

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L 'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش – الجزائر-

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE

EL HARRACH (ALGER)

**THESE**

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT ES SCIENCES

EN SCIENCES AGRONOMIQUES

Option : Sciences alimentaires

**THEME**

Etude des effets associatifs de plantes fourragères des zones arides et de sous-produits issus de l'agronomie saharienne via la technique de production de gaz in vitro : « Essai d'établissement d'un modèle mathématique »

Présentée par : DJAMILA DEFFAIRI

Devant le jury :

<b>BENCHABANE A.</b>	Professeur	ENSA EL Harrach	Président
<b>ARHAB R.</b>	Professeur	Université Larbi Ben M'Hidi Oum el Bouaghi	Directeur de thèse
<b>TRIKI S.</b>	Professeur	ENSA E Harrach	Examineur
<b>ZELLAGUI A.</b>	Professeur	Université Larbi Ben M'Hidi Oum el Bouaghi	Examineur
<b>DJABRI B.</b>	Professeur	Université Mentouri Constantine	Examineur

## Remerciements

Louange à DIEU le tout puissant de m'avoir donné la force, le courage, la volonté, l'amour de savoir et surtout la patience pour pouvoir produire ce modeste travail .

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères tout particulièrement et avec reconnaissances à Monsieur ARHAB RABAH professeur à l'université Larbi ben Mhidi d'Oum el Bouaghi de m'avoir accordé sa confiance et de m'avoir permis de réaliser ce travail de recherche

Mes vives reconnaissances vont également à Monsieur BENCHAAABANE AHMED professeur à l'école nationale supérieure d'Agronomie el Harrach de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury . Je tiens aussi à lui exprimer ma profonde gratitude pour ses conseils et ses qualités scientifiques et humaines qui nous servent de modèle et d'exemple.

Mr. DJABRI B. professeur à l'université Mentouri Constantine , Monsieur Zellagui A. professeur à l'université Larbi ben Mhidi Oum el Bouaghi et Monsieur triki S. Professeur à l'école nationale supérieure d'Agronomie el Harrach n'ont pas hésité à accepter d'évaluer ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance.

Je tiens à remercier Madame Longo F. Maitre assistante à l'école nationale supérieure d'agronomie pour son aide et ses conseils qui ont toujours été une source d'information pour moi ;

Je tiens à remercier Monsieur Brahim errahmen Maitre de conférence à l'université de Blida et Madame Boudjemaa N. Maître de conférence à l'université de Blida pour l'aide qu'ils m'ont apporté .

Madame Faiza Ammad Maitre de conférence à l'université de Blida je te remercie infiniment pour toute l'aide que tu m'as apporté.

Un immense merci à mes chers parents tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense l'amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous

les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien être.

J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi. Par ce modeste travail je vous exprime ma reconnaissance éternelle et mon amour infini.

**QUE DIEU tout puissant vous accorde sa miséricorde et vous ACCEPTE dans son vaste paradis Rabi yarhamkom**

Je remercie beaucoup Mon époux et compagnon de vie pour son aide et son soutien.

Un très grand merci à mes chères sœurs adorées qui m'ont beaucoup aidé et soutenu aux moments difficiles. Merci du plus profond de mon cœur. Vous êtes les meilleures sœurs qu'une personne puisse avoir.

Sans oublier mon adorable fille zahrelbelle manel je t'aime beaucoup.

Une pensée à mes sœurs Dalila et fatiha Rabi yarhamhom qui m'ont laissé à mi chemin

Je n'oublierais jamais ma deuxième famille , mes amies de travail à l'université de Blida ( amel kuoidri , leila ,farida, hafida , atika , asma ,nacéra , amel kanane , nada, houria , fadhéla , et toute l'équipe merci à vous

Pendant la réalisation de cette thèse, un pourcentage assez conséquent de mon temps a été consacré à l'enseignement. Je remercie mes collègues enseignants-chercheurs Faculté des sciences de Nature et de la vie

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin durant l'élaboration de ce travail

## Résumé

Les fourrages sont fermentés seuls ou mélangés aux feuilles de palmier dans diverses combinaisons (0, 10, 20, 30, 40 et 50%), dans le liquide ruminal tamponné en utilisant des techniques *in vitro* de gaz. La production de gaz (mmole / g de MS) à 3, 6, 9, 24, 48 et 72 heures d'incubation a montré que les feuilles de palmier inclus abaisse la production de gaz lorsqu'il est associé à *Aristida pungens* ( $P < 0,0001$ ), alors que cet effet n'était pas significatif avec *Astragalus gombiformis* ( $P > 0,05$ ). Il est conclu que les feuilles des palmiers dattiers peuvent être un complément alimentaire adapté pour les petits ruminants parcourant *Aristida pungens* et *Astragalus gombiformis* dans les régions arides. Nos résultats montrent également que les pourcentages des feuilles du palmier incorporées doivent être inférieurs à 20% et à des courtes durées afin de minimiser les effets des tanins.

Le modèle de sandoval (2000) utilisé pour simuler la description du profil fermentaire de la production de gaz *in vitro* ne convient pas aux variétés caractéristiques des zones algériennes arides et semi arides alors que le modèle de la régression multiple utilisé

$Y = a + b(\text{temps}) + c(\text{Pourcent}) + d(\% * t)$  a révélé une bonne régression linéaire pour les deux mélanges.

Pour l'étude des plantes comme additif, la réduction de la production de gaz est enregistrée seulement suite à l'addition de *Juniperus phoenicea*. Cependant, la réduction de la production de méthane est observée pour les quatre plantes. La diminution la plus importante est notée pour *Carduus pycnocephalus* (22,19). Une réduction est également observée pour le nombre total de protozoaires et la production d'ammoniaque.

Pour les mixtures, l'ajout du foin de vesce-avoine ou des grignons d'olives à la margine et aux différentes concentrations entraîne une diminution dans la dégradabilité de la Matière sèche.

L'étude statistique a montré une bonne régression linéaire avec le paramètre temps qui joue un rôle très hautement significatif ( $p < 0,001$ ) pour les deux mélanges. La production du gaz diminue progressivement et hautement significative en fonction du temps avec le mélange margines grignons d'olive en comparaison avec le mélange margines foin de vesce avoine.

**Mots clés:** Effet associatif, Feuilles de palmier dattier, Fermentation *in vitro*, Ovins, Modélisation



## ملخص

يتم تخمير العلف بمفرده أو يخلط مع أوراق النخيل في توليفات مختلفة (0 ، 10 ، 20 ، 30 ، 40 و 50٪) في سائل كرشي معيبر باستخدام تقنيات الغاز في المختبر. أظهر إنتاج الغاز (mmol / g DM) عند 3 و 6 و 9 و 24 و 48 و 72 ساعة من الحضانة أن أوراق النخيل المدرجة تقلل من إنتاج الغاز عند دمجها مع *Astragalus gombiformis* ( $P < 0.0001$ )، في حين أن هذا التأثير لم يكن كبيراً مع *Aristida pungens* ( $P > 0.05$ ). خلصت الدراسة إلى أن أوراق نخيل التمر قد تكون مكملاً غذائياً مناسباً للمجترات الصغيرة التي تتجول على *Astragalus gombiformis* و *Aristida pungens* في المناطق الجافة. تظهر نتائجنا أيضاً أن النسب المئوية لأوراق النخيل المدمجة يجب أن تكون بنسب أقل من 20٪ ولفترات قصيرة من أجل تقليل تأثيرات التانينات.

نموذج سانوفال (2000) المستخدم لمحاكاة وصف التوصيف التخميني لإنتاج الغاز في المختبر غير مناسب للأصناف المميزة للمناطق الجافة وشبه الجافة الجزائرية ، في حين أن نموذج الانحدار المتعدد (  $Y = a + b(\text{temps}) + c(\text{Pourcent}) + d(\%*t)$  ) المستخدم، كشف عن انحدار خطي جيد لكلا الخليطين.

لدراسة النباتات كمضاف ، تم تسجيل انخفاض إنتاج الغاز فقط بعد إضافة *Juniperus phoenicea* ومع ذلك ، لوحظ انخفاض إنتاج الميثان في النباتات الأربعة. لوحظ أكبر انخفاض مع *Carduus pycnocephalus* (22.19). كما لوحظ انخفاض في العدد الإجمالي للبروتوزوا وإنتاج الأمونيا.

بالنسبة للخلائط ، فإن إضافة تين البيقة-الشوفان أو ثفل الزيتون إلى سائل الزيتون وبتراكيز مختلفة يؤدي إلى انخفاض في قابلية تحلل المادة الجافة.

أظهرت الدراسة الإحصائية انحداراً خطياً جيداً مع معلمة الزمن التي تلعب دوراً جدياً معنوي ( $p < 0.001$ ) للخليطين. يتناقص إنتاج الغاز تدريجياً وبشكل جدي معنوي مع مرور الوقت مع خليط سائل و ثفل الزيتون مقارنة مع خليط سائل الزيتون و الشوفان-البيقة.

**الكلمات المفتاحية:** التأثير الترافقي ، أوراق نخيل التمر ، التخمير في المختبر ، الأغنام ، النمذجة.

## Abstract

The objectives of the present study are to evaluate interactions between microbial degradation of native dryland plants, medicinal plants and agricultural by-products (dry palms, olive pomace and vegetable water). The model includes the principal effects of single substrate and mixtures of multiple interactions.

The forages were fermented alone or mixed with palm leaves in various combinations (0, 10, 20, 30, 40 and 50%) in buffered rumen fluid using in vitro gas techniques. Gas production (mmol/g of dry matter) at 3, 6, 9, 24, 48 and 72 h of incubation was measured from all feed combinations. The results showed that the included palm leaves reduced gas production when associated with *A. pungens* ( $p < 0.0001$ ), whereas this effect was less significant with *A. gombiformis* ( $P > 0,05$ ). This effect was more pronounced at earlier times of incubations. The in vitro organic matter digestibility decreased linearly with the increasing inclusion of date palm leaves in the mixtures. It is concluded that date palm leaves may be a suitable feed supplement for small ruminants browsing *A. pungens* and *A. gombiformis* in arid regions. Our results also showed that the inclusion level should be lower than 20% and for a short period in order to minimize tannins effect. The description of the fermentation profile of in vitro gas production showed that Sandoval model was poor and not appropriate for the characteristic varieties of arid and semi-arid areas in Algeria and the multiple regression models revealed a good linear regression for both mixtures.

$$Y = a + b (\text{temps}) + c(\text{Pourcent}) + d(\%*t)$$

Medicinal plants are a source of natural antimicrobial molecules that can replace antibiotics by modifying the fermentation profile in the rumen. Plants selected for this study are *Juniperus phoenicea*, *Satureja calamintha*, *Mentha pulegium* and *Carduus pycnocephalus*. The effect of these plants (1 and 2 mg / ml) is studied by in vitro gas production technique, in two different tests. Chemical analysis shows that *Juniperus phoenicea* contains the highest concentration of total sugars.

For the study of plants as an additive, the reduction of total gas production is only observed with *Juniperus phoenicea*. However, the reduction of methane production is detected with all plants. The largest reduction is recorded with *Carduus pycnocephalus* (22.19%). Reductions in the production of ammonia and total number of protozoa are also observed.

For olive byproducts, the kinetic parameters of the in vitro fermentation of the different singular substrates and their mixtures revealed that the production of gas resulting from the soluble fraction is significantly distinct between the three substrates ( $P < 0.05$ ). The strong production is noted for vegetable water (12.65 ml) and the lowest is observed for olive pomace (2.94 ml).

For mixtures, the addition of vetch-oat hay or olive pomace to vegetable water and at different concentrations leads to a decrease in the degradability of MS. They are 2.71, 11.98 and 21.63% respectively for the vegetable water-hay of vetch-oats mixture at concentrations of 60, 40 and 20%. This decrease is even more important for the mixture obtained with olive pomace where rates of: 32.43, 36.97 and 63.41%.

