espagne, remontant lentement vers le Nord. Dès 3.000 ans avant Jésus-Christ, l'olivier est cultivé en Egypte, Syrie, Palestine et la Phénicie.

Vers 1600 ans avant J-C, les Phéniciens diffusent l'olivier dans toute la Grèce. A partir du VIème siècle avant J-C, sa culture s'est étendue à tout le bassin Méditerranéen en passant par la Lybie, la Tunisie, la Sicile puis en Italie. Les Romains, lors de leurs conquêtes, poursuivent la propagation de l'olivier dans tous les pays côtiers de la Méditerranée (Henry, 2003).

*** Étymologie**

Cet arbre (*Olea europaea*), de la famille des Oléacées, ne comprend aucun surnom particulier.

II.2. Classification dans la systématique botanique De l'olivier (*Olea europaea*)

La classification botanique de l'arbre de l'olivier selon Cronquist (1981) est la suivante :

Tableau 6 : Classification d'*Olea europaea* (Cronquist, 1981).

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Scrophulariales</i>
Famille	<i>Oleaceae</i>
Genre	<i>Olea</i>
Espèce	<i>Europaea</i>

II.3. Description De l'olivier (*Olea europaea*)

II.3.1. Aspect général

Très rameux, au tronc noueux, au bois dur et dense, à l'écorce brune crevassée, il peut atteindre quinze à vingt mètres de hauteur, et vivre plusieurs siècles. Cependant, sous l'action d'animaux de pâture, ou dans des zones extrêmement ventées, ou exposées aux embruns, il conserve une forme buissonnante, de défense, et maintient la forme d'une boule compacte et impénétrable, lui donnant l'aspect d'un buisson épineux. Dans la plupart des modes de culture, les oliviers sont maintenus à une hauteur de trois à sept mètres afin de faciliter leur entretien et la récolte des fruits (Channel, 2006).



Figure 14 : Olivier âgé de 1.500 ans en Grèce (Channel, 2006).

II.3.2. Feuilles

Les feuilles sont opposées, ovales allongées, portées par un court pétiole, coriaces, entières, enroulées sur les bords, d'un vert foncé luisant sur la face supérieure, et d'un vert clair argenté avec une nervure médiane saillante sur la face inférieure. Le feuillage est persistant, donc toujours vert, mais cela ne veut pas dire que ses feuilles sont immortelles. Elles vivent en moyenne trois ans puis jaunissent et tombent, principalement en été. En cas de sécheresse, les feuilles sont capables de perdre jusqu'à 60 % de leur eau, de réduire fortement la photosynthèse et de fermer les stomates permettant les échanges gazeux pour réduire les pertes en eau par évapotranspiration, permettant ainsi la survie de l'arbre au détriment de la production fructi-florale.

C'est grâce à sa feuille que l'olivier peut survivre en milieu aride. Quand il pleut, les cellules foliaires s'allongent pour emmagasiner l'eau. Et, en cas de sécheresse, les feuilles se rétractent et bloquent l'activité de photosynthèse au détriment des fruits (Oussert et Brousse, 1978).



Figure 15 : Feuilles d'*Olea europaea* (Anonyme 2).

II.3.3. Fleurs

Selon Henry (2003) les fleurs sont blanches avec un calice, deux étamines, une corolle à quatre pétales ovales, et un ovaire de forme arrondie qui porte un style assez épais et terminé par un stigmate. Cet ovaire contient deux ovules. Les fleurs sont regroupées en petites grappes de dix à vingt, poussant à l'aisselle des feuilles au début du printemps sur les rameaux âgés de deux ans.

La plupart des oliviers sont auto-fertiles, c'est-à-dire que leur propre pollen peut féconder leurs propres ovaires. La fécondation se fait principalement par l'action du vent et la période de fertilité ne dure qu'une petite semaine par année. S'il ne pleut pas trop durant cette période, 5 à 10 % des fleurs produiront des fruits pour une bonne production.



Figure 16: Fleurs d'*Olea europaea* (Anonyme 2).

II.3.4. Fruits

L'olive est une drupe, dont la peau (épicarpe) est recouverte d'une matière cireuse imperméable à l'eau (la pruine), avec une pulpe (mésocarpe) charnue riche en matière grasse stockée durant la lipogénèse, de la fin août jusqu'à la véraison. D'abord vert, il devient noir à maturité complète. Le noyau très dur, osseux, est formé d'une enveloppe (endocarpe) qui se sclérifie l'été à partir de la fin juillet, et contient une amande avec deux ovaires, dont l'un est généralement stérile et non-fonctionnel : cette graine (rarement deux) produit un embryon, qui donnera un nouvel olivier si les conditions sont favorables (Argenson *et al.*, 1999) .



Figure 17: Fruit d'*Olea europaea* (Anonyme 2).

II.3.5. Racines

Le système racinaire de l'olivier est un chevelu très dense, il a ainsi un ancrage solide dans le sol qui lui permet de résister aux vents, à la sécheresse et à l'érosion. Parfois il présente de gros renflements qui sont des réserves lui permettant de faire face aux variations climatiques (Artaud, 2008). Pour assumer au mieux ces fonctions, le système racinaire a besoin d'un grand volume de terrain à explorer, contenant de l'oxygène, de l'eau et des éléments nutritifs assimilables (C.O.I, 2007).

Selon Kasraoui (2010), l'aspect définitif du système racinaire dépend des caractéristiques physicochimiques, de la profondeur, de la texture et de la structure du sol.

II.4. Les différents composés des feuilles d'*Olea europaea*

La composition chimique des feuilles varie en fonction de nombreux facteurs: variété, conditions climatiques, époque de prélèvement, âge des plantations (Nefzaoui, 1995).

Les feuilles sont particulièrement riches en carbohydrates, principalement des polysaccharides (tel que cellulose, hémicelluloses). La matière organique est constituée par des protéines, des lipides, des monomères et polymères phénoliques.

Les polymères phénoliques sont représentés par les tannins hydrolysables et condensés et principalement par la lignine. Les teneurs en lignine varient de 14,2% (Fegeros *et al.*, 1995) à 30,4% (Garcia-Gomez *et al.*, 2003) par rapport à la matière sèche. Les tannins condensés sont présents avec un pourcentage de 1% alors que les tannins solubles possèdent une teneur de 0,3% par rapport à la matière sèche (Fegeros *et al.*, 1995).

Les monomères phénoliques sont représentés par des acides phénoliques (tel que : l'acide caféique, l'acide syringique et l'acide vanillique), des alcools phénoliques (tel que : tyrosol et hydrotyrosol). Des tritèrènes (tel que l'acide olenolique) et des flavonoïdes (tel que : apigénin, lutéoline, quercétin, rutine et verbascoside) sont aussi présents dans les feuilles d'olivier. L'oleuropéine, un secoiridoïde, est le composé phénolique majoritaire dans les feuilles d'olivier (Benavente-Garcia *et al.*, 2000 ; Japon-Lujan *et al.*, 2006 ; Altiok *et al.*, 2008). D'après Benavente-Garcia *et al.*, (2000), l'oleuropéine constitue 24% des composés d'un extrait des feuilles d'olivier. Altiok *et al.*, (2008) ont trouvé aussi que l'oleuropéine représente 29%, en termes de pourcentage d'abondance dans un extrait des feuilles d'olivier. L'extrait phénolique des feuilles d'olivier est caractérisé par un pouvoir antioxydant important. Cette activité antioxydante est la résultante des synergies et antagonismes des différentes activités des divers composés qui le constituent. Les flavonoïdes (tel que la lutéoline, la rutine) sont les composés qui possèdent les pouvoirs antioxydants les plus élevés. La teneur en composés phénoliques dans les feuilles d'olivier varie entre 2,8 mg/g de matière sèche (Altiok *et al.*, 2008) et 44,3 mg/g de matière sèche (Boudhrioua *et al.*, 2009). Elle peut même dépasser les 250 mg/g de matière sèche (Mylonaki *et al.*, 2008).

II.5. Intérêts et utilisations des feuilles d'*Olea europaea*

Depuis l'antiquité, les feuilles d'olivier sont employées en phytothérapie. A l'époque Grecque, les feuilles ont été utilisées pour désinfecter les blessures cutanées. Les anciens leur attribuaient des vertus antiseptiques et la propriété de combattre toutes sortes d'infections. Au XIX^{ème} siècle, on s'en servait pour combattre le paludisme (malaria). Ces usages sont tombés en désuétude pendant un certain temps en raison de l'omniprésence des antibiotiques. Cependant, les professionnels modernes de la santé ont commencé à utiliser l'extrait de feuille d'olivier, en 1995, les premiers résultats furent très positifs. Depuis, il a été démontré que la feuille d'olivier possède de nombreux avantages thérapeutiques contre de nombreuses maladies et des vertus dans le maintien de la santé globale.

La feuille d'olivier et son extrait est l'un d'un certain nombre d'espèces de plantes médicinales qui a été et continue d'être étudié volumineusement. Par leurs pouvoir antimicrobien et antiviral, les feuilles d'olivier peuvent être bénéfique dans le traitement des affections causées par ou associés à un virus, un rétrovirus, une bactérie ou un

protozoaire. Parmi ces pathologies traitables il y a: la grippe, le rhume, les infections dues aux candidas, la méningite, l'encéphalite, le VIH / ARC / SIDA, la fatigue chronique, l'hépatite B, la pneumonie, la tuberculose, la malaria, la diarrhée sévère, les infections des voies urinaire et les soins dentaires. Comme un anti-oxydant, l'extrait de feuilles d'olivier protège les vaisseaux sanguins et améliorer la circulation sanguine. Il a été montré qu'il peut être efficace dans la protection du cœur lors d'une l'occlusion coronaire. Il est recommandé aussi pour prévenir et traiter l'hypertension et l'artériosclérose. Les feuilles d'olivier ont été démontrées aussi possédant des propriétés anti-cancérigènes. Outre, leur richesse en flavonoïdes leur attribue la propriété radio-protective. Par leurs effets sur certains enzymes métaboliques, les feuilles d'olivier possèdent des propriétés anti-lipidimique et sont aussi indiquées pour le traitement des diabètes. Les études réalisées sur les effets thérapeutiques des feuilles d'olivier pour la santé sont généralement des études *in vitro* uniquement quelques études *in vivo* ont été réalisées (Aouidi, 2012).

Les feuilles d'olivier sont aussi largement utilisées dans l'alimentation des animaux (chèvres, veaux....). La digestibilité de la matière organique (MO) est en moyenne de 50%, mais varie fortement selon la proportion de rameaux dans le mélange et le mode de conservation. Ces deux facteurs agissent de façon déterminante sur la digestibilité et donc la valeur nutritive des résidus. Depuis les travaux de Maymone *et al.*, (1950), on sait que la digestibilité des résidus diminue fortement après le séchage au soleil ou l'ensilage. La digestibilité des feuilles sèches est de 30 à 50%, alors que pour les feuilles vertes, elle est de 50 à 60%. Distribués en vert, les feuilles et rameaux sont bien ingérés par les animaux, sans problèmes d'adaptation ni de troubles.

Partie expérimentale

Chapitre I :
Matériels et Méthodes

I. Avant propos et rappel des objectifs

Les travaux qui ont fait l'objet de cette thèse, ont été réalisés majoritairement dans le laboratoire des analyse des aliments au Département de médecine vétérinaire et de production animale (DMVPA) Université Federico II Naples en Italie, la préparation de nos extraits a été faite au laboratoire d'analyse des aliments au Département de technologie alimentaire Université Batna1 et pour le screening et les dosages phytochimiques des métabolites secondaires c'était au Centre de Recherche en Biotechnologie (Crbt) a Constantine. Cette thèse a pour objectifs principaux d'étudier l'effet de différents extraits de deux plantes médicinales : *Eucalyptus globulus* et *Olea Europaea* riches en composés phénoliques spécialement en flavonoïdes, ainsi qu'un bioflavonoïde naturel sur l'activité fermentaire du microbiote ruminal.

Dans un premier temps on s'est intéressé à l'évaluation de la composition chimique des deux plantes retenues pour cette étude et celle du substrat de référence par la détermination de leurs contenus respectifs en matières sèche, en matières azotées totales et en fraction pariétale.

Dans un second temps, la récupération des différentes substances bioactives présentes dans chaque plante a été effectuée par leur affrontement à différents solvants organiques de polarité croissante (eau, acétate d'éthyle et n-butanol. Cette partie a été complété par un screening phytochimique et une analyse quantitative de métabolites secondaires surtout en phénols totaux, en flavonoïdes et en tannins. Dans une seconde partie, des essais de réduction de la méthanogénèse ruminale *in vitro* ont été engagé par l'utilisation de ces trois extraits : *Eucalyptus globulus* et *Olea europaea* a des concentrations croissantes. Leur impact a également été établi sur divers paramètres de fermentation ruminale à savoir (le pH, les AGV, l'ammoniaque, la digestibilité apparente de la matière sèche et de la matière organique et sur la population des protozoaires). Pour l'évaluation de l'impact de nos extraits sur la méthanogénèse ruminale, un essai en parallèle a été mené pour étudier l'effet d'un bioflavonoïde naturel (Quercétine) avec des doses croissantes sur l'activité métabolique du microbiote ruminal.

Dans cette partie expérimentale seront abordées aussi les modalités générales des méthodes expérimentales *in vitro* et des protocoles réalisés, ainsi que les méthodes analytiques utilisées.

II. Matériel végétal

II.1. Echantillonnage et préparation du matériel végétal

La collecte des deux plantes *Eucalyptus globulus* et *Olea europaea* a été effectuée durant l'année 2016 et les plantes ont été prélevées au stade de floraison de la région d'Ain Beida, située dans la ville d'Oum El Bouaghi en Algérie (35° 47'47 "de latitude Nord, 7° 23'34" de longitude Est et 1008 m d'altitude). Entre 05 et 10 spécimens de chaque espèce végétale sont prélevés afin d'obtenir un échantillon représentatif de la biomasse végétale. Après leur identification par un spécialiste en botanique au sein du département des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Larbi Ben M'Hidi, Oum El Bouaghi, les partie aériennes des plantes sont coupées avec des ciseaux et séchées à l'air libre et à l'ombre jusqu'à poids constant. Les échantillons sont ensuite broyés grossièrement au laboratoire à l'aide d'un hachoir puis broyés une seconde fois avec un broyeur muni d'un tamis de 1 mm. Les échantillons sont ensuite conservés pour la préparation des extraits, les analyses chimiques et les expériences de la fermentation et de digestibilité *in vitro*.

III. Préparation des extraits

III.1. Procédé d'extraction

L'extraction des flavonoïdes est réalisée à partir de la partie aérienne des deux plantes selon le protocole décrit par Cetkovic et *al.* (2007) ; Il est basée sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans les solvants organiques. Cette méthode comprend deux grandes étapes : la première phase d'extraction avec le méthanol pour solubiliser les flavonoïdes et la deuxième est réalisée avec l'acétate d'éthyle (extraction des monoglycosides) et le n-butanol (pour solubiliser les di et les triglycosides).

L'extraction des flavonoïdes est effectuée à partir de la matière sèche finement broyée par du méthanol 70%. Le macérât est filtré sur Büchner puis soumis à une évaporation à basse pression à 35°C avec un rotavapeur (Buchi rotavapor R-200). Le résidu est récupéré dans de l'eau bouillante, puis filtré. Le filtrat est débarrassé des cires, des lipides par l'hexane et de la chlorophylle par un lavage avec du chloroforme pour obtenir une phase aqueuse. Afin de séparer les flavonoïdes en fractions aglycones, monoglycosides, di et triglycosides, la phase aqueuse subit trois extractions avec l'acétate d'éthyle (récupérer certains flavonoïdes aglycones mais surtout les monoglycosides), le n-butanol (récupérer notamment les

flavonoïdes di et triglycosides). La phase aqueuse finale contient surtout les flavonoïdes glycosylés les plus polaires (figure18).

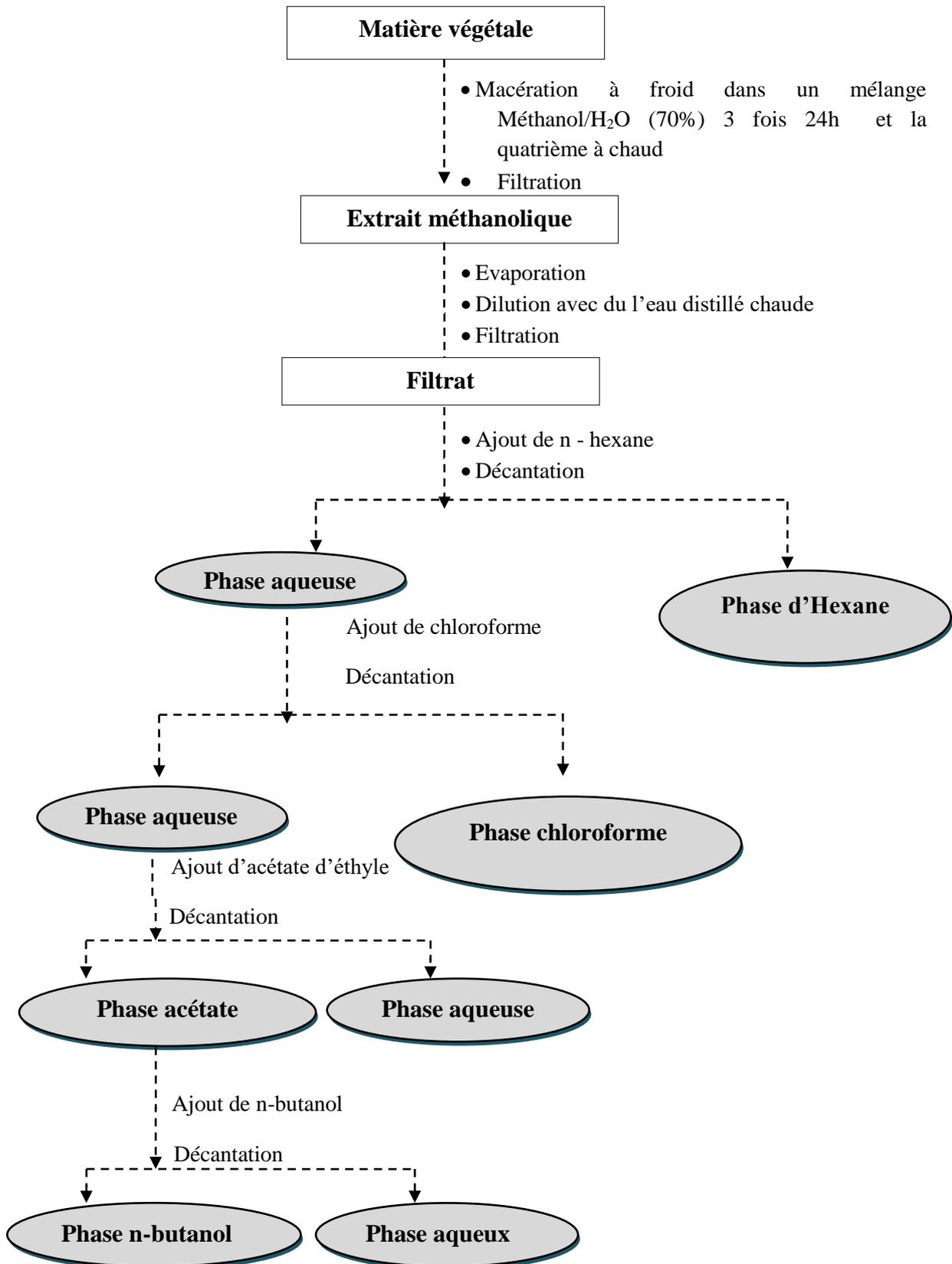


Figure 18 : protocole d'extraction des flavonoïdes (Cetkovic *et al.*, 2007).

III.2. Rendement des extractions

Le rendement d'extraction est déterminé par rapport à 450 g de la matière végétale initiale (broyat des feuilles sèches). Il correspond à la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation) :

$$\left[R \% = \frac{P1 - P2}{P3} \times 100 \right]$$

P1 : Poids du ballon après évaporation

P2 : Poids du ballon avant évaporation (ballon vide)

P3: Poids de la matière végétale initiale.

IV. Analyses phytochimiques des extraits

IV.1. Analyse qualitative

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

IV.1.1. Mise en évidence des saponines

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

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

IV.1.2. Mise en évidence des phénols totaux

1 ml de chaque extrait est dilué par addition de 2 ml d'eau distillée. Deux à trois gouttes de chlorure ferrique (FeCl₃ à 2%) sont ajoutés et le virage de couleur indique la présence de composés phénoliques comme suit :

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

IV.1.3. Mise en évidence des stéroïdes

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

IV.2. Analyse quantitative des composés phénoliques

IV.2.1. Analyse des phénols totaux

➤ Principe de la réaction

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi, 1965) selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par Muller *et al.* (2010).

Le réactif FCR, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$), est réduit lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximale aux environs de 750 -765 nm.

➤ Mode opératoire

20 μ l d'extrait de plante + 100 μ l de FCR dilué (1 :10) + 75 μ l de carbonate de sodium (7,5%) + mettre le mélange à l'obscurité pendant 2h + lecture à 765 nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol).

*Gamme d'étalonnage

*Préparation de la gamme d'étalon de l'acide gallique :

On prend 0,5 mg de l'acide gallique et on le dissout dans 5 ml de Méthanol pour obtenir la solution S_1 (0,2mg/ml). Les dilutions sont préparées dans des eppendorfs comme suit :

25µg/ml → 25µl de S1+ 175µl de MeOH

50 µg /ml → 50µl de S1+ 150µl de MeOH

75µg/ml → 75µl de S1+ 125µl de MeOH

100µg/ml → 100µl de S1+ 100µ de MeOH

125µg /ml → 125µl de S1+ 75µl de MeOH

150µg /ml → 150µl de S1+ 50µl de MeOH

175 µg /ml → 175µl de S1+ 25µl de MeOH

200µg /ml → 200µl de S1

20µl de chaque dilution sont transférés dans une microplaque + 100µl FCR (1 :10) + 75µl de Na₂CO₃ (7,5%) + incubation 2h + lecture à 765nm.

IV.2.2. Dosage des flavonoïdes

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

➤ Principe de la réaction

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre Al⁺³ et les flavonoïdes. La méthode de Topçu *et al.* (2007) est utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque 96 puits.

*Préparation de l'extrait de plante :

Une masse de 1 milligramme d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de méthanol pour obtenir la solution (S2).

➤ Procédure

A- Pour l'extrait

50µl (S₂) (extrait de plante) + 130 µl (MeOH) +10 µl (S₁)(CH₃COOK) + 10 µl (Al(NO₃)₂, 9H₂O) + attendre 40 mn + lecture à 415 nm. Un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50µl extrait + 150µl méthanol).

B- Pour l'étalon***Préparation de la gamme d'étalon de la Quercétine**

On prend 1 mg de la Quercétine et on le dissolvé dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution 0,2mg/ml S_m .

Les dilutions sont préparées dans des eppendorfs comme la suite :

Quercétine (25) → 25µl S_m + 175 µl MeOH

Quercétine (50) → 50µl S_m + 150µl MeOH

Quercétine (75) → 75 µl S_m + 125µ MeOH

Quercétine (100) → 100µl S_m + 100µl MeOH

Quercétine (125) → 125 µl S_m + 75µl MeOH

Quercétine (150) → 150µl S_m + 50µl MeOH

Quercétine (175) → 175µl S_m + 25µl MeOH

Quercétine (200) → 200µl S_m + 0 MeOH

50 µl de chaque dilution sont transférés dans une microplaque 96 puits + 130 µl (MeOH) + 10 µl (S_1) (CH_3COOK) + 10 µl ($Al(NO_3)_2 \cdot 9H_2O$) + attendre 40 mn + lecture à 415 nm.

IV.2.3. Dosage des tanins totaux

Cette méthode se base sur la quantification des tanins totaux par leur précipitation, grâce à l'utilisation d'un chélateur chimique: le polyvinylpyrrolidone (PVPP). 100 mg de PVPP sont introduits dans des tubes à essai et ajoutés de 1 ml d'eau distillé et 1 ml d'extrait de l'échantillon. La solution, agitée au vortex, est maintenue à 4°C pendant 15 min. Elle est agitée une seconde fois puis centrifugée à 3000 g pendant 10 min. Après centrifugation, le surnageant comporte uniquement les phénols simples autres que les tanins. Leur contenu est alors mesuré comme décrit dans le protocole de dosage des phénols totaux. La teneur en tanins totaux correspond à la différence entre la teneur en phénols totaux et celle additionnée du PVPP. Elle est exprimée en équivalents g d'acide tannique/kg MS (Makkar *et al.*, 1993).

V. Caractérisation chimique des substrats

Les analyses chimiques des deux plantes étudiées ainsi que le substrat de référence sont réalisées selon les normes décrites par l'Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990). Toutes les analyses sont faites en triple.

V.1. Détermination de la teneur en matière sèche (MS)

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

$$MS \% = [(T + PS) - T] \times 100 / [(T + PF) - T]$$

T: Poids du creuset vide,

(T+PF): Poids du creuset + échantillon frais,

(T+PS): Poids du creuset+ échantillon sec.

V.2. Détermination de la teneur en cendres (MM) et en matière organique (MO)

La teneur en cendres brutes est obtenue après incinération de 2 g de matière sèche de l'échantillon (aliment) dans un four à moufle à une température de 550°C pendant cinq heures. La calcination complète doit produire des cendres blanches ou grises ne renferment plus de particules charbonneuses. Le taux de la matière minérale correspond à la différence de poids qui résulte après la combustion et le refroidissement au dessiccateur. La matière minérale et la matière organique sont exprimées en % de la matière sèche et sont calculées selon les expressions suivantes :

$$MM \% = \left[\frac{Pt - Pc}{Pa} \right] \times 100$$

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

Avec :

MM : matière minérale, exprimée en % par rapport à la matière sèche.

MO : matière organique, exprimée en % par rapport à la matière sèche.

Pa : poids de l'échantillon en g.

Pc : poids du creuset vide en g.

Pt : poids du creuset avec l'échantillon après sortie du four en g.

V.3. Détermination de la teneur en matières azotées totales (MAT)

Les matières azotées englobent toutes les molécules comportant au moins un atome d'azote. En analyse, on distingue des matières azotées non protéiques et des matières azotées protéiques. La teneur en matière azotées totales (N 6,25) est obtenue après une minéralisation puis une distillation et une titration selon la méthode de Kjeldahl. Le pourcentage en azote total se calcule selon la formule :

$$MAT \% = \frac{(V1-V2) \times 1,4 \times 6,25}{1000} \times 100$$

MAT : matière azotée totale exprimée en pourcentage par rapport à la matière sèche.

V1 : volume de H₂SO₄ (0,1 N) en ml.

V2 : volume de NaOH (0,1 N) en ml.

V.4. Détermination de la teneur en matières grasses (MG) La teneur en matière grasse est déterminée par extraction en continu à l'éther éthylique.

Dans un appareil adéquat type (Soxhlet Tecator) à 06 postes. Cette méthode est plus utilisée en analyse courante, les graisses ainsi dosées se nomment extrait étheré (EE).

La matière grasse est solubilisée dans l'éther éthylique (50ml). La méthode consiste en la distillation de l'échantillon d'aliment en poudre (1,5g), mélangé avec (1,5g) de sulfate de sodium anhydre pendant une heure à 110°C. Séparation de l'éther volatil, et quantification de la matière grasse par pesée, après évaporation complète de l'éther à l'étuve. La teneur en matière grasse est calculée selon l'expression :

$$MG \% = [(P1 - P0) / Pe] \times 100$$

MG : matière grasse exprimée en (%) par rapport à la matière sèche.

P0 : poids de la capsule vide en g.

P1 : poids de la capsule après l'extraction en g.

Pe : poids de la prise d'essai en g.

V.5. Détermination des composés de la paroi végétale

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

V.5.1. Estimation de la fraction NDF (Neutral Detergent Fibre)

Les parois totales ont été déterminées par la méthode de Van Soest (1991) après attaque de l'échantillon par une solution NDF dans un fibertec. Le principe de la méthode consiste en une hydrolyse à chaud d'un échantillon en présence d'un détergent neutre, selon la méthode suivante :

Le réactif utilisé est un détergent neutre (solution NDF) qui est préparé de la manière

suivante : dissoudre dans 1 litre d'eau distillée ; 30g de sodium dodecyl sulfate (SDS) ; 18,61g de di-sodium di-hydro éthyl di-amino neutracétate (EDTA) ; 6,81g de sulfate de sodium décahydraté ; 10 ml d'éthoxy éthanol (éther pur : anti-mousse) et 4,56 g de sodium hydrogénophosphate).

* Mode opératoire et calcul

Dans un creuset préalablement pesé (P0), on pèse 1g d'échantillon en double (E). On ajoute 100 ml de la solution NDF et on laisse agir à chaud sur une rampe à hydrolyse pendant une heure. On lave 3fois à l'acétone .On filtre et on sèche dans l'étuve à 105°C pendant 24 heures (P1).

La teneur en NDF de l'échantillon est déterminée par l'expression :

$$NDF \% = \left[\frac{P1 - P0}{E \times MS} \right] \times 100$$

Avec :

NDF : Neutral Detergent Fiber en %

P0 : poids du creuset vide en g.

P1 : poids du creuset et de l'échantillon en g.

E : poids de la prise d'essai en g.

MS : Matière sèche en %.

V.5.2. Estimation de la fraction ADF (Acid Detergent Fibre)

L'opération a été réalisée sur le résidu NDF, elle permet de déterminer le pourcentage des hémicelluloses. Pour un litre de solution ADF il nous faut :

- 20 g de CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) (C₁₉ H₄₂ Br N)
- 30 ml de H₂SO₄ (0.5 N)

Dans un bécher de 1000 ml, mettre le CTAB avec une quantité suffisante d'eau distillée, ajouter l'H₂SO₄ en agitant doucement et avec précaution car il dégage une forte chaleur. Laisser refroidir puis compléter le volume avec de l'eau distillée jusqu'à un litre.

*** Mode opératoire :**

2g de matière sèche sont soumis à deux hydrolyses successives l'une acide (H₂SO₄, 0,26N) et une autre basique (KOH, 0,23N) d'une durée de 60 min. Après hydrolyse, les échantillons sont étuvés pendant 24 heures à 105°C, puis calcinés pendant 5 heures à 550°C (on conserve le résidu ADF pour l'analyse ADL).

La teneur en ADF est calculée comme suit :

$$\text{ADF}\% = [(P1-P2) / (PE \times \text{MSa})] \times 100$$

% ADF : pourcentage ADF exprimée en % de la MS

P1 : poids du creuset en porcelaine + résidu NDF après séchage à l'étuve à 105°C en g

P2 : poids du creuset en porcelaine + résidu ADF après séchage à l'étuve à 105°C en g

PE : prise d'essai en g

MSa : % MSa /100.

V.5.3. Estimation de la fraction ADL (Acid Detergent Lignin)

Ce dosage permet également de déterminer le pourcentage de cellulose. La fraction lignine est obtenue par attaque à froid du résidu ADF par l'acide sulfurique à 72%. Après 3 heures d'hydrolyse, rincer à trois reprises chaque creuset avec de l'eau distillée chaude et l'acétone, sécher à l'étuve à 105°C pendant 24 heures, laisser refroidir, peser (P1) et enfin

calciner dans un four à moufle à 450 pendant 3 heures et noter leurs poids (P2) après refroidissement.

La teneur en ADL est ainsi calculée comme suit :

$$\text{ADL \%} = (\text{P1-P2}) / (\text{PE} \times \text{MS a}) \times 100$$

% ADL : pourcentage de lignine exprimée en % de la MS

P1 : poids du creuset en porcelaine+ résidu NDF après sortie étuve

P2 : poids du creuset après calcination en g

PE : prise d'essai en g

MS a = % MS a / 100.

La teneur en cellulose est calculée comme suit :

$$\text{Cellulose \%} = \text{ADF\%} - \text{ADL\%}$$

La teneur en hémicellulose est calculée comme suit :

$$\text{Hémicellulose \%} = \text{NDF\%} - \text{ADF\%}$$

Estimation des carbohydrates non fibreux comme suit :

$$\text{NFC} = 100 - (\% \text{NDF} + \% \text{PB} + \% \text{EE} + \% \text{CT}) \quad (\text{NRC, 2001})$$

VI. Fermentations *in vitro* en présence des extraits

VI.1. Technique de production de gaz *in vitro*

Les caractéristiques de fermentation *in vitro* ont été étudiées en utilisant la technique la production de gaz cumulative (IVGPT) selon la méthode rapportée par Calabro (2015).

La technique de production de gaz *in vitro* est une simulation de la dégradation des aliments par la microflore du rumen. A l'origine, elle a été développée par Menke *et al.* (1979) dans des seringues de verre. La technique a ensuite été modifiée par (Arhab, 2006) en remplaçant les systèmes batch par des seringues en plastique. Alors que Theodureau *et al.* (1994) ont utilisé des flacons en verre à la place des seringues. Dans les différents systèmes batch et à la fin de la fermentation, le gaz est mesuré à l'aide d'un baromètre (Spec Scientific LTD., Scottsdale, AZ, USA) ou par lecture volumétrique.

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

digestibilité réelle. L'incubation des substrats broyés avec l'inoculum est réalisée dans des conditions anaérobies et à 39°C. L'inoculum est composé de liquide ruminal auquel a été ajouté un milieu de culture ; la production de gaz pendant le processus de fermentation est mesuré par un système manuel constitué par un transducteur de pression.

VI.2. Conduction de la fermentation *in vitro*

VI.2.1. Inoculum

Le jus de rumen utilisé comme inoculum dans le système automatisé provient de six vaches laitières (poids moyen de 680 kg). La ration totale des vaches est composée d'un mélange contenant de l'ensilage de maïs, du foin d'avoine et du concentré (CP 120 et NDF 435 g. kg⁻¹) et les vaches ont un accès libre à l'eau. La ration est calculée afin de satisfaire les besoins d'entretien et de production de l'animal. Les vaches reçoivent deux repas par jour. Le prélèvement du liquide ruminal (phase liquide et phase solide) se fait sur chaque animal donneur et rapidement transporté au laboratoire dans des thermos préchauffés à 39 °C et saturés en CO₂ assurant la température adéquate pour minimiser les changements de la population microbienne et pour éviter toute contamination en oxygène.

Au laboratoire, le liquide ruminal des vaches est bien mélangé, puis filtré à travers quatre couches de (gaze) de type Mousline et barboté avec du CO₂ à 39°C selon le protocole suggéré par Calabrò *et al.* (2015). Le fluide ruminal (10 ml) a été ensuite mélangé avec la solution tampon (75 ml) et à un agent réducteur (4 ml). Toute la manipulation est réalisée sous un flux constant de CO₂ (figure 19).



Figure 19: Prélèvement du liquide ruminal.

VI.2.2. Eléments constitutifs du milieu de culture

Dans nos fermentations, le milieu de culture est composé d'une solution tampon, d'une solution de macrominéraux, d'une solution d'oligo-éléments, d'un indicateur du potentiel d'oxydoréduction et d'une solution réductrice (annexe 1,2). Le mélange de couleur bleue est chauffé jusqu'à virage de la couleur vers le rose. Ensuite, la solution est barbotée avec un flux continu de CO₂, ce qui entraîne la réduction de la salive artificielle indiquée par le virage de la couleur du rose au blanc transparent. A cette étape, le jus de rumen filtré est ajouté avec la salive artificielle. Enfin, un barbotage en surface est maintenu pendant un certain temps de manière à maintenir une atmosphère totalement anaérobie (figure 20).

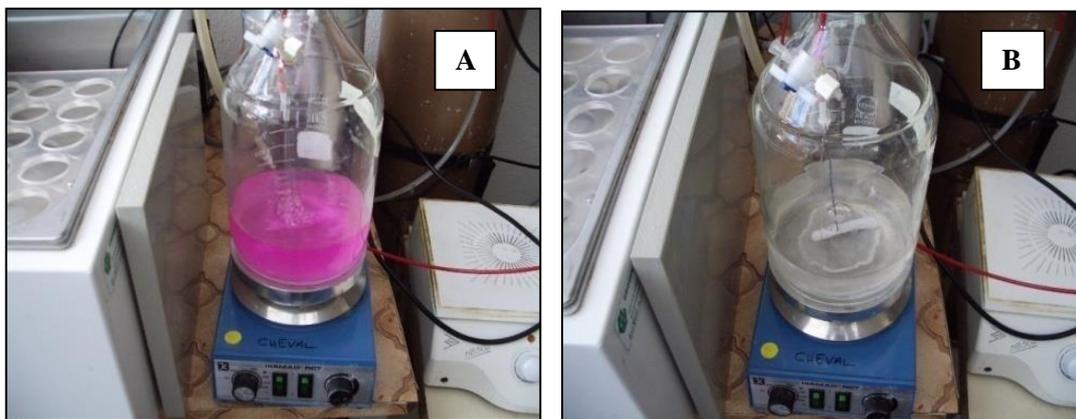


Figure 20: Préparation de la salive artificielle (Arhab, 2006).

VI.3. Fermentation *in vitro*

Les effets des extraits des deux (02) plantes étudiés (*Eucalyptus globulus* et *Olea europaea*) ont été examinés *in vitro* en utilisant des cultures mixtes de microorganismes du rumen (jus de rumen). Le substrat utilisé pour les fermentations *in vitro* est un mélange de quatre ingrédients (foin de luzerne, foin de ray-grass, soja et maïs) ont été choisis et convenablement combinés afin de formuler un régime équilibré recommandé pour la vache laitière (fourrage: concentré ratio 60:40; Unité Fourragère lait / kg 0,89) (Tableau 7).

Tableau 7 : Composition chimique des ingrédients du substrat de référence.