Statistical analysis showed a good linear regression with time parameter which plays a very highly significant role ( $p < 0.001$ ) for the two mixtures. The production of the gas decreases gradually and highly significantly over time with the olive-pomace vegetable water mixture in comparison with the vegetable water-hay of vetch-oats mixture.

**Key words:** Associative effect, Date palm leaves, In vitro Fermentation, Sheep, Modeling

## Liste des abréviations

**AGV** : Acides Gras Volatils.

**CH<sub>4</sub>** : Méthane.

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone.

**H<sub>2</sub>** : Dihydrogène.

**MS** : Matière sèche.

**MO** : Matière organique.

**MM** : Matière minérale.

**ST** : Sucres totaux.

**ADF** : Acid detergent fibre

**ADL** : Acid detergent lignin

**AGV** : Acide gras volatils

**c** : Vitesse de la dégradation

**CP** : Crude protein

**DM** : Dry matter

**MAT** : Matière azotée totale

**MS** : Matière sèche

**MM** : Matière minérale

**NDF** : Neutral detergent fibre

**OM** : Matière organique

**TCT** : Tanins condensés totaux

**TT** : Tanins totaux

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Les ressources fourragères en Algérie (AMRANI, 2006).....	4
<b>Tableau 2.</b> Répartition des aires destinées à l'alimentation du cheptel (Ziani, 2002).....	5
<b>Tableau 3. Principales espèces de champignons anaérobies isolés du tube digestif des herbivores (d'après Fonty et al., 1995).</b> .....	17
<b>Tableau 4.</b> Zones de collecte des plantes utilisées.....	28
<b>Tableau 5</b> Les différentes mixtures réalisées.....	29
<b>Tableau 6.</b> Composition des solutions de dosage de l'ammoniaque (Chaney et Marbach, 1962) .....	37
<b>Tableau 7 :</b> composition chimique des substrats fourragers singuliers (en g/kg de matière sèche). .....	40
<b>Tableau 8 :</b> composition chimique calculée du mélange <i>Stipagrostis pungens</i> et les feuilles du palmier (exprimés en g/kg de MS) .....	46
<b>Tableau 9:</b> composition chimique calculée du mélange <i>Astragalus gombiformis</i> et les feuilles de palmes.....	46
<b>Tableau 10 :</b> résultats de la méthode de <u>Levenberg-Marquardt</u> .....	50
<b>Tableau 11.</b> Concentrations en éléments minéraux et sucres totaux (g/100 g MS) des plantes médicinales .....	49
<b>Tableau 12.</b> Production de gaz <i>in vitro</i> et les constantes cinétiques modélisées des mélanges 50 du foin de vesce-avoine et des plantes médicinales ( <i>Juniperus phoenicea</i> , <i>Carduus pycnocephalus</i> , <i>Satureja calamintha</i> et <i>Mentha pulegium</i> ).....	52
<b>Tableau 13 :</b> production de méthane enregistrée après 96h d'incubation.....	52
des mélanges du foin de vesce avoine et de plantes médicinales <i>Juniperus phoenicea</i> , <i>Carduus pycnocephalus</i> , <i>Satureja calamintha</i> et <i>Mentha pulegium</i> .....	53
<b>Tableau 14:</b> faciès fermentaire enregistré après 24h d'incubation des mélanges du foin de vesce avoine et des plantes médicinales (pH , ammoniaque, protozoaires ) .....	55
<b>Tableau 15 :</b> teneurs des substrats singuliers en matière sèche et leurs concentrations en éléments minéraux et sucres totaux (g/100 g MS).....	56

<b>Tableau 16</b> : production de gaz <i>in vitro</i> des substrats singuliers et des mélange.....	57
<b>Tableau 17</b> : Résultats de la méthode de multiple-régression .....	59
<b>Tableau 18</b> . Paramètres cinétiques du modèle exponentiel des substrats singuliers et des mélanges. ....	61
<b>Tableau 19</b> : Analyse qualitative et quantitative du pool gazeux des substrats singuliers et des mixtures.....	63
<b>Tableau 20</b> : paramètres fermentaires (pH et ammoniac), dénombrement des protozoaires et digestibilité des substrats singuliers et des mixtures.....	65
<b>Tableau 21</b> : paramètres fermentaires (pH et ammoniac), dénombrement des protozoaires et digestibilité des substrats singuliers et des mixtures.....	69

## LISTES DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Organisation structurale de la paroi végétale (Mathieu simon, 2009).....	6
<b>Figure 2.</b> Structure de la molécule de cellulose ( Roger et al, 2002) .....	7
<b>Figure 3.</b> Unités phénylpropanes précurseurs des lignines. (René et al ., 2004).....	9
<b>Figure 4.</b> Structure des tanins.....	11
<b>Figure 5.</b> Représentation schématique du rumen et du réseau dans un plan vertical (1) et un plan horizontal (2). Les flèches indiquent les mouvements du contenu (Fonty et al., 1995).....	13
<b>Figure 6.</b> Métabolisme des protides dans le rumen (Gaste, 1988).....	18
<b>Figure 7</b> Voies du métabolisme des glucides dans le rumen (Jouany, 1994).....	19
<b>Figure 8.</b> Métabolisme de l'hydrogène dans les différentes voies fermentaires du rumen.....	24
<b>Figure 9.</b> Courbe étalon pour la détermination de la concentration en sucres totaux des plantes médicinales et des sous-produits oléicoles.....	32
<b>Figure 10.</b> Courbe étalon pour la détermination des concentrations en phénols totaux et tanins totaux des échantillons désertiques.....	34
<b>Figure 11.</b> Courbe étalon ayant servie pour la détermination de la concentration en tanins condensés des échantillons désertiques.....	35
<b>Figure 12.</b> Principe de dosage de l'azote ammoniacal (N-NH <sub>3</sub> ).....	39
<b>Figure 13.</b> Courbe étalon correspondant au dosage de l'azote ammoniacal (N-NH <sub>3</sub> ).....	40
<b>Figure 14 :</b> Production de gaz en fonction du pourcentage des feuilles du <b>Palmier dattier et <i>Aristida pungens</i> <u><i>Stipagrostis pungens</i></u></b> à différentes périodes .....	49
<b>Figure 15 :</b> Production de gaz en fonction du pourcentage <i>Palmier dattier et A gombiformis</i> à différentes périodes.....	50

**Figure 16 :** production de gaz en fonction de deux paramètres pourcentage d'un mélange d'aliment en fonction du temps (MF : Margine plus foin de vesce-avoine, MGO : Margine plus grignon d'olive).....60

**Figure 17 :** modélisation de la production de gaz en fonction du temps en variant le pourcentage (%) du mélange d'aliment (MF : Margine plus foin de vesce-avoine, MGO : Margine plus grignon d'olive).....61

## SOMMAIRE

Remerciements

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumés

Introduction.....	1
I..Analyse descriptive de la situation fourragère en Algérie.....	3
1.1. Composition chimique des fourrages .....	5
1.2. Principaux constituants pariétaux .....	6
1.3. Constituants azotés.....	8
1.4. Constituants phénoliques .....	8
1.5. Digestion des fourrages chez les ruminants.....	12
1.6. Flore et faune du Rumen .....	13
1.7 Processus fermentaire du rumen .....	17
<b>18.Méthodologie d'évaluation de la Valeur nutritive des fourrages.....</b>	<b>20</b>
1.9. Modélisation .....	25
<b>2.1Rappel des objectifs .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2Matériel végétal et traitement .....</b>	<b>27</b>
2.3 Caractérisation chimique des échantillons .....	29
2.3.1 Détermination de la matière sèche .....	29
2.3.2 Détermination de la matière minérale.....	30
2.3.3 Détermination de la matière azotée totale .....	30
2.3.4 Détermination des composés de la paroi végétale .....	30
2.4 Caractérisation phytochimique des échantillons .....	33
2.4.1. Détermination des tanins .....	34
2.5. Fermentation <i>in vitro</i> des mixtures par le microbiote ruminal .....	35
2.5.1. Technique de production de gaz <i>in vitro</i> .....	35

2.6.	Mesure du pH et analyse des produits fermentaires.....	38
2.6.1.	_Mesure du pH .....	38
2.6.2.	_Dosage de l'ammoniaque .....	38
2.7.	Analyse qualitative et quantitative des acides gras volatils (AGV) .....	40
3.	Etude des effets associatifs de mélange de substrats fourragers .....	44
3.1.	Composition chimiques des substrats singuliers et en mélange.....	44
3.2.	Fermentation <i>in vitro</i> des mélanges.....	47
3.3.	Modélisation de la production de gaz .....	50
3.4.	Etude des effets associatifs de mélange de plantes médicinales.....	51
3.4.1.	Composition chimiques des substrats singuliers et en mélange .....	51
3.4.2.	Etude <i>in vitro</i> de l'inclusion des plantes médicinales sur l'activité fermentaire du microbiote ruminal .....	52
3.4.3.	Profil fermentaire .....	55
305.	Etude des effets associatifs de mélange de sous-produits oléicoles.....	56
3.5.1.	Composition chimique des margines et des grignons d'olives .....	56
3.5.2.	Fermentation <i>in vitro</i> des substrats singuliers et de leurs mixtures .....	57
3.6	Profil fermentaire.....	66
3.6.3.	Composition quantitative de la faune ruminale (protozoaires).....	66
	Digestibilité de la matière sèche .....	67
	Conclusion.....	70

Références bibliographiques

Annexe

# INTRODUCTION

Les ruminants constituent l'une des principales sources protéiques pour l'homme. Les propriétés qualitatives et quantitatives des ressources protéiques sont essentiellement influencées par la nature et la qualité de leur alimentation.

Le problème de la disponibilité fourragère et de la qualité de l'alimentation animale sont aggravés dans les régions arides et semi-arides à cause de la rareté et de l'irrégularité des précipitations qui limitent la croissance des espèces herbacées et le rendement de la biomasse dans les parcours.

Ainsi, l'élevage dans ces régions subit une véritable carence en plantes riches en valeur nutritive (Robles *et al.*, 2008).

En Algérie, les parcours occupent les deux tiers de la superficie totale répandue, surtout dans les régions arides où les plantes contiennent des composés antinutritionnels provoquant une altération de la fermentation et par conséquent une remarquable diminution de la digestibilité.

Dans ces régions seuls les fourrages pauvres, les résidus de récoltes et les sous produits agroindustriels sont utilisés pour l'alimentation des ruminants.

Face à ces circonstances qui s'aggravent de plus en plus, le recours à la complémentation est devenu indispensable et inévitable. Notre stratégie consiste à améliorer la qualité nutritive de la ration alimentaire pour une meilleure fermentation et digestion.

Les feuilles de palmier dattier ont été déjà utilisées seules comme complément alimentaire aux ruminants dans les régions oasiennes, cependant aucune étude n'a été réalisée dans le but de vérifier la qualité de la fermentation après une association des feuilles de palmier avec les fourrages.

Aucune étude en Algérie n'a démontré cet effet associatif dans la formulation des aliments conçus pour les ruminants. Dans ce contexte nous avons pensées à poser la problématique suivante :

- Formulation de plusieurs associations de plantes dans la ration alimentaires des ruminants contribue-t-elle à l'amélioration de l'aptitude fermentaire du microbiote ruminal?
- Existe-il une méthode mathématique fiable pour prédire ces effets associatifs ?

L'objectif de ce présent travail est de développer un modèle mathématique pour mimer et décrire les processus fermentaires ruminants de substrats autochtones, par comparaison aux modèles mathématiques conçus pour des substrats plus digestibles (tempérés et méditerranéennes). Dans cette présente étude, un travail préliminaire consistait à collecter les données expérimentales sur la fermentation ruminale *in vitro* de substrats singuliers ou en

association. Il s'agit de plantes autochtones de zones arides (*Astragalus gombiformis* et *Stipagrostis pungens*), de plantes médicinales (*Juniperus phoenicea*, *Satureja calamintha*, *Mentha pulegium* et *Carduus pycnocephalus*) et de sous-produits agricoles (les palmes sèches, les grignons d'olives et les margines). Dans un second lieu, cette étude s'est intéressée à évaluer l'employabilité des modèles mathématiques pour la simulation des processus de fermentation et la détermination des paramètres cinétiques.

Notre travail s'articule en deux parties, un rappel bibliographique puis une partie expérimentale qui comprend la méthodologie et les résultats et discussion.

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

## 1.1. Analyse descriptive de la situation fourragère en Algérie

L'élevage en Algérie se caractérise par son caractère traditionnel, basé sur le nomadisme et l'exploitation des ressources naturelles de la steppe, des parcours des hauts plateaux et de la jachère pâturée (Carter, 1975). D'après Nedjraoui (2001), cet élevage concerne principalement les ovins, les caprins, les bovins et les camelins où les régions steppiques et présahariennes détiennent 80% de l'effectif total constitué essentiellement par le cheptel ovin.

Le bilan fourrager en Algérie a permis de relever que le taux de couverture des besoins du cheptel algérien se situe à moins de 80% pour une offre estimée à 8 milliards d'unités fourragères (UF) en 2001. Ce déficit fourrager estimé à 22% est plus prononcé dans les zones littorales, steppiques et sahariennes pour des taux respectifs de 58%, 32% et 29% (Adem et Fahey, 2002) (**tab. 1**). Le recours à la valorisation des ressources fourragères marginalisées et la recherche de sources alternatives susceptibles de combler ce déficit semblent un moyen palliatif pour endiguer ce problème. Selon Adem et Fahey (2002), la superficie occupée par les fourrages est de 39 millions d'hectares (2001). Ces superficies sont représentées, essentiellement, par les steppes et les pacages (82%), les terres en jachère (7,8 %) et les soles pourvoyeuses de chaumes et de pailles (9%). Ces ensembles se caractérisent par la faiblesse de la productivité fourragère. Parmi les 4 ressources fourragères qui restent limitées, on distingue entre autres les prairies naturelles et les jachères pâturées occupant une surface d'environ 3.040.000 ha, les parcours de steppe (20 millions ha). Par contre les fourrages artificiels en sec ne représentent que 457.000 ha (statistiques série B 1994) et restent dominés par l'association vesce-avoine (50% de la sole fourragère) (Hamrit, 1995).

**Tableau1.** Les ressources fourragères en Algérie (AMRANI, 2006)

Sources fourragères	Superficie (hectares)		Productivité moyenne U F/ ha		observations
Parcours steppique	15 à 20 millions			100	Plus ou moins dégradés
Les forêts	Plus de 03 millions			150	-
Chaumes de céréales	Plus de 03 millions			300	Nécessité d'améliorer la qualité des chaumes
Végétation de jachères pâturées	Moins de millions	02	250		Nécessité d'orienter la végétation
Fourrages cultivés	Moins de 500			1000 à 1200	Orge, avoine, luzerne, trèfle, vesce avoine et le sorgho
Les prairies permanentes	Moins de 300			-	Nécessité d'une prise en charge

Les fourrages cultivés sont essentiellement constitués de fourrages secs (2/3 environ des surfaces fourragères). Par contre, la part des fourrage verts est faible (1/3). Elle est principalement composée de céréales. Les légumineuses occupent seulement 4,5% de la surface fourragère verte. En matière de superficie, les fourrages cultivés n'occupent que 8,4% de la surface agricole utile (SAU). Les fourrages secs représentent 78,1% des fourrages cultivés et la jachère pâturée occupe 76,5% de la surface totale des fourrages naturels (**tab. 2**).

Tableau 2. Répartition des aires destinées à l'alimentation du cheptel (Ziani, 2002).

Zones	Structure des superficies fourragères ha				
	Fourrage cultivé	Jachère	Prairies naturelles	Pacages et parcours	Chaumes et pailles
Tell	340226	1552773	31335	1491675	2658009
Montagne	28534	293422	10555	527400	237329
Steppe	55565	647122	170	12279372	748699
Sud	6125	15713	0	17353552	15533
Total	430450	2509030	42060	31652000	3659570

## 1.2. Composition chimique des fourrages

La production fourragère constitue la matière première de l'alimentation animale, ce qui explique l'importance majeure de la notion de qualité, puisqu'il s'agit d'aliments à transformer (Boutalbi, 1983 in Hamrit, 1995). L'objectif de la production fourragère est la quantité d'unités fourragères ou de matières azotées digestibles; par conséquent la connaissance de la composition chimique et la valeur nutritive de l'association s'avère importante (Hamrit, 1995).

Les parois végétales représentent de 30 à 80% de la matière sèche de l'appareil végétatif des plantes fourragères, elles constituent la principale source d'énergie du ruminant.

La paroi cellulaire est maintenant considérée comme un compartiment dynamique impliqué dans de nombreux processus physiologiques tels que le développement, la signalisation ou la défense contre des stress biotiques ou abiotiques. De l'intérieur vers l'extérieur, on voit la paroi secondaire directement en contact avec la membrane plasmique, la paroi primaire, puis la lamelle moyenne (fig. 1). Elle est constituée majoritairement de réseaux de polysaccharides (90% en masse) (cellulose, hémicellulose et pectine), mais renferme aussi des protéines, formant un assemblage supramoléculaire complexe. Ces différentes macromolécules sont étroitement liées en un réseau dont la cohésion est assurée aussi bien par des liaisons hydrogène que par des liaisons ioniques ou covalentes.

La paroi d'une cellule jeune est un réseau très hydrophile (60 à 80% de matière fraîche). Ses propriétés changent au cours de la vie cellulaire : plastique et extensible durant la période de croissance, elle devient rigide seulement en fin de croissance.

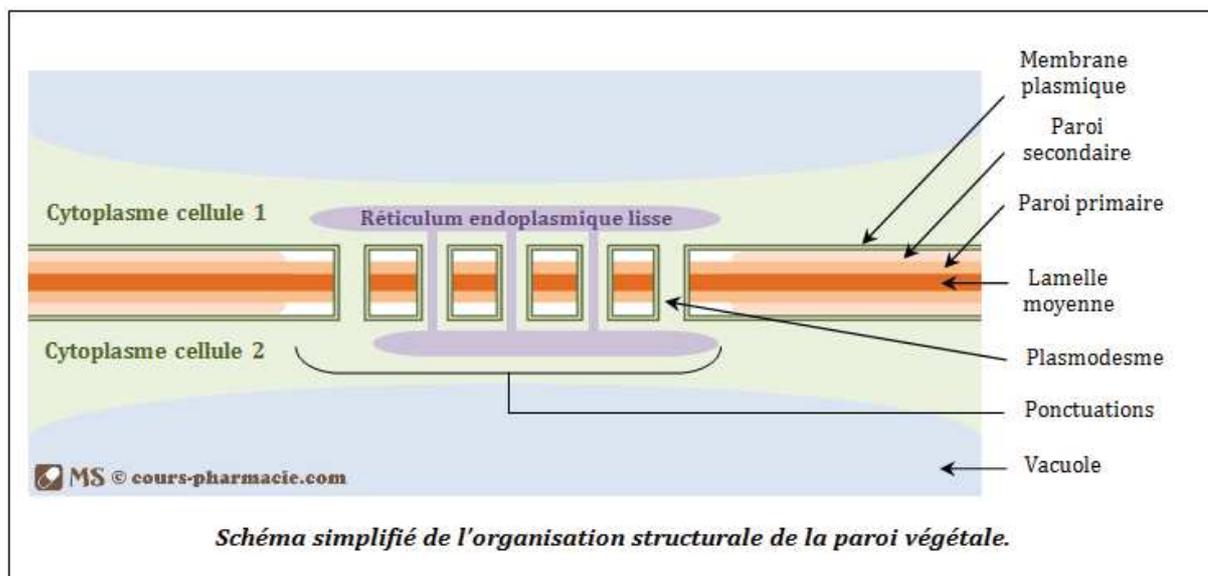


Figure 1. Organisation structurale de la paroi végétale (Mathieu, 2009).

### 1.3. Principaux constituants pariétaux

#### 1.3.1. Cellulose

La cellulose est la molécule organique la plus abondante de la planète. Elle joue un rôle de soutien et constitue en moyenne 45% des parois des plantes fourragères, un peu moins dans la paroi primaire et un peu plus dans la paroi secondaire. La cellulose est une macromolécule stéréo régulière, formée de maillons de D-glucose (configuration chaise) liés par un seul type de liaison glycosidiques :  $\beta$  1-4. L'unité de base est un diholoside formé de deux unités glucose : le cellobiose (fig. 2). Ce motif se répète en un nombre très grand. Le degré de polymérisation n'est pas établi avec précision, il est estimé entre 10.000 et 25.000 unités glucose. Cette polymérisation est plus élevée dans la paroi secondaire que dans la paroi primaire (Mc Neil et *al.*, 1984 ; Lam et *al.*, 1990).

Les microfibrilles de cellulose se déposent en strates concentriques parallèles à la surface cellulaire. Cette structure semble être un élément défavorable à la dégradation enzymatique en limitant les pénétrations des molécules d'eaux et des enzymes (Weimer et *al.*, 1990b; Carpita and Gibeaut, 1993).

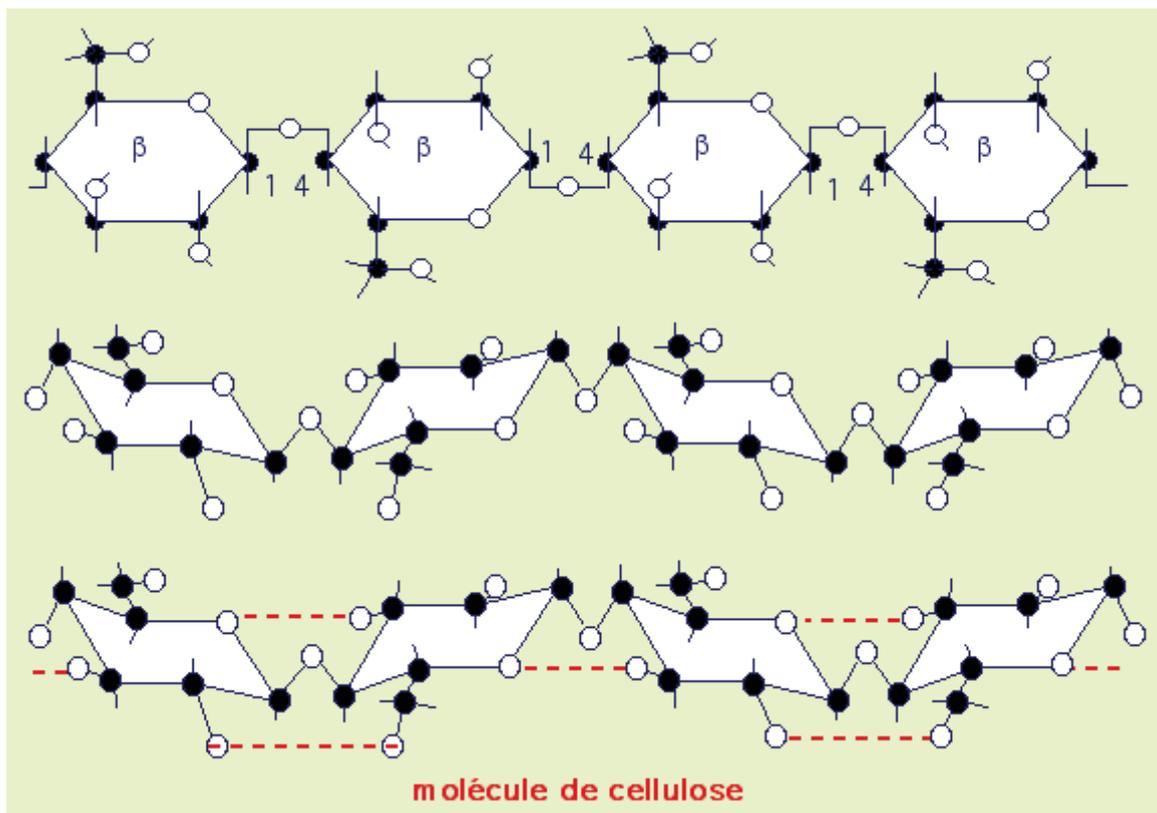


Figure 2. Structure de la molécule de cellulose (Roger et *al.*, 2002)

### 1.3.2. Hémicelluloses

Les hémicelluloses (ou celluloses) sont des polymères hétérogènes, solubles dans l'eau et pouvant être extraits de la paroi des cellules végétales par des solutions alcalines. Ce groupe de composés consiste en la réunion d'hétéropolysaccharides nombreux et variés qui représentent en moyenne de 15 à 30% de la masse sèche du bois. Les parois légumineuses contiennent beaucoup moins d'hémicelluloses que les graminées (Besle et *al.*, 1994 ; Jarrige et *al.*, 1995). Les hémicelluloses ont un rôle important dans la flexibilité et la plasticité de la paroi cellulaire. Leur teneur décroît de la paroi primaire à la paroi secondaire.