Ingrédients	CP % comme aliment	NDF % comme aliment	UFL /kg MS	%	CP % MS dans aliment	NDF % MS dans aliment	UFL % MS dans aliment
Foin de luzerne	15,50	53,13	0,66	26,50	4,11	14,08	0,17
Foin de ray-grass 1	11,43	55,23	0,67	18,50	2,11	10,22	0,12
Foin de ray-grass 2	6,87	50,00	0,65	15,00	1,03	7,50	0,10
Soja	37,28	18,68	1,14	10,00	3,73	1,87	0,11
Maïs	7,20	9,60	1,25	30,00	2,16	2,88	0,38

L'inoculation et l'incubation sont faites selon la technique décrite par Theodureau *et al.*, (1994), Le jus de rumen (10 ml) est mélangé à (75 ml) de salive artificielle et (4 ml) d'agent réducteur et distribué de façon anaérobie dans des flacons en verre (batch) de 120 ml contenant $1,0051 \pm 0,022$ g de substrat; les flacons sont ensuite supplémentés par 50, 75 et 100 mg de chaque fraction d'extraits d'*Eucalyptus globulus* et d'*Olea europaea* (D50, D75, D100, respectivement); Les flacons sont ensuite fermés avec des bouchons en butyl, puis sertis avec une capsule en aluminium. Les flacons sont ensuite scellés, secoués et incubés (figure 21). Les concentrations d'extraits utilisées dans la présente étude sont basées sur le résultat des essais préliminaires *in vitro* (optimisation des doses).

Les incubations sont réalisées en trois séries en employant trois jus de rumen différents.

- *Série 1* pour les extraits D'*Eucalyptus globulus*
- *Série 2* pour les extraits D'*Olea europaea*
- *Série 3* pour la quercétine

Soit 6 répétitions par dose pour chaque extrait sont réalisées. Dans les mêmes conditions, trois fermenteurs témoins (D0) (substrat + jus de rumen plus salive artificielle sans additif) ainsi que trois fermenteurs blancs, sans substrat (blanc : jus de rumen plus salive artificielle) sont incubés pour faire les corrections nécessaires.

De la même façon six répétitions sont réalisées pour chaque concentration (150,175 et 200 mg) d'un bioflavonoïde pur (flavonol) (Quercetin, Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, MO, USA). L'incubation est réalisée à 39°C dans une étuve à agitation rotatoire. Le volume de gaz (ml/g MS) produit après 24 h d'incubation (GP24) est utilisé comme indice de digestibilité et valeur nutritive de l'énergie, comme suggéré par Menke et Steingass (1988).



Figure 21: Système de fermentation en batch

VII. Détermination des différents paramètres fermentaires

VII.1. Mesure du pH

Après 24h de fermentation, les bouteilles sont placées dans un bain à glace afin d'interrompre la fermentation et sont ouverts pour mesurer le pH de leur contenu à l'aide d'un pH-mètre (model 3030 Alessandrini Instrument, glass électrode, Jenway, Dunmow, UK).

VII.2. Analyse qualitative des gaz

Après 24h d'incubation, un système de seringues graduées est utilisé d'une part pour permettre la mesure de la pression en millilitre et, d'autre part, pour permettre le prélèvement d'un échantillon de gaz en vue de son analyse chromatographique pour déterminer le volume de méthane (CH₄) et de (CO₂) produit.

VII.3. Analyse quantitative de la phase gazeuse

Le système utilisé permet la mesure des changements de pression en p.s.i (livre \ pouce carré) à l'intérieur de chaque flacon, par rapport à la pression atmosphérique en libérant le piston de la seringue graduée.

Dans ce système, le nombre de moles ou de ml de gaz est déduit de la loi des gaz parfaits:

$$PV = n R T$$

Où : **P** est la pression enregistrée du batch, **V**: volume mort du batch, **R**: constante des gaz parfaits (0,082 L atm /K°.mol), **T**: température du gaz en °K.

La production nette de gaz dans chaque bouteille correspond à la production de gaz après 24 heures d'incubation soustraite du volume de gaz enregistré à t₀, et du volume moyen de gaz produit par le flacon témoin (blanc), par la relation suivante :

$$V_t = (V_{24} - V_0) - (BV_t - BV_0)$$

où : V_t (ml) est le volume de gaz produit au temps t, V₂₄ (ml) le volume de gaz enregistré au temps t = 24 h, V₀ (ml) le volume de gaz enregistré au temps t₀, BV₀ (ml) le volume moyen de gaz du blanc enregistré au temps t₀, BV_T (ml) le volume de gaz moyen du blanc enregistré au temps t = 24 h.

VII.4. Analyse qualitative et quantitative des acides gras volatils (AGV)

✓ Principe

La composition et la teneur des acides gras volatils, présents dans le jus de rumen et produits après 24h de fermentation, sont déterminées par chromatographie en phase gazeuse selon la technique de Jouany (1982). La CPG utilisée est une CPG Shimadzu, modèle 2010.

Elle est composée de:

- un passeur d'échantillon,

- un injecteur avec division de flux ou split,
- un four à l'intérieur duquel est placée la colonne,
- un détecteur à ionisation de flamme (FID).

L'injecteur permet la vaporisation de l'échantillon avant son introduction dans une colonne capillaire. La colonne utilisée est une colonne capillaire de silice fondue 30 m, 0,25 mm DI, épaisseur de film 0,25 µm).

Les AGV sont séparés selon leur coefficient de partage entre la phase mobile et la phase stationnaire. Les solutés, détectés par ionisation de flamme, sortent par ordre croissant de leur poids moléculaire. Un intégrateur relié au détecteur du chromatographe calcule les surfaces des pics qui sont proportionnelles à la quantité des composés.

✓ Préparation des échantillons

Après pour la détermination des acides gras volatils (AGV), un échantillon de liquide de fermentation a été centrifugé à 12.000 tours pendant 10 minutes à 4 ° C (centrifugeuse Universal 32R, Hettich Furn Tech Division DIY, Vlotho, Allemagne), après dans des tubes Ependorff préalablement libellés, une aliquote (1 ml) de surnageant a été mélangé avec 1 ml d'acide oxalique (0,06 mole);ensuite conservés dans le congélateur pour le dosage ultérieur des AGV.

✓ Dosage chromatographique

L'analyse d'un échantillon se fait en isotherme pendant 10 min. L'injecteur est à 220°C et le détecteur FID à 250°C. La pression en gaz vecteur, azote, est de 0,5 bar. Un volume fixe d'échantillon (0,25 à 0,50 µl) est injecté en tête de colonne et élué dans les conditions de température et de pression définies précédemment. En sortie de la colonne, les pics, détectés lors de l'étalonnage, permettent de connaître la surface des pics de l'étalon (étalon externe composée d'acide acétique, propionique, butyrique, isobutyrique, valérique et isovalérique), de calculer la concentration molaire de chacun des composés de l'échantillon par rapport à celle de l'étalon selon la formule :

$$Ca = \frac{Sa}{Se \times ka}$$

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

VII.5. Analyse du méthane et de gaz et de gaz carbonique

La production de méthane et de gaz carbonique est analysée par chromatographie en phase gazeuse (figure 22). La phase gazeuse provenant de chaque flacon (3 ml) est prélevée par un système de seringue munie d'une valve et analysé à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (GC Trace 1310, Thermo Scientific, Waltham, MA USA) équipé d'un détecteur de boucle TC et d'une colonne remplie (HaySepQ SUPELCO, 3/16 pouce, maille 80/100). La concentration du gaz est déterminée par utilisation d'un courbe étalon établie grâce à un gaz standard certifié (Alphagaz, N° 0735562.00). Le volume du dioxyde de carbone est calculé par différence entre le gaz total enregistré et le volume du méthane produit (Guglielmelli *et al.*, 2011).



Figure 22: Analyse de la phase gazeuse méthane (CH_4) et de gaz carbonique (CO_2) par chromatographie en phase gazeuse.

VII.6. Dosage de l'azote ammoniacal ($N-NH_3$)

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

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

✓ Dosage

5 ml d'une solution A (**tableau 8**) sont mélangés avec 2 μl de l'échantillon. Après une bonne homogénéisation, 5ml d'une solution B (**tableau 8**) sont ajoutés. Ce mélange homogénéisé est maintenu dans un bain marie à 37°C pendant 20 min. La densité optique est mesurée à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-1650 PC Shimadzu Corporation, Japan). Les résultats sont rapportés à une courbe étalon standard et exprimés en équivalent de chlorure d'ammonium (NH_4Cl) (annexe 3).

Tableau 8 : Composition des solutions pour le dosage de l'azote ammoniacal

Solution A	<i>pour 500 ml Eau distillée</i>	
	<i>Phénol</i>	<i>15 g</i>
	<i>Nitroprosside de sodium</i>	<i>25 g</i>
Solution B	<i>pour 500 ml Eau distillée</i>	
	<i>Hydroxyde de sodium</i>	<i>2,5 g</i>
	<i>Hypochlorite de sodium</i>	<i>5 ml</i>

VII.7. Etude de la digestibilité des substrats

VII.7.1. Digestibilité apparente de la matière sèche (DMS)

Après 24h de fermentation, le contenu de chaque flacon de fermentation est vidé et transféré dans des tubes Falcon préalablement tarés. Il est centrifugé à 5000 rpm pendant 10 min. Le surnageant est récupéré, alors que le culot est complété avec les particules collées dans le batch après son rinçage par 10 ml d'eau distillée. Une seconde centrifugation est effectuée à 5000 rpm pendant 10 min. Le surnageant est jeté et le culot est récupéré et séché à 80°C pendant 48 heures puis pesé (Mellenberger, 1970).

La digestibilité apparente de la matière sèche est déterminée par la formule suivante :

$$DMS = \frac{(MSi - MSr) - MSb}{MSi} \times 100$$

où **MSi** correspond à la prise d'essai sec introduite dans chaque batch, **MSr** correspond à la matière sèche résiduelle dans chaque batch de fermentation et **MSb** représente la moyenne du résidu sec du blanc.

VII.7.2. Digestibilité apparente de la matière organique (DMO)

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

La digestibilité apparente de la matière organique est déterminée par la formule suivante:

$$DMO = \frac{(MOi - MOR) - MOb}{MOi} \times 100$$

où **MOi** correspond à la matière organique introduite dans chaque batch, **MOR** correspond à la matière organique résiduelle dans chaque batch de fermentation et **MSb** représente la moyenne du résidu organique du blanc.

VII.8. Estimation de l'énergie métabolisable (ME)

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

$$ME \text{ (MJ/kg MS)} = 2,2 + 0,136 \text{ GP} + 0,057 \text{ CP} + 0,0029 \text{ EE}$$

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

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

VIII.1. Dénombrement des protozoaires (comptage direct)

Les protozoaires sont traités avec une solution de MFS (vert de méthyle saline) (**tableau 9**) qui permet la fixation des cellules par le formaldéhyde et la coloration des noyaux par le vert de méthyle (Ogimoto et Imai, 1981). Le dénombrement est réalisé sur une cellule de Malassez, qui est une lame épaisse en verre dans laquelle est creusée une chambre de comptage constituée de 100 rectangles, parmi lesquels 25 sont subdivisés en 20 petits carrés pour faciliter le comptage. Le volume total de la cellule est égal à $1\mu\text{l}$, soit $0,01\mu\text{l}$ par rectangle, ce qui permet une évaluation quantitative (figure 23).

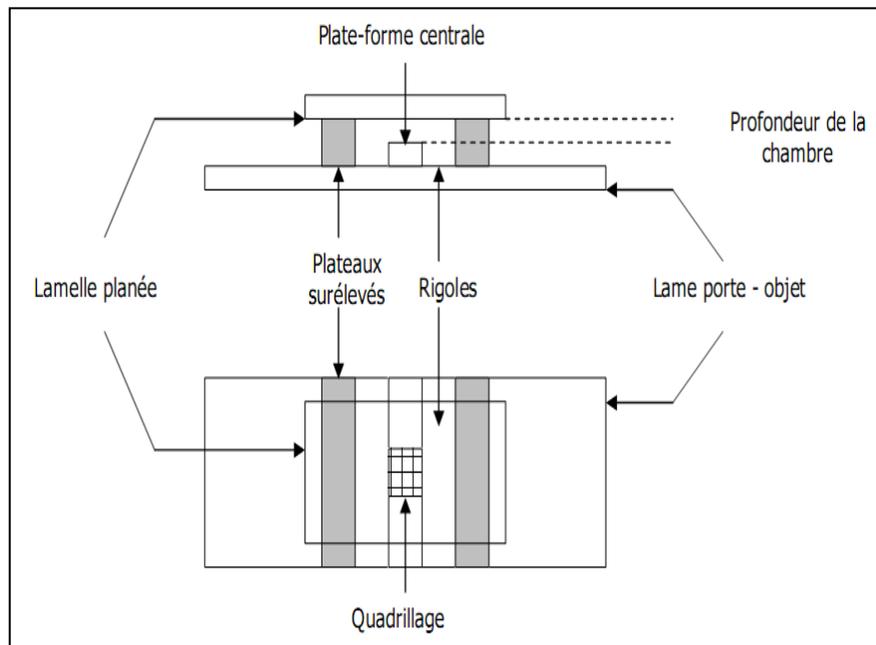


Figure 23: Schéma descriptif de la cellule de malassez.

Tableau 9 : Composition de la solution MFS (Ogimoto et Imai, 1981).

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

VIII.1.1. Echantillonnage

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

VIII.1.2. Comptage et calcul

L'échantillon à compter est mis entre lame et lamelle à l'aide d'une pipette pasteur en évitant la formation de bulles d'air. Le comptage est fait sur les 25 rectangles subdivisés en petits carrés (figure 24). à l'aide d'un microscope à l'objectif ×40. Chaque échantillon est compté deux fois est si la différence entre les deux résultats est supérieure à 10% le dénombrement doit être refait.

Le nombre des protozoaires est exprimé selon la relation suivante :

$$N = n1 \times v \times n2 \times f \times 1000$$

N: nombre de cellules par ml

n1: nombre de cellules comptées

v: volume d'un rectangle=0,01µl

n2: nombre de rectangles comptés= 25

f: facteur de dilution.

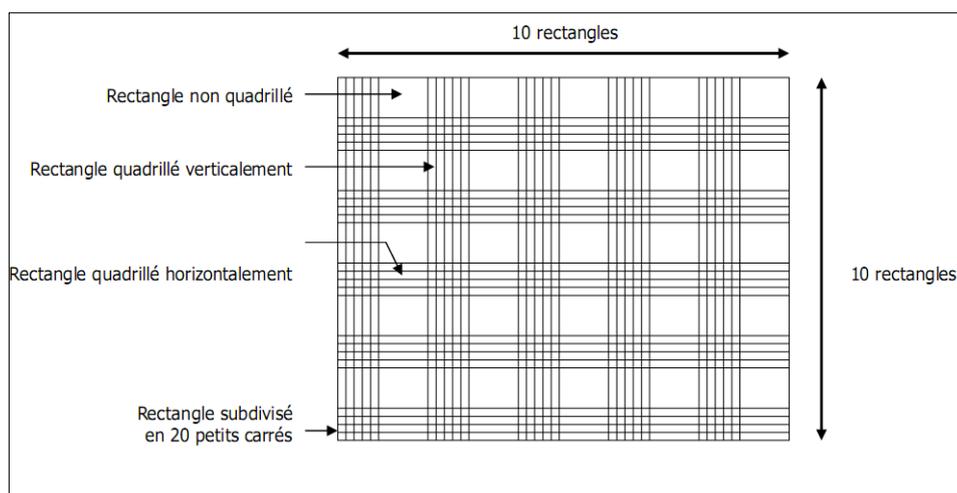


Figure 24 : Quadrillage de dénombrement de la cellule de Malassez.

IX. Stœchiométrie des fermentations

Pour aller plus loin dans l'interprétation des données, plusieurs calculs ont été effectués sur la base de la production des AGV pour calculer la production de gaz totaux théorique, de méthane et de gaz carbonique. La production de gaz totaux théoriques (en mmol de carbone par mmol d'AGV produit) correspond à la somme :

- de la production de gaz direct. Il s'agit du gaz produit lors des fermentations.
- et de la production de gaz indirect. Il s'agit de la production de gaz liée à la réaction acido-basique entre la production d'AGV et les tampons présents dans le système.

La production de gaz direct (mmol de carbone / mmol AGV) a été estimée à partir des équations stœchiométriques proposées par Getachew *et al.*, (1998).

CO₂ estimé : $A/2 + P/4 + 1.5 * B$; **A** : production d'acétate (moles), **P** : production de propionate (moles), **B** : production de butyrate (moles) (Getachew *et al.*, 1998)

CH₄ estimé : $[A + 2 * B] - CO_2 \text{ estimé}$; **A** : production d'acétate (moles), **B** : production de butyrate (moles) (Getachew *et al.*, 1998)

Gas total estimé : $CO_2 \text{ estimé} + CH_4 \text{ estimé} + CO_2 \text{ indirect}$ (1mmole CO₂ indirect = 0.87 mmoles AGV_t) (Getachew *et al.*, 1998).

R : L'effet antimethanogenic relatif à l'ajout de chaque extrait (dose de quercetine) (Relative antimethanogenic effect).

R = $\mu \text{ test} / \mu \text{ control}$ (Lopez *et al.*, 2010) L'effet relatif (R) fournit une indication de la séparation comparative entre les moyens de test et de contrôle (μ):

Si R est égal à l'unité (R = 1), la valeur d'essai est identique au contrôle, les valeurs plus faibles (R < 1) indiquent une production décroissante dans le traitement d'essai comparativement au témoin, mais des valeurs plus élevées (R > 1) indiquent que le méthane a été augmenté en réponse à l'additif.

R' : Le pourcentage de réduction/d'augmentation de la production du méthane relatif à l'ajout de chaque substrat (relative **percentage** of increase (positive) or decrease (negative) in methane production

R' = $(\mu \text{ test} - \mu \text{ control}) / \mu \text{ control}$ (Lopez *et al.*, 2010)

$$\text{BH \%} = \text{TR H}_2 = \frac{4\text{M}+2\text{P}+2\text{B}}{2\text{A}+\text{P}+4\text{B}} \times 100 \quad (\text{Demeyer, 1990}),$$

BH : bilan d'hydrogène ; **M** : production de méthane (mmoles) ; **P** : production de propionate (mmoles); **B** : production de butyrate (mmoles); **A** : réduction d'acétate (mmoles).

X. Calcul et analyses statistiques

✓ **Le facteur de partition (PF mg / ml)** : est un indicateur de l'efficacité de la fermentation, a été calculé comme le rapport entre la matière organique dégradé *in vitro* (MOD, mg) et le volume de gaz produit (G24, ml) à la fin de l'incubation (Blümmel *et al.*, 1997).

$$PF = MOD/G24$$

✓ **Le rendement en biomasse microbienne : (MBY, mg)** : Il a été également calculé en utilisant la matière organique dégradé *in vitro* (MOD, mg), (GP24, ml) et un facteur stœchiométrique (2.25) (Blümmel *et al.*, 1997) comme suit:

$$MBY = MOD - (G24 \times 2.25)$$

Toutes les données *in vitro* (caractéristiques de fermentation et produits finaux) des deux plantes étudiés (*Eucalyptus globulus*, *Olea europaea*) ont été traitées par une analyse multi variée à deux facteurs avec interaction sous GLM (General linear model) dans IBM SPSS 24 pour tester l'effet du type d'extraction (acétate d'éthyle, n-butanol, aqueux) et leurs dosages (D0, D50, D75, D100) pour les deux plantes utilisées après une transformation logarithmique des valeurs et une vérification de l'homogénéité des variances intra- groupes .

La comparaison multiple des moyennes a été effectuée par l'utilisation de l'ajustement de Bonferroni au risque d'erreur de 5%.

Pour les fermentations de la quercétine, L'effet de l'augmentation la dose de quercétine sur les paramètres de fermentation et sur les produits terminaux, a été analysé statistiquement premièrement, en utilisant les contrastes orthogonaux avec le logiciel SAS/STAT(R) et par la suite par une Anova à un seul facteur (effet dose) La comparaison

des moyennes a été effectuée par l'utilisation de l'ajustement de Bonferroni au risque d'erreur de 5% a l'aide de logiciel IBM SPSS 24.

Chapitre II:
Résultats et Discussion

I. Aspects chimiques des plantes étudiées et du substrat de référence

I.1. Constituants cellulaires

La composition chimique des deux plantes étudiées *Eucalyptus globulus* et *Olea europaea*, est faite en comparaison avec le substrat formulé utilisé pour la technique de *in vitro* gas production (IVGPT), les résultats sont exposée dans le tableau 10.

I.1.1. Teneur en matière sèche

Il ressort du tableau 10 que les teneurs en matière sèche sont relativement élevées pour les deux plantes *Eucalyptus globulus* (924,8 g/Kg) et *Olea europaea* (931,2 g/Kg) comparativement au substrat de référence (907,5 g/Kg). Ce qui nous permet de juger que ces deux plantes pourraient être valorisées en alimentation animale.

I.1.2. Teneur en matières minérales

Les teneurs en matières minérales des trois échantillons sont également représentées dans le tableau 10, les deux plantes se distinguent par un contenu important en minéraux comparativement à l'aliment utilisé comme substrat de références pour les fermentations *in vitro*. Pour le contenu en cendres d'*Eucalyptus globulus*, les résultats obtenus sont supérieurs à ceux notés par Manh *et al.*, (2012) et Thao *et al.*, (2015) (55,0 et 60,0 g kg⁻¹ MS, respectivement). En outre, Les feuilles d'olivier sont riches en cendres comparativement au substrat témoin (98,7 g kg⁻¹ de MS) (P< 0,001). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Delgado-Pertõanaez *et al.*, (2000). Cependant, ils diffèrent de ceux notés par Martin-Garcia *et al.*, (2008). Ces inconsistances sont probablement dues à plusieurs conditions telles que l'origine, la proportion de branches sur l'arbre, les conditions de stockage, les conditions climatiques, la teneur en humidité et le degré de contamination avec le sol.

I.1.3. Teneur en matières azotées totales

D'après le tableau 10, les deux plantes étudiées montrent des teneurs en protéines brutes considérablement élevées (≥ 100 g/Kg MS). La teneur la plus importante est enregistrée avec *Olea europaea* (101,2 g Kg⁻¹MS), suivie d'*Eucalyptus globulus* (100 g Kg⁻¹MS). Le substrat de référence montre par contre une teneur en MAT plus élevé (115,9 g Kg⁻¹ MS). Les valeurs enregistrées pour les deux plantes rejoignent la littérature ; pour la plante *Eucalyptus globulus* le niveau de protéines brutes est similaire aux valeurs rapportées par Manh *et al.*, (2012) (95,0

g kg⁻¹ MS), mais inférieur par rapport à Ulger *et al.*, (2017) pour les feuilles fraîches (128,5 g kg⁻¹ MS).

Tableau 10: Teneurs en matière sèche (g/Kg), Composition chimique du substrat témoin, *Eucalyptus globulus. L* et *Olea europaea. L* (g Kg⁻¹ MS).

Paramètres	Plante			S.E.M	P-Value
	<i>O. europaea</i>	<i>E. globulus</i>	Substrat incubé		
MS	931,2 ^a	924,8 ^b	907,5 ^c	0,43	< 0,001
MM	98,7 ^a	108,3 ^b	63,8 ^c	0,82	< 0,001
MO	832,5 ^a	816,5 ^b	843,7 ^c	0,54	< 0,001
MAT	101,2 ^a	100 ^a	115,9 ^a	0,37	0,089
NDF	230,5 ^a	289,9 ^b	395,0 ^c	2,89	< 0,001
ADF	126,1 ^a	219,5 ^b	235,9 ^b	1,94	< 0,001
ADL	66,6 ^a	91,6 ^b	69,1 ^a	0,45	0,005
EE	20,7 ^a	53,3 ^b	37,1 ^c	0,51	< 0,001
Amidon	ND	ND	142,9	0,19	
CC	59,5 ^a	128,0 ^b	166,8 ^c	1,82	< 0,001
HC	106,2 ^a	70,4 ^a	159,1 ^b	1,56	0,001
NFC	549 ^a	448,6 ^b	388,2 ^c	2,73	< 0,001
EM (MJ kg ⁻¹ DM)	ND	ND	252,0	0,16	ND

EE: extrait éthéré; **CC:** cellulose **CC= ADF-ADL**; **HC:** hémicellulose **HC= NDF-ADF**; **NFC:** carbohydrates non fibreux **NFC=100- (%NDF+%PB+%EE+%CT)(NRC, 2001)**; **EM :** énergie métabolisable estimé *in vitro*.

^{a,b,c} moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes ($p < 0,05$) ; les tests sont ajustés pour toutes les comparaisons par paire au sein d'une ligne de chaque sous-table la plus interne, à l'aide de la correction de Bonferroni. ; P : probabilité ; S.E.M : L'erreur standard des moyennes.

Cependant, comme le suggèrent Brooker et Kleinig (2006) pour les plantes d'*Eucalyptus*, la concentration individuelle des constituants varie selon l'espèce, la saison, l'emplacement, le climat, le type de sol, le régime de fertilité et l'âge des feuilles. En ce qui concerne la plante *Olea europaea*, la teneur en protéines brutes des feuilles d'olives (101, 2 g kg⁻¹ MS) est comparable à celle du substrat témoin ($P > 0,05$). Cette concentration est suffisante pour assurer une bonne croissance bactérienne. Hariadi et Santoso (2010) ont signalé que l'administration d'un régime alimentaire avec une concentration en protéines brutes inférieure à 70 g kg⁻¹ de MS limite l'activité microbienne en raison d'un manque d'azote. Au contraire, le niveau des protéines brutes qui sont supérieures à cette valeur sont considérés comme un facteur favorisant pour le développement microbien, ce qui pourrait

donner à *Eucalyptus globulus* un large avantage nutritionnel pour compléter les aliments de mauvaise qualité en azote. Il reste cependant, à étudier leur palatabilité.

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

I.1.4. Teneur en lipides

Les teneurs en lipides des plantes analysées sont représentées par le tableau 10. Les deux plantes et le substrat de référence se révèlent pauvres en lipides. *Eucalyptus globulus* et *Olea europaea* enregistrent une valeur de 53.3g Kg⁻¹ MS et 20.7 g Kg⁻¹MS respectivement. Le fourrage de référence enregistre une valeur intermédiaire de 37,1 g Kg⁻¹ MS.

Wilson and Brigstocke (1981), ont indiqué que le taux de matière grasse dans la ration alimentaire des ruminants ne doit pas dépasser 8% de MS. Autrement, la digestion des fibres serait altérée. Il est clair que les teneurs en lipides enregistrées pour les deux plantes et le substrat de référence examinés dans cette étude sont de loin inférieures aux normes préconisées néfastes pour les ruminants (donc trop faibles pour avoir des effets négatifs sur le métabolisme et la digestion ruminale).

I.2. Teneur en constituants pariétaux et en carbohydrates non fibreux (NFC)

Les résultats de l'analyse des polysaccharides pariétaux et de l'estimation des hydrates de carbone non fibreux des échantillons étudiés sont représentés par le tableau 10. Globalement, l'analyse de la fraction pariétale des substrats étudiés démontre une composition très distincte. Concernant la fraction insoluble qui représente la paroi totale (cellulose + hémicellulose +lignine), elle est plus élevée pour *Eucalyptus globulus* (290 g Kg⁻¹ MS) comparativement à *Olea europaea* (232,2 g Kg⁻¹ MS). Le fourrage de référence enregistre par contre la valeur la plus élevée (395 g Kg⁻¹ MS). Les teneurs de la fraction ADF

(lignocellulose) sont également distinctes entre les substrats. La teneur la plus élevée est enregistrée pour le fourrage de référence (235,9 g Kg⁻¹MS). *Eucalyptus globulus* enregistre une valeur plus élevée (219,5 g Kg⁻¹ MS) comparativement à *Olea europaea* (126,1g Kg⁻¹ MS). Quand aux résultats des concentrations en lignine des trois échantillons, ils sont variables mais relativement comparable pour la plante *Olea europaea* et le substrat de référence qui enregistrent (66,6 g Kg⁻¹ MS et 69,1g Kg⁻¹ MS, respectivement). En revanche nettement supérieure pour la plante *Eucalyptus globulus* (91,6 g Kg⁻¹ MS).

Dans les végétaux, la lignine qui est considérée comme un composé phénolique synthétisé par la plante pendant les périodes les plus avancées de sa croissance et intervient dans la rigidité de la plante. Ainsi des teneurs élevées en fractions ADF et ADL est généralement associé a la formation de complexes insolubles entre les tannins et les autres constituants, ce qui pourrait éventuellement engendrer une diminution de sa digestibilité *in vitro*.

Dans cette étude, les teneurs en NFC calculés, sont différents entre les trois substrats. *Olea europaea* renferme une teneur plus élevée (549 g Kg⁻¹ MS) que celle d'*Eucalyptus globulus* (448,6 g .Kg⁻¹ MS). Le substrat de référence renferme une teneur assez proche de celle d'*Eucalyptus globulus*. L'explication apportée est en relation avec la composition chimique différente de ces trois substrats. En effet, la relation appliquée prend en compte les principaux constituants chimiques de ces substrats. De plus, nous avons noté dans cette étude que la concentration de NFC est plus élevée comparativement au substrat témoin. Efficacement; la concentration de cette composante dépend de facteurs tels que la variété de la plante, les conditions climatiques, l'année et la proportion de bois. En ce qui concerne les carbohydrates structuraux, il semble que les feuilles d'olivier aient le niveau le plus élevé de NFC (source d'énergie directe). En ce qui concerne sa composition chimique, les feuilles d'olivier doivent être considérées pour l'alimentation animale comme complément, source de cendres, de MAT et de NFC. Pour ces raisons, Molina-Alcaide et Yanez-Ruiz (2008), dans leur rapport ont déclaré que les feuilles d'olivier fournissent la moitié de l'énergie et les besoins en acides aminés des moutons et des chèvres à l'entretien si elle est adéquatement complétée aux fourrages.

II. Analyse phytochimique des substrats étudiés

II.1. Détermination du rendement des extractions

Les rendements des extractions à partir des deux plantes et leurs caractéristiques sont signalés dans le tableau 11. Pour le fractionnement des extraits bruts de deux espèces *Eucalyptus globulus* et *Olea europaea*, les résultats montrent que la fraction aqueuse représente le rendement le plus élevé (5,22 % ; 5,77 %) suivi de la fraction butanolique (4,44% ; 5,42 %). Par contre, le rendement le plus faible est obtenu avec la fraction d'acétate d'éthyle (1,11% et 1,37 %) respectivement pour *Eucalyptus globulus* et *Olea europaea*.

En fait, plusieurs facteurs influençant le rendement d'extraction parmi eux on peut citer: la durée de séchage, la granulométrie du broyat, la nature des solvants de différentes polarités, le ratio volume de solvant par masse de broyat, le temps de macération et la vitesse d'agitation.

Tableau 11: Rendements et caractéristiques des extraits d'*Eucalyptus globulus* et *Olea europaea*.

<i>La plante</i>	<i>Extrait</i>	<i>Rendement extraits (%)</i>	<i>Aspect</i>	<i>Couleur</i>
<i>E. globulus</i>	<i>AcOEt</i>	1,11 %	Poudre	Marron très clair
	<i>BuOH</i>	4,44 %	Poudre	Marron clair
	Aqueux	5.22 %	Huileux	Marron clair
<i>O. europaea</i>	<i>AcOEt</i>	1,37%	Poudre	Marron très clair
	<i>BuOH</i>	5.42%	Poudre	Marron clair
	Aqueux	5,77 %	Huileux	Marron foncé

Le rendement a été déterminé par rapport au poids du matériel végétal sec rendu en poudre, les résultats ont été exprimés en pourcentage de MS.

II.2. Teneurs en métabolites secondaires

II.2.1. Analyse qualitative des extraits

L'analyse qualitative des composés secondaires présents dans les extraits des deux plantes étudiées est présentée dans le tableau 12. Il ressort du tableau 12 que les métabolites

secondaires sont dissouts de différentes manières dans les solvants organiques utilisés. Ainsi, les saponines présentes chez *E. globulus* et *O. europaea* sont respectivement dissout dans l'eau et le butanol. Par contre, l'acétate d'éthyle permet la dissolution des composés phénoliques.

Le screening phytochimique des extraits d'*E. globulus* et d'*O. europaea* à montré une richesse particulière en phénols totaux ce qui rend très intéressant un dosage des composés phénoliques majeurs de nos extraits pour avoir une idée sur la composition phytochimique approximative de nos extraits principalement en phénols totaux, flavonoïdes totaux et en tanins totaux.

Tableau 12 : Analyse qualitative des composés secondaires

<i>Extractions</i> <i>Métabolites</i>	<i>Substrat</i> <i>De</i> <i>Référence</i>	<i>E. globulus</i>			<i>O. europaea</i>		
		<i>AcOEt</i>	<i>BuOH</i>	<i>Aqueux</i>	<i>AcOEt</i>	<i>BuOH</i>	<i>Aqueux</i>
<i>Saponine</i>	-	-	+	+	-	+	+
<i>Phénols totaux (PT)</i>	+	++	++	+	+	++	+
<i>Stéroïdes</i>	-	-	-	-	-	-	-

+ Présence, +++ Teneur élevé, _ absence.

II.2.2. Analyse quantitative des extraits

L'analyse quantitative des teneurs en composés phénoliques présents dans les extraits des deux plantes étudiées est présentée dans les figures 25 et 26 respectivement. Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures \pm SD.

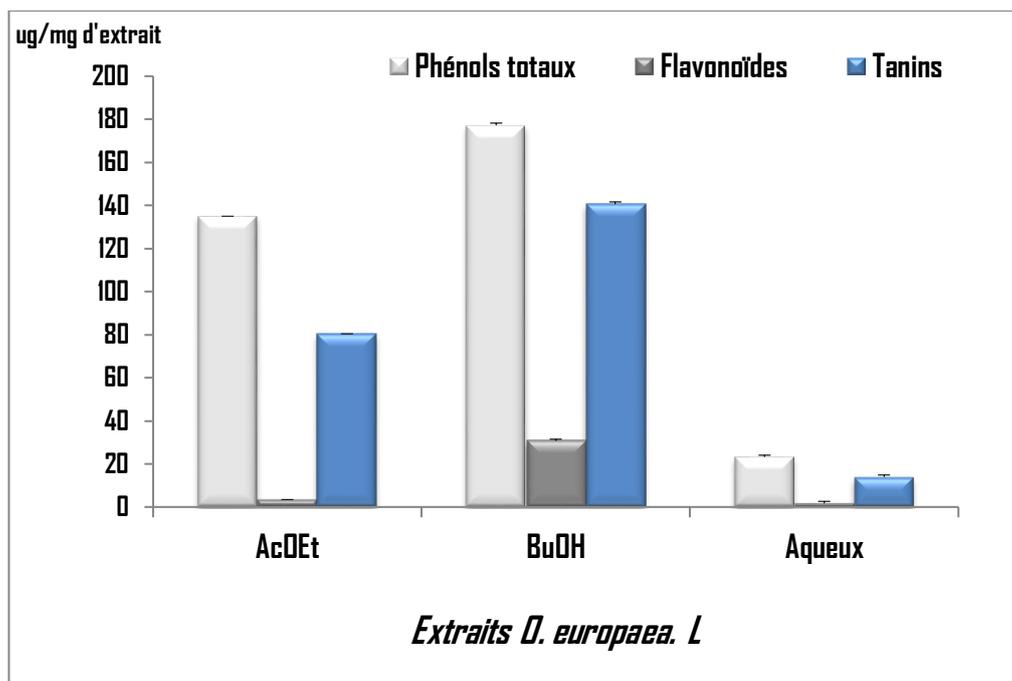
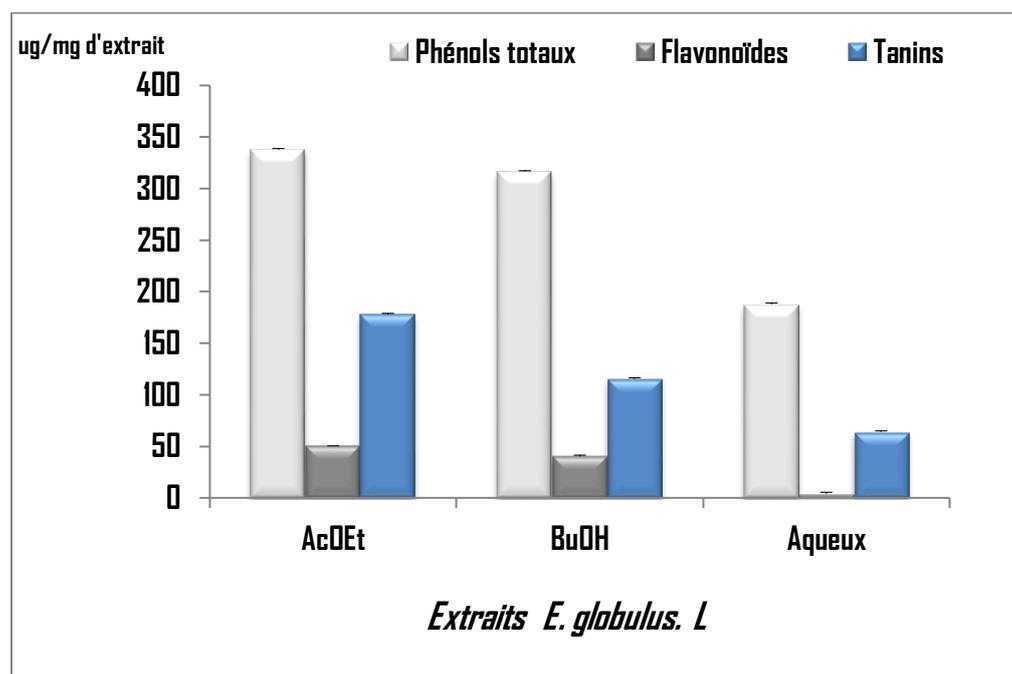


Figure 25: Comparaison de la teneur des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins des extraits d'*O. europaea. L.*



Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures \pm SD.