Parmi les hémicelluloses les plus communes dans la paroi des cellules du bois, on trouve les familles des xylanes, des mannanes et des galactanes. Ce sont des polysaccharides dont la chaîne principale linéaire est constituée respectivement de xylose, de mannose et de galactose. Ces chaînes peuvent être soit ramifiées par le greffage d'autres unités de sucres ou des groupements acétyles, soit entrecoupées par l'incorporation de sucres dans la chaîne linéaire.

### 1.3.3.Pectines

Les pectines sont des polysaccharides hétérogènes acides, dont les monomères de bases sont les galacturonates qui forment des chaînes assemblées en angle droit des molécules de rhamnose. Ils jouent un rôle de ciment intracellulaire (Aman, 1993), principalement localisées au niveau de la lamelle moyenne (Martens et *al.*, 1988).

La matière sèche des légumineuses fourragères contient de 6 à 10% de pectines, au lieu de 1 à 3% pour les graminées (Bourquin et Fahey, 1994 ; Jarrige et *al.*, 1995). Elles sont présentes sous forme neutre ou acide. Les pectines des légumineuses sont constituées par l'acide galacturonique, le rhamnose, le galactose et l'arabinose (Jung et Buxton, 1994).

### 1.4. Constituants azotés

Les constituants azotés se trouvent sous forme protéique, essentiellement dans les cellules chlorophylliennes et sous forme non protéique dans les vacuoles de la cellule végétale. Les limbes des graminées et les feuilles des légumineuses sont plus riches en matières azotées que les tiges (Demarquilly, 1986).

Les constituants azotés protéiques représentent de 75 à 85 % de l'azote total. 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 sont essentiellement abondants dans les vacuoles, les tissus conducteurs de l'appareil végétatif et les racines. Sur le plan chimique, ils représentent la fraction soluble dans l'éthanol (Jarrige, 1980). Ils représentent 15 à 25% de l'azote des fourrages verts. Ils diffusent très vite dans le rumen, sont rapidement dégradés en ammoniac et ne sont utilisables par les ruminants une fois transformés en protéines microbiennes (Jouany, 1994a).

### 1.5. Constituants phénoliques

#### 1.5.1.Lignines

Les lignines sont des polymères pariétaux qui représentent le deuxième constituant le plus abondant dans le bois. Dans leur état natif (non modifié ou non déstructuré), on parle de protolignines. La lignine est un polymère complexe, non linéaire. Sa polymérisation n'est pas linéaire et les motifs de base associés entre eux constituent un réseau qui s'interpénètre dans le réseau de cellulose. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, ce n'est pas la paroi "secondaire" des éléments du bois qui est la plus lignifiée mais plutôt la partie mitoyenne entre les cellules, ce qui renforce la cohésion et donc la résistance mécanique du bois.

La lignine est un corps dur qui confère au bois sa rigidité et sa dureté (lignum= bois), elle possède une action inhibitrice vis-à-vis à la dégradation des polyosides pariétaux dans le rumen (Jung and Deetz, 1993). Elle est essentiellement constituée par le polymère du coniférol ; la copolymérisation de trois alcool hydroxycinnamiques : l'alcool p-coumarique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (fig. 3).

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). Chez les graminées, la lignification augmente fortement à certaines périodes de croissance de la plante (Ballet, 1989). A l'inverse, les parois des légumineuses ont une teneur en lignines qui évolue peu au cours de la croissance (Buxton et Russel, 1988 ; Martens et *al.*, 1988).

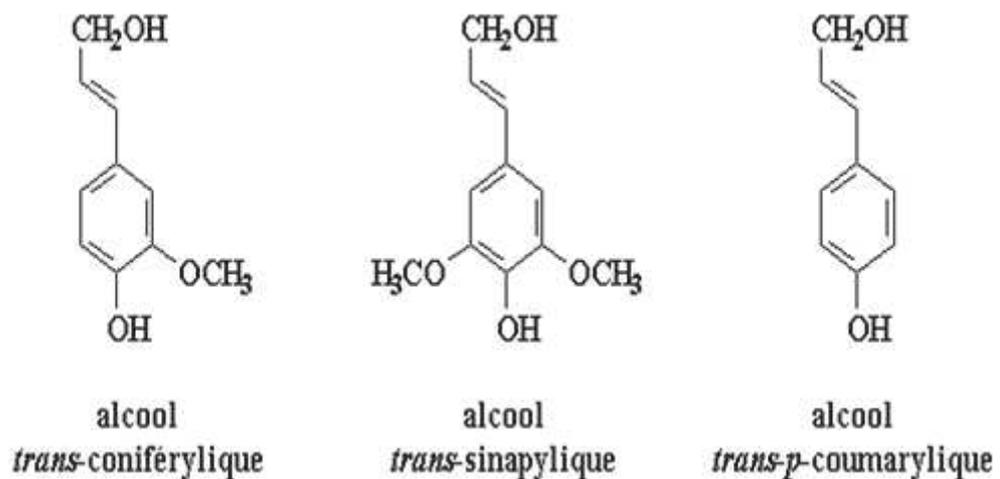


Figure 3. Unités phénylpropanes précurseurs des lignines. (René et *al.* , 2004).

### 1.5.2. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés aromatiques qui contiennent au moins un groupement carboxylique et un cycle phénolique. Ils sont dérivés des acides cinnamiques et benzoïques. Ils sont situés à des carrefours métaboliques importants puisqu'ils sont précurseurs d'un grand nombre de composés secondaires tels que les stilbènes, les coumarines, les flavones, la lignine et les anthocyanes.

Les acides phénoliques sont présents chez toutes les plantes et leurs rôles dans les mécanismes de résistance ont été décrits par de nombreux chercheurs (Friend, 1981 ; Bell, 1981 ; Matern et Kneusel, 1988 ; Nicholson et Hammerschmidt, 1992 ; Métraux et Raskin, 1993). Ils

interviendraient dans les mécanismes de défense des plantes en tant que constituants des parois cellulaires, en tant que composés antimicrobiens constitutifs des plantes ou induits en réponse à l'infection et en tant que molécule signal (Métraux et Raskin, 1993). Ils représentent des sites d'initiation de la lignification.

Le type d'acide phénolique présent dans les parois peut influencer la qualité des fourrages. L'acide p-coumarique est le plus toxique et le plus étroitement lié à la partie non dégradable du végétal (Kondo et *al.*, 1990; Jung et Bruxton, 1994).

### 1.5.3. Tanins

Les tanins sont des molécules naturellement synthétisées par les plantes, en réponse aux différents stress abiotiques et biotiques (Frutos et *al.*, 2002 ; Sliwinski et *al.*, 2002). Ils sont présents approximativement dans 80% des plantes ligneuses et dans 15% des plantes herbacées.

Les tanins sont des composés polyphénoliques qui sont classés en deux grands groupes : les tanins hydrolysables, composés d'un noyau central de glucides auquel des acides carboxyliques phénoliques sont liés par liaison esters et les tanins condensés ou catéchine, l'épicatéchine, ou le gallocatéchine (fig.4).

Les tanins ont une très haute affinité pour les protéines et forment des complexes protéines-tanins. L'ingestion d'une plante contenant des tannins condensés diminue l'utilisation des nutriments et les protéines peuvent être affectées dans une grande mesure, diminuant de ce fait la prise alimentaire. D'autre part, les tanins hydrolysables sont potentiellement toxiques pour les animaux. La consommation d'aliments contenant des niveaux élevés de tanins hydrolysables provoque une toxicité hépatique et rénale et peut entraîner la mort de certains animaux Les tanins ont un poids moléculaire variant entre 500 et 3000 Da et de complexité variable (Makkar, 1995a; Aganga et Mosase, 2001). Leurs fonctions hydroxyles multiples permettent la formation de complexes, en premier lieu avec les protéines et à moindre degré avec les ions métalliques, les acides aminés et les polysaccharides. De ce fait, leur présence dans la plupart des plantes fourragères limite leur utilisation par les ruminants et diminue, par conséquent, la productivité animale (Makkar, 2003).

Les méthodes d'analyse des tanins sont généralement classées en deux groupes : les méthodes chimiques et les méthodes de précipitation des protéines.

Les effets des tanins sur la digestibilité de la ration alimentaire des ruminants dépendent essentiellement des interactions établies entre les tanins et les composants des aliments. De plus, les tanins peuvent influencer directement le microbiote ruminal et l'activité enzymatique (Mc

Sweeney et *al.*, 2001). Cette activité antinutritive varie entre les espèces fourragères, en fonction de leur teneur en tanins (Rubanza et *al.*, 2005), de la nature et de la structure des tanins (Dalzell et Kerven, 1998), du degré de leur polymérisation (Shofield et *al.*, 2001), de leur stéréospécificité aux protéines (Frazier et *al.*, 2003).