Figure 26: Comparaison de la teneur des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins des extraits d'*E. globulus. L.*

Il ressort de la lecture combinée des figures 25 et 26 que la concentration des composés phénoliques des extraits des plantes étudiées révèle des variations considérables entre les

espèces *Eucalyptus globulus* et *Olea europaea*. L'extrait *AcOEt* d'*Eucalyptus globulus* montrent la plus forte concentration de phénols totaux (PT) avec une valeur de 337,81 µg EAT/mg d'extrait suivie de l'extrait *AcOEt* d'*Olea europaea* avec une valeur de 135 µg EAT/mg. L'extrait *BuOH* avec des valeurs de 316,87 µg EAT/mg d'extrait et 177,19 µg EAT/mg d'extrait respectivement pour les plantes *Eucalyptus globulus* et *Olea europaea*. Les valeurs le plus basses de (PT) sont enregistrées pour l'extrait aqueux avec une concentration de 187,78 µg EAT/mg d'extrait et 23,25 µg EAT/mg d'extrait respectivement pour *Eucalyptus globulus* et *Olea europaea*.

Une tendance similaire est constatée pour les flavonoïdes, l'extrait *AcOEt* d'*Eucalyptus globulus* s'avère le plus riche en flavonoïdes (50,42 µg EQ/mg d'extrait), que l'extrait *AcOEt* *Olea europaea* (3,46 µg EQ/mg d'extrait). Cependant le butanol a amélioré la dissolution des flavonoïdes d'*Olea europaea* dont la concentration à augmenter 10 fois par rapport à l'acétate d'éthyle (30,67 µg EQ/mg d'extrait). Cependant, cette concentration a diminué pour les plantes *Eucalyptus globulus* (40,35 µg EQ/mg d'extrait). Cette discordance entre les différents solvants est due principalement à leur polarité qui définit leur affinité respective soit pour les flavonoïdes glycosylés ou aglycones. Cette constatation est réconfortée par les résultats des extraits aqueux des deux plantes où il ressort que l'eau (solvant le plus polaire) n'agit que sur une certaine de flavonoïdes. Dans ce cas, les teneurs les plus faibles (3,81 µg EQ/mg d'extrait) et (1,71 µg EQ/mg d'extrait) respectivement pour *Eucalyptus globulus* et *Olea europaea*.

Pour le dosage des tannins totaux (TT) dont les concentrations les plus élevées sont enregistrées pour l'extrait *AcOEt* d'*Eucalyptus globulus* (177,81 µg EAT/mg d'extrait). Plusieurs types de phénols, incluant les phénols simples et les polyphénols composés, affectent la valeur nutritive des aliments (Frutos *et al.*, 2004; Lamy *et al.*, 2011). La Concentration des tanins supérieure à 5% de MS affecte négativement l'ingestion et la digestibilité du fourrage (Silanikove *et al.*, 1996). Cependant, certains auteurs rapportent que les ruminants sont capables de tolérer des plantes avec des teneur en tanins en dessous de 100 g /kg MS (Gasmi-Boubaker *et al.*, 2005), bien que le niveau de tolérance puisse varier entre les espèces animales (Onwuka, 1992). Il est maintenant bien établi que les tanins peuvent complexer et inhiber les enzymes microbiennes mais aussi former des complexes avec les protéines alimentaires, les polysaccharides et avec plusieurs minéraux (Makkar, 2003a), ce qui les rend indisponibles à la fois pour le microbiote ruminal et pour l'animal hôte. Ils peuvent aussi diffuser leurs produits métaboliques dans les tissus et provoquer une toxicité

(Cheeke, 1995). Cependant, chez les ruminants, il a été démontré que les tanins alimentaires < 4% MS peuvent avoir des effets bénéfiques car ils réduisent la dégradation des protéines dans le rumen par la formation de complexes protéines tanins conduisant ainsi à l'augmentation de l'absorption d'acides aminés dans l'intestin grêle (Brunet, 2008; Yang, 2002 ; Njidda and Nasiru, 2010). De plus, les tanins en se complexant aux hydrates de carbones peuvent réduire la production de gaz dans le rumen et réduire les ballonnements chez l'animal (Aganga and Tshwenyane, 2003). Sur cette base, les tannins ont été proposés comme additifs dans l'alimentation animale pour améliorer la croissance et la productivité des animaux et par conséquent minimiser les effets néfastes sur l'environnement (Lamy *et al.*, 2011; Njidda *et al.*, 2012). D'autres recherches constatent que la teneur et la quantité des composés secondaires ne déterminent pas toujours l'effet souhaité mais que d'autres facteurs comme la réactivité, la structure, le poids moléculaire et l'interaction des différents composés secondaires peuvent intervenir (McSweeney *et al.*, 2001).

Cette variabilité et hétérogénéité dans la concentration des composés phénoliques dans nos extraits peuvent être dues en partie aux différents solvants d'extraction utilisés, les essais de quantification entrepris et les standards utilisés (Del Pino *et al.*, 2005). Ces discordances peuvent être aussi dues au stade de croissance des plantes étudiées et/ou à la saison de collecte et à la nature du site de prélèvement (Rubanza *et al.*, 2005).

Les variations saisonnières en polyphénols, d'une manière générale, suivent des modèles différents dans chaque espèce végétale (Hagerman, 1987). En plus, avec l'évolution du stade de développement, la proportion de feuilles dans la biomasse de la plante entière diminue. Cela laisse supposer, les feuilles étant plus riches en tanins que les tiges, pendant la période de croissance les plantes produisent une quantité importante de biomasse et la synthèse des composés phénoliques est faible, alors que pendant la floraison la croissance est ralentie et le carbone serait plus disponible pour la synthèse des tanins (Iason *et al.*, 1993).

La comparaison des résultats des différents travaux de la littérature reste donc difficile (Schofield *et al.*, 2001). Ainsi, le concept selon lequel une teneur en tanins dans la plante inférieure à 50 g/kg MS serait bénéfique pour la santé et la nutrition de l'animal (Barry and McNabb, 1999).

III. L'effet des extraits d'*Eucalyptus globulus. L* sur les caractéristiques de la fermentation *in vitro*

III.1. Production de gaz total (GP24)

L'effet des extraits d'*Eucalyptus globulus. L* sur les caractéristiques de la fermentation *in vitro* est rapporté dans le tableau 13. Il indique que les extraits d'*Eucalyptus globulus* ont augmenté la production de gaz (GP24) par rapport au témoin, même si les réponses sont différentes en fonction des doses et ne sont pas statistiquement significatives ($P > 0,05$). Certains chercheurs ont également signalé l'augmentation de la production de gaz pendant l'incubation *in vitro* pour d'autres extraits de plantes riches en métabolites secondaires y compris l'*Eucalyptus*, (Jiménez-Peralta *et al.* 2011, Sallam *et al.* 2010).

Pour l'extrait *AcOEt*, toutes les doses ont augmenté les valeurs de GP24 par rapport au témoin. Cette augmentation est de 6,5, 10,9 et 18,9% respectivement pour la D50, D75 et D100. La même tendance est observée pour l'extrait *BuOH* où l'augmentation a atteint 36,40% pour la D100. De plus, l'extrait aqueux stimule la production de gaz, mais dans ce cas, la plus forte valeur de GP24 est observée pour la D50 (plus de 10,3% par rapport au témoin).

La production de gaz durant la fermentation *in vitro* est généralement un bon indicateur de dégradabilité et de la fermentescibilité des aliments dans le rumen et de l'activité microbienne. Ainsi, des valeurs de gaz élevées indiquent une meilleure disponibilité des nutriments pour les microorganismes du rumen (Makkar *et al.*, 1997). En outre, l'augmentation de la production de gaz peut être attribuée à l'effet négatif limité des métabolites secondaires présents dans les extraits étudiés. En effet, ces métabolites peuvent stimuler la fermentation ruminale si leurs concentrations sont faibles ou modérées (Jiménez-Peralta *et al.*, 2011, Salem *et al.*, 2014) et /ou elles reflètent la capacité des micro-organismes du rumen à les utiliser comme source d'énergie (Salem *et al.* 2014; Wachenheim *et al.* 1992; Hart *et al.* 2008).

L'augmentation de la production de gaz enregistrée dans cette étude en raison de l'ajout d'extraits pourrait également être attribuée à un taux plus rapide de dégradation du substrat dans le rumen. En effet, les substances bioactives, en particulier les enzymes (amylase et lipase) présents dans les extraits d'*Eucalyptus globulus* peuvent améliorer l'activité des microbes fibrolytiques dans le rumen en augmentant la proximité entre substrats et microbes (Morgavi *et al.* 2000). Ce qui peut engendrer un taux de fermentation plus rapide et une

Tableau 13: Effet des extraits d'*Eucalyptus* à différentes doses sur la production du gaz cumulative (VCSS, VCISO), le CH₄, CO₂ et le facteur de partition (PF) après 24 heures de fermentation *in vitro*.

Paramètres	Extraits <i>Eucalyptus globulus. L</i> (mg)										S.E.M	P-value
	<i>AcOEt</i>				<i>BuOH</i>			<i>Aqueux</i>				
	D0	D50	D75	D100	D50	D75	D100	D50	D75	D100		
VCSS	95,02 ^a	101,19 ^a	105,32 ^a	112,91 ^a	102,12 ^a	123,55 ^a	129,63 ^a	123,46 ^a	104,81 ^a	107,87 ^a	2,74	0,055
VCISO	102,20 ^a	108,84 ^a	113,30 ^a	121,45 ^a	109,85 ^a	132,90 ^a	139,44 ^a	132,80 ^a	112,74 ^a	116,03 ^a	2,95	0,055
CH₄ % Total Gaz	12,85 ^a	1,98 ^b	1,07 ^c	0,71 ^c	11,99 ^a	11,93 ^a	11,83 ^a	12,54 ^a	12,42 ^a	13,13 ^a	0,83	0,0001
CH₄ ml/g MS	12,15 ^a	2,00 ^b	1,14 ^b	0,80 ^b	12,27 ^a	14,72 ^a	15,42 ^a	15,43 ^a	13,00 ^a	14,18 ^a	0,94	0,0001
CH₄ ml/g MO	13,07 ^a	2,15 ^b	1,22 ^b	0,86 ^b	13,20 ^a	15,83 ^a	16,59 ^a	16,60 ^a	13,98 ^a	15,25 ^a	1,01	0,0001
CH₄ ml/g MOD	20,79 ^a	3,67 ^b	2,25 ^b	1,64 ^b	22,23 ^a	26,43 ^a	28,83 ^a	25,62 ^a	21,23 ^a	25,21 ^a	1,63	0,0001
CO₂ % total gaz	81,72 ^a	96,89 ^{a,b}	102,33 ^b	110,94 ^{b,c}	89,40 ^{a,b}	107,13 ^{a,b}	112,99 ^b	106,63 ^b	90,65 ^{a,b}	92,58 ^{a,b}	2,56	0,026
CO₂ ml/g MS	86,26 ^a	95,82 ^b	97,37 ^c	97,87 ^c	87,25 ^a	86,91 ^a	87,02 ^a	86,25 ^a	86,59 ^a	86,11 ^a	0,78	0,0001
CO₂ ml/g MO	87,91 ^a	104,22 ^{a,b}	110,08 ^b	119,33 ^{b,c}	96,17 ^{a,b}	115,24 ^{a,b}	121,54 ^b	114,70 ^b	97,51 ^{a,b}	99,59 ^{a,b}	2,75	0,026
CO₂ ml/g MOD	139,86 ^a	177,93 ^{a,b}	202,42 ^{b,c}	227,53 ^c	162,07 ^{a,b}	192,20 ^{a,b}	211,58 ^b	177,02 ^a	148,00 ^a	164,99 ^a	5,51	0,0001
PF	6,21 ^a	5,38 ^{a,b}	4,87 ^{a,b}	4,32 ^b	5,39 ^{a,b}	4,56 ^b	4,18 ^{b,c}	4,98 ^a	5,86 ^a	5,23 ^a	0,14	0,0001

^{a,b,c} moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes ($p < 0,05$) ; les tests sont ajustés pour toutes les comparaisons par paire au sein d'une ligne de chaque sous-table la plus interne, à l'aide de la correction de Bonferroni. ; P : probabilité ; S.E.M : L'erreur standard des moyennes.

dégradation meilleure du substrat (Akanmu *et al.*, 2017).

III.2. Production de méthane (CH₄)

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

Les gaz majoritairement produits lors des fermentations sont du méthane (CH₄) et du gaz carbonique (CO₂), leur volumes après 24h de fermentation sont statistiquement différent après addition des extraits d'*Eucalyptus* (P<0,05) (tableau 13). Il apparait que le CO₂ est produit en un volume supérieur à celui du CH₄ pour toutes les doses testées.

Chouinard (2000) a rapporté que tous les animaux d'élevage produisent du CH₄ et du CO₂ par la dégradation anaérobie de la biomasse ingérée. Le CO₂ est produit soit directement de la dégradation des hydrates de carbonés de l'aliment, soit indirectement à partir des sels (HCO₃) présents dans la salive artificielle lors de la neutralisation de l'acidité induite par la production des AGV (Archimede *et al.*, 1999). Ce gaz représente environ plus de la moitié du volume total du gaz produit dans le cas de l'utilisation du tampon de Menke (Menke and Steingass, 1988). Par ailleurs, des travaux ont montré que les concentrations de CH₄ et de CO₂ évoluent en sens inverse au cours de la journée : les concentrations de l'un étant maximales dans le contenu ruminal au moment où les concentrations de l'autre sont minimales (Vermorel, 1995a).

Nos résultats concernant la production de méthane sont très intéressants et présentés dans le tableau 13. L'extrait *AcOEt* a diminué de façon constante la production de CH₄. Cette activité est être due aux tanins ou des flavonoïdes de l'extrait acétate qui sont des flavonoïdes glycosylés. Des résultats analogues ont été enregistrés par Chaudhary et Gupta (2013) qui ont rapporté une réduction de la production de méthane *in vitro* (<15%) due à l'extrait méthanolique d'*Eucalyptus globulus* par rapport au témoin. Les mêmes constatations sont *in vivo* sur des vaches recevant 100 g / jours de farine de feuilles d'*Eucalyptus* (Manh *et al.*, 2012). Les auteurs ont conclu que les feuilles d'*Eucalyptus* réduisaient l'émission de méthane (CH₄ estimée à partir de la production d'AGV) dans le rumen des bovins sans affecter la digestibilité des nutriments.

Concernant la production de méthane, seul l'extrait *AcOEt* a diminué significativement la production de CH₄ et pour toutes les concentrations (P <0,05). Cette réduction est dose-dépendante (83,6, 90,7 et 93,4% respectivement pour les doses D50, D75 et D100). Au contraire, pour les extraits *BuOH* et *aqueux*, une augmentation de la production de méthane est observée comparativement au témoin, mais les différences ne sont pas statistiquement significatives (P > 0,05).

Comme il est connu, le solvant acétate d'éthyle permet de dissoudre principalement des composés hydroxylés principalement de flavonoïdes glycosylés. Ces fractions ont l'affinité de se lier glycoalyx des bactéries, ce qui pourrait limiter la fixation des Archaea-bactéries aux protozoaires qui leur fournissent de l'hydrogène. De plus, ce volume élevé de CH₄ enregistré pour les extraits *BuOH* et *aqueux* comme suggéré par Dey *et al.* (2014), pourrait être dû au taux de fermentation rapide et la production excessive d'hydrogène (H₂) dans le rumen qui est naturellement converti en CH₄ par les méthanobactéries.

En conséquence, la différence dans la production de méthane entre les extraits d'*Eucalyptus* peut être attribuée à la composition et la concentration différente de ces composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et les tanins) et aux effets synergiques et/ou antagonistes de ces composés secondaires de nos extraits. Cette considération soutient des études antérieures qui suggèrent que le potentiel des flavonoïdes dans la réduction du CH₄ est lié au nombre et à la position des groupes hydroxyle et à la présence de groupes aliphatiques et glycosylés dans leur structure dont l'activité antimicrobienne se manifeste généralement par l'inhibition de la fonction de la membrane cytoplasmique, de la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne ou de la synthèse des acides nucléiques (Cushnie et Lamb, 2011). En outre, les interactions avec d'autres composés présents dans les extraits (tels que les tanins) doivent également être prises en compte (Makkar, 2003 ; Oskoueian *et al.*, 2013 Amokrane *et al.*, 2016).

Le méthane est positivement corrélé à la production de C2 et C4 (r = 0,720, P <0,01 et r= 0,595, P <0,05 respectivement). Alors qu'il est négativement corrélé à la production de C3 (r= 0,591, P <0,05) (annexe 5). Ce résultat est conforme à l'idée que la production de propionate et la méthanogenèse sont deux voix compétitives et alternatives pour régénérer les co-facteurs oxydés dans le rumen.

III.3. Facteur de partition (PF)

L'inclusion de l'extrait *AcOEt* et *BuOH* dans les systèmes de fermentation à également diminué le facteur de partition (PF). Cependant, l'extrait *aqueux* n'a aucun effet significatif sur le PF (tableau 13).

Dans la présente étude, seuls les extraits *AcOEt* ont influencé statistiquement le facteur de partition. Ce paramètre (rapport de la matière organique dégradée en mg par le volume de gaz produit en ml) est un indicateur de l'efficacité de fermentation; avec la même quantité de substrat dégradable, lorsque le facteur de partition est plus petit, plus de gaz est produit et moins de substrat est utilisé pour la production des AGV ou de la biomasse microbienne. Dans cette étude, les valeurs PF observées pour tous les extraits ont été supérieures à la valeur maximale théoriquement possible (4,41 mg / ml) basée sur le calcul stœchiométrique de Blümmel *et al.*, (1997). Selon Makkar *et al.*, (1997), ces valeurs élevées de PF sont dus à la capacité des tanins à former des complexes avec les protéines, qui sont majoritairement insolubles dans une solution détergente neutre et par conséquent, pourraient contribuer à la fraction non dégradable. Conformément à nos conclusions, Sobhy *et al.*, (2010) ont rapporté des valeurs PF comparables pour des feuilles fraîches d'*Eucalyptus citriodora* (6,1 mg / ml) et des feuilles résiduelles (5,7 mg / ml) incubées comme substrats après extraction d'huile essentielle de feuilles d'*Eucalyptus* après 24 h d'incubation avec du liquide ruminal des ovins.

III.4. Digestibilité apparente *in vitro* de la matière sèche (DMS) et de la matière organique (DMO) et estimation de l'énergie métabolisable

La dégradabilité de la matière sèche (DMS) ainsi que celle de la matière organique (DMO) ont été affecté par l'ajout des extraits d'*Eucalyptus* (tableau 14), même si ce n'est pas la même tendance pour les trois types d'extraits. En particulier, pour l'extrait *AcOEt*, la DMS et la DMO ont été significativement diminué ($P < 0,05$) pour la D75 et la D100 par rapport à D0; inversement, pour l'extrait *BuOH* et *aqueux*, les valeurs de (DMO) étaient comparables à D0 ($P > 0,05$).

Dans la présente étude, l'ajout des extraits d'*Eucalyptus* a influencé la digestibilité apparente de la matière sèche (DMS) et de la matière organique (DMO), de la même façon que Sirohi *et al.*, (2012) qui ont observé une diminution significative de la digestibilité de la matière sèche *in vitro* par rapport au témoin en raison de l'ajout de différents extraits méthanoliques de plantes. Prayitno *et al.*, (2016) ont signalé que les extraits d'ail ont affecté

fortement et significativement la digestibilité de la matière sèche et de la matière organique *in vivo* chez des vaches laitières en lactation. Cependant, une différente tendance a été inversement observée *in vivo* chez les bovins ayant reçu *Eucalyptus camaldulensis* en complément de la paille de riz (Manh *et al.* 2012); les auteurs ont indiqué que l'addition d'*Eucalyptus* n'affecte pas le coefficient de digestibilité mais avait des effets négatifs sur la palatabilité (l'ingestion), probablement en raison de la teneur élevée en composés phénoliques de l'*Eucalyptus*. Dans notre étude, la réduction de la digestibilité est due à l'activité des composés phénoliques présents dans les extraits car des corrélations négatives sont notées entre la DMO et les PT ($r = -0,805$, $P < 0,01$), FT ($r = -0,838$, $P < 0,01$) et TT ($r = -0,833$, $P < 0,01$) (annexe 6).

Les extraits d'*Eucalyptus* n'ont pas affecté l'énergie métabolisable estimée par rapport au témoin ($P > 0,05$). Une méta analyse réalisée sur 101 expérimentations et 290 traitements a permis de montrer que la part d'énergie métabolisable perdue sous forme de CH_4 diminue significativement lorsque la proportion de concentré (ou de céréales) représente plus de 40% de la ration (Sauvant and Giger-Reverdin, 2007). Dans notre cas, le substrat utilisé dans les batch contient justement 40% de concentré.

Une forte corrélation positive est observé entre l'énergie métabolisable et la production du gaz GP24 ($r = 1,00$, $P < 0,01$) (annexe 6), puisque à la base ce paramètre est estimé à partir de la production de gaz, des protéines bruts et de des matières grasses (Menke and Steingass, 1988).

Tableau 14 : Effet des extraits d'Eucalyptus à différentes doses sur la digestibilité apparente de la matière sèche et de la matière organique et de l'énergie métabolisable après 24 heures fermentation *in vitro*.

Paramètres	Extraits <i>Eucalyptus globulus. L</i> (mg)									S.E.M	P-value	
	<i>AcOEt</i>				<i>BuOH</i>			<i>Aqueux</i>				
	D0	D50	D75	D100	D50	D75	D100	D50	D75			D100
DMS (%)	63,75 ^a	59,04 ^{a,b}	55,24 ^{b,c}	53,23 ^c	59,59 ^a	60,44 ^a	57,59 ^a	65,26 ^a	66,39 ^a	60,88 ^a	0,76	0,0001
DMO (%)	62,97 ^a	58,64 ^{a,b}	54,46 ^{b,c}	52,15 ^c	59,24 ^a	60,01 ^a	57,14 ^a	64,83 ^a	65,99 ^a	60,40 ^a	0,76	0,0001
EM (MJ/Kg MS)	5,64 ^a	5,82 ^a	5,94 ^a	6,17 ^a	5,85 ^a	6,47 ^a	6,65 ^a	6,47 ^a	5,93 ^a	6,02 ^a	0,08	0,054

^{a,b,c} moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes ($p < 0,05$) ; les tests sont ajustés pour toutes les comparaisons par paire au sein d'une ligne de chaque sous-table la plus interne, à l'aide de la correction de Bonferroni. ; P : probabilité ; S.E.M : L'erreur standard des moyennes.

IV. L'effet des extraits d'*Eucalyptus globulus. L* sur les produits finaux de fermentation *in vitro*

Les résultats des produits finaux de la fermentation *in vitro* (pH, ammoniacque et biomasse microbienne) sont indiqués dans le tableau 15.

IV.1. Le pH

Le pH est un paramètre très important dans la régulation et l'optimisation des fermentations ruminales. Le pH du jus de rumen fraîchement collecté est de 6,23. Cette valeur indique des conditions physico-chimiques favorables à une bonne activité fermentaire du microbiote ruminal. Après l'addition de la salive artificielle, une légère augmentation de pH a été constatée. Le pH du mélange jus du rumen/salive artificielle a atteint une valeur moyenne de 6,72. Cette augmentation de pH peut être expliquée par l'effet tampon de la salive artificielle qui contribue à la neutralisation de l'acidité du milieu (Mould *et al.*, 2005).

L'addition des extraits d'*Eucalyptus* et aux différentes doses n'affecte pas les valeurs de pH dans le liquide des fermentations à la fin de l'incubation *in vitro* (après 24 h) par rapport au témoin (D0), sauf pour les extraits aqueux où une légère diminution ($P < 0,05$) des valeurs de pH a été notée pour les concentrations de D75 et D100. Cette légère acidification relative du milieu de fermentation pour la culture supplémentée avec l'extrait *aqueux* est essentiellement due à l'accumulation des acides gras volatiles (AGV) et de l'acide lactique comme produit final de fermentation dans le milieu (Bernard *et al.*, 2001 ; Madrid *et al.*, 2002).

Dans l'ensemble, pour tous les extraits d'*Eucalyptus*, les valeurs de pH sont comprises entre (6,66 et 6,76), elles restent donc dans l'intervalle favorable à la croissance et de l'activité cellulolytique du microbiote ruminal (Ørskov et Ryle, 1990).

Tableau 15: Effet des extraits d'*Eucalyptus* à différentes doses sur le pH, l'azote ammoniacal (N-NH₃) et l'estimation de la biomasse microbienne (BM) après 24 heures fermentation *in vitro*.

Paramètres	Extraits <i>Eucalyptus globulus. L</i> (mg)									S.E.M	P-value	
	<i>AcOEt</i>				<i>BuOH</i>			<i>Aqueux</i>				
	D0	D50	D75	D100	D50	D75	D100	D50	D75			D100
pH	6,72 ^a	6,75 ^a	6,75 ^a	6,76 ^a	6,71 ^a	6,70 ^a	6,70 ^a	6,68 ^b	6,66 ^b	6,70 ^{a,b}	0,01	0,019
N-NH₃ (mM/g)	60,01 ^a	32,24 ^b	24,18 ^{b,c}	22,67 ^c	23,05 ^b	38,65 ^c	25,77 ^b	39,76 ^b	38,02 ^b	34,86 ^b	2,42	0,0001
BM (mg)	195,53 ^a	208,25 ^a	216,46 ^a	232,94 ^a	210,50 ^a	254,01 ^a	266,74 ^a	254,05 ^a	215,81 ^a	221,76 ^a	5,65	0,056

^{a,b,c} moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes ($p < 0,05$) ; les tests sont ajustés pour toutes les comparaisons par paire au sein d'une ligne de chaque sous-table la plus interne, à l'aide de la correction de Bonferroni. ; P : probabilité ; S.E.M : L'erreur standard des moyennes.

IV.2. L'azote ammoniacal (N-NH₃)

Selon Serment *et al.*, (2011), la concentration en ammoniacque (N-NH₃) est un compartiment intermédiaire entre la dégradation des protéines et l'utilisation de l'azote pour la croissance microbienne. Pour tous les extraits et pour toutes les concentrations, la production de N-NH₃ a diminué significativement par rapport au témoin (P <0,05). Excepté pour l'extrait *AcOEt*, cette diminution est dose dépendante. Nos résultats corroborent parfaitement avec ceux de Santana *et al.*, (2012) qui ont observé que l'extrait éthanolique d'*Eucalyptus* présentait une qualité de modulateur de la fermentation dans le rumen, toute en diminuant la dégradation de l'azote sans affecter les valeurs de pH.

Les références concernant la production de l'azote ammoniacal *in vitro* pour des extraits d'*Eucalyptus* sont rares, mais de nombreuses recherches ont été menées pour évaluer l'effet des huiles essentielles sur la fermentation *in vitro* (Salem *et al.* 2014, Sirohi *et al.* 2012); ces auteurs ont noté que les huiles essentielles d'*Eucalyptus* diminuait la production de N-NH₃. Manh *et al.*, (2012) ont également observé que la supplémentation de la ration des bovins par des feuilles d'*Eucalyptus* diminuait significativement la production de l'ammoniacque *in vivo* dans le jus du rumen.

Les faibles concentrations de N-NH₃ présentées dans cette étude peuvent témoigner d'une grande utilisation d'ammoniacque pour la croissance microbienne, validée par les valeurs du PF enregistrées.

Comme il est connu, la concentration d'azote ammoniacal est directement liée à la dégradation des composés azotés des substrats par les microorganismes du rumen (Van Soest, 1994). Une diminution de la concentration en N-NH₃ pourrait s'expliquer aussi par une action spécifique des extraits d'*Eucalyptus globulus* sur un groupe bactérien appelé « bactéries productrices de l'hyper-ammonium » tels que: *Clostridium sticklandii*, *Anaerobius peptostreptococcus* et *Clostridium aminophilum*. Ce groupe de bactéries, bien qu'il soit présent en faible nombre dans le rumen, est responsable de jusqu'à 50% de la désamination (Russell *et al.* 1991). L'inhibition de ce groupe de bactéries pourrait être due une diminution de la désamination des acides aminés et de la concentration de N-NH₃ comme le suggèrent de nombreux auteurs (Sallam *et al.*, 2009, Broderick et Balthrop, 1979, Cardozo *et al.*, 2004).

Ce résultat est confirmé par les travaux de Blummel *et al.*, (1997) stipulant que la dégradation de la masse protéique alimentaire conduit essentiellement à la production

d'ammoniaque et la biomasse microbienne. L'effet corrélatif positif significatif enregistré entre le N-NH₃ et le PF ($r=0,696$, $P<0,05$) pourrait justifier ce constat. En effet, nos résultats sont en accord avec ceux de (Min *et al.*, 2003 ; Durmic *et al.*, 2010 ; Goel and Makkar, 2012) ayant signalé l'effet négatif des métabolites secondaires sur la protéolyse ruminale *in vitro* via leur capacité à se lier avec les protéines ruminales en provoquant leur inactivation. Similairement, dans notre étude, les phénols totaux et les flavonoïdes affectent négativement et significativement la production ruminale de l'ammoniaque ($r=-0,694$, $r=-0,728$, $P<0,05$ respectivement).

IV.3. Rendement de la biomasse microbienne (BM)

L'addition des extraits d'*Eucalyptus* n'a pas affecté la production de la biomasse microbienne (BM) par rapport au témoin ($P> 0,05$). Comme ce paramètre est estimé sur la base de la production de gaz et de la matière organique dégradée et combiné au PF ($r= -0,879$, $P<0,01$) (annexe 4), il semble que l'extrait *AcOEt* agit sur l'équilibre des microorganismes du rumen.

En effet, Thao *et al.*, (2015), en utilisant la technique du comptage direct et du tube en rouleau, ont noté que la supplémentation en poudre d'*Eucalyptus* n'affecte pas les bactéries viables et les zoospores fongiques ; en revanche, les bactéries protéolytiques et les protozoaires étaient significativement diminués suite à l'ajout de la farine d'*Eucalyptus*, ce qui est en accord avec nos résultats.

IV.4. La production des acides gras volatils (AGV)

Le profil des acides gras volatils totaux, des proportions molaires des AGV (%) et le ratio molaire (C2/C3) et les BCP après 24 heures de fermentation *in vitro* est présenté dans le tableau 16.

Il ressort que l'addition des extraits d'*Eucalyptus* n'a pas affecté significativement la production des AGV totaux (AGV_t) ($P >0,05$), il est important de noter une légère diminution des valeurs des AGV pour les extraits *AcOEt* d'*Eucalyptus* par rapport au témoin. Cependant, pour les extraits *BuOH* pour la D100 et *aqueux* pour la D75 et la D100 pour lesquels un accroissement a été observé (tableau 16).

Tableau 16 : Effet des extraits d'*Eucalyptus* à différentes doses sur le profil des acides gras volatils totaux (mM/g), les concentrations molaires des AGV (mM/g), le ratio molaire et les BCP après 24 heures de fermentation *in vitro*.

Paramètres	Extraits <i>Eucalyptus globulus. L</i> (mg)									S.E.M	P-value	
	<i>AcOEt</i>				<i>BuOH</i>			<i>Aqueux</i>				
	D0	D50	D75	D100	D50	D75	D100	D50	D75			D100
AGV _t (mM/g)	88,35 ^a	81,65 ^a	69,7 ^a	81,76 ^a	86,68 ^a	81,34 ^a	91,01 ^a	81,71 ^a	93,00 ^a	92,0 ^a	3,37	0,224
Acétate C2	52,01 ^a	43,37 ^{a,b}	41,87 ^b	45,79 ^{a,b}	51,54 ^a	46,89 ^a	53,32 ^a	47,51 ^a	55,62 ^a	55,4 ^a	1,63	0,550
Propionate C3	23,73 ^a	27,36 ^a	24,81 ^a	28,10 ^a	25,57 ^a	24,86 ^a	26,92 ^a	23,09 ^a	26,14 ^a	25,6 ^a	0,61	0,334
Butyrate C4	9,09 ^a	8,55 ^a	6,30 ^b	5,66 ^b	7,43 ^b	7,39 ^b	8,50 ^{a,b}	8,40 ^a	8,61 ^a	8,28 ^a	0,19	0,0001
Iso-Butyrate	0,62 ^a	0,38 ^b	0,34 ^b	0,36 ^b	0,39 ^b	0,35 ^b	0,38 ^b	0,46 ^b	0,44 ^b	0,46 ^b	0,02	0,0001
Valerate	1,70 ^a	1,48 ^a	1,15 ^a	1,37 ^a	1,15 ^a	1,21 ^a	1,25 ^a	1,48 ^a	1,34 ^a	1,21 ^a	0,05	0,066
Iso-Valerate	1,21 ^a	0,52 ^b	0,39 ^b	0,49 ^b	0,59 ^b	0,63 ^b	0,64 ^b	0,77 ^b	0,86 ^b	0,85 ^b	0,05	0,0001
C2/C3	2,21 ^a	1,59 ^b	1,69 ^b	1,63 ^b	2,02 ^a	1,88 ^a	1,98 ^a	2,06 ^a	2,13 ^a	2,17 ^a	0,15	0,0001
BCP	2,07 ^a	1,10 ^b	1,04 ^b	1,04 ^b	1,14 ^b	1,21 ^b	1,12 ^b	1,50 ^{a,b}	1,39 ^b	1,49 ^{a,b}	0,07	0,0001

BCP : Concentration d'acides gras à chaîne ramifiée = (isobutyrique + isovalérique) /AGV_t ;

^{a,b,c} moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes ($p < 0,05$) ; les tests sont ajustés pour toutes les comparaisons par paire au sein d'une ligne de chaque sous-table la plus interne, à l'aide de la correction de Bonferroni. ; P : probabilité ; S.E.M : L'erreur standard des moyennes.

Compte tenu de la proportion molaire de chaque acide gras volatile, les résultats indiquent que l'inclusion des extraits d'*Eucalyptus* induit une légère diminution de la concentration en acétate uniquement pour l'extrait *AcOEt* mais elle n'est pas significative ($P > 0.05$). Cette décroissance est parallèlement accompagnée d'une légère augmentation dans la concentration du propionate. Cette situation l'a déjà évoqué Busquet *et al.*, (2006) et elle est conforme aux études antérieures *in vitro* sur l'effet des extraits végétaux sur le profil des AGV menées par plusieurs auteurs (Hess *et al.*, 2003, Hristov *et al.*, 2003, Patra *et al.*, 2006, Sirohi *et al.*, 2012).

En ce qui concerne le butyrate, tous les extraits d'*Eucalyptus* ont diminué sa production ($P < 0,01$) excepté l'extrait *aqueux*. Le même effet est observé pour les acides gras à chaîne ramifiée (isobutyrique et isovalérique) dont la diminution de leur proportion dans les AGV totaux (BCP) est significative ($P < 0,001$). Le rapport C2/C3 n'est affecté que par l'extrait *AcOEt* et il est significativement inférieur à la valeur du témoin ($P < 0,01$).

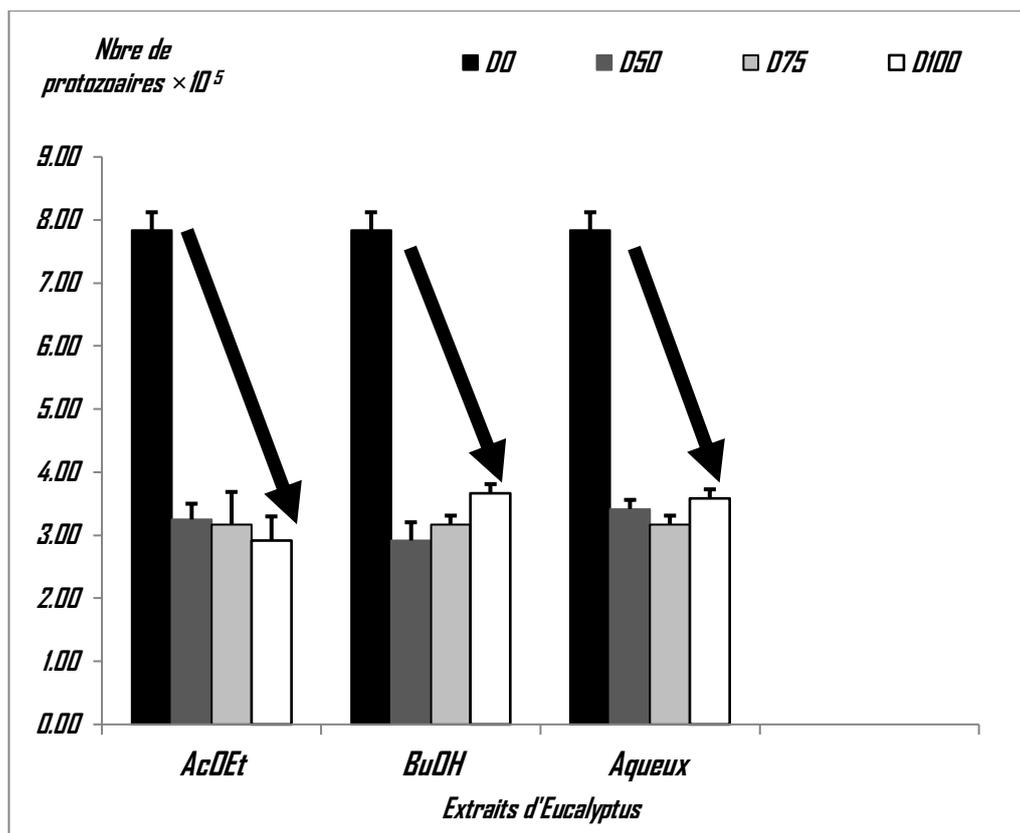
Il a été précédemment rapporté dans la littérature que la production du méthane dans le rumen est étroitement liée au rapport C2/C3 et que la diminution du méthane a conduit à une proportion molaire de propionate plus élevée et par conséquent, à un rapport C2/C3 plus faible (Amokrane *et al.*, 2016, Nellot *et al.*, 1997, Mitsumori et Sun, 2008). De ce fait, la diminution observée dans la production de CH₄ pour l'extrait *AcOEt* peut être attribuée principalement à un rapport NADH / NAD⁺ élevé (Amokrane *et al.*, 2016; Miller, 1995).

L'analyse de la matrice des corrélations montre une corrélation positive significative entre la concentration du C2 et C4 et les AGV_t, puisque on sait très bien que ces deux AGV majeurs sont impliqués efficacement dans la production de H₂, contrairement au C3 qui est impliqué dans l'utilisation de H₂. Les tanins totaux ont montré un effet corrélatif significatif et négatif sur le processus de production des AGV totaux de même que pour l'acétate ($r = -0,679$, $P < 0,01$; $r = 0,800$, $P < 0,01$) respectivement. Ce résultat confirme l'effet négatif des tanins sur la production des AGV. Ainsi que, l'impact négatif des composés phénoliques sur l'orientation des voies fermentaires via le rapport C2/C3. En effet, des corrélations négatives sont notées entre les composés phénoliques (PT, FT, TT) et le rapport C2/C3 ($r = -0,808$, $P < 0,01$; $r = -0,839$, $P < 0,01$; $r = -0,969$, $P < 0,01$) respectivement.

V. L'effet des extraits d'*Eucalyptus globulus. L* sur la population des protozoaires

Comme le montre la figure 27, tous les extraits d'*Eucalyptus* induisent une diminution dans la population des protozoaires après 24 h d'incubation. Le nombre total de protozoaires pour tous les extraits d'*E. globulus* est considérablement plus faible que le témoin. Cependant, l'effet est différent selon le type d'extrait et de la dose utilisée ; pour l'extrait *AcOEt*, la plus forte réduction est notée pour la D100 (64,9%), tandis que pour l'extrait *BuOH* pour la D50 et pour l'extrait *aqueux* pour la D75. La diminution du nombre total de protozoaires est probablement due aux activités anti-protozoaires des métabolites secondaires contenus dans les extraits d'*Eucalyptus* (Agarwal *et al.*, 2009; Benchaar *et al.*, 2008), cette action se traduit par une réduction des bactéries méthanogènes, qui vivent libres en phase aqueuse ou fixées aux protozoaires (Newbold *et al.*, 1995), Benchaar *et al.*, (2008) et Morgavi *et al.*, (2010) ont précisé que la diminution du nombre de producteurs d'hydrogène (H_2), comme les protozoaires, dans le rumen est une approche importante pour réduire les émissions de CH_4 . Pour cette raison, la diminution du nombre de protozoaires et le déclin de la production de méthane suite à l'ajout de l'extrait *AcOEt* pourraient être dus à la réduction de l'apport d'hydrogène pour les bactéries méthanogènes. Parmi la communauté de protozoaires, il est bien documenté que les protozoaires ciliés du rumen sont de puissants microorganismes producteurs de H_2 (Sobhy *et al.*, 2010 ; Jouany et Lassalas, 2000).

Dans notre étude, le nombre de protozoaires est diminué pour tous les extraits, mais la production de CH_4 est affectée seulement pour l'extrait *AcOEt*. Cet effet antagoniste remarqué pour les extraits *BuOH* et *aqueux* pourrait s'expliquer par la nature des métabolites secondaires présents dans chaque extrait. Effectivement, Kamra *et al.*, (2005) et Sobhy *et al.*, (2010) indiquent que les espèces végétales et les composés végétaux secondaires peuvent différer dans leurs activités anti-méthanogènes et anti-protozoaires en raison de la source différente, ainsi que le niveau d'inclusion. Au contraire, Goel *et al.*, (2007) ont précisé qu'il n'y a pas de corrélation *in vitro* entre les bactéries méthanogènes et la population de protozoaires et la production de méthane. D'autres études sont donc nécessaires pour mieux comprendre la relation entre la population microbienne et la production de méthane dans le rumen.



D0, D50, D75 et D100: 0 (témoin), 50, 75 et 100 mg d'extrait ajouté dans les flacons de culture, respectivement.

Figure 27: Effet des extraits d'*Eucalyptus globulus. L* à différentes doses sur la population des protozoaires après 24 h d'incubation *in vitro*.

Nous avons établie une forte corrélation entre les protozoaires et la production de l'ammoniac. Il en ressort que le taux des protozoaires est positivement et significativement corrélé à la concentration en ammoniac ($r= 0,917$, $P<0,01$) (annexe 7), donc la prolifération des protozoaires est stimulé par une production accrue en ammoniac, ce qui pourrait justifier dans notre cas la réduction dans la population des protozoaires en réponse à la baisse de la concentration en N-NH₃ dans le milieu de culture par rapport au témoin.

VI. Stœchiométrie des fermentations après addition des extraits d'*Eucalyptus globulus. L*

La stœchiométrie du C et H dans la fermentation ruminale est un point clé pour comprendre la répartition des composés diététiques dégradables entre les produits de fermentation utiles (acides gras volatils (AGV) et biomasse microbienne) et les déchets tels que le méthane (CH₄) et le dioxyde de carbone (CO₂). Dans ce contexte, les méthodes d'estimation *in vitro* peuvent être utiles car les productions d'AGV et de gaz sont beaucoup plus faciles à mesurer que par les méthodes *in vivo*.

La fermentation du substrat avec une composition glucidique correspondant à un régime avec 40 % de concentré, avec ou sans addition d'extraits de plantes, a été étudiée *in vitro* avec la technique de production de gaz *in vitro* (IVGPT). La production d'AGV a été mesurée après 24 heures d'incubation, ainsi que la production et la composition du gaz (CH₄, CO₂) ont été calculées à partir de la production des AGV selon les relations stœchiométriques classiques citées précédemment dans le chapitre matériels et méthodes.

La production de gaz *in vitro* a deux origines: dégradation des substrats (gaz direct) et tamponnement des AGV (gaz indirect). Après 24h heures d'incubation, la production de gaz résultant de la fermentation du substrat en présence d'extraits d'*E. globulus* est essentiellement composée de dioxyde de carbone (CO₂ mesuré) (tableau 17). Le volume de CO₂ produit varie entre 3,35 et 4,63 mmol/g MS. En effet, le dioxyde de carbone est produit soit directement de la dégradation des substrats organiques de l'aliment par le microbiote ruminal soit indirectement à partir de la salive artificielle pour neutraliser l'acidité induite par la production des AGV. De plus, les coefficients stœchiométriques choisis ont surestimé la production théorique de CH₄ par rapport à la production mesurée (tableau 17). Cela peut remettre en question cette façon habituelle de modéliser la production de CH₄.

En admettant que 1 mmol des AGV produits à partir du système fermentaire génère 0.87- 1.0 mmol du CO₂ à partir du système tampon à base de bicarbonate (Beuvink and Spoelstra, 1992; Blümmel et Ørskov, 1993). Dans notre étude, en se basant sur les données prédites, nous constatons que le gaz indirect (CO₂) produit dans les systèmes batch après 24h d'incubation représente entre 50,50 et 55.76 % de la production totale du gaz estimé. Les résultats obtenus recourent ceux de Blümmel et Ørskov (1993) rapportant un pourcentage de gaz indirect 53.6% du gaz total à l'issue de la fermentation de la paille pendant 24h. Ainsi, Blümmel *et al.*, (1999) ayant observé des proportions de gaz indirect entre 49 et 56 % lors de la fermentation *in vitro* de 55 substrats. Dans le même contexte, Getachew *et al.*, (1998) stipule qu' à partir d'une ration à base de fourrage, le gaz indirect produit à partir du bicarbonate du tampon représente 50% du gaz total, néanmoins, cette production s'élève à 60% dans le cas des rations à base de concentré.

En contrepartie, les données réelles calculées à partir de nos essais révèlent une surestimation de la quantité du gaz indirect (CO₂) produite à partir du système tampon utilisé. Etant donné que le système tampon utilisé dans notre étude contient des bicarbonates ainsi que des phosphates, et que la réaction des AGV avec les phosphates, contrairement à celle des

bicarbonates, ne produit pas de gaz, nous ne supposons qu'une partie considérable des AGV produits à partir de la fermentation de notre substrat en présence d'extraits d'*E. globulus* à réagit plutôt avec le phosphate qu'avec le bicarbonate. Similaire à nos résultats, Beuvink and Spoelstra (1992) ont estimé que 13% des AGV produits ont été réagi avec les phosphates du système tampon. De ce fait, nous suggérons que la plus grande partie du méthane produit dans nos essais est à l'origine un CO₂ provenant de la fermentation des constituants du substrat testé et non plus du système tampon. Ces résultats sont confirmés, dans notre étude, par l'absence d'un effet corrélatif entre la production du gaz et la production des AGV (Annexe 5), et ils sont incohérents avec ceux de Blümmel et Ørskov (1993) ayant rapporté l'association étroite entre la production du gaz et la production des AGV *in vitro*. Autrement dit, la prédiction des quantités des gaz produites au terme des fermentations à partir des concentrations définies des AGV majeurs pourrait être selon les données de notre étude, infiables et incompatibles, cela pourrait être dû aux conditions différentes des essais et les différentes techniques de mesure de gaz utilisées dans chaque essai.

L'analyse qualitative du pool gazeux, révélée par le rapport CO₂/CH₄, indique que ce ratio est compris entre 6,55 et 151,67. Le rapport le plus élevé a été noté après addition de l'extrait AcOEt d'*E. globulus*. La faible production de méthane observée pour les cultures supplémentées avec l'extrait AcOEt d'*E. globulus* conduit à s'interroger sur le devenir de l'hydrogène produit lors de la fermentation, est-il incorporé au méthane ou a d'autres voies? Pour vérifier cette situation, Le bilan d'hydrogène a été calculé; dans notre étude, il est compris entre 45,40 et 58,27 %, nos résultats ne corroborent pas avec ceux de Demeyer (1990) qui a déduit que le bilan d'hydrogène dans les conditions fermentaires normales doit être (> 78%). D'où il est possible de conclure que l'hydrogène produit lors de la dégradation de notre substrat en présence des extraits d'*Eucalyptus* n'est pas essentiellement incorporé en méthane.

Dans les conditions fermentaires normales l'hydrogène formé doit être éliminé au fur et à mesure de sa production puisqu'une élévation de sa pression partielle inhiberait l'action des déshydrogénases impliquées dans le processus de réoxydation des cofacteurs réduits (Miller 1995), l'utilisation continue de l'hydrogène dans le rumen est majoritairement assurée par les bactéries archaéméthanogènes pour réduire une partie du CO₂ en méthane (CH₄) ce qui n'est probablement produit ici. Cette situation pourrait être expliquée par l'existence d'autres voies métaboliques concurrentes pour l'utilisation de l'hydrogène, comme la synthèse de propionate, l'acétogénèse réductrice, la réduction des nitrates, des sulfates, ainsi que la

saturation des acides gras insaturés, constituent d'autres voies de fixation de l'hydrogène même si celles-ci sont considérées comme mineures par rapport à la méthanogénèse. Il est aussi admis qu'une réduction de 20% du méthane digestif ne perturbe pas les fonctions digestives ou fermentaires essentielles du rumen (Martin *et al.*, 2006). Au-delà de ce seuil, une réduction de la méthanogénèse ne peut être envisagée que si l'hydrogène peut-être métabolisé dans d'autres voies conduisant par exemple à la synthèse de propionate ou de butyrate pour éviter son accumulation dans les gaz de fermentation.

CO₂ estimé : $A/2+P/4+1.5*B$; **A** : production d'acétate (moles), **P** : production de propionate (moles), **B** : production de butyrate (moles) (Getachew *et al.*, 1998)

CH₄ estimé : $[A+2*B]-CO_2 \text{ estimé}$; **A** : production d'acétate (moles), **B** : production de butyrate (moles) (Getachew *et al.*, 1998)

Gas total estimé : CO₂ estimé + CH₄ estimé+ CO₂ indirect (1mmole CO₂ indirect = 0..87 mmoles AGVt) (Getachew *et al.*, 1998)

R : L'effet antimethanogenic relatif à l'ajout de chaque extrait (dose de quercetine) (Relative antimethanogenic effect).

R = μ test/ μ control (Lopez *et al.*, 2010) L'effet relatif (R) fournit une indication de la séparation comparative entre les moyens de test et de contrôle (μ):

Si R est égal à l'unité (R = 1), la valeur d'essai est identique au contrôle, les valeurs plus faibles (R < 1) indiquent une production décroissante dans le traitement d'essai comparativement au témoin, mais des valeurs plus élevées (R > 1) indiquent que le méthane a été augmenté en réponse à l'additif.

R' : Le pourcentage de réduction/d'augmentation de la production du méthane relatif à l'ajout de chaque substrat (relative **percentage** of increase (positive) or decrease (negative) in methane production

R' = $(\mu \text{ test} - \mu \text{ control})/\mu \text{ control}$ (Lopez *et al.*, 2010)

BH % = $TR H_2 = \frac{4M+2P+2B}{2A+P+4B} \times 100$ (Demeyer, 1990)

BH% : bilan d'hydrogène ; **TR H₂** : taux de récupération de l'hydrogène

M : production de méthane (mmoles) ; **P** : production de propionate (mmoles); **B** : production de butyrate (mmoles); **A** : roduction d'acétate (mmoles).

Tableau 17 : Stœchiométrie de la fermentation *in vitro* (mM/ g MS) et le taux de récupération d'hydrogène (%) après addition des différentes doses des extraits d'*Eucalyptus globulus. L* au substrat de référence en comparaison avec le contrôle.

Paramètres	Extrait <i>Eucalyptus globulus. L</i> (mg)										SEM	P-Value
	AcOEt				BuOH			Aqueux				
	D 0	D50	D75	D100	D50	D75	D100	D50	D75	D100		
CH ₄ mesuré	0,50 ^a	0,08 ^b	0,04 ^b	0,03 ^b	0,50 ^a	0,60 ^a	0,63 ^a	0,63 ^a	0,53 ^a	0,58 ^a	0,04	0,0001
CH ₄ estimé	2,46 ^a	1,91 ^a	1,98 ^a	1,91 ^a	2,08 ^a	2,23 ^a	2,42 ^a	2,22 ^a	2,56 ^a	2,42 ^a	0,05	0,005
CO ₂ mesuré	3,35 ^a	3,97 ^a	4,19 ^a	4,55 ^a	3,66 ^a	4,39 ^a	4,63 ^a	4,37 ^a	3,72 ^a	3,80 ^a	0,10	0,027
CO ₂ estimé	4,56 ^a	4,13 ^{a,b}	3,85 ^b	3,88 ^{b,c}	4,10 ^a	4,22 ^a	4,61 ^a	4,21 ^a	4,73 ^a	4,41 ^a	0,06	0,002
CO ₂ indirect	7,69 ^a	7,10 ^a	5,95 ^b	7,12 ^a	7,54 ^a	7,08 ^a	7,92 ^a	7,11 ^a	8,09 ^a	8,03 ^a	0,11	0,0001
Gaz total mesuré	4,19 ^a	4,46 ^a	4,64 ^a	4,98 ^a	4,50 ^a	5,44 ^a	5,72 ^a	5,44 ^a	4,62 ^a	4,76 ^a	0,12	0,054
Gaz total estimé	14,71 ^a	13,15 ^b	11,78 ^c	12,91 ^b	13,71 ^a	13,53 ^a	14,95 ^a	13,54 ^a	15,37 ^a	14,40 ^a	0,20	0,0001
CO ₂ /CH ₄	6,71 ^a	49,63 ^b	104,75 ^c	151,67 ^d	7,32 ^a	7,31 ^a	7,35 ^a	6,94 ^a	7,01 ^a	6,55 ^a	7,08	0,0001
CH ₄ /Gaz Total	0,12 ^a	0,02 ^b	0,01 ^b	0,01 ^b	0,11 ^a	0,11 ^a	0,11 ^a	0,12 ^a	0,12 ^a	0,12 ^a	0,01	0,0001
CH ₄ /AGV _t	0,06 ^a	0,01 ^b	0,01 ^b	0,001 ^b	0,06 ^a	0,07 ^a	0,07 ^a	0,08 ^a	0,06 ^a	0,06 ^a	0,00	0,0001
R	-	0,07	0,16	0,09	1,01	1,21	1,27	1,18	1,07	1,17	-	-
R'	-	- 0,84	- 0,91	- 0,93	0,01	- 0,40	0,27	1,19	1,11	1,13	-	-
BH (%)	52,13 ^a	50,63 ^a	45,40 ^a	47,97 ^a	58,03 ^a	57,77 ^a	57,53 ^a	58,27 ^a	53,00 ^a	54,43 ^a	0,90	0,019

^{a,b,c} moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes ($p < 0,05$) ; les tests sont ajustés pour toutes les comparaisons par paire au sein d'une ligne de chaque sous-table la plus interne, à l'aide de la correction de Bonferroni. ; P : probabilité ; S.E.M : L'erreur standard des moyennes.

VII. L'effet des extraits de feuilles d'olive (*Olea europaea. L*) sur les caractéristiques de la fermentation *in vitro*

VII.1. Production de gaz total (GP24)

Les paramètres de la production de gaz enregistrés sont mentionnés dans le tableau 18. Les données bibliographiques sur l'impact des extraits de feuilles d'olive sur la fermentescibilité *in vitro* dans le rumen sont rares. Cependant, de nombreuses études rapportent le pouvoir antiméthanogénique d'extraits naturels de plantes chez les ruminants (Bodas *et al.*, 2008, Durmic *et al.*, 2013, Shakeri *et al.*, 2016).

Dans le présent travail, l'extrait *AcOEt* de feuilles d'olives induit une augmentation significative de la production de gaz ($P < 0,01$). Une même tendance est observée pour l'extrait *aqueux*. En revanche, l'extrait *BuOH* n'influe pas la production de gaz après 24h. Ces résultats sont différents de ceux observés par Jafari *et al.*, (2016) qui rapportent un effet négatif sur la production de gaz.

Comme il est connu, la production de gaz est un bon indice microbien de l'activité fermentaire dans le rumen. Par conséquent, les résultats de la production de gaz (GP24) suggèrent une activité spécifique de nos extraits sur la fermentation microbienne ruminale.

VII.2. Production de méthane (CH₄)

L'extrait *AcOEt* induit une diminution importante de la production de méthane comparativement au témoin et le pourcentage de réduction est dose dépendant (2,88, 3,17 et 3,53% respectivement pour les concentrations D50, D75 et D100). Cette réduction de CH₄ été statistiquement significative ($P < 0,01$). En outre pour l'extrait *BuOH*, une réduction dans la production de méthane est notée, cependant, cette dernière n'est pas statistiquement significative ($P > 0,05$).

D'après Orskov and Mc.Donald, (1979) et Wolin (1975), la réduction du méthane est synonyme d'une augmentation de la production de propionate. Cette conclusion corrobore parfaitement avec les résultats enregistrés dans notre expérience. Ainsi pour l'extrait *AcOEt*, la réduction de la concentration en méthane dans le pool gazeux est accompagnée d'une augmentation du propionate (tableau 21). La même tendance est observée pour les extraits *BuOH* et *aqueux*. Pour ces derniers cas, cette augmentation de propionate est probablement due à la teneur élevée de ces deux extraits en sucres solubles.

Tableau 18: Effet des extraits de feuilles d'olive (*Olea europaea. L*) à différentes doses sur la production du gaz cumulative (VCSS, VCSC), le CH₄, CO₂ et le facteur de partition (PF) après 24 heures de fermentation *in vitro*.

Paramètres	Extraits <i>Olea europaea. L</i> (mg)										S.E.M	P-Value
	<i>AcOEt</i>				<i>BuOH</i>			<i>Aqueux</i>				
	D0	D50	D75	D100	D50	D75	D100	D50	D75	D100		
VCSS (ml /g MS)	99,35 ^a	102,57 ^a	115,24 ^b	116,96 ^b	103,96 ^a	98,08 ^a	103,63 ^a	99,43 ^a	112,22 ^{a,b}	99,35 ^a	1,47	0,0001
VCSC (ml/g MO)	106,86 ^a	110,33 ^a	123,96 ^b	125,81 ^b	111,83 ^a	105,50 ^a	111,47 ^a	106,95 ^a	120,72 ^{a,b}	106,86 ^a	1,58	0,0001
CH ₄ % Total Gaz	15,59 ^a	12,75 ^b	11,15 ^c	10,69 ^c	15,00 ^{a,b}	13,99 ^{b,c}	13,73 ^c	15,34 ^{a,b}	15,18 ^{a,b}	15,59 ^a	0,28	0,0001
CH ₄ ml/g MS	15,76 ^a	13,08 ^b	12,81 ^b	12,47 ^b	15,67 ^a	13,81 ^a	14,37 ^a	15,77 ^a	16,66 ^a	15,76 ^a	0,27	0,0001
CH ₄ ml/g MO	16,95 ^a	14,07 ^b	13,78 ^b	13,42 ^b	16,84 ^a	14,85 ^a	15,46 ^a	16,96 ^a	17,92 ^a	16,95 ^a	0,30	0,0001
CH ₄ ml/g MOD	30,59 ^a	26,20 ^a	29,14 ^a	27,64 ^a	31,94 ^a	28,74 ^a	31,19 ^a	28,95 ^a	32,11 ^{a,b}	30,59 ^a	0,56	0,015
CO ₂ % total gaz	81,72 ^a	86,02 ^a	98,82 ^b	99,09 ^b	86,66 ^a	82,35 ^a	87,38 ^a	84,75 ^a	90,54 ^{a,b}	81,72 ^a	1,21	0,0001
CO ₂ ml/g MS	80,85 ^a	83,88 ^b	85,97 ^b	84,91 ^b	83,03 ^b	83,27 ^b	83,43 ^b	82,46 ^b	82,51 ^b	80,85 ^a	0,28	0,0001
CO ₂ ml/g MO	87,90 ^a	92,52 ^a	106,29 ^b	106,58 ^b	93,22 ^a	88,58 ^a	93,99 ^a	91,16 ^a	97,40 ^{a,b}	87,90 ^a	1,30	0,0001
CO ₂ ml/g MOD	158,48 ^a	172,31 ^a	224,87 ^b	219,58 ^b	176,31 ^a	171,27 ^a	189,71 ^a	155,73 ^a	174,45 ^a	158,48 ^a	4,38	0,0001
PF Ratio	5,12 ^a	4,87 ^a	3,83 ^b	3,87 ^b	4,77 ^a	4,88 ^a	4,40 ^a	5,30 ^a	4,75 ^{a,b}	5,12 ^a	0,10	0,0001

^{a,b,c} moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes ($p < 0,05$) ; les tests sont ajustés pour toutes les comparaisons par paire au sein d'une ligne de chaque sous-table la plus interne, à l'aide de la correction de Bonferroni. ; P : probabilité ; S.E.M : L'erreur standard des moyennes.

VII.3. Facteur de partition (PF)

Les valeurs de PF calculées sont comprises entre 3,83 et 5,30. Pour l'extrait *AcOEt* où une production élevée en gaz est notée ; les valeurs de PF sont affectées (tableau 18). Cette réduction du PF est statistiquement significative pour les doses D75 et D100. Cette situation s'explique par l'orientation des fermentations soit vers la production des AGV ou de la biomasse microbienne. Tandis que pour les extraits *BuOH* et *aqueux*, les valeurs de PF sont comparables au témoin. Dans cette manipulation, les valeurs de PF observées pour tous les extraits sont supérieures à la valeur maximale théoriquement possible (4,41 mg / ml) basée sur le calcul stœchiométrique de Blümmel *et al.*, (1997) à l'exception pour la D75 et la D100 pour l'extrait *AcOEt*.

VII.4. Digestibilité apparente de la matière sèche (DMS) et de la matière organique (OMD) et de l'énergie métabolisable

Les résultats de la digestibilité apparente de la matière sèche et organique et de l'énergie métabolisable sont montrés dans le tableau 19. Pour les extraits *BuOH* et *aqueux*, la digestibilité de la matière organique (DMO) n'est pas significativement affectée. Dans le cas de l'extrait *aqueux*, ce paramètre est légèrement augmenté. Cependant, l'extrait *AcOEt* réduit significativement la DMO ($P < 0,05$) et la diminution la plus importante est enregistrée pour la D75. Seul l'extrait *AcOEt* a influencé positivement et significativement l'énergie métabolisable ($P < 0,05$). Contrairement pour les extraits *BuOH* et *aqueux* pour lesquels, ce paramètre reste comparable au témoin ($P > 0,05$).

Tableau 19 : Effet des extraits de feuilles d'olive (*Olea europaea. L*) à différentes doses sur la digestibilité apparente de la matière sèche et de la matière organique et de l'énergie métabolisable après 24 heures fermentation *in vitro*.

Paramètres	Extraits <i>Olea europaea. L</i> (mg)									S.E.M	P-value	
	<i>AcOEt</i>				<i>BuOH</i>			<i>Aqueux</i>				
	D0	D50	D75	D100	D50	D75	D100	D50	D75			D100
DMS (%)	55,58 ^a	54,76 ^{a,b}	48,26 ^b	49,93 ^{a,b}	53,66 ^a	51,51 ^a	47,86 ^a	57,72 ^a	57,95 ^a	55,58 ^a	0,76	0,026
DMO (%)	54,65 ^a	53,70 ^{a,b}	47,48 ^b	48,71 ^{a,b}	53,36 ^a	51,25 ^a	47,05 ^a	56,69 ^a	57,16 ^a	54,65 ^a	0,69	0,023
EM (MJ/Kg MS)	6,42 ^a	6,51 ^a	6,89 ^b	6,93 ^b	6,55 ^a	6,38 ^a	6,55 ^a	6,42 ^a	6,80 ^{a,b}	6,42 ^a	0,04	0,0001

^{a,b,c} moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes ($p < 0,05$) ; les tests sont ajustés pour toutes les comparaisons par paire au sein d'une ligne de chaque sous-table la plus interne, à l'aide de la correction de Bonferroni. ; P : probabilité ; S.E.M : L'erreur standard des moyennes.

VIII. L'effet des extraits de feuilles d'olive (*Olea europaea. L*) sur les produits finaux de fermentation *in vitro*

VIII.1. Le pH

Les valeurs de pH sont indiquées dans le tableau 20. Il ressort que seul l'extrait *AcOEt* a affecté les valeurs de pH ($P < 0,001$). Cependant, une légère augmentation des valeurs de pH a été notée pour l'extrait *BuOH* mais elle n'est pas statistiquement significative ($P > 0,05$). Pour les extraits *aqueux*, les valeurs du pH sont comparables au témoin et dans cette présente étude pour tous les traitements, les valeurs de pH varient entre 6,47 et 6,63. Le pH de l'environnement ruminal est la résultante de la production d'acide, des tampons salivaires et des tampons propre de la ration. Bien qu'il soit difficile de définir avec précision une plage précise, il est généralement admis que dans les conditions normales de fonctionnement du rumen, le pH se situe entre 6,0 et 7,0 (Remond *et al.*, 1995), ces valeurs étant considérées comme optimales pour maintenir une croissance normale et une bonne activité cellulolytique du microbiote ruminal (Ørskov and Ryle, 1990).

VIII.2. L'azote ammoniacal (N-NH₃)

Pour les trois extraits et pour les trois concentrations, la production d'azote ammoniacal est augmentée comparativement au témoin ($P < 0,01$), à l'exception de la D100 pour les extraits *AcOEt* et *aqueux* (tableau 20). Le N-NH₃ est un produit final de la dégradation des protéines dont une partie est consommée par le microbiote ruminal pour sa croissance. Selon Wallace *et al.*, (2002) l'usage des huiles essentielles végétales comme agent antimicrobien permet de moduler les activités de la population microbienne du rumen en réduisant la dégradation des protéines alimentaires et en améliorant l'échappement du N dans le rumen. Alors que dans notre étude, l'augmentation de la production d'ammoniaque avec les extraits de feuilles d'olivier par rapport au témoin pourrait probablement être attribuée à une inhibition sélective des microorganismes utilisateurs d'ammoniaque et suggèrent également, que les niveaux de ces extraits végétaux n'avaient aucun impact dramatique sur la désamination des acides aminés par les bactéries produisant de l'hyper-ammoniac (Castillejos *et al.*, 2005 ; Gunal *et al.*, 2014). Différemment, Jafari *et al.*, (2016) indiquent une diminution de la concentration *in vitro* de N-NH₃ par rapport à celle du témoin après addition des fractions de feuilles de papaye riches en composés phénoliques (extrait chloroformique et *AcOEt*). Cet effet est attribué à des groupes hydroxyle phénoliques (par exemple, tanins) qui peuvent réagir avec les protéines, formant des complexes tanin-protéine et empêchent ainsi leur

Tableau 20: Effet des extraits de feuilles d'olive (*Olea europaea. L*) à différentes doses sur le pH, l'azote ammoniacal (N-NH₃) et l'estimation de la biomasse microbienne (BM) après 24 heures fermentation *in vitro*.

Paramètres	Extraits <i>Olea europaea. L</i> (mg)										S.E.M	P-value
	<i>AcOEt</i>				<i>BuOH</i>			<i>Aqueux</i>				
	D0	D50	D75	D100	D50	D75	D100	D50	D75	D100		
pH	6,47 ^a	6,63 ^b	6,60 ^{b,c}	6,56 ^c	6,53 ^a	6,53 ^a	6,53 ^a	6,47 ^a	6,44 ^a	6,47 ^a	0,01	0,0001
N-NH₃ (mM/g)	62,11 ^a	89,20 ^b	62,40 ^a	50,13 ^a	71,80 ^a	64,78 ^a	69,88 ^a	72,26 ^{a,b}	76,82 ^a	62,11 ^a	1,83	0,0001
BM (mg)	212,73 ^a	211,21 ^a	236,65 ^b	240,41 ^b	214,20 ^a	203,69 ^a	215,67 ^a	212,75 ^a	236,75 ^b	212,73 ^a	2,84	0,0001

^{a,b,c} moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes ($p < 0,05$) ; les tests sont ajustés pour toutes les comparaisons par paire au sein d'une ligne de chaque sous-table la plus interne, à l'aide de la correction de Bonferroni. ; P : probabilité ; S.E.M : L'erreur standard des moyennes.

dégradation par les protéases. Cette constatation réconforte nos constatations car nos extraits contiennent une faible quantité des tanins (confirmé par l'analyse phytochimique de nos extraits).

VIII.3. Rendement de la biomasse microbienne (BM)

La quantification de la synthèse de la biomasse microbienne dans le rumen prend toute son importance dans la fermentation de la matière organique des aliments puisque la synthèse de la biomasse microbienne satisfait 70-85% de l'énergie et 70-100% des besoins en protéines des ruminants, ce qui nécessite de comprendre les facteurs alimentaires influençant la biomasse microbienne du rumen. La détermination des facteurs d'alimentation affectant la synthèse de la biomasse microbienne *in vivo* est trop coûteuse. Par conséquent, la technique de production de gaz *in vitro* du rumen est utilisée pour l'évaluation de l'énergie alimentaire dans les aliments pour ruminants et a été aussi adopté pour évaluer le potentiel de production de biomasse microbienne donc la répartition de la matière organique fermentée entre la biomasse microbienne et les déchets de fermentation.

Dans notre étude, une augmentation du rendement de la biomasse microbienne pour l'extrait *AcOEt* est observée pour la D75 et la D100. Cette augmentation est statistiquement significative et s'accompagne parallèlement avec l'augmentation de l'énergie métabolisable (EM) pour les mêmes concentrations. L'augmentation de la production de l'azote ammoniacal comparativement au témoin spécialement pour les extraits *AcOEt* pourra être attribuée à l'incorporation de l'ammoniaque produit dans la synthèse de la biomasse microbienne ce qui améliore ce paramètre. Cependant, pour l'extrait *BuOH* et *aqueux*, le rendement de la biomasse microbienne reste comparable au témoin à l'exception pour la D75 pour l'extrait *aqueux*.

VIII.4. Production des acides gras volatils (AGV)

L'impact des extraits de feuilles d'olive utilisés à différentes concentrations sur le profil des acides gras volatils totaux (mM/g), les concentrations molaires des AGV (mM/g), le ratio C2/C3 et les BCP après 24 heures de fermentation *in vitro* est présenté dans le tableau 21.

Tous les extraits d'olive n'ont aucun effet sur la production totale d'AGV par rapport au témoin ($P > 0,05$). Cependant, il est important de noter une légère diminution des valeurs totales d'AGV pour l'extrait *AcOEt* par rapport au témoin. Contrairement pour l'extrait *aqueux*, un accroissement est observé pour les trois concentrations testées. L'addition de

l'extrait *AcOEt* a légèrement diminué la concentration en acétate, alors que sa concentration est augmentée pour l'extrait aqueux ($P > 0,05$). En parallèle, l'addition de tous les extraits de feuilles d'olive augmente la production de propionate comparativement au contrôle même si cette augmentation n'est pas statistiquement significative ($P > 0,05$). En ce qui concerne le butyrate, seule l'inclusion de l'extrait *AcOEt* a diminué sa production d'une façon significative ($P < 0,01$), pour les extraits *BuOH* et *aqueux*, les valeurs sont comparables au témoin. Le rapport acétate /propionate (C2/C3) est affecté par les extraits *AcOEt* et *BuOH*, et ce dernier est significativement plus bas que la valeur du témoin ($P < 0,05$). Tous les extraits d'*Olea europaea* ont affecté significativement la production d'acides gras à chaîne ramifiée BCP par rapport au témoin ($P < 0,01$).

Selon McDonald *et al.*, (1995), la fermentation des aliments riches en amidon tend à produire plus de propionate, tandis que les substrats fibreux entraînent une augmentation de la formation d'acétate. L'addition d'extrait *AcOEt* a stimulé certaines voies favorables telles que la production de propionate, ce qui a entraîné une réduction significative du rapport acétate au propionate. La diminution du rapport C2/ C3 avec les proportions croissantes de propionate est rapportée par de nombreux auteurs. Cela confirme que la réduction du CH_4 (pour l'extrait *AcOEt* dans notre cas) est le résultat de la réorientation des molécules d'hydrogène H_2 du chemin de la méthanogenèse à la production de propionate (Demeyer et Van Nevel, 1975). Ces résultats sont en accord avec le résultat obtenu par Molina-Alcaide *et al.*, (2010) qui ont rapporté un rapport C2 / C3 inférieur dans les fermenteurs en culture continue nourris avec un régime contenant des feuilles d'olive par rapport au foin de luzerne.

La diminution du ratio C2/ C3 observée avec les extraits de feuilles d'olive pourrait être due aussi à une croissance réduite des bactéries cellulolytiques dans le rumen, ce qui est en ligne avec des études antérieures (Molina Alcaide *et al.*, 2010).

Tableau 21: Effet des extraits de feuilles d'olive à différentes doses sur le profil des acides gras volatils totaux (mM/g), les concentrations molaires des AGV (mM/g), le ratio molaire C2 /C3 et les BCP après 24 heures de fermentation *in vitro*.

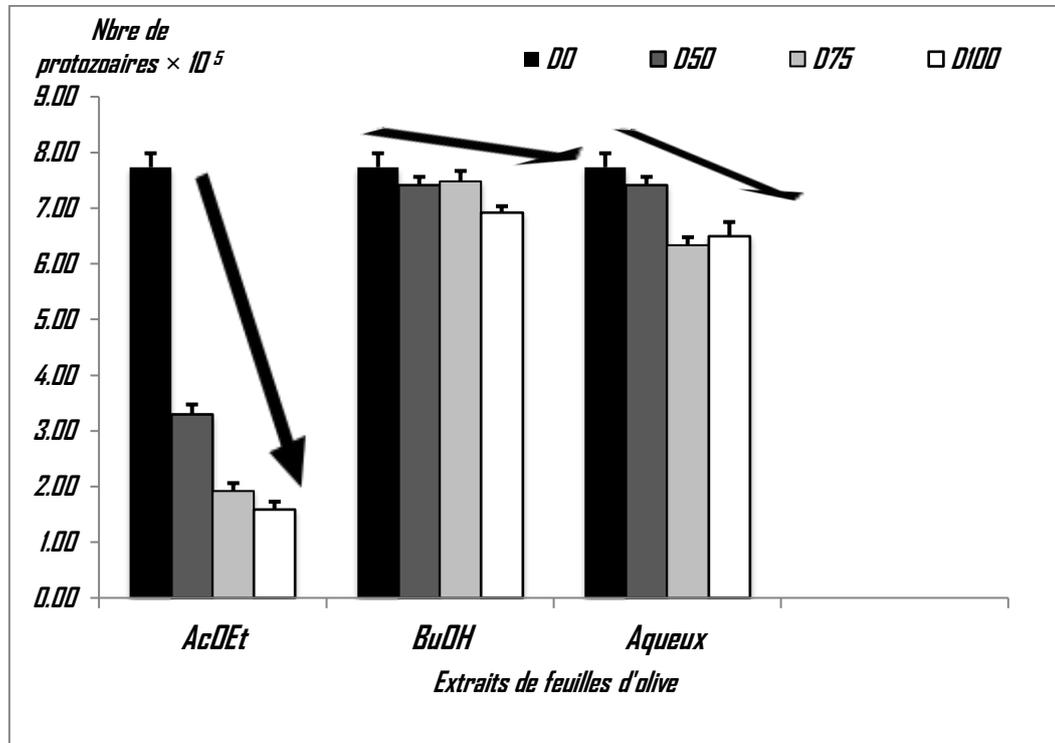
Paramètres	Extraits <i>Olea europaea. L</i> (mg)									S.E.M	P-value	
	<i>AcOEt</i>				<i>BuOH</i>			<i>Aqueux</i>				
	D0	D50	D75	D100	D50	D75	D100	D50	D75			D100
AGV _t , mM/g	89,11 ^a	82,40 ^a	83,42 ^a	86,28 ^a	91,72 ^a	87,34 ^a	92,08 ^a	99,00 ^a	101,58 ^a	98,94 ^a	1,83	0,536
Acétate C2	55,99 ^a	53,90 ^a	51,77 ^a	57,66 ^a	57,10 ^a	55,05 ^a	57,54 ^a	64,85 ^a	63,95 ^a	63,64 ^a	1,09	0,263
Propionate C3	16,44 ^a	16,44 ^a	19,74 ^a	20,55 ^a	18,05 ^a	18,52 ^a	20,03 ^a	19,00 ^a	19,69 ^a	20,82 ^a	0,50	0,516
Butyrate C4	12,55 ^a	8,97 ^{a,b}	9,19 ^{a,b}	5,29 ^b	12,90 ^a	11,37 ^a	11,69 ^a	11,99 ^a	14,07 ^a	11,59 ^a	0,47	0,002
Iso-Butyrate	0,78 ^a	0,62 ^{a,b}	0,58 ^{a,b}	0,52 ^b	0,69 ^{a,c}	0,44 ^b	0,50 ^{b,c}	0,63 ^a	0,78 ^a	0,58 ^a	0,03	0,021
Valerate	1,76 ^a	1,42 ^{a,b}	1,28 ^b	1,32 ^{b,c}	1,54 ^{a,b}	1,11 ^b	1,38 ^{a,b}	1,42 ^{a,b}	1,80 ^a	1,30 ^b	0,05	0,009
Iso-Valerate	1,58 ^a	1,05 ^{a,b}	0,87 ^b	0,93 ^{b,c}	1,43 ^{a,c}	0,85 ^b	0,93 ^{b,c}	1,12 ^{a,b}	1,30 ^{a,b}	1,02 ^b	,06	0,010
C2 /C3 ratio	3,49 ^a	3,28 ^{a,b}	2,68 ^b	2,81 ^{b,c}	3,16 ^{a,b}	3,00 ^{a,b}	2,89 ^b	3,41 ^a	3,25 ^a	3,06 ^a	0,06	0,019
BCP	2,63 ^a	2,03 ^{a,b}	1,72 ^b	1,68 ^{b,c}	2,31 ^a	1,48 ^b	1,56 ^b	1,76 ^b	2,05 ^{a,b}	1,61 ^{b,c}	0,08	0,0001

BCP : Concentration d'acides gras à chaîne ramifiée = (isobutyrique + isovalérique) /AGV_t ;

^{a,b,c} moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes ($p < 0,05$) ; les tests sont ajustés pour toutes les comparaisons par paire au sein d'une ligne de chaque sous-table la plus interne, à l'aide de la correction de Bonferroni. ; P : probabilité ; S.E.M : L'erreur standard des moyennes.