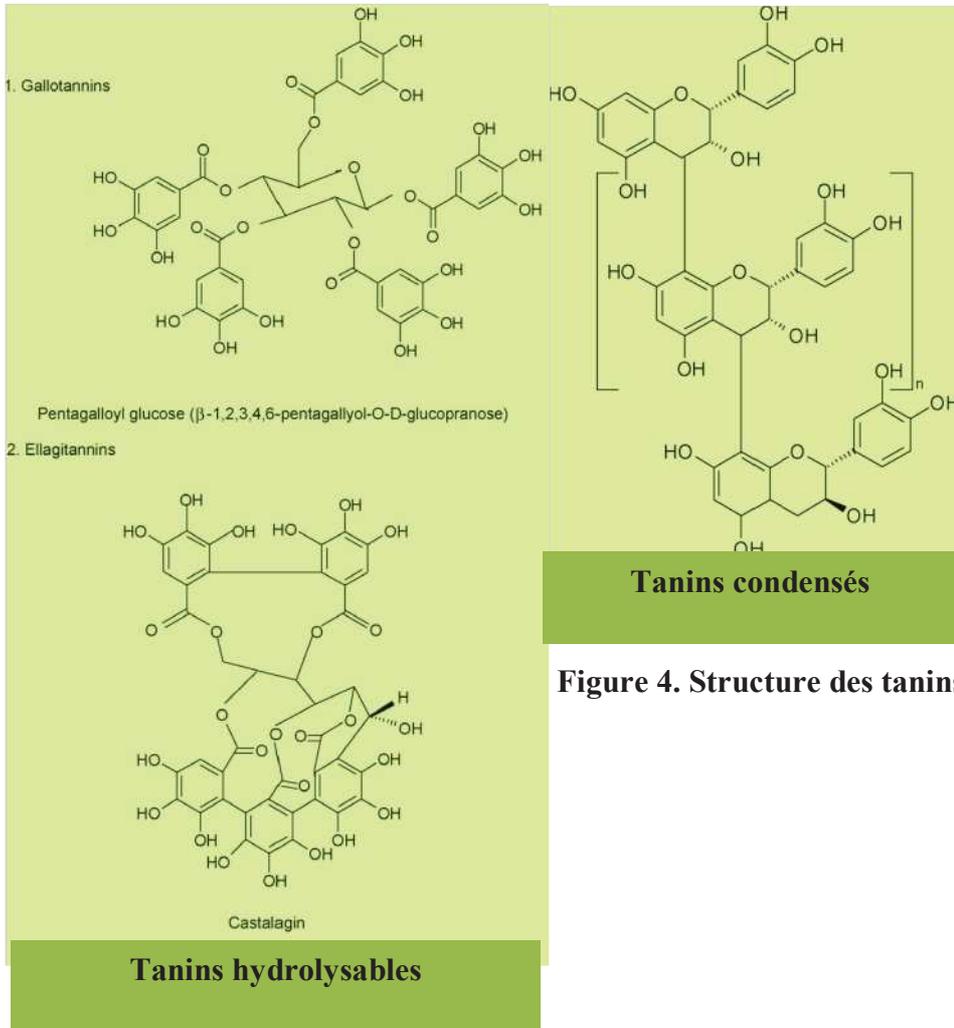


Figure 4. Structure des tanins.

Les composés phénoliques, en particulier les tanins condensés, exercent une action inhibitrice sur la croissance des microorganismes du rumen (Mc Sweeney et *al.*, 2001). On distingue trois mécanismes d'action des tanins :

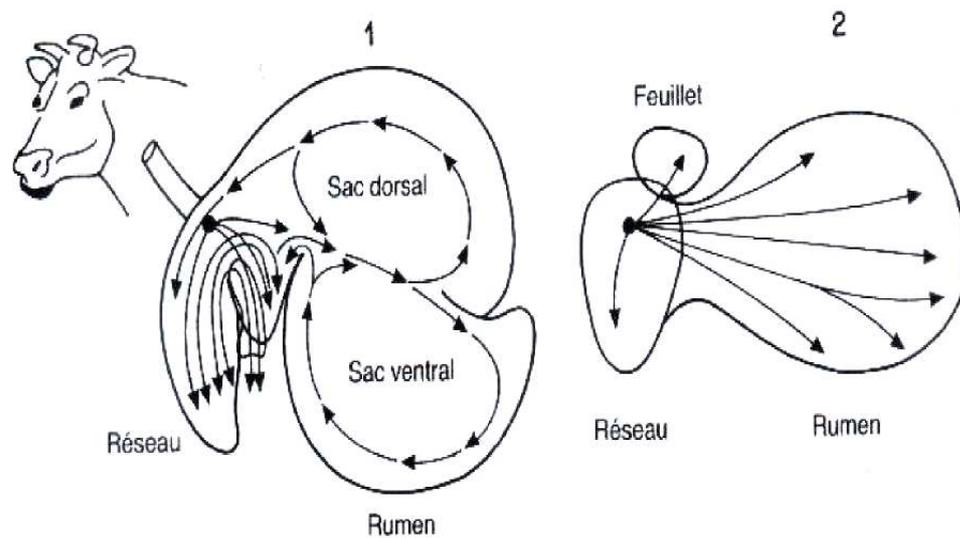
- les tanins ont la capacité d'inhiber les enzymes extracellulaires secrétées par les bactéries ou les privent des substrats. Ainsi, l'activité de l'endoglucanase de *Fibrobacter succinogenes* est inhibée *in vitro* par les tanins condensés de *Lotus corniculatus* (Makkar, 2003),

- ils peuvent se lier aux minéraux et perturber ainsi l'absorption des ces oligoéléments indispensables à la croissance des bactéries. En se combinant aux ions calcium entrant dans la structure du glycocalyx et du peptidoglycane, les tanins affectent ainsi la perméabilité de la paroi bactérienne et bloquent les sites de fixation des bactéries cellulolytiques (Guimares-Beelen *et al.*, 2006),
- et ils agissent sur la membrane cellulaire des bactéries ; leur effet antimicrobien peut être dû à leur liaison aux protéines des pores de la paroi cellulaire, altérant de ce fait les mécanismes de transport des molécules. Ils peuvent également pénétrer (tanins à faible PM) à travers les pores de la paroi cellulaire externe et désactiver les perméases du périplasma impliquées dans le transport des acides aminés et des glucides (Leinmuller *et al.*, 1991).

## **1.6. Digestion des fourrages chez les ruminants**

Les ruminants sont capables d'utiliser de l'azote non protéique pour synthétiser des protéines de haute qualité et peuvent dégrader la paroi cellulaire des plantes et, par conséquent, ils occupent une place très importante dans le monde parmi les animaux domestiques élevés à des fins de production (viandes, lait).

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. Le ruminant doit cette spécificité à quelques particularités digestives et à un tube digestif qui n'est pourtant pas fondamentalement différent de celui des monogastriques (Barone, 1984). Anatomiquement l'originalité réside dans la présence en amont du tube digestif, d'un estomac volumineux et compartimenté (fig. 5). Les deux premiers réservoirs, le rumen et le réticulum, constituent un vaste réservoir pouvant être comparé à un fermenteur fonctionnant en continu et dans lequel se déroule une véritable digestion biologique des aliments. L'abomasum est le 4ème 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) (MARDEN, 2007).



**Figure 5.** Représentation schématique du rumen et du réseau dans un plan vertical (1) et un plan horizontal (2). Les flèches indiquent les mouvements du contenu (Fonty *et al.*, 1995).

### 1.7. Flore et faune du rumen

La fonction digestive des ruminants est caractérisée par l'existence d'une micropopulation, résidant dans les préestomacs, notamment dans le rumen. Cette micropopulation se caractérise par son extrême diversité : on y retrouve ainsi un important nombre de protozoaires, de champignons et de bactéries, cette dernière population constituant la flore du rumen.

Il existe une relation de dépendance très forte entre la micropopulation du rumen et l'animal hôte (Gouet *et al.*, 1986). La flore microbienne autorisant la digestion de la cellulose, et l'apport de protéines d'origine microbienne qui est bénéfique pour le ruminant. Néanmoins, cette symbiose est un équilibre fragile, qui peut, si l'écosystème ruminal est perturbé, se déplacer vers la production de substances toxiques (Guillaume, 2007).

L'action des microorganismes revêt une importance toute particulière puisqu'ils sont les premiers à dégrader les aliments dans le rumen précédant ainsi l'action des enzymes digestives de l'hôte. Le microbiote ruminal dégrade 60 à 90 % des aliments digestibles et assure notamment la transformation des polysaccharides pariétaux des végétaux en composés assimilables par l'animal (Vincent *et al.*, 2006).

### 1.7.1. Eubactéries

La flore ruminale se caractérise par son extrême diversité, le nombre d'espèces bactériennes colonisant le rumen étant important, et présentant des activités enzymatiques variées. Les bactéries seules représentent environ 50% de la biomasse microbienne. Elle est composée essentiellement de bactéries anaérobies strictes non sporulées. Le rumen d'un adulte contient environ  $10^{12}$  cellules bactériennes /ml.

La colonisation du tractus digestif des ruminants par les bactéries est rapide. Dès le premier jour, les premières bactéries s'installent : *Escherichia coli* et des *Streptocoques*, alors que les bactéries cellulolytiques apparaissent au 4<sup>ème</sup> jour chez 75% des jeunes des ruminants (Fonty et al., 1988).

Les espèces sont généralement classées selon les substrats qu'elles fermentent ou dégradent, et leurs fonctions peuvent être limitées ou au contraire larges, se superposer à d'autres de sorte que la régression d'une espèce ne déprimera pas l'ensemble des fermentations et l'efficacité du rumen sera maintenue.

Les espèces de bactéries les plus importantes appartiennent au groupe des cellulolytiques (ou encore fibrolytiques) qui comprennent principalement *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvens*. Leur présence et leur activité dépendent d'un ensemble très vaste d'autres microorganismes indispensables. La plupart des cellulolytiques sont capables aussi de dégrader les hémicelluloses en compagnie de souches plus spécifiquement adaptées. Ce microbiote occupe différentes niches écologiques au niveau du rumen. Ainsi, 75 % des bactéries sont associées à des particules alimentaires ; Ce sont elles qui, en grande partie, sont responsables de la dégradation ruminale des aliments (Ørskov, 1992). Un second groupe moins spécifique est associé à la phase liquide (bactéries dissociées, population à haut rythme de division). Enfin le troisième groupe est constitué de bactéries anaérobies facultatives adhérentes à l'épithélium du rumen qui consomment rapidement l'oxygène qui entre avec les aliments et l'eau. Enfin, selon la nature des nutriments fermentescibles disponibles et des caractéristiques physico-chimiques du milieu, la nature et le rapport entre les différentes populations du rumen peuvent changer radicalement, ce qui influence la qualité et la quantité des produits terminaux de fermentation. A titre d'exemple, une ration riche en fourrages favorise le développement de la flore cellulolytique alors qu'une autre riche en concentrés avantage la flore amylolytique, tandis que la chute de pH (pH= 5,8) entraîne une baisse de l'adhésion bactérienne et une inhibition de la flore fibrolytique.

## 1.7.2. Archaeobactéries

1.7.3. *Les Archaea* : sont des microorganismes unicellulaires procaryote dotés de parois cellulaires atypiques. La taille et la structure de leurs génomes ainsi que le dense arrangement de leurs gènes en opérons sont similaires aux génomes de bactérie. De plus, le matériel génétique est composé d'un chromosome circulaire unique.

Les méthanogènes : tirent leur énergie de la réduction du CO<sub>2</sub> par l'hydrogène pour donner du méthane. Ils peuplent des environnements anaérobies riches en matériaux organiques en décomposition tels que les eaux stagnantes et les bassins d'eaux usées. On les trouve aussi dans le tractus intestinal de nombreux animaux, dans les sources chaudes au fond des océans,

## 1.7.4. Protozoaires

Les protozoaires sont des organismes eucaryotes cellulaires. Deux types de protozoaires peuplent le rumen : les flagellés et les ciliés. Les ciliés représentent près de la moitié de la biomasse microbienne et leur concentration varie de 10<sup>4</sup> à 10<sup>6</sup> cellules /ml, elle est distribuée entre les particules solides et la phase liquide (Jouany et al., 1994b).

Le type de la ration alimentaire conditionne fortement les populations des protozoaires et ils sont très sensibles à la non nutrition et peuvent disparaître en 2 à 3 jours de diète (Jouany et Ushida, 1998).

Selon Fonty et al. (1988) *Epidinium*, *Entodinium*, *Diplodinium*, *Isotricha*, *Ophryoscolex* et *Polyplastron* sont généralement présents simultanément, mais la totalité d'entre eux disparaît temporairement au cours du troisième mois et chez 60% d'entre eux pendant 1 à 4 semaines. Cette défaunation spontanée affecte particulièrement le genre *Polyplastron* qui peut disparaître 90% des animaux. Une période de défaunation naturelle entre 2 et 4 mois après la naissance a été observée chez les agneau recevant une alimentation mixte ( Petkov et Enev, 1970).