IX. L'effet des extraits de feuilles d'olive (*Olea europaea. L*) sur la population des protozoaires

Comme il est indiqué dans la figure 28, tous les extraits de feuilles d'olive induisent une diminution dans la population de protozoaires après 24 h d'incubation. Il est à signaler que seul l'extrait *AcOEt* entraîne une diminution significative de la population de protozoaires comparativement au témoin (D0). La plus grande réduction enregistrée est de 79,6% avec la dose de D100. Cette réduction est liée à celle observé pour le méthane avec une forte corrélation positive ($r= 0,738$, $P <0,01$) (Annexe 11). Ces résultats sont en accord avec des études antérieurs réalisés sur l'effet des extraits végétaux riches en polyphénols (Jafari *et al.*, 2016 ; Kim *et al.*, 2015). En outre, l'addition des deux extraits *BuOH* et *aqueux* a également réduit le nombre de protozoaires, mais cette réduction est faible comparativement à l'extrait *AcOEt*. Il est bien connu que les protozoaires ciliés jouent un rôle clé dans la méthanogenèse ruminale puisque les méthanogènes s'attachent à leur surface (10 à 20% des méthanogènes vivent en association avec des protozoaires) et que la réduction des protozoaires réduirait également la population des archae-bactéries méthanogènes. Ce qui entrainera par conséquence la réduction de CH₄.



D0, D50, D75 et D100: 0 (témoin), 50, 75 et 100 mg d'extrait ajouté dans les flacons de culture, respectivement.

Figure 28 : Effet des extraits de feuilles d'olive (*Olea europaea. L*) à différentes doses sur la population des protozoaires après 24 h d'incubation *in vitro*.

X. L'effet de la quercétine « Témoin positif » sur les caractéristiques de la fermentation *in vitro*

Les données obtenues par les analyses de contraste sont reportées dans le tableau 22 et celles de l'impact de la quercétine sur les caractéristiques de la fermentation *in vitro* sont montrées dans le tableau 23 et la figure 29.

D'après la plupart des paramètres considérés, en augmentant la concentration de quercétine, la composante linéaire de la variance montre un effet significatif ($P < 0,001$). Toutefois, la digestibilité de la matière organique (DMO) a mis en évidence un effet linéaire clair (l'augmentation de la concentration de quercétine a entraîné automatiquement une diminution de la DMO). Inversement, pour la VCSO (production cumulative de gaz liée à la matière organique incubée) et le pH, c'est le modèle sigmoïdal qui exprime mieux les données obtenues pour ces deux paramètres, montrant une différence nette ($P < 0,01$) entre les doses faibles (D0, D150) et les doses élevées (D175, D200) (tableau 22).

L'augmentation des doses de quercétine a également réduit significativement la production de CH_4 , montrant ainsi des effets linéaires et quadratiques (comme % de gaz total produit) et sigmoïdaux (comme ml / g MO incubée). La production de méthane a été calculée comme pourcentage (% du gaz total produit) et en tant que quantité (ml) par matière organique incubée ou dégradée (Figure 30). Dans tous les cas, sauf pour le CH_4 comme ml / MOD (matière organique dégradée), l'ajout de quercétine a réduit la production de méthane, montrant les valeurs les plus faibles pour la concentration la plus faible (D150).

L'addition de la quercétine à des doses croissantes a affecté négativement et significativement le PF par rapport au contrôle ($P < 0,01$) qui corrobore avec une augmentation du gaz total produit GP24 et une diminution de substrat utilisé pour la production des AGV ou de la biomasse microbienne. L'ajout de la quercétine a augmenté également significativement le rendement de la biomasse microbienne BM par rapport au témoin ($P < 0,01$) ainsi que l'énergie métabolisable estimée ($P < 0,05$) (tableau 23).

Tableau 22: Résultats des analyses de contraste pour les principaux paramètres déterminés pour la fermentation de la quercétine après 24 h d'incubation.

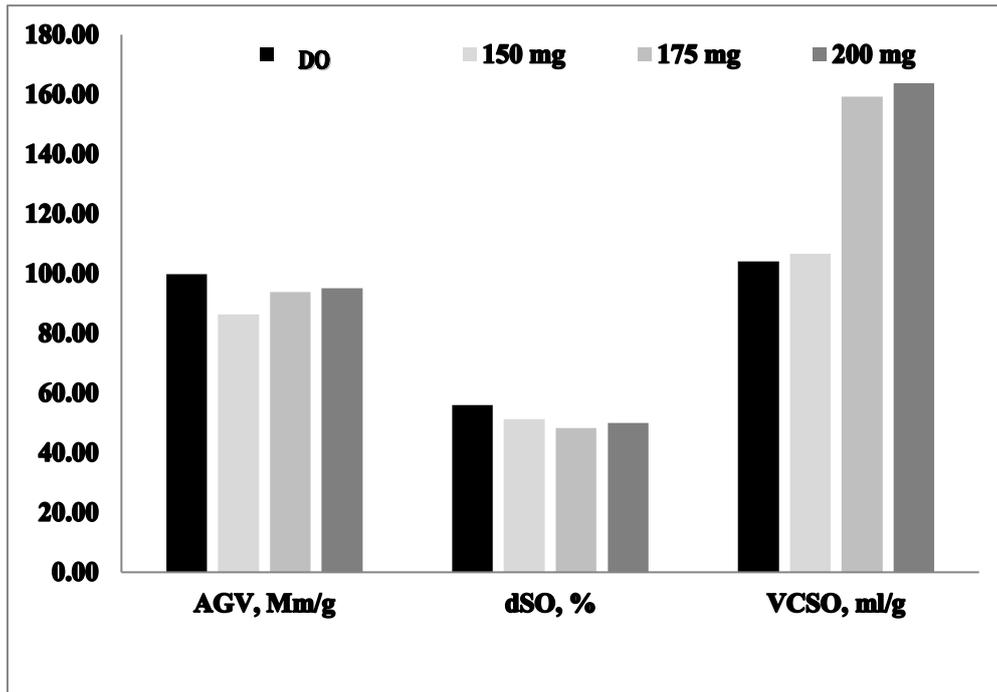
<i>Effet</i>	pH	DMO	VCSSO	AGV	C2/C3	N-NH ₃	CH ₄ ¹	CH ₄ ²
<i>Lineaire</i>	***	***	***	NS	***	***	***	NS
<i>Quadratique</i>	NS	*	NS	NS	NS	***	***	*
<i>Sigmoidal</i>	***	NS	***	NS	*	***	NS	**

CH₄: production de méthane (¹ comme % du gaz total produit ; ² comme ml /g de matière organique incubée). ***, **, *, NS: P <0,001, P <0,01, P <0, 05, non significatif, respectivement.

Tableau 23 : Effet des différentes doses de la quercétine sur les différents paramètres de fermentation *in vitro* après 24 h d'incubation.

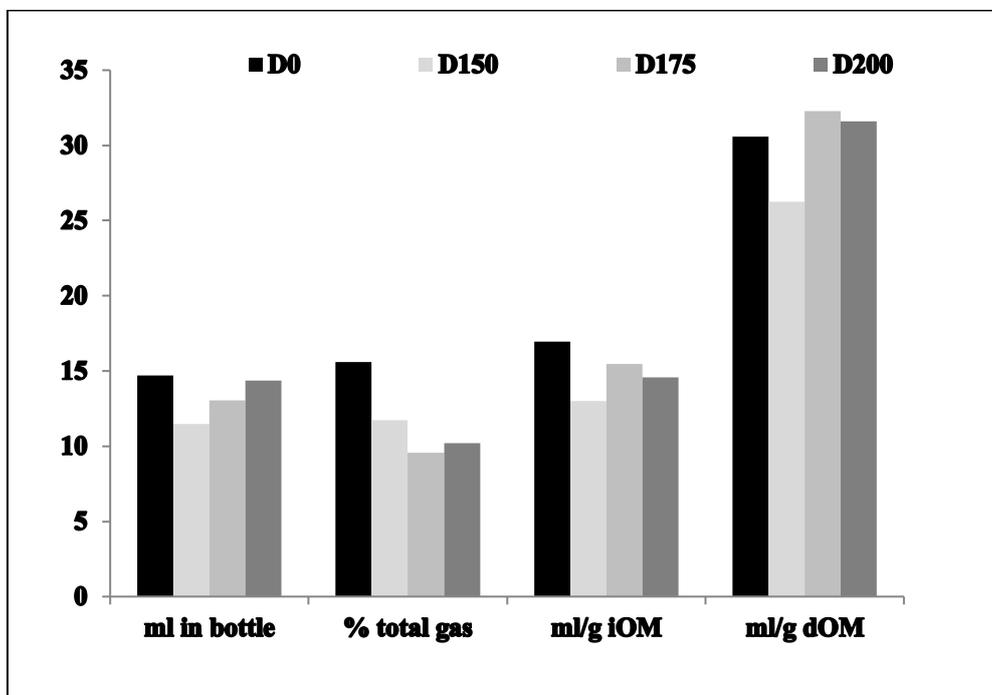
Paramètres	D0	D150	D175	D200	S.E.M	P. Value
DMS %	55,58 ^a	53,76 ^{a,b}	48,92 ^b	50,54 ^{a,b}	0,97	0,029
DMO%	54,65 ^a	52,44 ^{a,b}	47,50 ^b	49,58 ^{a,b}	0,97	0,014
VCSS	99,35 ^a	106,04 ^a	149,62 ^b	142,75 ^b	7,11	0,001
VCSSO	106,86 ^a	108,68 ^a	160,95 ^b	153,56 ^b	8,00	0,0001
CH ₄ % Total Gaz	15,59 ^a	11,72 ^b	9,55 ^c	10,20 ^c	0,71	0,0001
CH ₄ ml/g MS	15,76 ^a	12,10 ^a	14,36 ^a	14,63 ^a	0,52	0,050
CH ₄ ml/g MO	16,95 ^a	13,02 ^a	15,45 ^a	15,73 ^a	0,55	0,051
CH ₄ ml/g MOD	30,59 ^a	26,26 ^a	32,30 ^a	31,61 ^a	0,98	0,104
CO ₂ % total gaz	81,72 ^a	85,13 ^a	133,66 ^b	126,53 ^b	7,44	0,0001
CO ₂ ml/g MS	80,85 ^a	82,47 ^b	88,75 ^c	88,44 ^c	1,06	0,0001
CO ₂ ml/g MO	87,90 ^a	91,57 ^a	143,77 ^b	136,10 ^b	8,01	0,0001
CO ₂ ml/MOD	158,48 ^a	184,74 ^a	300,95 ^b	273,57 ^b	18,52	0,0001
PF	5,01 ^a	4,10 ^{a,c}	2,63 ^b	3,16 ^{b,c}	0,29	0,0001
BM	240,98 ^a	232,37 ^a	362,55 ^b	345,98 ^b	18,95	0,0001
EM	5,42 ^a	5,87 ^{a,b}	6,59 ^b	6,40 ^{a,b}	0,17	0,026

^{a,b,c} moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes ($p < 0,05$) ; les tests sont ajustés pour toutes les comparaisons par paire au sein d'une ligne de chaque sous-table la plus interne, à l'aide de la correction de Bonferroni. ; P : probabilité ; S.E.M : L'erreur standard des moyennes.



D0, D150, D175 et D200 : dosage de la quercétine (mg dans chaque flacon).

Figure 29: Caractéristiques de la fermentation *in vitro* avec les différentes doses de quercétine.



D0, D150, D175 et D200 : dosage de la quercétine (mg dans chaque flacon).

Figure 30 : Production de méthane après 24 h d'incubation.

XI. L'effet de la quercétine sur les produits finaux de la fermentation *in vitro*

Les produits finaux et le pH après 24 h de fermentation sont indiqués dans le tableau 24. Les valeurs de pH se situaient entre 6,42 et 6,72. Pour les acides gras volatils totaux (AGV_t), les différences dans la production des AGV_t entre les différentes doses de quercétine sont principalement dues à la concentration du propionate qui est faible avec la D0 et D150 comparativement à la D150 et D200, même si les valeurs de butyrate avec ces deux doses sont assez élevées. Les acides gras volatils n'ont pas clairement influencés par l'addition de la quercétine, tandis que le rapport C2/C3 a diminué de façon significative ($P < 0,001$) lorsque le niveau de quercétine augmente comme conséquence à l'augmentation de la concentration du propionate dans le milieu. L'ammoniaque a diminué nettement suite à l'ajout des différentes concentrations de quercétine au régime, la production de l'ammoniaque (N-NH₃) a montré un effet hautement significatif ($P < 0,001$) que ce soit pour le modèle linéaire, quadratique et sigmoïdal.

En général, la plupart des données obtenues dans cette étude sont en accord avec de nombreux auteurs qui ont évalué l'effet des métabolites secondaires des plantes sur la fermentation dans le rumen (Durmic and Blache, 2012). En général, la diminution de la dégradabilité de la matière organique, du rapport C2/C3, d'ammoniaque (N-NH₃) et de production de méthane (CH₄) lors de l'ajout de ce flavonoïde peut être attribuée à l'action antimicrobienne de ce dernier, comme l'indique Cushnie and Lamb (2011). Cependant, les résultats dans la bibliographie concernant la quercétine sont très rares.

Seradj *et al* (2014) ont également étudié l'effet de Bioflavex (BF) et de ses composants flavonoïdes purs (Hésperidine HS, Isonaringine IN, Naringine NG, Néo-ériocitrine NE, Neohesperidine NH et Poncirine PC) ont été testés contre le témoin (CTR) à 200 µg / g de matière sèche du substrat incubé sur les caractéristiques de la fermentation ruminale dans un système d'incubation *in vitro* (Theodorou *et al.*, 1994); ils ont rapporté que l'ajout de BF ou de ses composants flavonoïdes a atténué la production de gaz cumulé ($P < 0,01$) sauf pour NE et PC, mais aucune différence ($P > 0,10$) n'a été enregistrée dans le taux de production de gaz (ml/ h) 12 heures après l'incubation. La production de méthane (ml/g MS) est réduite ($P < 0,01$) par addition de flavonoïdes, à l'exception du NE et du NG, qui ne différaient pas du témoin. Cependant, aucun changement n'est détecté dans la concentration totale des AGV, mais les flavonoïdes ont augmenté le propionate au détriment de la proportion d'acétate ($P < 0,01$) qui est en accord avec nos résultats. L'abondance de la population de d'archées

hydrogénotrophiques méthanogènes (HMA) a été réduite ($P < 0,01$) par BF et ses composants principaux (NG et NH), cette flore qui est intimement liée à la population des protozoaires.

Broudiscou *et al.*, (2000) ont également étudiés l'effet de 13 extraits de plantes, dont du Ginko biloba contenant 4,2% de quercétine /g de MS, en culture continue. Ils ont trouvé une réduction de la production de CH_4 mais aucun effet sur les AGV. Cette réduction de la production de CH_4 devrait être expliquée par une reconduction hypothétique de l'excès d'hydrogène vers une voie métabolique du propionate, comme cela peut se produire avec d'autres composés anti-méthanogènes (Demeyer et Van Nevel, 1975, McAllister et Newbold, 2008). Par conséquent, l'ajout de substances flavonoïdes spécifiques comme la quercétine peut modifier spécifiquement l'écosystème microbien du rumen et améliorer l'efficacité de la croissance microbienne.

Nos résultats concordent bien avec les travaux de recherche montrant l'effet inhibiteur *in vitro* des flavonoïdes purs. Oskoueian *et al.*, (2013) qui ont évalué les effets des différents flavones, y compris la quercétine, à la concentration de 4,5% de matière sèche initiale incubée sur l'activité microbienne du rumen *in vitro* après 24 h d'incubation, ont rapporté une augmentation de la production de gaz total ($P < 0,05$) et du rapport C2/C3 ($P < 0,05$). Alors que la digestibilité de la matière sèche, l'ammoniaque (N-NH₃), le pH et l'AGV_t n'ont pas été influencés par l'ajout de la quercétine. La réduction significative des microorganismes producteurs de méthane ($P < 0,05$) reflète directement la diminution significative des émissions de méthane ($P < 0,05$) (Oskoueian *et al.*, (2013). Ainsi que l'effet d'autres composés polyphénoliques comme la 9,10-anthraquinone (Garcia-Lopez *et al.*, 1996) ou celle d'extraits végétaux riches en flavonoïdes (Broudiscou *et al.*, 2000, Bodas *et al.*, 2012) sur la production de méthane. Ils ont été suggérés que l'inhibition de CH_4 se produit par deux mécanismes principaux les composés qui affectent directement la formation de méthane en interférant ou en réduisant le flux de carbone ou d'électrons dans la chaîne alimentaire microbienne, dans cette approche, l'hydrogène ne s'accumulerait pas et le propionate augmenterait aux dépens de l'acétate et du butyrate, comme il a été déjà mentionné dans cette discussion. Un exemple de ceci devrait être les composés de type ionophores, qui agissent contre les bactéries qui produisent de l'hydrogène et du dioxyde de carbone comme précurseurs de la méthanogenèse (Chen et Wolin, 1979). En outre, certains inhibiteurs de méthane peuvent être toxiques pour les méthanogènes (Exemple les acides gras).

Les auteurs ne connaissent pas les rapports décrivant le mécanisme anti-méthanogène des flavonoïdes, donc leurs activités sur le microbiote ruminal n'est pas totalement élucidée, ainsi et d'après les données récentes, il est impossible de déterminer si l'inhibition du méthane par les substances flavonoïques se produit par une dépression évidente de l'abondance de la flore méthanogène. Cependant, le fait que la présence de flavonoïdes dans le milieu d'incubation déprime également l'acéto-méthanogène semble suggérer une toxicité hypothétique des flavonoïdes ou de leurs métabolites de dégradation vis-à-vis de la population des archaea-méthanogènes.

Tableau 24: Effet de différentes doses de quercétine sur les produits finaux de fermentation après 24 h d'incubation *in vitro*.

Paramètres	D0	D150	D175	D200	SEM	P-Value
pH	6,47 ^a	6,48 ^a	6,71 ^b	6,70 ^b	0,04	0,006
N-NH ₃ , mM/g	62,11 ^a	17,00 ^b	21,23 ^c	21,99 ^c	5,52	0,0001
AGV _t , Mm/g	99,93 ^a	82,90 ^a	93,78 ^a	95,06 ^a	2,90	0,862
Acétate C2	55,99 ^a	54,02 ^a	58,46 ^a	57,38 ^a	1,71	0,860
Propionate C3	16,44 ^a	17,06 ^{a,b}	24,36 ^b	24,78 ^{b,c}	1,36	0,009
Butyrate C4	12,55 ^a	11,81 ^a	7,83 ^a	7,19 ^a	0,85	0,018
Iso-butyrate	0,78 ^a	0,60 ^a	0,56 ^a	0,53 ^a	0,04	0,140
Valerate	1,76 ^a	1,56 ^a	1,50 ^a	1,38 ^a	0,06	0,193
Iso-valerate	1,58 ^a	1,26 ^a	0,84 ^a	0,87 ^a	0,11	0,028
C2/C3 ratio	3,49 ^a	3,17 ^a	2,41 ^b	2,31 ^b	0,16	0,001
BCP	2,63 ^a	2,15 ^a	1,50 ^b	1,53 ^b	0,15	0,0001

BCP : Concentration d'acides gras à chaîne ramifiée = (isobutyrique + isovalérique) /AGVt ;

^{a,b,c} moyennes dans la même ligne affectées de lettres différentes sont significativement distinctes ($p < 0,05$) ; les tests sont ajustés pour toutes les comparaisons par paire au sein d'une ligne de chaque sous-table la plus interne, à l'aide de la correction de Bonferroni. ; P : probabilité ; S.E.M : L'erreur standard des moyennes.

XII. Effet de la quercétine sur la population des protozoaires

Comme il est présenté dans la figure 31, l'ajout de la quercétine et aux différentes concentrations supprime la population de protozoaires comparativement au témoin. Cette réduction est probablement accompagnée de la réduction des microorganismes producteurs de méthane, ce qui explique la diminution du méthane produit. Selon Lowry et Kennedy, (1997), la quercétine, est un aglycone phénolique, bien qu'insoluble dans l'eau, il peut être rapidement dégradé par les microbes du rumen et pourrait améliorer l'activité microbienne dans le rumen. Cependant, sa biotransformation ou sa dégradation dans certains cas peut engendrer de nouveaux dérivés qui affectent l'activité microbienne du rumen (Simons *et al.*, 2005 ; Patra and Saxena, 2011). Il semble que les flavonoïdes y compris la quercétine ont différentes cibles cellulaires ; ils peuvent inhiber la fonction de la membrane cytoplasmique, la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne et /ou la synthèse d'acides nucléiques (Cushnie and Lamb, 2005). Ce potentiel antimicrobien des flavonoïdes dépend du nombre et la position des groupes hydroxyles et la présence de groupes aliphatiques et des groupes glycosylés dans leurs structures. De plus, Mirzoeva *et al.*, (1997), ont rapporté l'action antibactérienne de la quercétine contre *E. coli* par la perturbation de la force motrice des protons et l'inhibition de la motilité bactérienne. Donc l'effet de la quercétine sur les microbes du rumen est souhaitable et devrait être considéré comme un composé alternatif pour manipuler les microbes du rumen vers le maintien des bactéries cellulolytiques avec un niveau inférieur de protozoaires et de population méthanogène.

À ce jour, peu d'informations sont disponibles sur le mécanisme d'action direct des flavonoïdes purs contre les microbes du rumen. Les résultats obtenus dans cette étude indiquent que la quercétine maintient de l'activité de la fermentation microbienne dans le rumen avec réduction de la production de méthane.

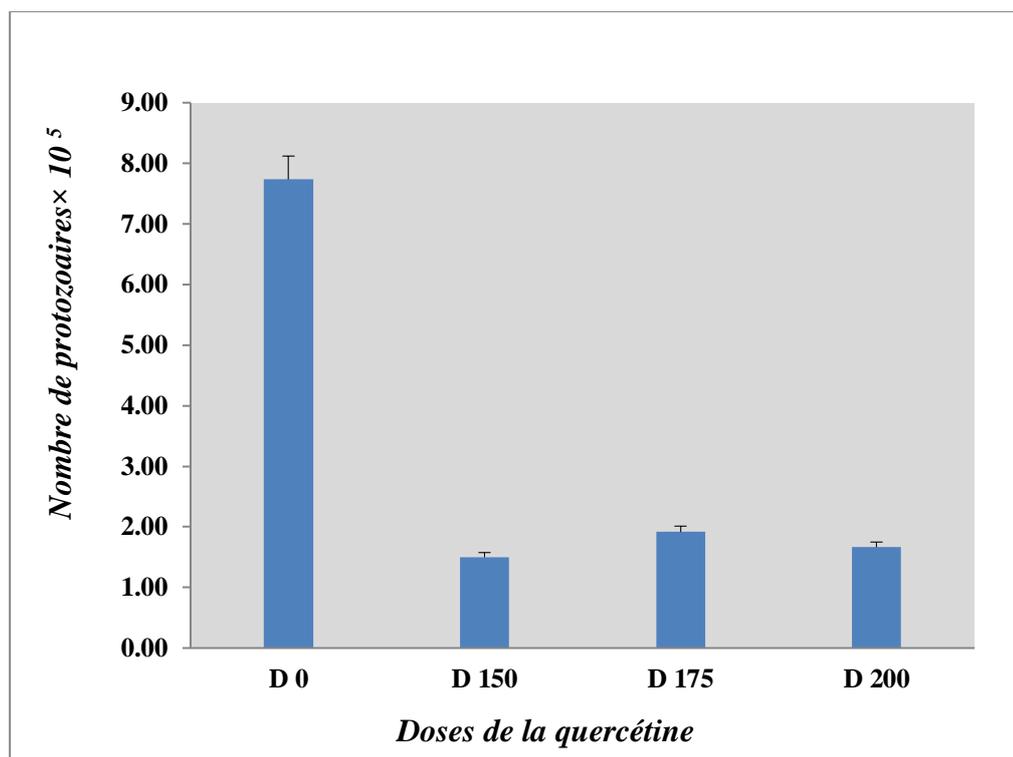


Figure 31 : Effet de la quercétine sur la population des protozoaires.

***Conclusion
et Perspectives***

De manière générale, les trois extraits d'*Eucalyptus globulus* (acétate d'éthyle, n-butanol et aqueux) testés ont des effets différents sur la fermentation ruminale *in vitro*, en raison de la nature, de l'activité et de la concentration de leurs composés actifs. Il s'avère que l'extrait d'acétate d'éthyle est le plus actif (due probablement aux actions synergiques et/ou antagonistes de ces flavonoïdes aglycones, monoglycosidés et de ces tanins), et semble être le meilleur modulateur de la fermentation *in vitro* en raison de sa capacité à stimuler la production de gaz tout en minimisant la méthanogénèse et la production des protozoaires sans affecter la production des AGV avec un effet dose dépendant très prononcé. Etant donné que cet extrait affecte négativement la digestibilité apparente de la matière sèche et organique, pour cette raison différents niveaux d'extrait doivent être testés afin de trouver une dose appropriée pour obtenir un rendement maximal sur la méthanogénèse ruminale sans affecter la valeur nutritive des aliments. Les extraits d'*Eucalyptus globulus* devraient également être testés *in vivo* afin d'élucider la dose appropriée pour améliorer la fermentation ruminale avec des effets positifs en tenant compte de l'impact économique et environnemental et surtout avec un minimum d'effets négatifs sur la digestibilité des aliments. De plus, il est nécessaire d'étudier l'adaptation des microbes du rumen et de la population de protozoaires à l'action antimicrobienne prolongée de ces métabolites secondaires sur l'alimentation des ruminants.

Pour la deuxième plante et sur la base de nos résultats, il est raisonnable de conclure aussi que les extraits de feuilles d'olive, en particulier l'extrait acétate d'éthyle, ont des effets bénéfiques sur certains processus de fermentation ruminale. L'extrait acétate d'éthyle peut améliorer spécifiquement l'efficacité de la fermentation dans le rumen, bien que le mode d'action de ces extraits de feuilles d'olive ne soit pas bien connu. Des futures recherches *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires pour identifier et sélectionner la dose optimale et les types de régimes qui confèrent des effets positifs des extraits de feuilles d'olive sur la population microbienne et la fermentation dans le rumen.

Pour l'usage de flavonoïde purifié ou de synthèse dans notre manipulation la quercétine, les résultats obtenus sont contradictoires de point de vue nutritionnel et environnemental, ce bioflavonoïde s'est avérée avoir un effet dose-dépendant clair sur les caractéristiques de la fermentation ruminale *in vitro* et sur la réduction du méthane. Effectivement, une augmentation de la supplémentation en quercétine engendre une réduction évidente de méthane, mais aussi une diminution de la digestibilité apparente de la matière sèche et organique *in vitro* a été aussi observée. Pour cette raison, différents

niveaux de quercétine devraient être testés pour trouver une dose appropriée pour obtenir le maximum d'inhibition d'émission de méthane sans affecter la dégradabilité de la matière sèche et organique des aliments.

Au terme de cette étude, on peut conclure que l'utilisation des extraits de plantes (*Eucalyptus globulus* et *Olea Europaea*) pour réduire la méthanogénèse est une piste intéressante par son caractère «naturel» apprécié par les consommateurs mais aussi parce qu'elle est facilement applicable en pratique. Cependant, vu le nombre élevé de molécules potentiellement intéressantes que pourraient contenir les extraits de ces deux plantes et les réponses divergentes de l'écosystème microbien observées durant notre étude, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour identifier les meilleures cibles ainsi que la détermination des molécules bioactives responsables des effets observés (des études complémentaires sur leur vectorisation s'avèrent nécessaires). Il est aussi primordial de décerner les principaux obstacles à l'utilisation pratique de ces extraits de plantes comme additifs alimentaires pour ruminants et autres animaux (limitée pour plusieurs raisons).

- Premièrement la qualité et la quantité du (des) composé (s) actif (s) qui sont extrêmement variable et difficile à standardiser.
- Autres facteurs qui influent sur la composition en métabolites secondaires qui sont : le stade végétatif, la partie de la plante utilisée pour préparer l'extrait, et si la plante a été stimulée (intentionnellement ou non) pour synthétiser des composés secondaires défensifs. Les conditions environnementales et la variété de cultivar peuvent expliquer en partie la variation de la production de métabolites secondaires par les plantes.
- Certains des composés bioactifs sont des antioxydants, et cette propriété peut être perdue pendant le stockage. Donc le bénéfice des animaux dépend de tous ces éléments à savoir la composition chimique, de la préparation de la plante, car il peut y avoir des additifs avec des effets synergiques et/ou antagonistes parmi les composés bioactive dans un mélange complexe de métabolites secondaires.
- Il est communément admis que les extraits de plantes sont des produits « sûrs-sans danger » parce qu'ils sont produits naturellement. Cependant, il doit être rappelé que ces métabolites secondaires font partie des mécanismes de défense utilisés par les plantes contre les pathogènes et les agressions

- environnementales. Ainsi, une dose excessive peut être toxique pour les animaux ou au moins induire une réponse négative lorsqu'il est consommé. Donc les mécanismes de toxicité et les doses toxiques pour les animaux ne sont pas bien connus et peu des informations sont disponibles sur la transformation de ces substances en produits animaux comestibles et leur toxicité éventuelle pour les consommateurs. Jusqu'à le jour ou des données probantes soient disponibles.

En perspectives, il serait donc intéressant de développer de nouvelles pistes de recherche scientifique sur les additifs végétaux en nutrition animale, pour cela, quelques suggestions sont avancées:

- Développer des recherches qui contribueraient à une meilleure connaissance de la composition chimique exacte de ces extraits et l'identification de leurs composés secondaires par des techniques d'identification moléculaire avancés a savoir la HPLC et la RMN, afin de mieux comprendre les différentes classes de ces composés qui sont derrière les effets observés.
- L'étude des mécanismes d'action de ces composés secondaires, particulièrement les flavonoïdes, les huiles essentielles et les tannins et de leurs effets sur l'activité du microbiote ruminal spécialement sur les archaea-bactéries par des techniques de biologie moléculaire pourrait être d'un grand intérêt.
- En outre, Cette étude mérite d'être compléter par d'autres investigations *in vitro*, pour déterminer l'effet dose de l'extrait acétate d'éthyle d'eucalyptus et des feuilles d'olive ainsi que pour la quercetine et aussi des études par le RUSITEC afin de s'assurer de la stabilité dans le temps des effets observés *in vitro*. Ainsi, il est recommandé aussi d'augmenter le nombre de répétitions et des tests *in vitro* afin de fixer la dose optimale de ces métabolites secondaires.
- Des études *in vivo* devraient être envisagées en vue de mieux connaitre la réaction de l'animal et de ses performances; ainsi que la qualité de ces produits (lait, viande) suite a l'utilisation de ces additifs végétaux dans l'alimentation animale. Ce qui fait de ces recherches seraient d'autant plus profitables pour une éventuelle utilisation en nutrition animale.

***Références
bibliographiques***

- 1- **Aganga, A.A., Tshwenyane, S.O., 2003.** Feeding values and anti-nutritive factors of forage tree legumes. *Pak. J. Nutr.* 2, 170–177.
- 2- **Agarwal, N., Shekhar, C., Kumar R., Chaudhary, L.C., Kumra, D.N. 2009.** Effect of Peppermint (*Mentha piperita*) Oil on In vitro Methanogenesis and Fermentation of Feed with Buffalo Rumen Liquor. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 148: 321-327.
- 3- **Akanmu, A.M., Abubeker, H. 2017.** The use of certain medicinal plant extracts reduced in vitro methane production while improving in vitro organic matter digestibility. *Anim. Prod.* <http://dx.doi.org/10.1071/AN16291>.
- 4- **Albert, V., 2015.** Huile essentielle eucalyptus globulus chine. Ed. herbacée cinéolée.
- 5- **Alkorta, I., Garbisu, C., Liama, M.J., Serra, J.L., 1998.** Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry.*, 33: 21-28.
- 6- **Altiok, E., Baycin, D., Bayraktar, O., Ulku, S., 2008.** Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Sep. Purif. Technol.*, 62(2), 342-348.
- 7- **Amokrane, S., Rabah, A., Tudisco, R., Rahab H., Infascelli, F., Calabrò, S. 2016.** Effect of *Chamaemelum nobile* and *Chrysanthemum segetum* extracts on ruminal methanogenesis, in vitro degradability and methane forming population. *International J. Adv. Res.*, 4 (5): 141-154.
- 8- **Amouretti, M., Comet, G., 2000.** Le livre de l'olivier. Ed. Edi. sud, 107 p.
- 9- **Angelidaki, I., Mogensen, A.S., Ahring, B.K., 2000.** Degradation of organic contaminants found in organic wastes. *Biodegradation.*, 11: 377-83.
- 10- **AOAC, 1990.** Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 15th ed. Arlington, VA. ed. USA.
- 11- **Aouidi, F., 2012.** Etude et valorisation des feuilles de l'olivier « *Olea europaea* » dans l'industrie agroalimentaire. Thèse de doctorat en génie biologique. Université de Carthage. 213p.
- 12- **Argenson, C., Regis, S., Vaysse, P., 1999.** L'Olivier. Éditions Ctifl, Paris, coll. Monographie, 204 p.
- 13- **Arhab, R., 2006.** Etude de la fermentescibilité *in vitro* et de la digestibilité *in vivo* de végétaux des zones arides et de sous produits de l'agronomie saharienne par l'estimation de l'activité métabolique du microbiote ruminale d'ovins. Thèse de doctorat en sciences, Université Mentouri de Constantine, 150p.
- 14- **Artaud, M., 2008.** L'olivier sa contribution dans la prévention et le traitement du syndrome métabolique. Ed. C.O.I., 30 p.

- 15- Arthur, P.F., Archer, J.A., Johnston, D.J., Herd, R.M., Richardson, E.C., Parnell, F. 2001.** “Genetic and phenotypic variance and covariance components for feed intake, feed efficiency, and other postweaning traits in Angus cattle”, *J. Anim. Sci.*, 79, 2805-2811.
- 16- Aumont, G., 1999.** Comparison of fresh and dried *Digitaria decumbens* grass intake and digestion by Black-belly rams. *J. Agric. Sci.* 133, 235–240.
- 17-Aydogan, C., 2008.** *Phytotherapy Research*, 9:1239 - 1242.
- 18- Ayres, M.P., Clausen, P.H., Maclean, S.F., Redman, A.M., Reichart, P.B., 1997.** Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. *Ecology.*, 78 (6): 1696-171.
- 19- Baba-Moussa, F., Akpagana, K., Bouchet, P., 1999.** Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology.*, 66: 335-338.
- 20- Bahman, A.M., Topps, J.H., Rooke, J.A., 1997.** Use of date palm leaves in high concentrate diets for lactating Friesian and Holstein cows. *Journal of Arid Environments.*, 35: 141-146.
- 21- Baldwin, R.L., Emery, R.S., 1960.** The oxidation-reduction potential of rumen contents. *Journal of Dairy Science.*, 43: 506-511.
- 22- Ballet, N., 1989.** Contribution à l'étude cinétique de la lignification et à l'étude de l'action d'un inhibiteur de ce processus chez le blé et le maïs. Mesures obtenues par voies biochimiques et histologiques. D.E.A., Université Blaise-Pascal, Clermont -Ferrand, France.
- 23- Barone, R., 1984.** Splanchnologie I. Appareil digestif, Appareil respiratoire. Tome 3. In: Anatomie comparée des mammifères domestiques. 2ème édition. Eds. Vigot, Paris. pp 333-379.
- 24- Barry, T.N., Manley, T.R., Duncan S.J., 1986.** The role of condensed tannins in the nutritional value of lotus pedunculatus for sheep: Sites of carbohydrates and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. *British J.of Nutrition.* 55, 123-137.
- 25- Barry, T.N., McNabb, W.C., 1999.** The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *Br. J. Nutr.* 81, 263–272.
- 26- Bate-Smith, E., 1973.** Tannins of herbaceous leguminosae. *Phytochemistry.*, 12: 1809 - 1812.
- 27- Bauchart, D., 1981.** Digestion comparée des lipides chez les ruminants et chez les monogastriques. *Bull. Tech. CRVZ Theix, INRA*, 46, 45-55.
- 28- Baucher, M., Monties, B., Montagu, M.V., Boerjan, W., 1998.** Biosynthesis and Genetic Engineering of Lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences.*, 17: 125-197.

- 29- Bauman, D.E., Griinari, J. M., 2001.** Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livestock Production Science.*, 70: 15-29.
- 30- Bayourthe, C., Ali-Haimoud-Lekhal, D., 2014.** Les extraits de plantes chez le ruminant: effets sur les fermentations dans le rumen et la qualité lipidique des produits animaux. *INRA Prod. Anim.*, 27 (4) : 317-328.
- 31- Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P., Yang, W.Z., 2003.** Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.*, 81: 37-47.
- 32- Beever, D.E., Cammell, S.B., Sutton, J.D., Spooner, M.C., Haines, M.J., Harland, J.I., 1989 :** “Effects of concentrate type on energy utilization in lactating dairy cows”, Y. Van der Honing et W.H. Close édés., *Energy Metabolism of farm Animals*, EAAP Publ., Pudoc, Wageningen, 43,33-66.
- 33- Béguin, P., Aubert, J.P., 1994.** The biological degradation of cellulose. *Microbiology Reviews.*,13:25-58.
- 34- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J. A., 2000.** Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea L*-leaves. *Food Chemistry*, 68(4), 457-462.
- 35- Benchaar, C., McAllister, T.A., Chouinard, P.Y., 2008.** Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or yucca schidigera saponin extracts. *J. Dairy Sci.*, 91:4765-4777.
- 36- Bennick, A., 2002.** Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine.*, 13 (2): 184-196.
- 37- Bernard, J.K., Martin, S.A., Wedegaertner, T.C., 2001.** In vitro mixed ruminal microorganism fermentation of whole cottonseed coated with gelatinized corn starch and urea. *PubMed.* 84 (1):154-8.
- 38- Bertrand A. 1992.** Les filières D’approvisionnement Enbois-Energie d’Antananarivo Et De Mahajanga. Evolutions et Perspectives, Proposition Pour La Planification Des Actions. UPED ; CIRAD-Foret, Nogent/Marne.
- 39- Bertrand, A et Le Roy, E. 1991.** Appui méthodologique aux volets foncier et économie forestière. ATP FOFIDA- CIRAD. L’économie forestière sur les hautes terres malgaches ; Nogent/Marne.
- 40- Bertrand, A., 1989.** Analyse économique de l’approvisionnement d’Antananarivo en produits forestiers et propositions de réforme de la réglementation et des redevances forestières. DEF, CTFT, Nogent/Marne.
- 41- Beuvink, J.M.W., Spoelstra, S.F., 1992.** Interactions between substrate, fermentation endproducts, buffering systems and gas production upon fermentation of different

- carbohydrates by mixed rumen microorganisms *in vitro*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 37: 505–509.
- 42-Bisset, W.J., Shaw, N. H., 1954.** A comparison of D.C.P.A., T.C.P.A. and Arsenic for killing Eucalypt regrowth in subtropical native pastures. J. Aust. Inst. Agric. Sci., 20, 177-181.
- 43- Blanco, P., Sieiro, C., Villa, G.T., 1999.** Production of pectic enzymes in yeasts. FEMS Microbiology Letters.175:1-9.
- 44- Bledzki, A.K., Gassan, J., 1999.** Composites reinforced with cellulose based fibres. Progress in Polymer Science. 24 : 221-274.
- 45- Blümmel, M., Aiple, K.P., Steingass, H., Becker, K., 1999.** A note on the stoichiometrical relationship of short chain fatty acid production and gas evolution *in vitro* in feedstuffs of widely differing quality. J. Ani. Phy. and Anim. Nut. 81: 157-167.
- 46- Blümmel, M., Makkar, H.P.S., Beker, K. 1997.** In vitro gas production: a technique revisited. Anim. Physiol. Anim. Nutr., 77: 24-34.
- 47- Blümmel, M., Orskov, E.R., 1993.** Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. Anim. Feed Sci. Technol. 40: 109-119.
- 48- Bodas, R., Lopez, S., Fernandez, M., Garcia-Gonzalez, R., Rodriguez, A.B. Wallace, R.J., 2008.** *In vitro* screening of the potential numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. Anim Feed Sci Technol, 145:245–258.
- 49- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F.J., López, S., 2012.** Manipulation of rumen fermentation and methane production with plantsecondary metabolites. Anim. Feed Sci. Technol. 176, 78–93.
- 50- Bogaert, C., Gomez, L., Jouany, J-P., Jeminet, G., 1989:** Effects of the ionophore antibiotics lasalocid and cationomycin on ruminal fermentation *in vitro*, Anim. Feed Sci. Technol., 27, 1-15.
- 51- Bonhomme, A., 1990.** Rumen ciliates: their metabolism and relationships with bacteria and their hosts. Animal Feed Science and Technology., 30:203-266.
- 52- Bonnemoy, F., Fonty, G., Michel, V., Gouet, P., 1993.** Effect of anaerobic fungi on the ruminal proteolysis in gnotobiotic lambs. Reproduction Nutrition and Development. 33: 551-555.
- 53- Bonnin, E., Dolo, E., Le Goff, A., Thibault, JF., 2002.** Characterisation of pectin subunits released by an optimised combination of enzymes. Carbohydrate Research., 337: 1687-1696.
- 54- Bouazza, L., 2014.** Etude de la valeur nutritive de légumineuses arbustives du genre *Acacia*. Effets spécifiques de leurs hautes teneurs en tannins condensés sur la

méthanogénèse ruminale d'ovins. Thèse de doctorat en Sciences. Université Constantine 1, 154 p.

55- Boudhrioua, N., Bahloul, N., Ben Slimen, I., Kechaou, N., 2009. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial Crops and Products*, 29, 412–419.

56- Boudy, P., 1952. Guide du forestier en Afrique, du Maroc, de Tunisie. Ed. Librairie agricole. Horticole forestier et Ménagère, Paris, 496p.

57- Bourquin, C.D., Fahey, J.G.C., 1994. Ruminant digestion and glycolysis linkage patterns of cell wall compounds from leaf and stem fractions of alfalfa or chardgrass and wheat straw. *Journal of Animal Science*, 72: 1362-1374.

58- Breet, C.T., Waldron, K., 1996. Physiology and biochemistry of plant cell walls, 2nd ed. Chapman & Hall.

59- Brock, F.M., Forsberg, C.W., Buchanan-Smith, J.G., 1982. Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. *British Journal of Nutrition*, 50: 769-782.

60- Broderick, G.A., Balthrop, J.E., 1979. Chemical inhibition of amino acid deamination by ruminal microbes in vitro. *J. Anim. Sci.*, 49: 1101-1111.

61- Brooker, M.I.H., Kleinig, D.A., 2006. Field Guide to Eucalyptus. South-eastern Australia. Bloomings, Melbourne, Australia, 3rd Ed., Vol. 1.

62- Broudiscou, L. P., Papon, Y., Broudiscou, A., 1999. Effects of inorganic nitrogen and amino acids on the degradation of ammonia-treated barley straw and proteosynthesis in a continuous culture of rumen microbes., *Anim. Feed Sci. Tech.* 77: 149-162.

63- Broudiscou, L.P., Papon, Y., Broudiscou, A.F., 2000. Effect of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 87 : 263– 277.

64- Brugère, H., 1983. Biochimie du rumen – Aspects physiologiques. *Bull. GTV.*, 3: 5-22.

65- Brunet, F., 2002. Rationnement et maladies métaboliques de la vache laitière. Thèse de Docteur vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 126.

66- Brunet, S., 2008. Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestif des ruminants. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier., 246 p.

67- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Cardozo, P.W., Kamel, C. 2005. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dualflow continuous culture, *J. Dairy Sci.*, 88, 2508-2516.

68- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., 2006. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.*, 89: 761-771.

- 69-C.O.I., 2007.** Technique de production en oléiculture., Espagne, 334 p.
- 70- Calabrò, S., Cutrignelli, M.I., Lo Presti, V., Tudisco, R., Chiofalo, V., Grossi, M., Infascelli, F., Chiofalo, B. 2015.** Characterization and effect of year of harvest on the nutritional properties of three varieties of white lupine (*Lupinus albus*L.). J. Sci. Food Agric., 95: 3127–3136.
- 71-Callaway, T.R., Martin, S.A., 1996.** Effect of organic acid and monensin treatment on *in vitro* mixed ruminal microorganisms fermentation of cracked corn”, J. Anim. Sci., 74, 1982-1989.
- 72- Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C. 2004.** Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. J. Anim. Sci., 82: 3230-3236.
- 73- Carpita, N.C., 1996.** Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology., 47: 445-476.
- 74- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A., Losa, R., 2005.** Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. Anim. Feed Sci. Technol, 119, 29–41.
- 75- Cetkovic, G.S., Brunet, J.M., Bjilas, S.M., Tumbas, V.T., Markov, S.L., Cetkovic, D.D. 2007.** Antioxidant potential, lipid peroxidation inhibition and antimicrobial activities of *Satureja montana* L., Subsp. *Kitaibelli* extracts. Int. J. Mol. Sci., 8: 1013-1026.
- 76- Channel, R., 2006.** Olive tree. 1500yrq.jpghttp://fr.wikipedia.org/wiki/*Olea_europaea*.
- 77- Charries, J., 1980.** L’eucalyptus sur les hauts plateaux malgaches : Témoin, acteur et victime de comportements sociaux et politiques. Cah O.R.S.T.O.M, Sér.Sci.Hum, 17 :267-268p.
- 78- Chaudhary, U.B., Gupta, A., 2013.** Effect of different plant extracts on Methane and total gas production in goats under *in vitro* condition. 2ndInt. Conf. and Exhib on Nutritional Science and Therapy, July 15-17, Philadelphia, USA.
- 79- Cheeke, P.R., 1995.** Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock. J. Anim. Sci. 73, 909–918.
- 80- Chen, M., Wolin, M.J., 1979.** Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. Appl. Environ.Microb. 38, 72–77.
- 81- Cheng, K.J., Costerton, J.W., 1980.** Adherent rumen bacteria -their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. In: Digestive physiology and metabolism in ruminants Ruckebush, Y.T.P. (Ed.). Falcon house, Lancaster, England, pp. 227-250.
- 82- Cheng, K.J., Forsberg, C.W., Minato, H., Costerton, J.W., 1991.** Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. In: Tsuda, T., Sasaki, Y.,

Kawashima, R. (Eds.), Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. Proc 7th int. symp. ruminant physiology, Sendai, Japan, Academic Press, Inc, pp. 595-624.

83- Cherif, S., Rahal, N., 1996. A clinical trial of a titrated Olea extract in the treatment of essential arterial hypertension, *J Pharm Belg*, 69-71.

84- Chesson, A., Steward, C.S., Wallace, R.J., 1982. Influence of plant phenolics acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. *Applied Environmental Microbiology.*, 44: 597-603.

85- Chilliard, Y., Ferlay, A., Doreau, M., 2001: Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids, *Livest. Prod. Sci.*, 70, 31-48.

86- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., Doreau, M., 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology.*, 109: 828-855.

87- Christophe, G., 2007. Étude de *Fibrobacter succinogenes* en bioréacteur anaérobie en vue de la dégradation de déchets végétaux. Thèse de doctorat université Blaise Pascal.

88- Coleman, G.S., 1975. The inter-relationship between rumen ciliate protozoa and bacteria. In: Mc Donald, W., Warner, A.C.I. (Eds.), *Digestion and metabolism in the ruminant.* The university of New England publ, Armidale, USA, pp. 149-164.

89- Coleman, G.S., 1983. Hydrolysis of fraction I leaf protein and casein by rumen entodiniomorphid protozoa. *Journal of Applied Bacteriology.*, 55: 111-118.

90- Collingborn, F.M.B., Gowen, S.R., Mueller-Harvey, I., 2000. Investigations into the biochemical basis for nematode resistance in roots of three *Musa* cultivars in response to *Radopholus similis* infection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.*, 48: 5297-5301.

91- Conchie, J., 1954. b-Glucosidase from rumen liquor. Preparation, assay and kinetics of action. *Biochemistry Journal.*, 58: 552-560.

92- Counotte, G.H.M., Lankhorst, H., Prins, R.A., 1982. Role of DL-lactic as an intermediate in rumen metabolism of dairy cows. *Journal of Animal Science.*, 56: 1222-1235.

93-Cronquist, A., 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia. Univesity Press.

94-Currie, H.A., Perry, C.C., 2007. Silica in plants: Biological, biochemical and chemical studies. *Annals of Botany.*, 100: 1383-1389.

95- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International J. Antimicrob. Agents*, 38 (2): 99–107.

- 96- Czerkawski, J.W., Blaxter, K.L., Wainman, F.W., 1966.** The metabolism of oleic, linoleic and linolenic acids by sheep with reference to their effects on methane production., Br. J. Nutr., 20, 349-362.
- 97- De Puytorac, P., Grain, J., Mignot, J.P., 1987.** Précis de protistologie. Société Nouvelle des Editions Boubee, Paris.
- 98- Del Pino, M.C.Á., Hervás, G., Mantecón, Á.R., Giráldez, F.J., Frutos, P., 2005.** Comparison of biological and chemical methods, and internal and external standards, for assaying tannins in Spanish shrub species. J. Sci. Food Agric. 85, 583–590.
- 99- Delgado-Pertóanaez, M., Goamez-Cabrera, A., Garrido, A., 2000.** Predicting the nutritive value of the olive leaf (*Olea europaea*): digestibility and chemical composition and *in vitro* studies. Anim. Feed Sci. Technol, 87.87-201.
- 100-Demarquilly, C., 1986.** Les matières azotées des plantes fourragères. In : Le Sélectionneur Français, 37 : 25-38.
- 101- Demeyer, D., Van Nevel, C.J., 1975.** Methanogenesis, an integrated part of carbohydrate fermentation and its control. In: Mcdonald L.W, Warner A.C.I, editors. Digestion and metabolism in the ruminant. Armidale, Australia: University of New England Publishing Unit; .p. 366-382.
- 102- Demeyer, D.I., 1990.** Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. Indian Summer Course on Rumen Metabolism and Ruminant Digestion, Vol. 2, INRA, Clermont Ferrand.
- 103- Demeyer, D.I., 1991.** “Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and the hindgut”, Jouany J.P éd.,*Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*, INRA Editions, Paris, 217-237.
- 104- Dey, A., Paul, S.S., Rathor, P.R., 2014.** Potential of *Moringa oleifera* leaves in modulating *in vitro* methanogenesis and fermentation of wheat straw in buffalo. The Indian J. Anim. Sci., 84: 533–538.
- 105- Dijkstra, J., Boer, H., Van Bruchem, J., Bruining, M., Tamminga, S., 1993.** Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. British Journal of Nutrition., 69: 385-396.
- 106- Doelle, H.W., 1969.** Chemosynthesis-Anaerobic respiration. In: Bacterial Metabolism. Academic Press, New York and London. pp 89-127.
- 107- Doré, J., Gouet, P., 1991.** Microbial interactions in the rumen. In: Jouany, J.P. (Ed.), Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. Paris, France, pp. 71-88.
- 108- Dumić, Z., Blache, D., 2012.** Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Animal Feed Science and Technology* 176, 150.

- 109- Durmic, Z., Moate, P.J., Eckard, R., Revell, D.K., Williams, R., Vercoe, P.E., 2013.** *In vitro* screening of selected feed additives, plant essential oils and plant extracts for rumen methane mitigation. *J Sci Food Agric*, 94:1191–1196.
- 110- Elsdén, S.R., Volcani, B.E., Gilchrist, F.M.C., Lewis, D., 1956.** Properties of a fatty acid forming organism isolated from the rumen of sheep. *Journal of Bacteriology.*, 72: 681-689.
- 111- Enemark, J.M.D., Jorgensen, R.J., Enemark, P.S., 2002.** “Rumen acidosis with special emphasis on diagnostic aspects of subclinical acidosis : a review”, *Veterinarija IR Zootehnika*, 42, 16-29.
- 112- Eugene, M., 2002.** Effets de la defaunation des ruminants sur les performances de production, en fonction de la ration ingérée. Etude de la variation de la protéosynthèse et de la cellulolyse microbienne ruminale. Thèse de doctorat, institut national agronomique Paris-Grignon.
- 113- FAO. 1995.** FAO Year book Production. Rome.;48:118–119.
- 114- Fegeros, K., Zervas, G., Apsokardos, F., Vastardis, J., Apostolaki, E. 1995.** Nutritive evaluation of ammonia treated olive tree leaves for lactating sheep. *Small Ruminant Research*, 17, 9-15.
- 115- Fengel, D., Wegener, G., 1984.** Distribution of the component within the wood cell wall. in: Fengel, D, Wegener, G. (Eds.), *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Verlag Kessel, pp. 227-239.
- 116- Feucht, W., Treutter, D. 1999.** The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defense. In: *Principles and practices in chemical ecology*, PRESS et BOCA RATON (Eds.), pp. 307-338.
- 117- Finlay, B.J., Esteban, G., Clarke, J.K., Williams, G.A., Embley, T.M., Hirt, R.P., 1994.** Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters.*, 117: 157-161.
- 118- Fonty, G., Forano, E., 1999.** Ecologie de la dégradation et de la fermentation des polyholosides constitutifs des parois végétales dans le rumen. *Cahiers Agricultures.*, 8: 21-35.
- 119- Fonty, G., Gouet, P., Jouany, J., Senaud, J., 1987.** Establishment of the Microflora and Anaerobic Fungi in the Rumen of Lambs. *Journal of General Microbiology.*, 133: 1835-1843.
- 120-Fonty, G., Joblin, K.N., 1991.** Rumen anaerobic fungi : their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fibre digestion. In: Tsuda, T., Sasaki, Y., Kawashima, R. (Eds.), *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 655-679.
- 121- Fonty, G., Jouany, J.P., Forano, E., Gouet, P.H., 1995.** L'écosystème microbien du réticulo-rumen. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M.

(Eds.), Nutrition des ruminants domestiques, ingestion et digestion. Paris, France, pp. 299-348.

122- Forano, E., Broussolle, V., Durand, R., 1996. Degradation of plant cell wall polysaccharides by rumen bacteria and fungi. *Annales de Zootechnie.*, 45: SUPP1.France. paris. 272 p.

123- Frutos, P., Hervas, G., García, F.G., Mantecón, A.R., 2004. Review. Tannins and ruminant nutrition. *Span. J. Agric. Res.* 2, 191–202.

124-Garcia-Gomez, A., Roig, A., Bernal, M.P., 2003. Composting of the solid fraction of olive millwastewater with olive leaves: organic matter degradation and biological activity. *BioresourceTechnology*, 86, 59-64.

125- Garcia-Gonzalez, R., Lopez, S., Fernandez, M, Gonzalez, J.S., 2006. Effects of the addition of some medicinal plants on methane production in a rumen simulating fermenter (rusitec), Soliva C.R., Takahashi J., Kreuzer M. eds., *Greenhouse Gases and Animal Agriculture*, Elsevier Science B.V., in press.

126- Garcia-Lopez, P.M., Kung, L., Odom, J.M., 1996. *In vitro* inhibition of microbial methane production by 9,10-anthraquinone. *J. Anim. Sci.* 74, 2276–2284.

127- Gasmi-Boubaker, A., Kayouli, C., Buldgen, A., 2005. *In vitro* gas production and its relationship to in situ disappearance and chemical composition of some Mediterranean browse species. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123, 303–311.

128- Ghedira, K; Goetz, P; Jeune, R., 2008. *Eucalyptus Globulus Labill.* Phytothérapie .6: 197-20.

129- Getachew, G., Blummel, M., Makkar, H.P.S., Becker, K., 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology.*, 72: 261-281.

130- Giger-Reverdin, S., Duvaux-Ponter, C., Sauvant, D., Martin, O., Nunes Do Prado, I., Muller, R., 2002. Intrinsic buffering capacity of feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology.*, 96,83-102.

131-Giger-Reverdin, S., Vermorel, M., Sauvant, D., 1992. Facteurs de variation de la production de méthane au cours de la digestion des aliments composés chez les ruminants. *Annales de zootechnie, INRA/EDP Sciences*, , 41 (1), pp.37-38.

132- Giordano, E., 1968. Osservazioni sull'apparato radicale dell'Eucalyptus globulus Labill. *Publ. del Centro di Spermentazione Agricola e Forestale.* X, 2 : pp.135-148.

133- Goel, G., Makkar, H.P., 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 729–739.

134- Goel, G., Makkar, H.P.S., Becker, K. 2007. Effect of saponin-rich fractions of different plants on rumen fermentation with particular reference to methane emission in vitro. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.*, 16: 68 (Abstract).

- 135-Goopy, J.P., Hegarty, R.S., 2006.** The persistence of divergent methane production over time in lot fed cattle, Soliva C.R., Takahashi J., Kreuzer M. éd., Greenhouse Gases and Animal Agriculture, Elsevier Science B.V., in press.
- 136- Gouet, P.H., Grain, J., Dubourguier, H.C., Albagnac, G., 1986.** Interactions entre espèces microbiennes anaérobies dans le rumen. *Reproduction Nutrition and Développement.*, 26 :147-149.
- 137-Groupe intergouvernemental d'expert sur l'évolution du climat (GIEC). 2013.** Changements climatiques 2013. Les éléments scientifiques. Résumé à l'intention des décideurs. [En ligne] [http://www.ipcc.ch/report/ar5/wg1/docs/WG1AR5_SPM_brochure_fr.pdf].
- 138- Guetachew, G., Blümmel, M., Makkar, H.P.S., Becker, K. 1998.** *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72: 261-281.
- 139- Guglielmelli, A., Calabrò, S. Primi, R., Carone, F., Cutrignelli, M.I., Tudisco, R., Piccolo, G., Ronchi, B., Danieli, P.P., 2011.** *In vitro* fermentation patterns and methane production of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) hay with different condensed tannin contents. *Grass For. Sci.*, 66, 488–500.
- 140- Guignard, J. L., 2001.** In Botanique systématique moléculaire. 12ème Edition Masson (Paris), 304.
- 141- Guillaume, H.B., 2007.** Flore du Rumen : Origine, Composition, Evolution, Conséquence Physiopathologiques. Thèse Med. Vet, Alfort, pp. 21-47.
- 142- Gunal, M., Ishlak, A., AbuGhazaleh, A.A., Khattab, W., 2014.** Essential oils effect on rumen fermentation and biohydrogenation under *in vitro* conditions. *Zech.J Anim Sci*, 10, 450–459.
- 143- Hagerman, A.E., 1987.** Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. *J. Chem. Ecol.* 13, 437–449.
- 144- Hagerman, A.E., 2002.** Tannin Chemistry (www.users.muohio.edu/hagermae).
- 145- Hariadi, B.T., Santoso, B., 2010.** Evaluation of tropical plants containing tannin on *in vitro* methanogenesis and fermentation parameters using rumen fluid. *J. Sci. Food Agric.*, 90: 456–461.
- 146-Hart, K.J., Yanez-Ruiz, D.R., Duval, S.M., McEwan, N.R., Newbold, C.J., 2008.** Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 147: 8–35.
- 147- Hatano, T., Kusuda, M., Inada, K., Ogawa, T.O., Shiota, S., Tsuchiya, T., Yoshida, T., 2005.** Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry.*, 66: 2047-2055.
- 148- Hegarty, R. S., 2001.** Greenhouse gas emissions from australian livestock sector. What do we know, what can we do ?, *Australian Greenhouse Office*.

- 149-Hegarty, R.S., 1999.** Mechanisms for competitively reducing ruminal methanogenesis, *Austr. J. Agric. Res.*, 50, 1299-1305.
- 150- Henry, S., 2003.** L'huile d'olive, son intérêt nutritionnel, son utilisation en pharmacie et en cosmétique. Diplôme d'état de docteur en pharmacie, Univ. Henri Poincaré, 127 p.
- 151- Hess, H.D., Kreuzer, M., Diaz, T.E., Lascano, C.E., Carulla, J.E., Solvia, C.R., Machmuller, A. 2003.** Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated fluid. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 109: 79-94.
- 152- Hillman, K., Lloyd, D., Williams, A.G., 1985.** Use of a portable quadrupole mass spectrometer for the measurement of dissolved gas concentrations in ovine rumen liquor in situ. *Current Microbiology.*, 12: 335-340.
- 153- Hino, T., Kuroda, S., 1993.** Presence of lactate dehydrogenase and lactate racemase in *Megasphaera elsdenii* grown on glucose or lactate. *Applied Environmental Microbiology.*59: 255-259.
- 154- Hino, T., Russel, J.B., 1985.** Effect of reducing-equivalent disposal and NADH / NAD on deamination of amino acids by intact rumen micro-organisms and their cell extracts. *Applied Environmental Microbiology.*, 50: 1368-1374.
- 155- Hino, T., Shimada, K., Marruyama, T., 1994.** Substrate preferences in a strain of *Megasphaera elsdenii*, a ruminal bacterium, and its implications in propionate production and growthcompetition. *Applied Environmental Microbiology.*, 60:1827-1831.
- 156- Hristov, A.N., Ivan, M., Neill, L., McAllister, T.A. 2003.** Evaluation of several potential bioactive agents for reducing protozoal activity in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 105: 163-184.
- 157-Hungate, R.E., 1966.** The rumen bacteria. In: Hungate, R.E. (Ed.). *The rumen and its microbes.* Academic Press INC, New york and London, pp. 8-10.
- 158- Hvelplund, T., 1991.** Volatile fatty acids and protein production in the rumen. In *rumen microbial metabolism and ruminant digestion*, pp. 165-178. Edited by J.P. Jouany. Paris: INRA.
- 159- Iason, G.R., Hartley, S.E., Duncan, A.J., 1993.** Chemical composition of *Calluna vulgaris* (Ericaceae): Do responses to fertilizer vary with phenological stage? *Biochem. Syst. Ecol.* 21, 315–321.
- 160-IBM Corp. Released, 2013.** IBM SPSS Statistics for Windows, Armonk, NY, USA. Version 22.0.
- 161- Ikwuegbu, O.A., Sutton, J.D. 1982.** The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep”, *Bri. J. Nutr.*, 48, 365- 375.*in vitro* evaluation. *J. Nutr. Ecol. Food Res.* 4, 1–3, 2017.
- 162- IPCC, 1992.** Climate change 1992, Houghton J.T., Callander, B.A., Varney S.K. édés., *The supplementary Report to the Scientific Assessment*, Cambridge University Press.

- 163-Iwasaki, K., Inoue, M., Matsubara, Y., 1998.** Continuous hydrolysis of pectate by immobilized polygalacturonase in a continuously stirred tank reactor. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry.*, 62: 262-272.
- 164- Jacob, M.R., 1936.** The primary and secondary leaf bearing systems of the eucalyptus. *C.F.5 T.B. Bull.*, 18.
- 165- Jacob, M.R., 1955.** Growth habits of the eucalyptus. Ed. by Forest and Timber Bureau. Dept of the Interior. Canberra. Australia.
- 166-Jafari, S., Goh, Y.M., Rajion, M.A., Jahromi, M.F., Ebrahimi, M., 2016.** Manipulation of rumen microbial fermentation by polyphenol rich solvent fractions from papaya leaf to reduce green-house gas methane and biohydrogenation of c18 PUFA. *J Agri Food Chem.* 64:4522–4530. 30.
- 167-Janssen, P.H., Kirs, M., 2008.** Structure of the *Archaeal* Community of the rumen. *Applied environmental Microbiology.*, 74: 3619-3625.
- 168- Japon-Lujan, R., Luque de Castro, M.D., 2006.** Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*, 1136, 185-191.
- 169-Jarrige, R., 1980.** Chemical methods for predicting the energy and protein value of forages. *Annales de Zootechnie*, 29: 299-323.
- 170- Jarvis, G.N., Strompl, C., Burgess, D. M., Skillman, L. C., Moore, E. R. B., Joblin, K. N., 2000.** Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. *Current Microbiology.*, 40: 327-332.
- 171- Jiménez-Peralta, F.S., Salem, A.Z.M., Mejia-Hernandez, P., Gonzalez-Ronquillo, M., Albarran-Portillo, B., Rojo-Rubio, R., Tinoco-Jaramillo, J.L., 2011.** Influence of individual and mixed extracts of two tree species on in vitro gas production kinetics of high-concentrate diet fed to growing lambs. *Livest. Sci.*, 136: 192–200.
- 172-Johnson, D.E., Phetteplace, H.W., Ulyatt, M.J., 2000.** Variations in the proportion of methane of total greenhouse gas emissions from US and NZ dairy production systems”, *Proc. of the 11th Int. Symp. on Methane Mitigation*, Novosibirsk, Russia, 249-254.
- 173- Johnson, D.E., Phetteplace, H.W., Seild, A.F., 2002.** Methane, nitrous oxide and carbon dioxide emissions from ruminant livestock production systems”, Takahashi J., Young B.A., eds., *Greenhouse Gases and Animal Agriculture*, Elsevier Science B.V., 77-85.
- 174- Jouany, J.P., 1982.** Dosage des acides gras volatils dans les contenus digestifs, les jus d'ensilage, les cultures bactériennes et les contenus de fermenteurs anaérobies. *Sciences des Aliments.*, 2: 131-144.
- 175- Jouany, J.P., 1988.** Effect of diet on populations of rumen protozoa in relation to fibre digestion. In :Nolan, J.V., Leng, R.A., Demeyer, D.I. The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion. Penambul Books, Armidale, NSW, 59-74.

- 176-Jouany, J.P., 1994.** Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. INRA (France), Productions Animales., 7 (3): 207-225.
- 177- Jouany, J.P., 1994.** Manipulation of microbial activity in the rumen”, *Arch. Anim. Nutr.*, 46,133-153.
- 178- Jouany, J.P., Lassalas, B., 1997.** Study of the adaptation of the rumen ecosystem to the antimethanogenic effect of monensin measured *in vivo*”, *Reprod.Nutr. Dev.* (suppl.), S69-S70.
- 179-Jouany, J.P., Ushida, K., 1990.** Protozoa and fibre digestion in the rumen. In: Hoshino, S., Onodera, R., Minato, H., Itabashi, H. (Eds.), *The rumen ecosystem. The microbial metabolism and its regulation.* Japan, pp. 139-150.
- 180- Jouany, J.P., Ushida, K., 1998.** The role of protozoa in feed digestion. *Asian-Australasian Journal of Animal Science.*, 12: 113-128.
- 181- Jouany, J.P., Ushida, K., 1998.** The role of protozoa in feed digestion. *Asian-Australasian Journal of Animal Science.*, 12: 113-128.
- 182- Jouany, JP., Lassalas, B., 2000.** Effect of protozoa on methane production in the rumen; consequences on carbon and hydrogen distribution among the other end products of fermentation. In: *Methane mitigation, Proc. 2nd Int. Conf. US Environ. Protection Agency and Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia.* pp. 121-123.
- 183- Jung, H.G., Deetz, D.A., 1993.** Cell wall lignification and degradability. p. 315-346, In Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., Ralph, J. eds . *Forage Cell Wall Structure and Digestibility.* ASA-CSSA-SSSA, Madis on, WI, USA.
- 184- Kamra, D.N., Agarwal, N., Chaudhary, L.C., 2005.** Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. In: Soliva C.R., Takahashi J., Kreuzer M. (Eds.) *Proc. 2nd Int. Conf. on greenhouse gases and animal agriculture.* Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zurich, Switzerland. pp. 102-111.
- 185-Karnati, S.K., Yu, Z., Sylvester, J.T., Dehority, B.A., Morrison, M., Firkins, J.L., 2003.** Technical note: Specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. *Journal of Animal Science.*, 81:812-815.
- 186- Kasraoui , F., 2010.** Etude pratique d'exigence de l'olivier. Mémoire d'ing. Agronomie, Univ. Tlemcen 40 P.
- 187- Keppler, F., Hamilton, J.T.G., Brab, M., Röckmann, T., 2006.** Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions, *Nature*, 439, 187-191.
- 188- Kim, E.T., Guan, L.L., Lee, S.J., 2015.** Effects of flavonoid-rich plant extracts on *in vitro* ruminal methanogenesis, microbial populations and fermentation characteristics. *Asian-Australas J Anim Sci.* 28:530–7.

- 189- Klieve, A.V., Bain, P.A., Yokoyama, M.T., Ouwerkerk, D., Forster, R.J., Turner, A.F., 2004.** Bacteriophages that infect the cellulolytic ruminal bacterium *Ruminococcus albus* AR67. *Letters of Applied Microbiology.*, 38: 333-338.
- 190- Klieve, A.V., Bauchop, T., 1988.** Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. *Applied and Environmental Microbiology.*, 54: 1637-1641.
- 191- Klieve, A.V., Swain, R.A., 1993.** Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pulsed-field gel electrophoresis and laser densitometry. *Applied and Environmental Microbiology.*, 59: 2299-2303.
- 192- Koike, S., Handa, Y., Goto, H., Sakai, K., Miyagawa, E., Matsui, H., Ito, S., Kobayashi, Y., 2010.** Molecular monitoring and isolation of previously uncultured bacterial strains from the sheep rumen. *Applied Environmental Microbiology.*, 76:1887-1894.
- 193- Kolb, E., 1975.** Physiologie de la digestion et de l'absorption. Chapitre IV. In: *Physiologie des animaux domestiques*. Editeurs Vigot Frères, Paris, France. pp 251-284.
- 194- Krause, D.O., Smith, W.J., Ryan, F.M., Mackie, R.I., McSweeney, C.S., 1999.** Use of 16S-Rna Based Techniques to Investigate the Ecological Succession of Microbial Populations in the Immature Lamb Rumen: Tracking of a Specific Strain of Inoculated *Ruminococcus* and Interactions with Other Microbial Populations *in Vivo*. *Microbial Ecology.*, 38 (4) : 365-376.
- 195- Lamy, E., Rawel, H., Schweigert, F.J., Capela e Silva, F., Ferreira, A., Costa, A.R., Antunes, C., Almeida, A.M., Coelho, A.V., Sales-Baptista, E., others, 2011.** The effect of tannins on Mediterranean ruminant ingestive behavior: the role of the oral cavity. *Molecules* 16, 2766–2784.
- 196- Lana, R.P., Russel, J.B., Van Amburg, M.E., 1998.** The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production”, *J. Anim. Sci.*, 76, 2190-2196.
- 197- Lanier, I., 1986.** Maladies de l'eucalyptus. *Bult. OEPP/EPPOB* 16 : 255-263 p.
- 198- Larrahondo, J. E., 1985.** Productos naturales: pruebas químicas iniciales en una planta. Guía de estudio del Departamento de Química, Universidad del Valle, pp. 10.
- 199- Lasseby, K.R., Ulyatt, M.J., Martin, R.J., Walker, C.F., Shelton, I.D., 1997.** Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand. *Atmospheric Environment*, 31, 2905-2914.
- 200- Lévêque, C., 2001.** Ecologie. De l'écosystème à la biosphère. Masson Sciences. Dunod, Paris. 502p.
- 201-Loesche, W.J., 1969.** Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. *Applied Microbiology.*, 18 : 723-727.
- 202- Lopez, S., Makkar, H.P.S., Soliva, C.R., 2010.** Screening plants and plant products for methane inhibitors. In, Vercoe PE, Makkar HPS, Schlink A (Eds): *In vitro* Screening of

Plant Resources for Extra-nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies. pp.191-231, London, New York.

203- Lourenço, M., Ramos-Morales, E., Wallace, R. J., 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal.*, 4: 1008-1023.

204- Loussert, T ., Brousse, G., 1978. L'olivier technique agricole et production Méditerranéenne. Ed. Maisonneuve et Lorose ,468 p.

205- Lowry, J., Kennedy, P., 1996. Fermentation of flavonols by rumen organisms,” Proceeding of Australian Society of Animal Production, vol. 21, p. 366.

206- Lwin, K.O., Hayakawa, M., Ban-Tokuda, T., Matsui, H., 2011. Real-Time PCR Assays for monitoring anaerobic fungal biomass and population size in the rumen. *Current Microbiology.*, 62(4): 1147-51.

207- Machmüller, A., Ossowski, D.A., Kreuzer, M., 2000. Comparative evaluation of the effects of coconut oil, oilseeds and crystalline fat on methane release, digestion and energy balance in lambs”, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 85, 41- 60.

208- Machmüller, A., Soliva, C.R., Kreuzer, M., 2003. Methane-suppressing effect of myristic acid in sheep as affected by dietary calcium and forage proportion, *Bri. J. Nutr.*, 90, 529-540.

209- Mackie, R.I., White, B.A., 1990. Symposium: Rumen microbial ecology and nutrition. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism : potential impact on nutrient output. *Journal of Dairy Science.*, 73: 2971-2995.

210- Madrid, J., Megias, M.D., Hernandez, F., 2002. *In vitro* determination of dry matter and cell wall degradation, and production of fermentation end products of various by-products. *Ani. Feed. Sci. Tech.* 51: 189-199.

211- Makkar, H.P.S., 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Rum. Res.*, 49: 241–256.

212- Makkar, H.P.S., 2003a. Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage: A Laboratory Manual. Springer Science & Business Media.

213-Makkar, H.P.S., Blümmel, M., Becker, K., 1997. *In vitro* rumen apparent and true digestibilities of tannin-rich forages. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 67: 245-251.

214-Makkar, H.P.S., Blümmel, M., Borowy, N. K., Becker, K., 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61: 161-165.

215- Manh, N., Wanapat, S., Uriyapongson, M., Khejornsart, S., Chanthakhoun, P.V. 2012. Effect of eucalyptus (*Camaldulensis*) leaf meal powder on rumen fermentation characteristics in cattle fed on rice straw. *African J. Agric. Res.*, 7(13): 1997-2003.