Les associations rencontrées sont très variées. Les interactions avec d'autres microorganismes sont nombreuses, les protozoaires ingèrent les bactéries endogènes et exogènes comme source de protéines pour leur synthèse cellulaire.

Les protozoaires ne sont pas indispensables à la digestion mais leur présence améliorent la digestibilité, uniformisent la fermentation entre les repas.

## 1.7.5. Champignons

Les champignons du rumen n'ont été découverts que tardivement

(Orskov et Ryle, 1990). La population fongique est estimée entre  $10^3$  et  $10^5$  cellules /ml soit environ 10% de la biomasse microbienne (Fonty et Joblin, 1991). Trois espèces ont été essentiellement : *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* et *Sphaeromonas communis* (tab. 3).

Les zoospores s'attachent sur les particules des plantes déjà abimées. Le rhizoïde pénétrant dans les tissus par protéolyse. L'activité protéolytique est assurée par des métallospores, ils hydrolysent l'extensine des parois. Ils contiennent beaucoup d'acides aminés, dont le contenu en adénine et en thymine (ce sont des bases azotées) est important, et à ce titre, les protéines des champignons sont très digestibles.

Les champignons produisent une importante quantité d' $H_2$  et sont donc associés, dans les réactions métaboliques, aux bactéries méthanogènes, bactéries consommatrices de dihydrogènes (Stewart et Bryant, 1988). En outre, l'élimination des champignons diminue la digestibilité et augmente la proportion de propionate (Tiret, 2001).

## 1.7.6. Interactions entre les espèces microbiennes dans le rumen

Le rumen est le siège de nombreuses interactions entre les microorganismes qui doivent subsister dans cet environnement complexe (Fonty et *al.*, 1995). La croissance relative des populations du rumen dépend de ces interactions qui sont elles mêmes contrôlées par les facteurs du milieu et les caractéristiques physiologiques des microorganismes. Ainsi, le développement des microorganismes du rumen est directement dépendant des conditions physicochimiques du milieu. Ainsi, si la température, l'humidité, la pression osmotique et l'anaérobiose sont des conditions relativement fixes, le pH et la nature du substrat alimentaire varient et constituent donc des facteurs de sélection des populations microbiennes (Brugere, 1983).

**Tableau 3. Principales espèces de champignons anaérobies isolés du tube digestif des herbivores (d'après Fonty et al., 1995).**

Type de thalle	Nombre de flagelles sur la zoospore	Genre	Espèce	Origine	Référence
Monocentrique avec rhizoïdes filamenteux	>4	<i>Neocallimastix</i>	<i>N. frontalis</i> <i>N. patriciarum</i> <i>N. hurleyensis</i>	Rumen Rumen Rumen	Orpin (1975) Orpin et Munn (1986) Webb et Theodorou (1991)
	>4	<i>Piromyces</i>	<i>P. communis</i> <i>P. mae</i> <i>P. dumbonica</i> <i>P. rhizinflata</i>	Rumen Cæcum de cheval Cæcum d'éléphant Fèces d'âne	Orpin (1977a) Li et al (1990) Li et al (1990) Breton et al (1991)
Monocentrique avec rhizoïdes bulbeux		<i>Caecomyces</i>	<i>C. communis</i> <i>C. equi</i>	Rumen Cæcum de cheval	Orpin (1976) Gold et al (1988)
Polycentrique	>4	<i>Orpinomyces</i>	<i>O. joyonii</i> <i>O. bovis</i>	Rumen Rumen	Breton et al (1989) Barr et al (1989)
	<4	<i>Anaeromyces</i> <i>Ruminomyces</i>	<i>A. mucronatus</i> <i>R. elegans</i>	Rumen Rumen	Breton et al (1990) Ho et al (1990)

## 1.8. Processus fermentaires du rumen

### 1.8.1. Fermentation ruminale des protéides

Les protéines subissent de profonds remaniements dans le rumen dont l'intensité dépend de leurs propriétés physicochimiques et, en premier lieu, de leur solubilité. De ce fait, les protéines solubles sont entièrement remaniées alors que les protéines insolubles ne le sont que partiellement (Brugere, 1983).

L'hydrolyse des protéines est rapide et aboutit à la libération de petits peptides et d'acides aminés dans le rumen (fig. 6). La désamination des acides aminés est pratiquement synchrone de l'hydrolyse protéique et entraîne la formation rapide d'ammoniac et de chaînes hydrocarbonées. Ces différents éléments (acides aminés, NH<sub>3</sub> et chaînes hydrocarbonées) sont utilisés par les microorganismes pour leurs propres synthèses protéiques.

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 (Mackie et White, 1990). Les acides aminés produits sont en faible concentration dans le rumen. Ils sont désaminés pour produire de l'ammoniaque et des acides gras volatils (AGV)

(Mackie et White, 1990). Le recyclage de l'ammoniaque via l'urée dans le rumen est très important.

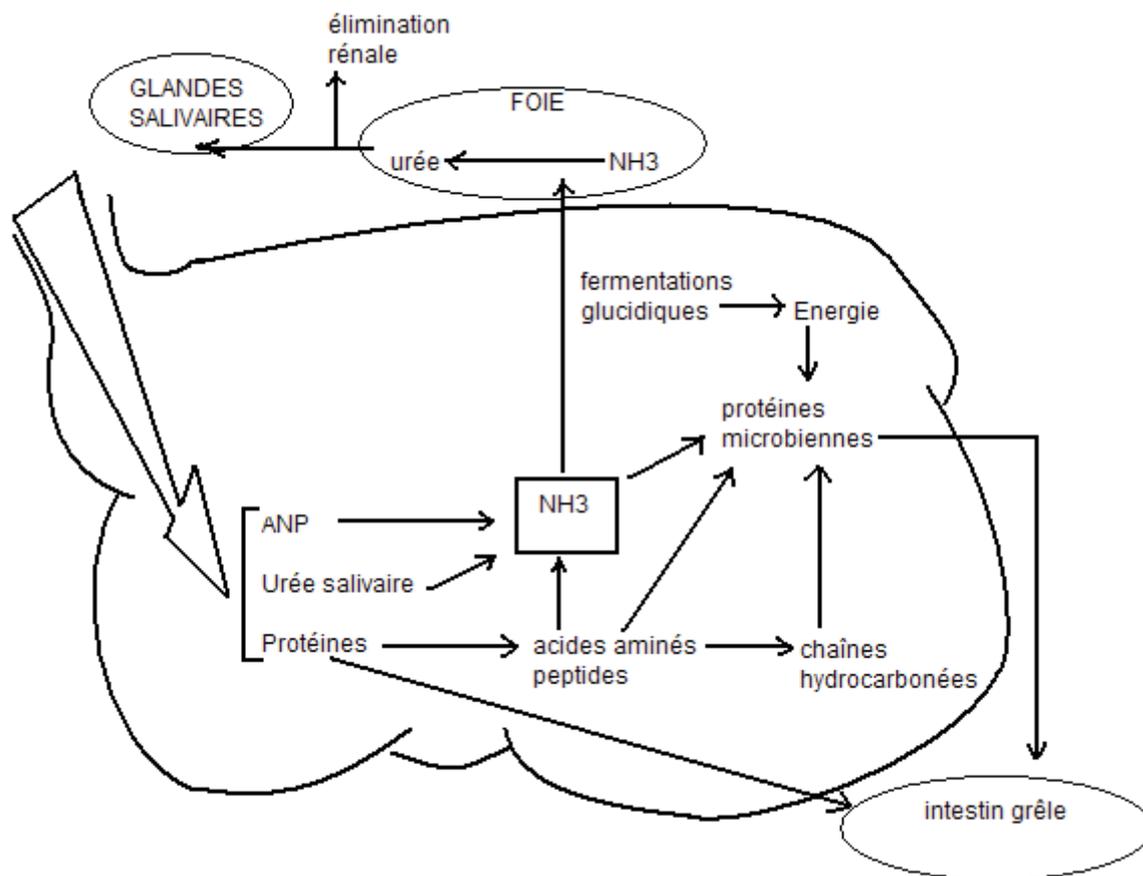


Figure 6. Métabolisme des protéines dans le rumen (Gaste, 1988)

### 1.8.2. Fermentation ruminale des glucides

Les glucides représentent en moyenne 75% de la matière sèche ingérée, ils peuvent être classés en deux catégories : les glucides pariétaux (cellulose, hémicelluloses et lignine) et les glucides cytoplasmiques (amidon et autres sucres solubles).

La dégradation des glucides commence par leur hydrolyse externe par des enzymes microbiennes extracellulaires. La deuxième phase est un processus fermentaire qui a lieu dans les cellules microbiennes, elle aboutit à la formation des acides gras volatils (AGV) et des autres acides organiques. L'énergie ainsi dégagée pourra être utilisée pour les synthèses bactériennes.

Les sucres solubles (oses en C5 et C6 et les diholosides) sont dégradés rapidement en  $CO_2$  et AGV avec libération d'énergie. Après l'ingestion, leur dégradation est très rapide et approche les 100%. Les AGV sont alors produits dans la proportion d'environ : 30% d'acétate (C2), 40% de propionate (C3), 20% de butyrate (C4) et 10% de valérate (C5).

L'amidon est lui aussi facilement hydrolysé. Il donne des dextrines et du maltose, pour aboutir à un mélange d'AGV où le propionate est prépondérant. L'hydrolyse de la cellulose se fait par l'action de cellulases (les endoglucanases, les exoglucanases et les  $\beta$ -glucosidases) et conduit surtout à un dimère (le cellobiose) qui sera ensuite fermenté pour donner des AGV dont l'acétate est le plus prépondérant (60 % des AGV totaux). Les hémicelluloses sont aussi activement dégradées par les entodiniomorphes, tandis que les holotriches auraient un rôle mineur dans la cellulolyse (Fonty et *al.*, 1995) ( fig. 7).

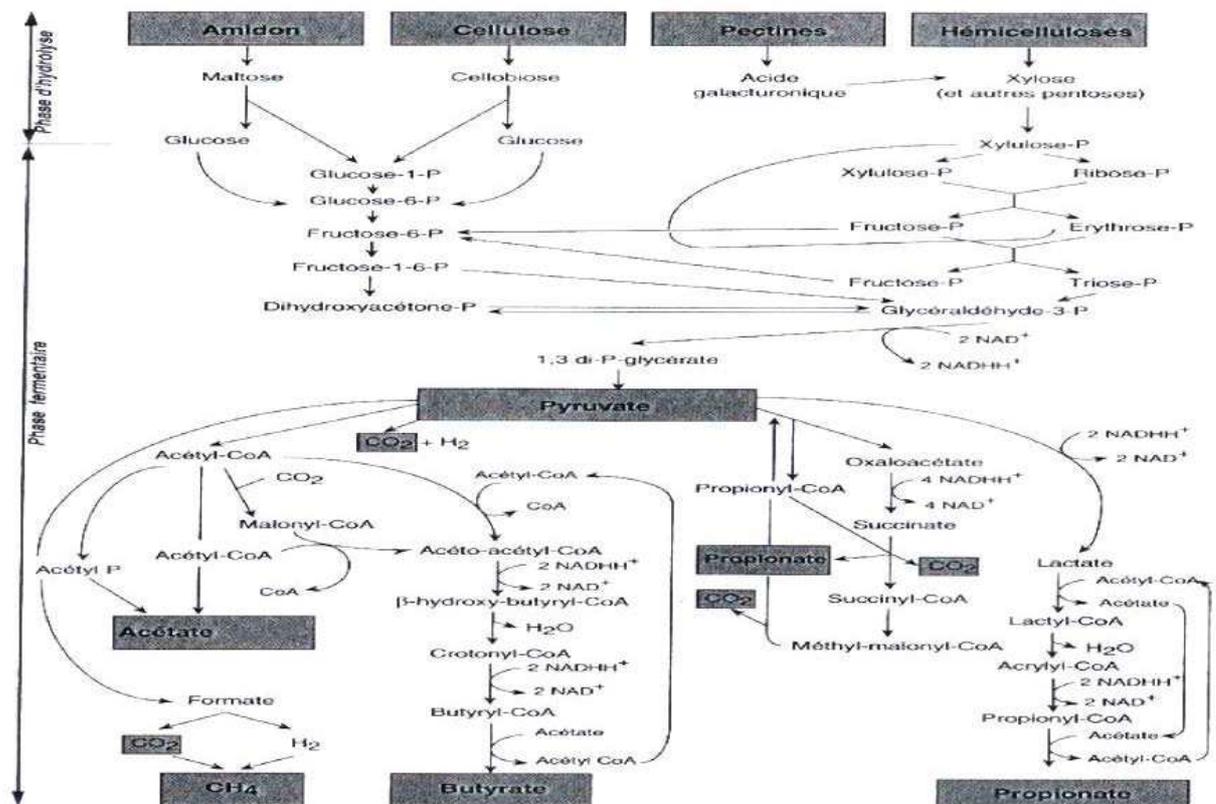


Figure 7 Voies du métabolisme des glucides dans le rumen (Jouany, 1994)

### 1.8.3. Fermentation ruminale des lipides

Les lipides constituent 2 à 5% de la matière sèche. Ils sont essentiellement composés de glycolipides à longue chaîne (C18-C20). Leur hydrolyse libère les acides gras et le glycérol. Les acides gras, doués d'un fort pouvoir réducteur du milieu ruminal, subissent une hydrogénation presque complète. Le glycérol est converti principalement en pyruvate qui est ensuite fermenté pour produire des AGV.

## 1.9. Méthodologie d'évaluation de la Valeur nutritive des fourrages

Différentes méthodes sont décrites dans la littérature pour estimer la valeur nutritive des fourrages et elles sont subdivisées en trois grandes catégories : les méthodes chimiques, physiques et biologiques.

### 1.9.1. Méthodes chimiques

**L'analyse chimique** : est la méthode la plus simple pour évaluer les fourrages. Beaucoup de données sur la composition des aliments sont basées sur les analyses approximatives, développées à travers le siècle dernier (McDonald et *al.*, 1995). Ce procédé est presque totalement abandonné et remplacé par d'autres méthodes analytiques plus fiables.

Une des méthodes chimiques fractionne le substrat en six fractions : la matière sèche (MS), les matières minérales (MM), les protéines brutes ou matières azotées totales (MAT), l'extrait éthéré ou matières grasses (EE), les fibres brutes et l'azote libre.

Il existe un autre procédé alternatif pour l'estimation des fibres (Van Soest et Wine, 1967). Ce dernier est maintenant le plus utilisé et le plus fiable. Ce procédé offre l'avantage de prédire l'ingestion et la valeur nutritive car il sépare les composants fibreux suivant leur dégradabilité, plutôt qu'en entités chimiques définies. Il a été développé pour quantifier à la fois les composants cellulaires et les composants pariétaux, principalement présents dans le matériel végétal (Mould, 2003).

### 1.9.2. Méthodes physiques

La spectrophotométrie à réflectance dans l'infrarouge (NIRS) est une méthode analytique et physique. Elle repose sur l'étude des spectres de réflectance, c'est-à-dire l'émission de radiations par la substance étudiée, lorsqu'elle est soumise aux rayons infrarouges sous différentes longueurs d'ondes, étalées de 730 à 2500 nm (Givens et Deaville, 1999; Mould, 2003). Les spectres d'absorption obtenus dépendent des liaisons chimiques établies entre les différents constituants de l'aliment. Il est, de ce fait, possible d'identifier à l'aide de témoins dans un spectre, des régions spécifiques qui correspondent aux différents composants alimentaires.

Les spectres d'absorption sont principalement influencés par la composition chimique mais aussi par la taille des particules, la température et l'homogénéité de l'échantillon (Reeves III, 2000). Cette méthode, développée par Norris et *al.* (1976), a été largement utilisée dans la prédiction de la digestibilité *in vivo* de la matière organique (Barber et *al.*, 1990), de l'énergie métabolisable (Givens et *al.*, 1992) et de l'ingestion volontaire (Deaville et Flinn, 2000 ; Steen et *al.*, 1998).

Comparativement à d'autres méthodes d'analyses, la technique NIRS est unique car elle est non destructrice et ne nécessite pas de réactifs chimiques. Elle est par conséquent non polluante (Adesogan et *al.*, 1998; Deaville et Flinn, 2000).

### **1.9.3. Méthodes biologiques**

La valeur alimentaire d'un fourrage dépend de son taux d'ingestion (quantité ingérée) et de sa valeur énergétique dont le meilleur d'évaluation est le coefficient de digestibilité de la matière organique (Chenost, 1970).

De nombreux travaux ont été menés afin de prévoir la digestibilité ; ils se sont basés essentiellement sur des techniques chimiques et, depuis 25 ans, des techniques de digestion *in vitro* par le jus de rumen ont été développés (Pigden et Bell, 1955). Ainsi, la technique de fermentation *in vitro* mise au point par Tilley et Terry (1961) fut proposée. Elle permettait de suivre la cinétique de la digestion des plantes fourragères. Dans ce procédé, la digestibilité de la matière sèche obtenue après de courtes durées de fermentation (8 heures pour les fourrages verts, 24 heures pour les foin) était corrélée aux quantités ingérées. Elle consistait dans son protocole expérimental à incuber en premier lieu le substrat pendant 48 heures en présence de jus de rumen (fermentation anaérobie), suivie d'une dans un second temps d'une digestibilité enzymatique (pepsine) pendant 24 heures pour digérer le substrat non dégradé et les protéines microbiennes. Cette analyse permet de prédire la digestibilité *in vivo* à partir de la digestibilité *in vitro*. En revanche, son inconvénient est de ne pas différencier entre deux substrats avec des valeurs de dégradation similaires mais des profils cinétiques différents. D'autant plus que la contamination microbienne et les résidus insolubles après traitement à la pepsine peuvent sous estimer la dégradation. Afin de palier à ces insuffisances, la méthode de Goering et Van Soest (1970), similaire à la technique de Tilley and Terry (1963), a été conçue. Cette technique inclut une étape supplémentaire dans laquelle le résidu est lavé avec une solution détergente neutre pour éliminer justement les facteurs de contamination.

### **1.9.4. Méthode de dégradation *in situ***

La méthode de dégradation *in situ*, appelée également *in sacco* ou méthode des sachets nylon, a pour objectif d'évaluer la vitesse et l'ampleur de la dégradation des aliments dans le rumen en particulier de leurs fractions azotées. Elle dérive de la méthode des poches de soie utilisée par Quin et *al.* (1938). Elle a été particulièrement utilisée dès la fin des années 1970 pour mesurer la dégradabilité de la fraction azotée des aliments et a ainsi été à la base de nombreux

systèmes d'évaluation de la valeur azotée des aliments. Cette méthode permet également l'étude des cinétiques de dégradation des constituants pariétaux (Chapoutot, 1998) et de l'amidon (Nocek et Tamminga, 1991 ; Offner et *al.*, 2003) des aliments.

Cette méthode est basée sur le placement des échantillons dans des sachets spéciaux. Ils sont ensuite incubés directement dans le rumen d'animaux munis d'une canule ruminale. Ces sachets sont composés de tissus biodégradables en nylon, en polyester ou en dacron.

Mehrez et Orskov (1977) proposent l'utilisation de cette technique pour évaluer le taux de dégradation des protéines en incubant plusieurs sachets. Cependant, ces mêmes auteurs ont observé que l'animal hôte est la source majeure de variation des résultats. Pour cela, ils ont suggéré que l'échantillon soit incubé au moins deux fois chez trois animaux. Il n'y a pas de différence significative entre la dégradation des aliments incubés chez les ovins et les bovins (Orskov, 2000). Cependant, cette technique exige certains paramètres : pores des sachets, rapport taille échantillon/surface des sachets, nombre et espèces animales, ration de l'animal et préparation de l'échantillon.

Les avantages de cette technique résident dans sa facilité de mise en œuvre et dans l'intérêt de la connaissance des caractéristiques dynamiques des processus de dégradation qu'elle permet d'obtenir (Sauvant et *al.*, 1995b). Les mesures sont réalisées directement dans le rumen, c'est à-dire dans les conditions les plus proches des conditions naturelles de dégradation. Par ailleurs, cette méthode souffre d'une faible reproductibilité (Michalet-Doreau et Aufrère, 1990).

### 1.9.5.Méthode de la production de gaz *in vitro*

L'évaluation de la valeur nutritive des aliments est effectuée par l'association entre deux techniques la fermentation ruminale et la production de gaz considérées actuellement comme des techniques de routine après les travaux de Menke et *al.* (1979) dans lesquels une forte corrélation entre la production de gaz *in vitro* et la digestibilité apparente a été établie.

Les techniques de production de gaz peuvent être subdivisées en deux groupes : les méthodes basées sur le volume de gaz et les méthodes basées sur la pression de gaz

**a) Mesure du volume de gaz (système de Menke) :** Menke et ces collaborateurs ont développé en 1979 à l'université de Hohenheim un système de fermentation *in vitro* en système batch par l'utilisation de seringues en verre afin de mesurer le volume de gaz produit *in vitro*. Les fermentations ont eu lieu dans des seringues en verre (100 ml de capacité) contenant 200 mg

de substrat et le mélange de jus de rumen et de la salive artificielle. L'ensemble est incubé à 39°C dans une étuve avec agitation rotatoire (température régnant dans le rumen).

Dans ces systèmes, la production de gaz après 24 heures est corrélée à la digestibilité *in vivo* de la matière organique. De même, le volume de gaz enregistré après 24 heures d'incubation combiné avec la concentration des constituants chimiques permet de prédire l'énergie métabolisable (Menke et Steingass, 1988).

Cette méthode a subi des modifications par Blümmel et Orskov (1993) et Makkar et *al.*, (1995b). Les principaux changements consistent dans le remplacement du système d'incubation (incubateur) par l'incubation des seringues dans des bains maries, d'une part, et d'autre part, par l'augmentation de la quantité incubée de 200 mg à 500 mg et l'utilisation d'un double volume de solution tampon.

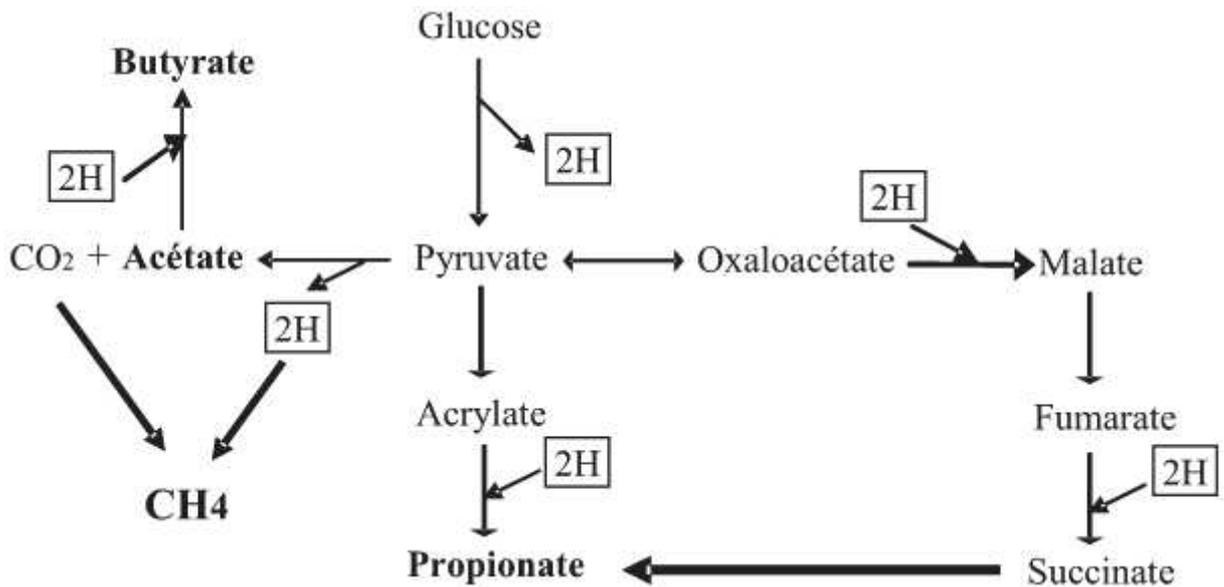
### **b) Mesure de la pression de gaz (système de Theodoreau)**

Ce procédé se base sur la mesure de la pression de gaz cumulé dans les systèmes batch (flacons en verre de 125 ml), contenant le substrat, la salive artificielle et le jus de rumen.