- 216- Marburg, M. W., 1999.** Plantes thérapeutiques - Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 3 édition technique & documentation. 636 pages.
- 217- Martens, G.C., Buxton, D.R., Barnes, R.F., 1988.** Feeding value (forage quality). In: Alfalfa and Alfalfa Improvement. Hanson, A.A., Barnes, R.F., Jill, R.R. (Eds.), Madison, Wisconsin, USA. pp, 463-492.
- 218- Martin, B., Fedele, V., Ferlay, A., Grolier, P., Rock, E., Gruffat, D., Chilliard, Y. 2004 :** Effects of grass-based diets on the content of micronutrients and fatty acids in bovine and caprine dairy products, Lüscher A., Jeangros B., Kessler W., Huguenin O., Lobsiger M., Millar N., Suter D. éd. éd., *Land use systems in grassland dominated regions*, Zürich, 9, 876-886.
- 219- Martin, B., Verdier-Metz, I., Buchin, S., Hurtaud, C., Coulon, J.-B., 2005.** How does the nature of forages and pasture diversity influence the sensory quality of dairy livestock products ?, *Anim. Sci.*, 81, 205-212.
- 220- Martin, C., Morgavi, D., Doreau, M., Jouany, J.-P., 2006.** Comment réduire la production de méthane par les ruminants ?, *Fourrages*, Vol.187, p.283-300.
- 221- Martin-Garcia, A.I., Molina-Alcaide, E., 2008.** Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaves for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 142, 317–329.
- 222- Maymone, B., Sblendorio, A., Ceci Ginestrelli, D., 1950.** Ricerche sulla composizione chimica, sulla digeribilità e sul valore nutritivo delle foglie di olivo (*Olea Europea* L.). *Ann. Ist. Sper. Zootec.* 4; 1–19.
- 223- Mc Donald, P, Greenhalgh, J.F.D, Edwards, R.A., Morgan, C.A., 1995.** Animal nutrition. 5th, Longmanns, London.
- 224- McAllister, T.A., Cheng, K.J., 1996.** Microbial strategies in the ruminal digestion of cereal grains. *Animal Feed Science and Technology.*, 62: 29-36.
- 225- McAllister, T.A., Newbold, C.J., 2008.** Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Aust. J. Exp. Agric.* 48, 7–13.
- 226- Mccaughey, W.P., Wittenberg, K., Corrigan, D., 1999.** Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows, *Can. J. Anim. Sci.*, 79, 221- 226.
- 227- Mccrabb, G.J., 2002.** “Nutritional options for abatement of methane emissions from beef and dairy systems in Australia”, Takahashi J., Young B.A. éd., *Greenhouse Gases and Animal Agriculture*, Elsevier Science B.V., 115-124.
- 228- McIntosh, F.M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R.J., Beever, D.A., Newbold, C. J., 2003.** Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Appl. Environ. Microb.*, 69: 5011-5014.

- 229- McSweeney, C.S., Palmer, B., Mc Neill, D.M., Krause, D.O., 2001.** Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91, 83–93.
- 230-Medjekal, S., 2016.** Effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive, la production de méthane et de tannins condensés d'arbustes fourragers locaux. Essai de contrôle *in vitro* de la méthanogénèse ruminale d'ovins par l'utilisation de plantes médicinales. Thèse de doctorat. Université Mentouri de Constantine, 175 p.
- 231-Mehani, M., 2006.** Diagnostic sur les essais d'introduction de quelques essences.
- 232- Mellenberger, R.W., Satter, L.D., Millett, M.A., Baker, A.J., 1970.** An *in vitro* technique for estimating digestibility of treated and untreated wood. *J. Anim. Sci.* 30 (6): 1005-1011.
- 233- Melun, F., Nguyen, N., 2012.** L'*eucalyptus* en France : une espèce remarquable pour la production de biomasse *Revue Forestière Française* (soumis), 20 p.
- 234- Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., Schneider, W., 1979.** The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci.* 93, 217–222.
- 235- Menke, K.H., Steingass, H., 1988.** Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim Res Dev* 28, 7–55.
- 236- Métro, A., 1955.** Eucalypts for planting. *FAO Forestry and Forest Products Studies II.*
- 237-Métro, A., 1963.** L'eucalitticoltura in una economia forestale modera. *Ann. Acc. It. Scienze. Forestali, frenz.*
- 238- Michalet-doreau, B., Fernandez, I., Peyron, C., Millet, L., Fonty, G., 2001.** Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reproduction Nutrition and Development.*, 4: 187-194.
- 239- Miller, T.L., 1995.** Ecology of methane production and hydrogen sinks in the rumen. In: Engelhardt W., Leonhard-Marek S., Breve G., Giesecke D. (Eds.) *Ruminant Physiology.* Stuttgart, Germany, pp. 317–331.
- 240- Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T., Mc Nabb, W.C., 2003a.** The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 106, 3–19.
- 241- Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., Calder, P. C., 1997.** Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria, *Microbiological Research*, vol. 152, no. 3, pp. 239–246.
- 242- Mitsumori, M., Sun, W., 2008.** Control of rumen microbial fermentation for mitigating methane emissions from the rumen. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.*, 21, 144–154.

- 243-Molina-Alcaide, E., Martin-Garcia, A.I., Moumen, A., Carro, M.D., 2010.** Ruminant fermentation, microbial growth and amino acid flow in single-flow continuous culture fermenters fed a diet containing olive leaves. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 94:227–236.
- 244-Molina-Alcaide, E., Yanez-Ruiz, D.R., 2008.** Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review. *Anim. Feed Sci. Technol*, 147. 247–264.
- 245- Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C., Newbold, C.J., 2010.** Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 4: 1024–1036.
- 246- Mosoni, P., Martin, C., Forano, E., Morgavi, D.P., 2011.** Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. *Journal of animal Science.*, 89(3):783-791.
- 247- Moss, A., Jouany, J.P., Newbold, J., 2000.** Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.*, 49, 231-253.
- 248- Mould, F. L., Morgan, R., Kliem, K. E., Krystallidou, E., 2005.** A review and simplification of the *in vitro* incubation medium. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123-124: 155-172.
- 249-Mueller-Harvey, I., 2001.** Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology.*, 91: 3-20.
- 250- Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A.M.V., Böhm, V., 2010.** Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 992–999.
- 251- Mylonaki, S., Kiassos, E., Makris, D.P., Kefalas, P., 2008.** Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surfacemethodology. *Anal. Bioanal. Chem.*, 392(5), 977-985.
- 252- Nefzaoui, A., 1995.** Feeding value of Mediterranean ruminant feed resources. Advanced course. Syria 12-23 March 1995.
- 253- Nellot, L., Demeyer, D., Verstracete, W., 1997.** Effect of 2-bromoethanesulfonic acid and *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 addition on stimulation of reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem by selective by inhibition of methanogens. *Appl. Environ. Microb.*, 63: 194–200.
- 254- Newbold, C.J., Lassalas, B., Jouany, J.P., 1995.** The importance of methanogens asso-ciated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Letters in Applied Microbiology*.21: 230-234.
- 255- Newbold, C.J., Rode, L.M., 2006.** Dietary additives to control methanogenesis in the rumen”, Soliva C.R., Takahashi J., Kreuzer M. éd., *Greenhouse Gases and Animal Agriculture*, Elsevier Science B.V., in press.

- 256- Newbold, C.J., Wallace, R.J., Chen, X.B., McIntosh, F.M., 1995.** Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. *J. Anim. Sci.*, 73: 1811–1818.
- 257- Njidda, A.A., Nasiru, A., 2010.** *In vitro* gas production and dry matter digestibility of tannincontaining forages of semi-arid region of north-eastern Nigeria. *Pak J Nutr* 9, 60–66.
- 258- Njidda, A.A., Olatunji, E., Raji, A., 2012.** Semi arid browse forages: Their antinutritive substances and in sacco neutral detergent fibre and organic matter degradability. *J. Agric. Vet. Sci.* 1, 21–30.
- 259- Nugent , J.H.A., Mangan, J.L., 1981.** Characteristics of the rumen proteolysis of fraction 1 (18S) protein from lucerne (*Medicago sativa* L). *British Journal of Nutrition.*, 46: 39-58.
- 260- Ogimot, K., Imai, S., 1981.** Atlas of Rumen Microbiology. Scientific Societies Press, Tokyo, Japan. pp. 158.
- 261- Okine, E.K., Basarab, J.A., Baron, V., Price, M.A., 2001.** Net feed efficiency in young graowing cattle : III. Relationship to methane and manure production, *Proc. Can. J. Anim. Sci.*, conference.
- 262- Okine, E.K., Mathison, G.W., Hardin, R.T., 1989.** Effects of changes in frequency of reticular contractions on fluid and particulate passage rates in cattle, *J. Anim. Sci.*, 67, 3388-3396.
- 263- Onwuka, C.F.I., 1992.** Tannin and saponin contents of some tropical browse species fed to goats. *Trop. Agric.* 69, 176–180.
- 264- Orpin, C.G., Munn, E.A., 1974.** The occurrence of bacteriophages in the rumen and their influence on rumen bacterial populations. *Experientia.*, 30 (9): 1018-1020.
- 265- Orskov, E.R., Donald, Mc. I., 1979.** The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science Cambridge*, 92: 499-503.
- 266- Ørskov, E.R., Ryle, M., 1990.** Energy Nutrition in Ruminants. Elsevier Science Publishers Ltd., Essex (UK).
- 267-Oskoueian, E., Abdullah, N., Oskoueian, A., 2013.** Effects of Flavonoids on Rumen Fermentation Activity, Methane Production, and Microbial Population. *BioMed Res. Inter.*, Article ID 349129, 8 pages.
- 268- Padrini, F., Lucheroni, M. T., 1996.** Le grand livre des huiles essentielles - guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassage Energetiques avec Plus de 100 Photographies. Ed. De Vecchi , Paris, pp.11, 15, 61 et 111.
- 269- Patra, A.K., Kamra, D.N., Agarwal, N., 2006.** Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 128: 276–291.

- 270-Patra, A.K., Saxena, J., 2009.** Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96: 363-375.
- 271- Patra, A.K., Saxena, J., 2011.** Exploitation of Dietary Tannins to Improve Rumen Metabolism and Ruminant Nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 24-37.
- 272- Penfold, A. R, Willis, J. L., 1961.** The Eucalyptus. Botany, cultivation, chemistry and utilization. London Leonard Hill (Books) limited.
- 273- Perroti, C., Caraffa, N., Aïli, S., 1999.** Se soigner par les plantes. Berti Editions, 118p.
- 274- Perry, K.D., Briggs, C.A.E., 1955.** A common type antigen in streptococci of groups D and E. *Journal of Pathology and Bacteriology.*, 70: 546.
- 275- Pinares-Patiño, C., Baumont, R., Martin, C., 2003.** “Methane emissions by charolais cows grazing a monospecific pasture of timothy at four stages of maturity”, *Can. J. Anim. Sci.*, 83, 769-777.
- 276- Pinares-Patiño, C., D’hour, P., Martin, C., 2006a.** Effects of grazing intensity on methane and carbon dioxide production by cattle”, *Agri. Ecosys. Environ.*, sous presse.
- 277- Pinares-Patiño, C., Ulyatt, M.J., Holmes, C.W., Barry, T.N., Lassey, K.R., 2000.** Some rumen digestion characteristics and methane emission in sheep. *Proc. 15th Symp. Energy Metabolism in Animals*, Elsinore, Denmark, 117- 120.
- 278- Pinares-Patiño, C., Vlaming, B., Cavanagh, A., Molano, G., Clark, H., 2006b.** Persistence of dairy cows in animal-to-animal variation in methane emission”, *Soliva C.R., Takahashi J., Kreuzer M. eds., Greenhouse Gases and Animal Agriculture*, Elsevier Science B.V., in press.
- 279- Popova, M., 2011a.** Structure et activité de la communauté des *Archaea* méthanogènes du rumen en relation avec la production de méthane par les ruminants. Thèse de Doctorat. Université Blaise Pascal. France.
- 280-Prayitno, C.H., Suwarno, S., Susanto, A., Jayanegara, A., 2016.** Effect of Garlic Extract and Organic Mineral Supplementation on Feed Intake, Digestibility and Milk Yield of Lactating Dairy Cows. *Asian J. Anim. Sci.*, 10: 213-218.
- 281- Rakotavao, N.A., 1995.** Enquete sur les activités et produits de cueillette-extractivisme dans la zone de Manjakandriana et particulièrement dans les zones boisées en Eucalyptus robuste. CIRAD-foret et FOFIDA-DRD, Antananarivo.
- 282- Ranilla, M.J., Morgavi, D.P., Jouany, J.P., 2004.** Effect of time after defaunation on methane production in vitro”, *Reprod. Nutr. Develop.*, 44 (Suppl.1), S35.
- 283- Règlement (EC) No. 1831/2003** of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Off. J. Europ. Union.*, L 268/29, 46: 29-44.

- 284-Remond, B., Brugere, H., Poncet, C., Baumont, R., 1995.** Le contenu du réticulorumen. In: Nutrition des Ruminants Domestiques. Editors. Jarrige, R., Y. Ruckebusch, C Demarquilly, M.H Farce, M. Journet, INRA, Paris ; p 253-298.
- 285-Rira, M., 2015.** Impact de plantes riches en métabolites secondaires sur la méthanogénèse ruminale et les activités fermentaires du microbiome ruminal chez des ovins. Thèse de doctorat. Université Mentouri de Constantine, 223 p.
- 286-Roger, P., 2012.** La constitution chimique du bois. *Biologie et Multimédia* - Université Pierre et Marie Curie - UFR des Sciences de la Vie.
- 287-Rosales, M., Galindo, W., Murgueitio, E., Larrahondo, J., 1989.** Sustancias antinutricionales en las hojas de árboles forrajeros. *Livestock Research and Rural Development*, 1 (1): 79–91.
- 288- Rubanza, C.D.K., Shem, M.N., Otsyina, R., Bakengesa, S.S., Ichinohe, T., Fujihara, T., 2005.** Polyphenolics and tannins effect on in vitro digestibility of selected Acacia species leaves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119, 129–142.
- 289- Rumpler, WV., Johnson, DE., Bates, DB., 1986.** The effect of high dietary cation concentration on methanogenesis by steers fed diets with and without ionophores. *J Anim Sci* 62, 1737-1741.
- 290- Russell, J.B., Onodera, R., Hindo, T., 1991.** Ruminal protein fermentation, new perspectives on previous contradictions. In: Tsuda T., Sasaki Y., Kawashima R. (Eds.). *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants.* Academic Press Tokyo, Japan. pp. 681-697.
- 291- Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Olivares, M., Elghandour, M.M.Y., Mellado, M., Arece, J., 2014.** Influence of *S. babylonica* extract on feed intake, growth performance and diet in vitro gas production profile in young lambs. *Trop. Anim. Health Prod.*, 46: 213–219.
- 292- Sallam, S.M.A., Bueno, I.C.S., Brigide, P., Godoy, P.B., Vitti, D.M.S.S., Abdalla, A.L., 2009.** Efficacy of Eucalyptus oil on in vitro ruminal fermentation and methane production. *Options Méditerranéennes - Nutritional and foraging ecology of sheep and goats*, 85: 267-272.
- 293-Sallam, S.M.A., Bueno, I.C.S., Nasser, M.E.A., Abdalla, A.L., 2010.** Effect of eucalyptus (*Eucalyptus citriodora*) fresh or residue leaves on methane emission in vitro. *Ita. J. Anim. Sci.*, 9: 299-303.
- 294- Santana, A., Pérez-Ruchel, A., Cajarville, C., Repetto, J.L., 2012.** Intake, digestibility and microbial protein synthesis in heifers fed pasture, total mixed ration or both. *J. Dairy Sci.*, 95: 488 (Abstract).
- 295- SAS/STAT(R) 9.2. 2014.** User's Guide, 2nd edn.
- 296-Satter, L.D., Slyter, L.L., 1974.** Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *British Journal of Nutrition.*, 32: 199-208.

- 297- Sauer, F. D., Fellner, V., Kinsman, R., Kramer, J. K., Jackson, H. A., Lee, A. J., Chen, S., 1998.** Methane output and lactation response in Hplstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet. *J. Anim. Sci.* 76:906-914.
- 298- Sauvant, D., 1993.** La production de méthane dans la biosphère : le rôle des animaux d'élevage", *Courrier de la cellule Environnement, INRA*, 18, 67-70.
- 299- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., 2007.** Empirical modelling by meta-analysis of digestive interactions and CH₄ production in ruminants. *EAAP Publ.* 124, 561–562.
- 300- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., 2009.** Les variations du bilan carbone des ruminants d'élevage. *Renc Rech Rumin.* 16.
- 301- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Serment, A., Broudiscou, L. P., 2011.** Influences des régimes et de leur fermentation dans le rumen sur la production de méthane par les ruminants. *INRA Productions Animales.*, 24, 433-446.
- 302- Sauvant, D., Meschy, F., Mertens, D., 1999.** Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA Productions Animales.*, 12: 49-60.
- 303-Schmidely, P., Glasser, F., Doreau, D., Sauvant, D., 2008.** Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors. 1. Total fatty acids. *Animal.*, 2: 677-690.
- 304- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001.** Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91, 21–40.
- 305- Seradj, A. R., Abecia, L., Crespo, J., Villalba, D., Fondevila, M., Balcells, J., 2014.** The effect of Bioflavex® and its pure flavonoid components on *in vitro* fermentation parameters and methane production in rumen fluid from steers given high concentrate diets. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 197: 85–91.
- 306- Serment, A., 2012.** Dynamique et intensité de biotransformation dans le rumen. Thèse de Doctorat. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech). pp : 316.
- 307-Serment, A., Schmidely, P., Giger-Reverdin, S., Chapoutot, P., Sauvant, D., 2011.** Effects of the percentage of concentrate on rumen fermentation, nutrient digestibility, plasma metabolites, and milk composition in mid-lactation goats. *J. Dairy. Sci.* 94: 3960–3972.
- 308- Shakeri, P., Durmic, Z., Vadhanabhuti, J., Vercoe, P.E., 2016.** Products derived from olive leaves and fruits can alter *in vitro* ruminal fermentation and methane production. *J Sci Food Agric.* 97(4):1367-1372. 29.
- 309- Shin, E.C., Cho, K.M., Lim, W.J., Hong, S.Y., An, C.L., Kim, E.J., Kim, Y.K., Choi, B.R., An, J.M., Kang, J.M., Kim, H., Yun, H.D., (2004a).** Phylogenetic analysis of protozoa in the in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. *J. Appl. Microbiol.*, 97, 378-383.

- 310- Shin, E.C., Choi, B.R., Lim, W.J., Hong, S.Y., An, C.L., Cho, K.M., Kim, Y.K., An, J.M., Kang, J.M., Lee, S.S., Kim, H., Yun, H.D., 2004b.** Phylogenetic analysis of archaea in three fractions of cow rumen based on the 16S rDNA sequence. *Anaerobe.*, 10: 313-319.
- 311- Shingfield, K. J., Griinari, J. M., 2007.** Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109: 799-816.
- 312- Sijelmassi, A., 1991.** Les plantes médicinales du Maroc. Ed. Le Fennec, Casablanca, 137 p.
- 313- Silanikove, N., Gilboa, N., Nir, I., Perevolotsky, A., Nitsan, Z., 1996.** Effect of a daily supplementation of polyethylene glycol on intake and digestion of tannin-containing leaves (*Quercus calliprinos*, *Pistacia lentiscus*, and *Ceratonia siliqua*) by goats. *J. Agric. Food Chem.* 44, 199–205.
- 314- Simons, A. L., Renouf, M., Hendrich, S., Murphy, P. A., 2005.** Human gut microbial degradation of flavonoids: structure function relationships, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 10, pp. 4258–4263.
- 315- Singleton, V.L., Rossi, J.A.J., 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16:144-58.
- 316- Sirohi, S.K., Goel, N., Pandey, P., 2012.** Efficacy of different methanolic plant extracts on anti-methanogenesis, rumen fermentation and gas production kinetics in vitro. *Open Vet. J.*, 2: 72-77.
- 317- Sobhy, M.A.S., Ives, C.S., Bueno, E.A., Nasser, M., Abdalla, A.L., 2010.** Effect of eucalyptus (*Eucalyptus citriodora*) fresh or residue leaves on methane emission in vitro. *Ita. J. Anim. Sci.*, 9:3, e58.
- 318- Sokatch, J.R., 1969.** Fermentation of sugars. In: *Bacterial physiology and metabolism*. p. 72-108, [Academic Press Inc]. London, UK.
- 319- Soliva, C.R., Meile, L., Cielak, A., Kreuzer, M., Machmüller, A., 2004.** Rumen simulation technique study on the interactions of dietary lauric and myristic acid supplementation in suppressing ruminal methanogenesis”, *Bri. J. Nutr.*, 92, 689-700.
- 320- Song, J.H., Kim, S.K., Chang, K.W., Han, S.K., Yi, H.K., Jeon, J.G., 2006.** *In vitro* inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Archives of Oral Biology.*, 51:1131-1140.
- 321- Stewart, C.S., Bryant, M.P., 1988.** The rumen bacteria. In : Hobson, P.N., editors. *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Science Publisher, New York, 21-75. 527 p.
- 322- Stewart, C.S., Crossley, M.V., Garrow, S.H., 1983.** The effect of avoparcin on laboratory cultures of rumen bacteria, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 292- 297.

- 323- Stumm, C.K., Gijzen, H.J., Vogels, G.D., 1982.** Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *British Journal of Nutrition.*, 47: 95-99.
- 324- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Benno, Y., 2001.** Dietdependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied Environmental Microbiology.*, 67 : 2766-2774.
- 325- Tajima, K., Arai, S., Ogata, K., Nagamine, T., Matsui, H., Nabamura, M., Aminov, R.I., Benno, Y., 2000.** Rumen Bacterial Community Transition During Adaptation to High grain Diet. *Anaerobe.*, 6: 273-284.
- 326- Tarakanov, B.V., 1971.** Bacteriophages in the contents of cattle rumen. *Mikrobiologiya .*, 40: 544-550.
- 327- Tavendale, M.H., Lane, G. A., Schreurs, N.M., Fraser, K., Meagher, L.P., 2005.** The effects of condensed tannins from *Dorycnium rectum* on skatole and indole ruminal biogenesis for grazing sheep, *Austr. J. Agr. Res.*, 56, 1331-1337.
- 328- Thao, N.T., Wanapat, M., Cherdthong, A., Kang, S., 2015.** Effects of Eucalyptus Crude Oils Supplementation on Rumen Fermentation, Microorganism and Nutrient Digestibility in Swamp Buffaloes. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.*, 27 (1): 46-54.
- 329-Theodoreau, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J., 1994.** A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48: 185-197.
- 330- Theodorou, M.K., France, J., 1993.** Rumen microorganisms and their interactions. In: *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism.* pp 145-163. Forbes, J. M., France, J. (eds). CAB international.
- 331- Thomson, J.A., 1983.** Molecular biology of xylan degradation. *Microbiol. Rev.* 10 : 65-82.
- 332- Topçu, G., Ay, A., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., Ulubelen, A., 2007.** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry* 103: 816–822.
- 333- Turnbull, J.W., 1991.** Future use of eucalyptus: opportunities and problems. In A.P.G. Schonau (ed). *IUFRO Symp Intensive for the role of eucalyptus.* Southern African Institute of Forestry, Pretoria. 2-27 p.
- 334- Ulger, I., Kamalak, A., Kurt, O., Kaya, E., Guven, I., 2017.** Comparison of the chemical composition and anti-methanogenic potential of *Liquidambarorientalis* leaves with *Laurusnobilis* and *Eucalyptusglobulus* leaves using an in vitro gas production technique. *Cienc. Invest. Agr.*, 44(1): 75-82.
- 335- Ushida, K., Jouany, J.P., 1994.** Fibre digesting capacities of 5 genera of rumen ciliates. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology.*, 3: 168.

- 336- Van Soest, P.J., 1994.** Nutritional Ecology of the Ruminant. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.
- 337- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991.** Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, 74: 3583–3597.
- 338- Vermorel, M., 1988.** Nutrition énergétique. *In* : Jarrige R. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Ed INRA, Paris, 57-74.
- 339- Vermorel, M., 1995a.** Emissions annuelles de méthane d'origine digestive par les bovins en France. Variations selon le type d'animal et le niveau de production", *INRA Prod. Anim.*, 8, 265-272.
- 340- Vermorel, M., 1995b :** Productions gazeuses et thermiques résultant des fermentations digestives, in Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M. H., Journet, M., éd., Nutrition des ruminants domestiques ingestion et digestion, INRA Editions, Paris, p 649-670.
- 341- Vermorel, M., Jouany, J-P., 1989.** Effects of rumen protozoa on energy utilization by wethers of two diets based on ammonia-treated straw supplemented or not with maize, *Asian Austral. J. Anim. Sci.*, 2, 475-476.
- 342- Villagran, J., Kadik, B., 1981.** Etude préliminaire sur l'évolution de *Phoracantha semipunctata* Fab, ravageur des forets en Algérie .C.N.R.E.F.p6.
- 343- Wachenheim, D.E., Blythe, L.L., Craig, A.M., 1992.** Characterization of rumen bacterial pyrrolizidine alkaloid biotransformation in ruminants of various species. *Vet. Human Toxicol.*, 34: 513–517.
- 344- Waghorn, G.C., Clark, D.A., 2006.** "Greenhouse gas mitigation opportunities with immediate application to pastoral grazing for ruminants", Soliva C.R., Takahashi J., Kreuzer M. éd., *Greenhouse Gases and Animal Agriculture*, Elsevier Science B.V., in press.
- 345- Waghorn, G.C., Shelton, I., McNabb, W., McCutchen, S., 1994.** Effects of condensed tannins in lotus *Pedunculatus* on its nutritive value for sheep. *J. Agric. Res.* 123, 109-119.
- 346- Wallace, R.J., Cotta, M.A., 1988.** Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: Hobson, P.N. (Ed.). *The rumen microbial ecosystem*. London and New-York, pp. 212-217.
- 347- Wallace, R.J., Joblin, K.N., 1985.** Proteolytic activity of a rumen anaerobic fungus. *FEMS Microbial Letters.*, 29: 19-25.
- 348- Wallace, R.J., Mcewan, N.R., Mcintosh, F.M., Teferedegne, B., Newbold, C.J., 2002.** Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian-Aust J Anim Sci*, 15, 1458- 1468.
- 349- Wallace, R.J., Wood, T.A., Rowe, A., Price, J., Yanez, D.R., Williams, S.P., Newbold, C.J., 2006.** Encapsulated fumaric acid as a means of decreasing ruminal methane

emissions, Soliva C.R., Takahashi J., Kreuzer M. éd(s.), Greenhouse Gases and Animal Agriculture, Elsevier Science B.V., in press.

350- Weatherburn, M.W., 1967. Phenol hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem.* 39, 971–974.

351-Webster, A.J.F., Osuji, P.O., White, F., Ingram, J.F., 1975. The influence of food intake on portal blood flow and heat production in the digestive tract of sheep, *Br. J. Nutr.*, 34, 125-139.

352- Welkie, D.G., Stevenson, D.M., Weimer, P.J., 2010. ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe.*, 16:94-100.

353- Whitford, M.F., Teather, R.M., Forster, R.J., 2001. Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiology.*, 1: 5.

354- Williams, A.G., Coleman, G.S., 1997. The rumen protozoa. In : Hobson, P.N., Stewart, C.S. *The rumen microbial ecosystem.* Second edition, Chapman et Hall, London, 73-139.

355- Wilson, J.R., 1994. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. *Journal of Agricultural Science.*, 122: 173-182.

356-Wilson, P.N., Brigstocke, T.D., 1981. Improved feeding of cattle and sheep : a practical guide to modern concepts of ruminant nutrition. Granada, St.Albans.

357- Wolin, M.J., 1975. Interaction between the bacterial species in the rumen. In: *Digestion and Metabolisme in the Ruminant.* Mc Donald J.W and Warner A.C.I. (Eds.), pp. 134-148.

358- Wolin, M.J., Stewart, C.S., Miller, T.L., 1997. Microbe-microbe interactions, In: Hobson, P.N., Stewart, C.S. *The rumen Microbial Ecosystem.* Chapman and Hall, London, 467-488.

359-Woodward, A., Coppock, D.L., 1995. Role of plant defense in the utilization of native browse in southern Ethiopia. *Agroforestry Systems.*, 32 (2): 147-161.

360- Wright, A. D., Kennedy, P., O’neill, C.J., Toovey, A.F., Popovski, S., Rea, S.M., Pimm, C.L., Klein, L., 2004. Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens, *Vaccine*, 22, 3976-3985.

361- Wright, A.D.G., Ma, X., Obispo, N.E., 2008. Methanobrevibacter phylotypes are the dominant methanogens in sheep from Venezuela. *Microbiology and Ecology.*, 56: 390-394.

362- Wright, D.E., 1967. Metabolism of peptides by rumen microorganisms. *Applied Microbiology.* 15: 547-550.

363- Yamaguchi, K., Honda, M., Ikigai, H., Hara, Y., Shimamura, T., 2002. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1(HIV-1). *Antiviral Research.*, 53: 19-34.

364- Yang, C.-M., 2002. Response of forage fiber degradation by ruminal microorganisms to branched-chain volatile fatty acids, amino acids, and dipeptides. *J. Dairy Sci.* 85, 1183–1190.

365- Zened, A., 2011. Particularités du microbiote et son activité lors de la déviation de la biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique de la voie trans-11 à la voie trans-10. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse. 336p.

366- Zimmer, N., Cordesse, R., 1996. Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA Productions Animales.*, 9: 167-179.

Webographie:

1- Anonyme 1 : <https://biologyforlife.wordpress.com/category/chapter-6-nutrition>, consulté le 12/07/2016.

2- Anonyme 2 : <https://sites.google.com/site/oliviervarenave2/description-botanique>, consulté le 25/06/2018.

Annexes

Annexe 1

Composition de la salive artificielle selon Theodureau *et al.*, 1994.

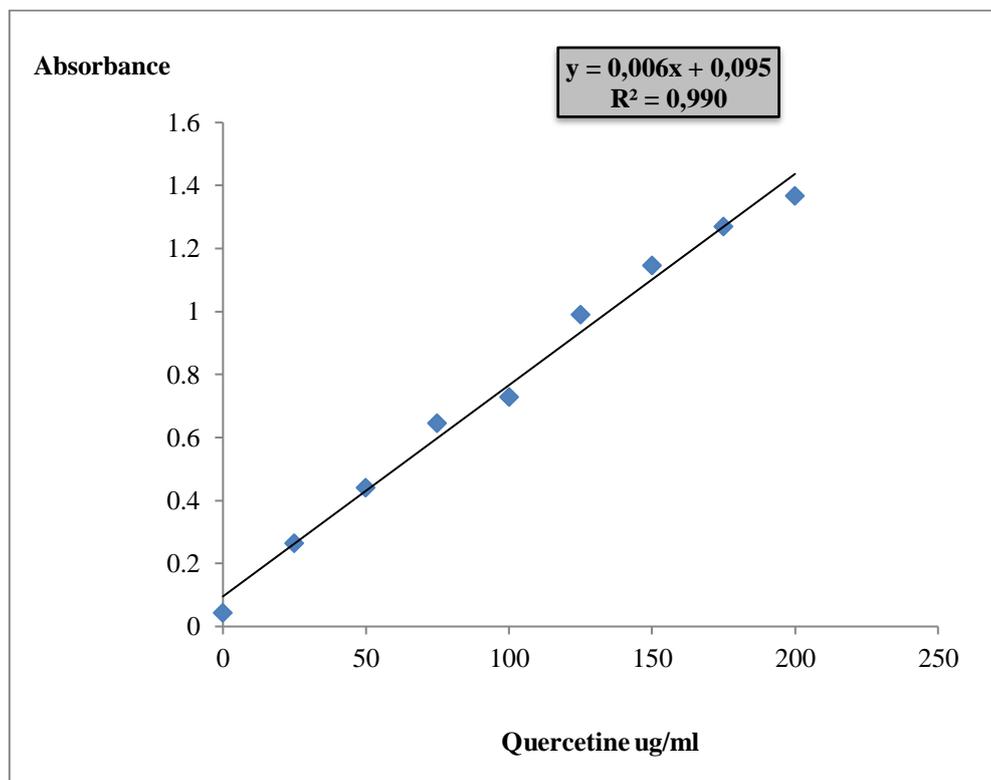
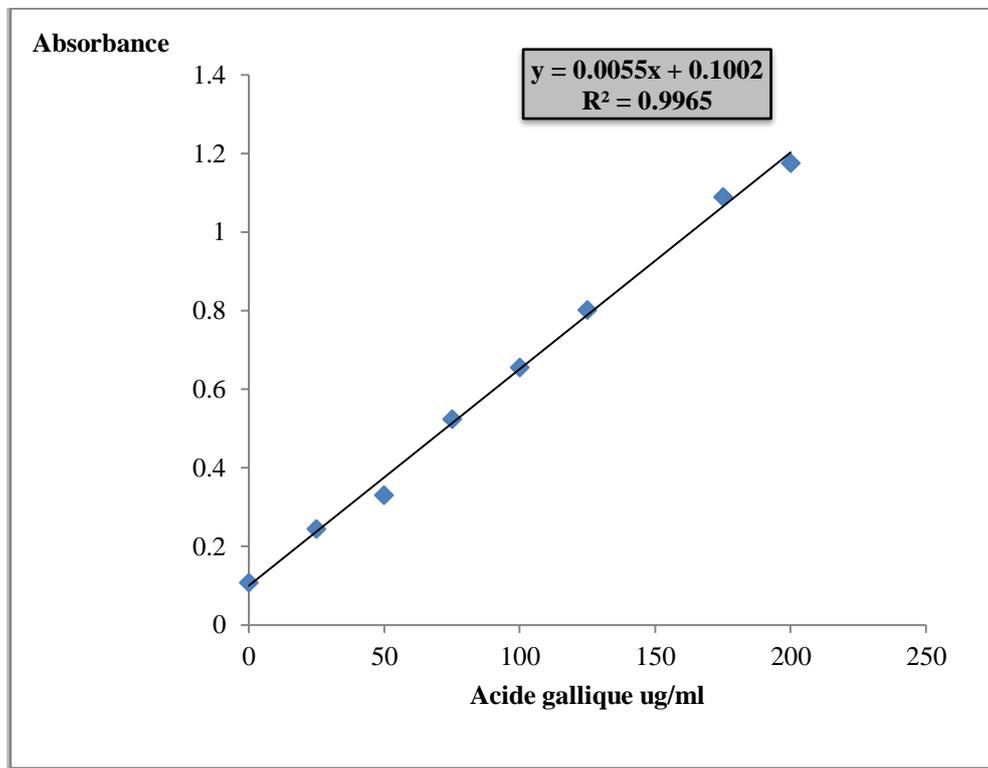
<i>Solutions</i>	<i>Theodureau</i>
	<i>Éléments</i>
<i>Oligo-éléments</i> (Solution macro minérale)	CaCl ₂ .2H ₂ O 13,2g MnCl ₂ .4H ₂ O 10,0g CoCl ₂ .6H ₂ O 8,0g Q.s.p. 1000 ml
<i>Tampon</i>	NaHCO ₃ 35,0g NH ₄ HCO ₃ 4,0g Q.s.p. 1000 ml
<i>Éléments minéraux</i> (Solution macro minérale)	Na ₂ HPO ₄ 5,7g KH ₂ PO ₄ 6,2g MgSO ₄ .7H ₂ O 0,6g Q.s.p. 1000 ml
<i>Indicateur d'oxydo- réduction</i>	Résazurine 0,1g (C ₁₂ H ₆ NO ₄). Q.s.p. 100 ml
<i>Solution réductrice</i>	NaOH (1N) 4 ml Na ₂ S.9H ₂ O 0,625 g L-Cystéine 0,625 g Q.s.p. 100 ml

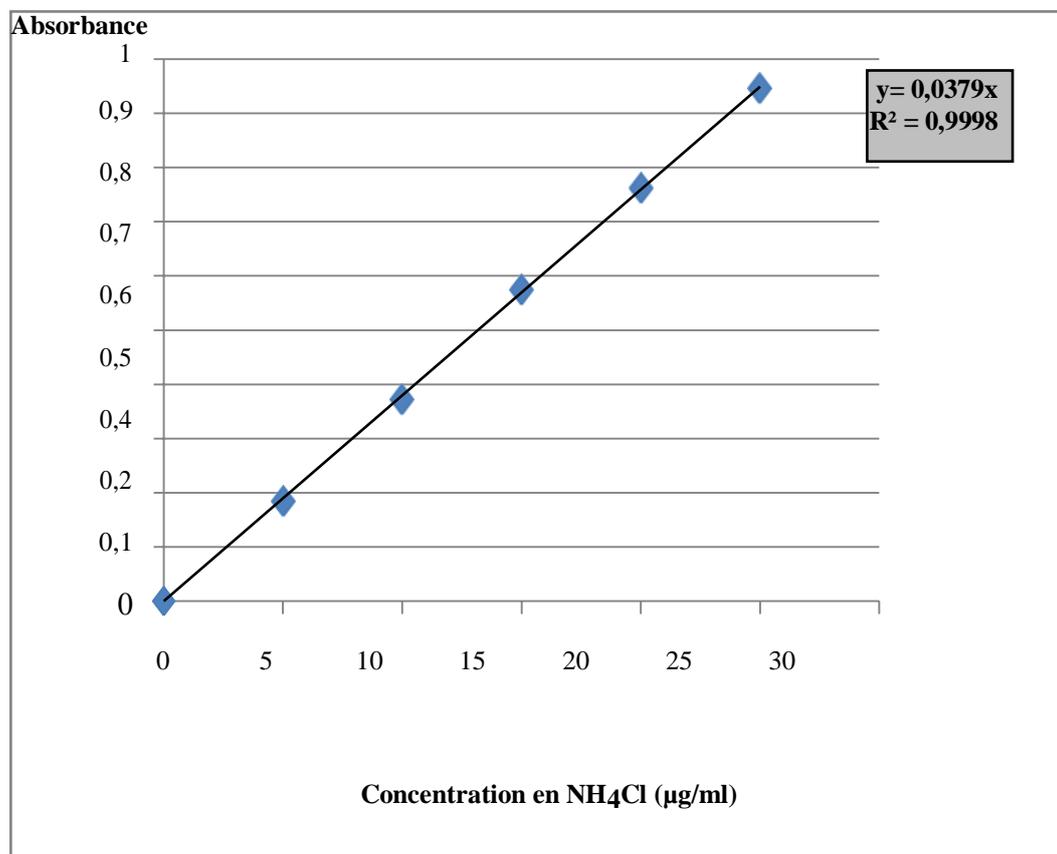
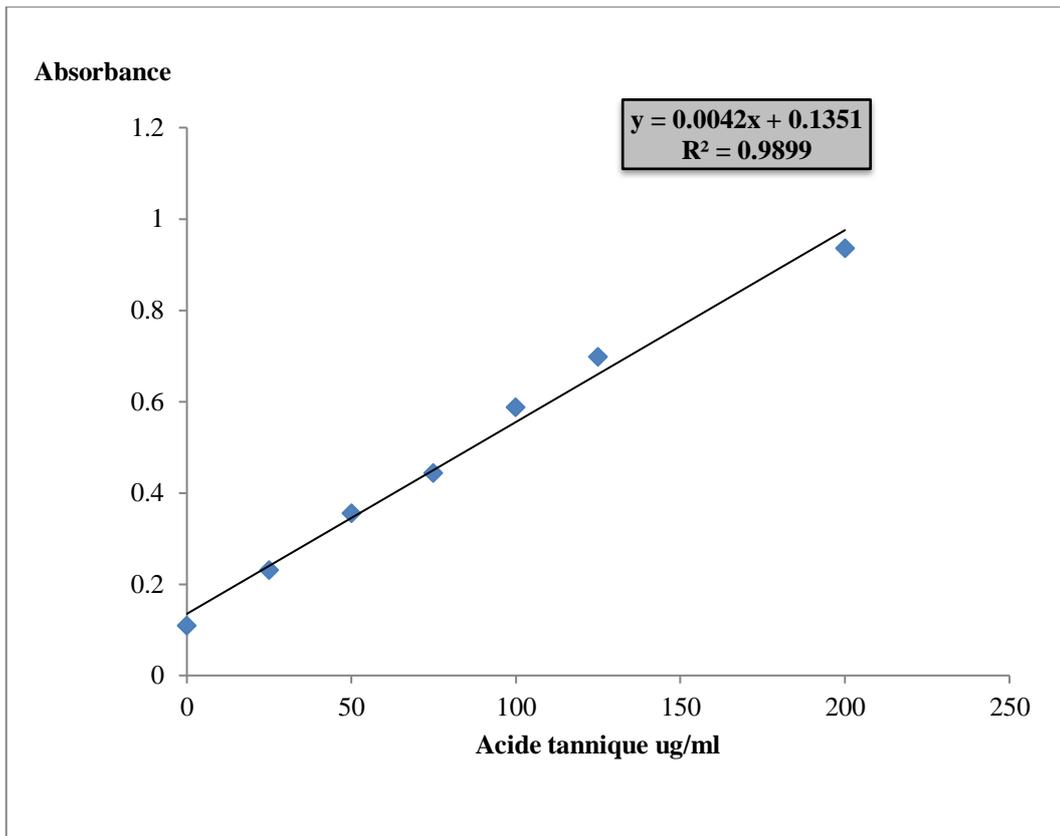
Annexe 2 : Préparation de la salive artificielle selon Theodureau *et al.*, 1994.

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

Annexe 3

Courbes étalons correspondant au dosage des phénols totaux, des flavonoïdes, des tanins totaux et de l'azote ammoniacal dosés par méthodes chimiques.





Annexe 5

Coefficient de Corrélations (r) entre la production du gaz carbonique et du méthane, le profil des acides gras volatils, quelques paramètres fermentaires et la composition chimique et phytochimique du substrat en présence d'extraits d'Eucalyptus examinés.				
	CO ₂	CH ₄	BH	GP24
AGV _t	-0,383	0,654*	0,428	-0,10
C2	-0,471	0,720**	0,372	-0,16
C3	0,524	-0,391	-0,039	0,33
C4	-0,579*	0,595*	0,362	-0,30
N-NH ₃	-0,638*	0,391	0,156	-0,44
BM	0,908**	0,280	0,602*	1,00**
MAT	-0,79	0,96	0,99	-0,77
NDF	0,03	0,99**	0,96**	0,59
ADF	-0,09	0,84*	0,92**	0,43
ADL	-0,06	-0,91*	-0,82*	-0,55
NFC	-0,03	-1,00**	-0,98**	-0,60
C	-0,02	0,98**	0,98**	0,55
PT	0,375	-0,601	-0,345	-0,04
FT	0,369	-0,660	-0,419	-0,08
TT	0,328	-0,878**	-0,675*	-0,24

* La corrélation est significative au niveau 0,05, ** La corrélation est significative au niveau 0,01.

Annexe 7

Coefficient de Corrélations (r) entre les protozoaires et la production des AGV, la production du gaz, du méthane, de l'ammoniaque, la digestibilité de la matière organique (DMO) et la composition chimique et phytochimique du substrat en présence des extraits d'Eucalyptus examinés.	
	Protozoaires
AGV_t	0,320
C2	0,324
C3	-0,501
C4	0,623*
C2/C3	0,540
GP24	-0,54
CH₄	,249
N-NH₃	0,917**
DMO	0,449
MAT	0,62
NDF	0,623
ADF	0,45
ADL	0,623
NFC	-0,623
C	0,623
PT	-0,433
FT	-0,438
TT	-0,476

* La corrélation est significative au niveau 0,05, ** La corrélation est significative au niveau 0,01.

Annexe 6

Coefficient de Corrélations (r) entre la digestibilité de la matière sèche (DMS), organique (DMO), l'énergie métabolisable estimée, la composition chimique et phytochimique, la production du gaz et la méthanogénèse du substrat en présence d'extraits d'Eucalyptus examinés.			
	DMO	DMS	EM
AGV_t	0,531	0,533	-0,099
C2	0,548	0,540	-0,157
C3	-0,517	-0,506	0,333
C4	0,773**	0,781**	-0,297
C2/C3	0,659*	0,648*	-0,352
GP24	-0,18	-0,20	1,00**
CH₄	0,699*	0,685*	0,286
MAT	0,94	0,94	-0,77
NDF	0,68	0,68	0,60
ADF	0,91*	0,91*	0,44
ADL	-0,43	-0,43	-0,56
NFC	-0,73	-0,73	-0,61
C	0,77	0,77	0,56
PT	-0,805**	-0,817**	-0,041
FT	-0,838**	-0,849**	-0,083
TT	-0,833**	-0,835**	-0,242

* La corrélation est significative au niveau 0,05, ** La corrélation est significative au niveau 0,01.

Annexe 4

Coefficients de Corrélations(r) entre les composants chimiques, phytochimiques et les paramètres fermentaires du substrat en présence d'extraits d'Eucalyptus examinés																		
	N-NH ₃	AGV _t	C2	C3	C4	C2/C3	BM	pH	PF	MAT	NDF	ADF	ADL	NFC	C	PT	FT	TT
N-NH ₃	1	0,365	0,332	-0,533	0,721**	0,551	-0,447	-0,16	0,696*	0,99	0,31	0,71	-0,03	-0,37	0,44	-0,694*	-0,728*	-0,641
AGV _t		1	0,915**	0,060	0,657*	0,607*	-0,100	-0,51	0,348	0,49	0,65	-0,53	0,58	0,63	-0,68	-0,533	-0,550	-0,679**
C2			1	-0,204	0,570	0,812**	-0,160	-0,53	0,420	-0,13	0,81*	0,52	-0,82*	-0,80	0,74	0,-633	-0,653	-0,800**
C3				1	-0,355	-0,729**	0,337	0,06	-0,581*	0,30	-0,39	-0,27	0,44	0,34	-0,40	0,468	0,498	0,511
C4					1	0,607*	-0,302	-0,38	0,637*	0,98	0,45	0,74	-0,15	-0,56	0,52	-0,562	-0,583	-0,628
C2/C3						1	-0,356	-0,34	0,665*	-0,80	0,93**	-0,96**	0,61	0,87*	-0,90*	-0,808**	-0,839**	-0,969**
BM							1	-0,44	-0,879**	-0,76	0,59	0,43	-0,55	-0,60	0,55	-0,035	-0,076	-0,235
pH								1	0,07	-0,50	-0,99**	-0,84*	0,90*	0,99**	-0,98**	0,78*	0,83**	0,94**
PF									1	0,86	-0,19	0,07	0,28	0,17	-0,11	-0,499	-0,490	-0,375
MAT										1	1,00**	1,00**	1,00**	-1,00**	1,00**	0,87	0,01	1,00
NDF											1	0,82*	-0,93**	-0,99**	0,99**	-0,99**	-0,99**	-0,99**
ADF												1	-0,57	-0,88*	0,90*	-0,75	-0,83*	-0,76
ADL													1	-0,87*	0,88*	0,96**	0,92**	0,96**
NFC														1	-0,99**	0,97**	0,97**	,97**
C															1	-0,96**	-0,99**	-0,96**
PT																1	0,996**	0,899**
FT																	1	0,928**
TT																		1

* La corrélation est significative au niveau 0,05, ** La corrélation est significative au niveau 0,01.

Annexe 8

Coefficients de Corrélations (r) entre les composants chimiques, phytochimiques et les paramètres fermentaires du substrat en présence d'extraits d'*Olea europaea* examinés

	NNH ₃	AGV _t	C2	C3	C4	C2/C3	BM	pH	PF	MAT	NDF	ADF	ADL	NFC	C	PT	FT	TT
N-NH₃	1	0,037	0,012	-0,190	0,271	0,198	-0,384	0,20	0,406	-0,22	-0,673	0,84*	0,673	0,673	-0,673	-0,029	0,032	-0,055
AGV_t		1	0,969**	0,781**	0,713**	-0,315	0,184	-0,58*	0,338	-0,77	0,351	0,82*	-0,351	-0,334	-0,351	-0,746*	-0,147	-0,972**
C2			1	0,768**	0,569	-0,271	0,250	-0,57	0,289	-0,31	-0,134	0,50	-0,134	0,134	-0,134	-0,633	-0,653	-0,800**
C3				1	-0,355	-0,818**	0,447	-0,10	-0,197	-0,98	0,302	-0,03	0,302	-0,302	0,302	0,468	0,498	0,511
C4					1	0,140	-0,249	-0,69*	0,651*	0,50	0,978	0,82*	0,978	-0,978	0,978	-0,562	-0,583	-0,628
C2/C3						1	-0,387	-0,41	0,507	0,98	-0,828	0,28	-0,828	0,828	-0,828	-0,808**	-0,839**	-0,969**
BM							1	0,04	-0,758**	-0,99	-0,755	-0,73	-0,755	0,755	-0,755	-0,035	-0,076	-0,235
pH								1	-0,52	0,82	-0,87*	-0,84*	-0,70	0,86*	-0,85*	0,63	0,02	0,92**
PF									1		0,860	0,59	0,860	-0,860	0,860	-0,499	-0,490	-0,375
MAT										1	-0,87	1,00**	0,87	0,86	0,87	-0,87	-0,27	0,001
NDF											1	1,00**	1,00**	-1,00**	1,00**	0,867	0,007	0,995
ADF												1	0,88*	-1,00**	1,00**	1,00**	0,99**	-0,99**
ADL													1	-1,00**	1,00**	0,867	0,007	0,995
NFC														1	-1,00**	-0,867	-0,007	-0,995
C															1	0,867	0,007	0,995
PT																1	0,996**	0,899**
FT																	1	0,928**
TT																		1

* La corrélation est significative au niveau 0,05, ** La corrélation est significative au niveau 0,01.

Annexe 9

Coefficient de Corrélations (r) entre la production du gaz carbonique et du méthane, le profil des acides gras volatils, quelques paramètres fermentaires et la composition chimique et phytochimique du substrat en présence d'extraits d' <i>Olea europaea</i> examinés.				
	CO ₂	CH ₄	BH	GP24
AGV _t	-0,026	0,358	-0,599*	-0,06
C2	0,028	0,335	-0,705*	0,01
C3	0,445	-0,132	-0,458	0,31
C4	-0,488	0,624*	-0,170	-0,45
N-NH ₃	-0,347	-0,050	-0,252	-0,34
BM	0,889**	0,141	0,080	0,95**
MAT	-1,00*	-0,22	-0,99	-0,99
NDF	0,857	0,680	0,912	-0,67
ADF	-0,73	0,84*	0,35	-0,73
ADL	-0,857	-0,680	-0,912	-0,77
NFC	-0,847	-0,693	-0,919	0,70
C	-0,857	-0,680	-0,912	-,072
PT	-0,232	-0,654	0,485	-0,37
FT	-0,540	-0,035	0,494	-0,55
TT	0,162	-0,941**	0,283	-0,03

* La corrélation est significative au niveau 0,05, ** La corrélation est significative au niveau 0,01.

Annexe 10

Coefficient de Corrélations (r) entre la digestibilité de la matière sèche (DMS), organique (DMO), l'énergie métabolisable estimée, la composition chimique et phytochimique, la production du gaz et la méthanogénèse du substrat en présence d'extraits d' <i>Olea europaea</i> examinés.			
	DMO	DMS	EM
AGV _t	0,529	0,554	-0,059
C2	0,512	0,544	0,009
C3	-0,058	-0,021	0,315
C4	0,708**	0,690*	-0,446
C2/C3	0,518	0,492	-0,411
GP24	-0,52	-0,51	1,00**
CH ₄	0,531	0,497	-0,014
MAT	0,98	0,97	-0,99
NDF	-0,944	-0,963	0,808
ADF	0,28	0,19	-0,72
ADL	0,944	0,963	-0,808
NFC	0,938	0,958	-0,797
C	0,944	0,963	-0,808
PT	-0,562	-0,589	-0,359
FT	-0,218	-0,267	-0,543
TT	-0,639	-0,632	-0,027

* La corrélation est significative au niveau 0,05, ** La corrélation est significative au niveau 0,01.

Annexe 11

Coefficient de Corrélations (r) entre les protozoaires et la production des AGV, la production du gaz, du méthane, de l'ammoniaque, la digestibilité de la matière organique (DMO) et la composition chimique et phytochimique du substrat en présence des extraits d'<i>Olea europaea</i> examinés	
	Protozoaires
AGV_t	0,320
C2	0,259
C3	-0,208
C4	0,732**
C2/C3	0,548
GP24	-0,61*
CH₄	0,738**
N-NH₃	0,075
DMO	0,558
MAT	0,98
NDF	-0,757
ADF	0,98**
ADL	0,757
NFC	0,745
C	0,757
PT	-0,156
FT	0,516
TT	-0,718*

* La corrélation est significative au niveau 0,05, ** La corrélation est significative au niveau 0,01.

Annexe 12

Coefficient de Corrélations (r) entre la production du gaz carbonique et du méthane, le profil des acides gras volatils, quelques paramètres fermentaires du substrat en présence de la quercétine.				
	CO ₂	CH ₄	BH	GP24
AGV _t	-0,03	0,36	-0,60*	-0,06
C2	0,03	0,34	-0,71*	0,01
C3	0,44	-0,13	-0,46	0,31
C4	-0,49	0,62*	-0,17	-0,45
N-NH ₃	-0,35	-0,05	-0,25	-0,34
BM	0,89**	0,14	0,08	0,95**
PF	-0,89**	0,28	-0,43	-0,89**
NDF	-0,67	0,85*	0,43	-0,67
ADF	-0,73	0,84*	0,35	-0,73
ADL	-0,75	0,51	0,15	-0,77
NFC	0,71	-0,85*	-0,38	0,70
C	-0,73	0,85*	0,35	-0,72

Annexe 13

Coefficient de Corrélations (r) entre la digestibilité de la matière sèche (DMS), organique (DMO), l'énergie métabolisable estimée, la composition chimique, la production du gaz et la méthanogénèse du substrat en présence de la quercétine.			
	DMO	DMS	EM
AGV _t	0,53	0,55	-0,06
C2	0,51	0,54	0,01
C3	-0,06	-0,02	0,32
C4	0,71**	0,69*	-0,45
C2/C3	0,52	0,49	-0,41
GP24	-0,52	-0,51	1,00**
CH ₄	0,53	0,50	-0,01
NDF	0,20	0,11	-0,66
ADF	0,28	0,19	-0,72
ADL	0,14	0,10	-0,77
NFC	-0,24	-0,16	0,69
C	0,28	0,19	-0,72

* La corrélation est significative au niveau 0,05, ** La corrélation est significative au niveau 0,01.

Annexe 14

Coefficient de Corrélations (r) entre les protozoaires et la production des AGV, la production du gaz, du méthane, de l'ammoniaque, la digestibilité de la matière organique (DMO) et la composition chimique et phytochimique du substrat en présence de la quercetine	
	Protozoaires
AGV _t	0,32
C2	0,26
C3	-0,21
C4	0,73**
C2/C3	0,55
GP24	-0,61*
CH ₄	0,74**
N-NH ₃	0,08
DMO	0,56
NDF	0,96**
ADF	0,98**
ADL	0,85*
NFC	-0,97**
C	0,98**

* La corrélation est significative au niveau 0,05, ** La corrélation est significative au niveau 0,01.

Annexe 15

Stœchiométrie de la fermentation *in vitro* (mmoles/ g MS) et le taux de récupération d'hydrogène (%) après addition des différentes doses des extraits d'*Olea europaea* au substrat de référence en comparaison avec le contrôle.

Paramètres	Extrait <i>Olea Europaea. L</i> (mg)									SEM	P-Value	
	<i>AcOEt</i>				<i>BuOH</i>			<i>Aqueux</i>				
	D 0	D50	D75	D100	D50	D75	D100	D50	D75			D100
CH ₄ mesuré	0,65 ^a	0,54 ^a	0,53 ^a	0,51 ^a	0,64 ^a	0,57 ^a	0,59 ^a	0,65 ^a	0,68 ^a	0,70 ^a	0,01	0,0001
CH ₄ estimé	2,62 ^a	2,32 ^a	2,17 ^a	2,24 ^a	2,58 ^a	2,43 ^a	2,52 ^a	2,87 ^a	3,03 ^a	2,88 ^a	0,06	0,035
CO ₂ mesuré	3,35 ^c	3,53 ^a	4,05 ^b	4,06 ^b	3,55 ^a	3,38 ^a	3,58 ^a	3,47 ^{a,c}	3,71 ^{a,b}	4,01 ^b	0,05	0,0001
CO ₂ estimé	4,43 ^a	3,78 ^a	3,79 ^a	3,56 ^a	4,43 ^a	4,18 ^a	4,36 ^a	4,71 ^a	5,15 ^a	4,83 ^a	0,11	0,084
CO ₂ indirect	6,74 ^a	6,09 ^a	6,17 ^a	6,41 ^a	6,75 ^a	6,49 ^a	6,70 ^a	7,85 ^a	7,67 ^a	6,74 ^a	0,15	0,334
Gaz totale mesuré	4,38 ^a	4,52 ^a	5,08 ^b	5,16 ^b	4,58 ^a	4,33 ^a	4,57 ^a	4,38 ^a	4,95 ^{a,b}	5,31 ^b	0,06	0,0001
Gaz totale estimé	13,80 ^a	12,19 ^a	12,12 ^a	12,20 ^a	13,77 ^a	13,10 ^a	13,57 ^a	14,93 ^a	16,04 ^a	15,39 ^a	0,31	0,166
CO ₂ /CH ₄	5,19 ^b	6,60 ^a	7,72 ^b	7,94 ^b	5,54 ^{a,c}	5,96 ^{a,b}	6,08 ^b	5,38 ^{a,b}	5,43 ^{a,b}	5,73 ^a	0,16	0,0001
CH ₄ /Gaz total	0,15 ^b	0,12 ^a	0,10 ^a	0,10 ^a	0,14 ^a	0,13 ^{a,b}	0,13 ^b	0,15 ^b	0,14 ^b	0,13 ^a	0,001	0,0001
CH ₄ /AGV _t	0,09 ^a	0,08 ^a	0,08 ^a	0,07 ^a	0,08 ^a	0,08 ^a	0,08 ^a	0,08 ^a	0,08 ^a	0,08 ^a	0,001	0,964
R	-	0,83	0,81	0,79	0,99	0,88	0,91	1,00	1,06	1,09	-	-
R'	-	- 0,17	- 0,19	- 0,21	- 0,01	- 0,12	- 0,09	0,00	0,06	0,09	-	-
BH (%)	49,60 ^a	47,53 ^a	51,47 ^a	48,27 ^a	50,17 ^a	49,67 ^a	50,17 ^a	46,90 ^a	48,20 ^a	49,63 ^a	0,39	0,610

Les valeurs dans la même ligne et sous-table ne partageant pas le même indice diffèrent significativement à $P < 0,05$. Les tests sont ajustés pour toutes les comparaisons par paire au sein d'une ligne de chaque sous-table le plus interne, à l'aide de la correction de Bonferroni. ; P : probabilité ; $S.E.M$: L'erreur standard des moyennes.

Annexe 16

Stœchiométrie de la fermentation *in vitro* (mmoles/g MS) et le taux de récupération d'hydrogène (%) après addition des différentes doses de quercétine au substrat de référence en comparaison avec le témoin.

Paramètres	D0	D150	D175	D200	S.E.M	P-value
CH ₄ mesuré	0,65 ^b	0,50 ^a	0,59 ^{ab}	0,60 ^{ab}	0,021	0,045
CH ₄ estimé	2,09 ^a	2,52 ^a	2,29 ^a	2,21 ^a	0,064	0,081
CO ₂ mesuré	3,35 ^a	3,49 ^a	5,48 ^b	5,19 ^b	0,305	0,0001
CO ₂ estimé	3,88 ^a	4,31 ^a	3,98 ^a	3,87 ^a	0,078	0,127
CO ₂ indirect	6,52 ^a	6,61 ^a	6,88 ^a	6,79 ^a	0,586	0,09
Gas totale mesuré	4,38 ^a	4,36 ^a	6,60 ^b	6,29 ^b	0,334	0,0001
Gaz totale estimé	12,49 ^a	13,44 ^a	13,15 ^a	12,87 ^a	0,206	0,464
CO ₂ /CH ₄	5,19 ^a	7,04 ^b	9,32 ^c	8,68 ^c	0,492	0,0001
CH ₄ /Gas total	0,15 ^c	0,11 ^b	0,09 ^a	0,10 ^a	0,007	0,0001
CH ₄ /AGV _t	0,09 ^b	0,07 ^a	0,07 ^{ab}	0,08 ^{ab}	0,003	0,067
R	-	0,77	0,91	0,93		-
R'	-	-0,23	-0,09	-0,07		-
BH (%)	58,50 ^b	46,64 ^a	53,44 ^b	54,94 ^b	1,431	0,002

Les valeurs dans la même ligne et sous-table ne partageant pas le même indice diffèrent significativement à $P < 0,05$. Les tests sont ajustés pour toutes les comparaisons par paire au sein d'une ligne de chaque sous-table le plus interne, à l'aide de la correction de Bonferroni. ; **P** : probabilité ; **S.E.M** : L'erreur standard des moyennes.

CO₂ estimé : $A/2 + P/4 + 1.5 * B$; **A** : production d'acétate (moles), **P** : production de propionate (moles), **B** : production de butyrate (moles) (Getachew *et al.*, 1998)

CH₄ estimé : $[A + 2 * B] - CO_2$ estimé ; **A** : production d'acétate (moles), **B** : production de butyrate (moles) (Getachew *et al.*, 1998)

Gas total estimé : CO₂ estimé + CH₄ estimé + CO₂ indirect (1mmole CO₂ indirect = 0.87 mmoles AGV_t) (Getachew *et al.*, 1998)

R : L'effet antimethanogenic relatif à l'ajout de chaque extrait (dose de quercétine) (Relative antimethanogenic effect)

R = μ test / μ control (Lopez *et al.*, 2010) L'effet relatif (R) fournit une indication de la séparation comparative entre les moyens de test et de contrôle (μ):

Si R est égal à l'unité (R = 1), la valeur d'essai est identique au contrôle, les valeurs plus faibles (R < 1) indiquent une production décroissante dans le traitement d'essai comparativement au témoin,

mais des valeurs plus élevées ($R > 1$) indiquent que le méthane a été augmenté en réponse à l'additif.

R' : Le pourcentage de réduction/d'augmentation de la production du méthane relatif à l'ajout de chaque substrat (relative **percentage** of increase (positive) or decrease (negative) in methane production

R' = $(\mu \text{ test} - \mu \text{ control})/\mu \text{ control}$ (Lopez *et al.*, 2010)

BH % = $\text{TR H}_2 = \frac{4M+2P+2B}{2A+P+4B} \times 100$ (Demeyer, 1990)

M : production de méthane (mmoles) ; **P** : production de propionate (mmoles); **B** : production de butyrate (mmoles); **A** : roduction d'acétate (mmoles).

Résumés

Résumé

L'objectif de ce travail de thèse est d'évaluer l'effet de trois extraits de deux plantes *Eucalyptus globulus* et *Olea europaea* riches en composés phénoliques sur les caractéristiques de la fermentation ruminale en utilisant la technique de production de gaz *in vitro* (IVGPT), quatre niveaux (D0, D50, D75 et D100 mg) de trois extraits d'*Eucalyptus* et des feuilles d'olive (AcOEt, BuOH et aqueux), dans les mêmes conditions des doses croissantes de quercétine (D0, D150, D175 et D200 mg) ont été ajoutées à un régime alimentaire formulé pour ruminants (fourrage/concentré: 60/40) et incubées à 39 °C en anaérobiose avec du liquide ruminal tamponné mélangé à la salive artificielle et les principaux paramètres de fermentation *in vitro* (pH, production de gaz total *in vitro* (GP24), concentration de CH₄, concentration de CO₂, la digestibilité apparente de la matière sèche et de la matière organique (DMS, DMO), estimation de l'énergie métabolisable (EM), concentration en ammoniacque (N-NH₃), les acides gras volatils totaux (AGV_t), AGV individuels et la population des protozoaires ont été déterminés après 24 h d'incubation.

Pour les extraits d'*E. globulus*, la production de CH₄ est significativement plus faible pour l'extrait AcOEt (P <0,01) mais comparable au témoin pour les extraits BuOH et aqueux. La production de N-NH₃ est réduite pour tous les extraits d'*eucalyptus* (P <0,01). Une légère diminution de la concentration en acétate pour l'extrait AcOEt qui corrobore avec une légère augmentation de la production du propionate pour tous les extraits, alors qu'aucun effet significatif n'a été enregistré pour le gaz total (GP24) et les AGV_t pour tous les extraits d'*E. globulus*. Le pH est affecté uniquement par l'extrait aqueux (P <0,05). L'extrait AcOEt diminue la digestibilité apparente de la matière sèche et de la matière organique *in vitro* (P <0,01) alors que pour les extraits BuOH et aqueux ce paramètre reste comparable au témoin. La quantification des protozoaires par comptage direct indique que la population de protozoaires est diminuée (P <0,01) pour tous les extraits d'*E. globulus* comparativement au témoin.

Pour les extraits d'*O. europaea*, l'ajout de l'extrait AcOEt a stimulé la GP24 qui coïncide avec une dépression de la concentration de CH₄ par rapport au témoin (P <0,01), cependant pour les extraits BuOH et aqueux la GP24 et le CH₄ restent comparables au témoin. La production de N-NH₃ est augmentée pour tous les extraits d'olives (P <0,01), la même tendance est observée pour la concentration en propionate pour tous les extraits même si elle n'est pas statistiquement significative, seul l'extrait AcOEt affecte le pH (P <0,01) alors qu'aucun effet n'est enregistré pour la production des AGV_t. L'extrait AcOEt diminue aussi la digestibilité de la matière sèche et de la matière organique (P <0,01) mais ce paramètre reste comparable au témoin pour les extraits BuOH et aqueux. La population de protozoaires est diminuée pour tous les extraits d'olive comparativement au témoin mais spécialement pour l'extrait AcOEt (P <0,01).

L'addition de la quercétine affecte la majorité des paramètres étudiés compris, le pH, le N-NH₃, la digestibilité de la matière sèche et de la matière organique et la production de méthane (P <0,05), alors qu'elle a augmenté significativement la GP24 (P <0,01), tandis que la production des AGV_t n'est pas affectée par l'addition de la quercétine.

En conclusion les extraits AcOEt d'*Eucalyptus* et des feuilles d'olive ont exercé des effets bénéfiques sur certains paramètres de fermentation, qui pourraient être prometteurs comme des puissants additifs anti-méthanogènes. De plus, l'évaluation du bon dosage semble être critique pour contenir l'impact environnemental, sans pour autant réduire la valeur nutritive des aliments. La quercétine a également démontré un effet dose-dépendant sur les caractéristiques de fermentation *in vitro* dans le rumen. Cependant, les résultats sont contradictoires de point de vue nutritionnel (réduction de la digestibilité) et environnemental (réduction du méthane).

Mots clés: Extraits de feuilles d'*Eucalyptus*, extraits de feuilles d'olive, composés phénoliques, quercétine, fermentation *in vitro*, production de méthane, population des protozoaires.

Abstract

The aim of this work thesis is to evaluate the effect of three extracts of two plants *Eucalyptus globulus* and *Olea europaea* rich in phenolic compounds on the characteristics of the ruminal fermentation by using the *in vitro* gas production technique (IVGPT), four levels (D0, D50, D75 and D100 mg) of three extracts of *Eucalyptus* and olive leaves (AcOEt, BuOH and aqueous), in the same conditions different increasing doses of quercetin (D0, D150, D175 and D200 mg) were added to a formulated diet for ruminants (fourrage/concentré ratio: 60/40) and incubated anaerobically at 39 °C with ruminal liquid mixed with the artificial saliva and the main parameters of *in vitro* fermentation (pH, production of total gas (GP24), concentration of CH₄, concentration of CO₂, the digestibility of the dry and organic matter (DM, DMO), estimation of the metabolisable energy (EM), ammonia concentration (N-NH₃), the total volatile fatty acids (AGV_t), individual AGV and the population of protozoa was determined after 24 hours of incubation.

For *E. globulus* extracts, the CH₄ production is significantly lower for AcOEt extract (P < 0,01) , but comparable to the control for BuOH and aqueous extracts. The N-NH₃ production is reduced for all *Eucalyptus* extracts (P < 0,01). A slight decrease of the acetate concentration for AcOEt extract which coincides with a slight increase of propionate production for all the extracts, while no significant effect was recorded for the total gas (GP24) and the AGV for all *E. globulus* extracts. The pH is only affected by the aqueous extract (P < 0,05). AcOEt extract decreases the *in vitro* digestibility of the dry and organic matter (P < 0,01), while for BuOH and aqueous extracts this parameter remains comparable to the control. The quantification of protozoa by direct count indicates that the population of protozoa is decreased (P < 0,01) for all *E. globulus* extracts compared with the control.

For the extracts of *O. Europaea*, the addition of AcOEt extract stimulated the GP24 which coincides with a depression of CH₄ concentration compared to the control (P < 0,01), however for BuOH and aqueous extracts the GP24 and the CH₄ remains comparable to the control. N-NH₃ production is increased for all olive extracts (P < 0,01), the same trend is observed for propionate concentration even if it is not statistically significant, only AcOEt extract affects the pH (P < 0,01) while no effect is recorded for the total AGV_t production. AcOEt extract also decreases the digestibility of dry and organic matter (P < 0,01) but this parameter remains comparable to the control for BuOH and aqueous extracts. The population of protozoa is decreased for all olive extracts compared with control but especially for AcOEt extract (P < 0.01).

The addition of quercetin affects most of the parameters studied included, pH, N-NH₃, digestibility of dry matter and organic matter and methane production (P < 0.05), while significantly increased GP24 (P < 0.01). AGV_t production was not affected by the addition of quercetin.

In conclusion, AcOEt extracts of *Eucalyptus* and olive leaves have beneficial effects on some fermentation parameters, which could be promising as powerful anti-methanogenic additives. In addition, the evaluation of the correct dosage seems to be critical to contain the environmental impact, without reducing the nutritional value of the food. Quercetin also demonstrated a dose-dependent effect on *in vitro* fermentation characteristics in the rumen. However, the results are contradictory from the nutritional (decrease degradability) and environmental (reduction of methane) point of view.

Key words: *Eucalyptus* leaves extracts; olive leaves extracts, phenolic compounds, quercetin, *in vitro* fermentation, methane production, protozoa population.

ملخص

الهدف من هذه الرسالة هو تقييم تأثير ثلاثة مستخلصات من نباتين *Olea europaea* و *Eucalyptus globulus* الغنيان بالمركبات الفينولية على خصائص تخمر الكرش باستخدام تقنية إنتاج الغاز في المختبر (IVGPT) ، أربعة مستويات (D0 ، D50 ، D75 و D100 ملغ) من ثلاثة مستخلصات من أوراق الأوكالبتوس و أوراق الزيتون (AcOEt ، BuOH والمائي) ، في نفس الظروف تم إضافة جرعات متزايدة مختلفة من الكيرسيتين (D0 ، D150 ، D175 و D200 ملغ) إلى نظام غذائي مصمم للحيوانات المجتررة (نسبة علف/مركز: 40/60) وحضنت لاهوانيا عند 39 درجة مئوية مع السائل الكرشى الممزوج باللعاب المصنع مخبرياً والمعلات الرئيسية للتخمر في المختبر (درجات الحموضة (pH) ، إنتاج الغاز الكلي (GP24) ، تركيز الميثان (CH₄) ، تركيز CO₂ ، قابلية هضم المادة الجافة والعضوية (DMO ، DMS) ، تقدير الطاقة (EM) ، تركيز الأمونيا (N-NH₃) ، مجموع الأحماض الدهنية المتقلبة (AGV_t) ، AGV الفردية، إنتاج الطفيليات كانت قد حددت بعد 24 ساعة من الحضان.

بالنسبة لمستخلصات *E. globulus* ، كان إنتاج CH₄ أقل بشكل ملحوظ لمستخلص AcOEt (P < 0,01) ولكنه مماثل للشاهد لمستخلصات BuOH والمستخلصات المائية. تم تقليل إنتاج N-NH₃ لجميع المستخلصات (P < 0,01) . انخفاض طفيف في تركيز الأسيتات (acétate) لمستخلص AcOEt الذي يتزامن مع زيادة طفيفة في إنتاج البروبيونات (propionate) لجميع المستخلصات ، في حين لم يتم تسجيل أي تأثير على إجمالي الغاز (GP24) و AGV_t لكل مستخلصات *E. globulus* . تأثرت درجة الحموضة (pH) فقط بالمستخلص المائي (P < 0,05) . أيضا قلل مستخلص AcOEt من قابلية الهضم في المختبر للمواد الجافة والعضوية (P < 0,01) ، بينما بالنسبة لمستخلصات BuOH والمستخلصات المائية ظل هذه المعلم مماثل للشاهد . أما فيما يخص تقنية العد المباشر تشير إلى أن عدد البروتوزوا ! انخفض بالنسبة لمستخلصات *E. globulus* مقارنة مع الشاهد (P < 0,01) .

بالنسبة لمستخلصات *O. Europaea* ، حفزت إضافة مستخلص AcOEt إنتاج GP24 الذي يتزامن مع انخفاض تركيز CH₄ مقارنة مع الشاهد < (P < 0, 01) ، أما بالنسبة لمستخلصات BuOH والمستخلصات المائية فإن GP24 و CH₄ لا يزالان مماثلان للشاهد. تم زيادة إنتاج N-NH₃ لجميع مستخلصات الزيتون (P < 0, 01) ، ويلاحظ نفس الشيء لتركيز البروبيونات (propionate) حتى لو لم تكن ذات دلالة إحصائية ، أيضا مستخلص AcOEt أثر على درجة الحموضة (pH) (P < 0,01) بينما لا يوجد أي تأثير تم تسجيله على إجمالي إنتاج AGV_t . قلل مستخلص AcOEt أيضا من قابلية هضم المادة الجافة والعضوية (P < 0,01) ولكن هذه المعلم بقي مماثل للشاهد بالنسبة لمستخلصات BuOH والمستخلصات المائية. انخفض عدد البروتوزوا بالنسبة لجميع مستخلصات الزيتون مقارنة مع الشاهد ولكن بشكل خاص لمستخلص AcOEt (P < 0,01) .

أثرت إضافة الكيرسيتين على معظم المعلمات المدروسة : درجة الحموضة ، إنتاج الميثان ، تركيز N-NH₃ وهضم المادة الجافة والمواد العضوية (P < 0,05) ، في حين زاد إنتاج الغاز الكلي GP24 بشكل كبير (P < 0,01) ، في حين لم يتأثر إنتاج AGV_t من خلال إضافة الكيرسيتين.

في الختام ، ممكن استنتاج أن مستخلصات AcOEt لأوراق الأوكالبتوس وأوراق الزيتون لها آثار مفيدة على بعض معايير التخمر ، والتي يمكن أن تكون واعدة كمضافات قوية مضادة للميثان. بالإضافة إلى ذلك ، يبدو أن تقييم الجرعة الصحيحة أمر بالغ الأهمية لاحتواء التأثير البيئي ، دون التقليل من القيمة الغذائية للأغذية. كما أظهرت النتائج أن تأثير الكيرسيتين يعتمد كلياً على تأثير الجرعة المضافة على خصائص التخمر الكرشى في المختبر في. ومع ذلك فإن النتائج تبقى متناقضة من وجهة النظر الغذائية (نقص الهضم) و البنية (الحد من الميثان).

الكلمات المفتاحية: مستخلصات أوراق الأوكالبتوس ، مستخلصات أوراق الزيتون ، مركبات الفينول ، الكيرسيتين ، التخمر في المختبر ، إنتاج الميثان ، تجمعات الأوليات (البروتوزوا).

الحمد لله