L'incubation est faite dans des étuves réglées à 39°C. L'enregistrement de la pression peut se faire manuellement selon la technique de Theodoreau et *al.* (1994), ou automatiquement selon la technique de Pell et Shofield (1993) et Cone et *al.* (1996).

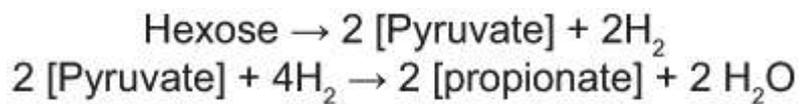
**c) Origine des gaz :** la production d'énergie au cours des processus fermentaires est le résultat de réactions d'oxydations qui, en milieu anaérobie (absence d'oxygène), se traduisent par la libération d'hydrogène métabolique (H) (fig. 8) que l'on retrouve dans la cellule sous différentes formes de cofacteurs réduits comme le NADH, NADPH, FADH. La forme oxydée de ces cofacteurs (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, FAD<sup>+</sup>) doit être ensuite régénérée pour que les fermentations puissent se poursuivre. Cette dernière étape conduit à la formation d'hydrogène libre (H<sub>2</sub>) dans le mélange gazeux du milieu fermentaire. Or, 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 méthanogènes pour réduire une partie du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) en méthane (CH<sub>4</sub>)

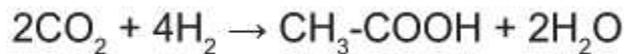


**Figure 8.** Métabolisme de l'hydrogène dans les différentes voies fermentaires du rumen

Ainsi, la synthèse de propionate mobilise 2H<sub>2</sub> par mole de propionate formée contre 4H<sub>2</sub> par mole de CH<sub>4</sub> synthétisée.



Comme la méthanogenèse, la production d'acétate par la voie de l'acétogenèse réductrice correspond à une réduction du CO<sub>2</sub> par H<sub>2</sub>, mais elle ne mobilise que 2H<sub>2</sub> par mole de CO<sub>2</sub>.



La voie de l'acétogenèse a été mise en évidence dans le gros intestin du ruminant mais n'intervient qu'à un niveau faible dans le rumen (Jouany et al., 1995). Ainsi, les gaz sont essentiellement produits suite à la fermentation des aliments en acétate et butyrate. Alors que la production de propionate est associée à une faible production de gaz générée principalement par le système tampon. La production molaire des acides gras volatils dépend de la nature des aliments (Blümmel et al., 1999). Par conséquent, le rapport acétate/butyrate est utilisé pour évaluer les différences observées entre les profils fermentaires des aliments.

## **1.10. Modélisation**

Les réponses nutritionnelles et zootechniques des ruminants aux variations de régime sont largement conditionnées par leurs effets au niveau du rumen.

Le développement des systèmes d'évaluation des aliments et des besoins des animaux a commencé dans la seconde partie du XIXe siècle dans un contexte de rationalisation de l'élevage (Wolff, 1874 et Fjord, 1889). L'objectif est d'adapter les régimes alimentaires aux besoins des animaux pour accompagner l'amélioration de productivité des exploitations. Des systèmes d'unités d'alimentation ont ainsi été définis pour préciser les apports et les besoins énergétiques et protéiques de l'animal (offner, 2003).

Les systèmes d'unités d'alimentation sont basés sur une approche de modélisation empirique et statique ; le développement des modèles mécanistes, à compartiments, semble être une alternative possible pour progresser et relever les défis actuels.

A partir des années 70, avec notamment les travaux de Baldwin et *al.* (1970), les phénomènes digestifs et métaboliques ont été abordés avec une approche de modélisation systémique.

Offner (2003) montre que les modèles du rumen développés jusqu'à présent n'ont pas donné de résultats probants, leur permettant de se substituer de manière efficiente aux approches empiriques. D'autres parts, la simulation de la formation des produits terminaux de fermentation n'est pas rigoureuse.

A l'avenir, les modèles mécanistes seront vraisemblablement plus largement reconnus et remplaceront progressivement les modèles factoriels empiriques, utilisés actuellement dans les systèmes d'alimentation (Baldwin, 2000).

### **1.10.1. Comparaison "qualitative" des représentations du rumen**

Les modèles du rumen ont évolué conjointement à l'accumulation de données expérimentales et au développement de l'informatique. Ces modèles ont pour principal objectif de prédire les variations des flux de nutriments au niveau du rumen. Les fractions de glucides et protéines d'origine alimentaire sont généralement définies de façon détaillée. Trois à cinq fractions sont considérées pour décrire les glucides. Le nombre des fractions protéiques, peu prises en compte au départ, tend à augmenter.

Les modèles mécanistes ne permettent pas à l'heure actuelle d'obtenir une meilleure précision que les modèles empiriques, alors que leur degré de complication augmente. Certaines limites sont apparues et ont pu être dépassées, notamment grâce aux études comparatives. Ainsi, la représentation des profils en acides gras volatils reste insuffisante, les interactions digestives sont

encore peu prises en compte. D'autre part, les simulations sont uniquement basées sur un mode d'alimentation en continu. Cependant et malgré ces aléas, les modèles mécanistes du rumen ont su évoluer avec les avancées de la recherche et la modélisation mécaniste a encore vraisemblablement de fortes potentialités d'évolution.

## **1.10.2. Modèles mathématiques**

### **1.10.2.1. Modèles d'Orskov (avec compartiment) et de France**

Deux modèles ont été retenus : le modèle d'Orskov et le modèle de France. La forme générale des deux fonctions étant exponentielle et sigmoïdale. L'allure des deux courbes admet une asymptote horizontale qui représente l'épuisement du substrat. Cependant, le fondement des deux modèles mathématiques est différent. Alors que le modèle de France possède deux paramètres A (production de gaz asymptotique) et c (vitesse de dégradation), celui d'Orskov comporte trois paramètres a (production de gaz à partir de la fraction dégradabile), b (production de gaz à partir de la fraction non dégradabile) et c (vitesse de dégradation).

Le modèle d'Orskov est bâti sur un processus fermentaire composé de compartiments . Il est à noter que tous les modèles mathématiques existants dans la littérature sont conçus sur cette base. Ils considèrent une quantité (en matière sèche) d'un substrat, tel un composant d'un fourrage, les feuilles d'une plante, la matière organique totale ou autres. Placée dans un flacon de culture au temps zéro, le substrat est alors incubé. Le milieu de culture comporte une fraction dégradabile S et une fraction non dégradabile  $\mu$  . La dégradation se produit à un taux  $\mu$  variable  $\mu(t)$  ( $h^{-1}$ ) et avec un temps de retard discret L (h). Ce temps de latence exprime les phénomènes se produisant en amont de la dégradation et concernant les gaz accumulés.

## PARTIE EXPERIMENTALE

## MATERIEL ET METHODE

### **2.1 Rappel des objectifs**

L'objectif de ce présent travail est de développer un modèle mathématique pour mimer et décrire les processus fermentaires ruminales de substrats autochtones, par comparaison aux modèles mathématiques conçus pour des substrats plus digestibles (tempérés et méditerranéennes). Dans cette présente étude, un travail préliminaire consistait à collecter les données expérimentales sur la fermentation ruminale *in vitro* de substrats singuliers ou en association. Il s'agit de plantes autochtones de zones arides (*Astragalus gombiformis* et *Stipagrostis pungens*), de plantes médicinales (*Juniperus phoenicea*, *Satureja calamintha*, *Mentha pulegium* et *Carduus pycnocephalus*) et de sous-produits agricoles (les palmes sèches, les grignons d'olives et les margines). Dans un second lieu, cette étude s'est intéressée à évaluer l'employabilité des modèles mathématiques pour la simulation des processus de fermentation et la détermination des paramètres cinétiques.

### **2.2. Matériel végétal et traitement**

Les deux plantes fourragères *Stipagrostis pungens* (Drinn, riche en fibres) et *Astragalus gombiformis* (Foulet el ibel, riche en protéines) ont été prélevées dans la wilaya d'El Oued, situé dans le Sud-est de l'Algérie qui se caractérise par un climat aride avec une moyenne de précipitations annuelles de 75 mm et une température moyenne comprise entre 1°C en hiver et 43°C en été. Ces plantes sont récoltées à maturité (tab. 4). Les parties aériennes (tiges, feuilles et fleurs) sont séchées à 60°C pendant 48 heures. Les échantillons sont ensuite broyés dans un broyeur de laboratoire à travers un tamis de 1mm.

Quatre plantes choisies en fonction de leurs caractéristiques thérapeutiques en médecine traditionnelle ont été également utilisées dans ce travail : *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, *Satureja calamintha* et *Carduus pycnocephalus*. L'identification botanique des espèces est faite suivant la classification proposée par Quezel et Santa (1963). Ces plantes de provenances variées sont collectées au mois de mai 2011 (tab.4). Elles sont séchées à l'air libre et à l'ombre puis broyées et tamisées à travers un tamis de 1 mm.

Deux sous produits de l'industrie oléicole sont retenus pour cette étude, il s'agit des grignons d'olives et des margines. Celles-ci sont obtenues à partir d'olives de couleur mi-noire. Ces olives sont pressées dans une huilerie automatique selon un processus d'extraction en continu (système à 3-phases). Cette huilerie est située dans la région de Sebt de la Wilaya de Guelma. L'échantillon est introduit dans des bidons en polypropylène et une fois au laboratoire, il est

stocké à l'obscurité dans un environnement non oxygéné à 4°C. Les grignons sont collectés également d'une huilerie à 3-phases située dans la Daïra de Sidi Maarouf, Wilaya de Jijel. Ils résultent de la trituration de différentes variétés d'olives.

Les palmes sèches (rachis plus épines) sont arrachées du palmier dattier et correspondent aux feuilles en stade de sénescence. Ces substrats sont également séchés à 60°C puis broyés en particules calibrées de 1-mm.

**Tableau 4.** Zones de collecte des échantillons (plantes et sous-produits agricoles) utilisées pour l'établissement de la base de données.

Substrats	Non scientifique	Zone de collecte		Partie collectée
		Wilaya	Région	
<i>Plantes désertiques</i>	<i>Astragalus gombiformis</i>	El Oued	Nekhla	Partie aérienne
	<i>Aristida pungens</i>	El Oued	Nekhla	Partie aérienne
<i>Plantes Médicinales</i>	<i>Mentha pulegium</i>	Constantine	Bkira	Partie aérienne
	<i>Carduus pycnocephalus</i>	Constantine	Campus universitaire	Partie aérienne
	<i>Juniperus phoenicea</i>	Batna	El hamla	Feuilles+baies
	<i>Satureja calamintha</i>	Jijel	Tahir	Feuilles
<i>Sous-produits agricoles</i>	<i>Palmes sèches</i>	El Oued	Nekhla	
	<i>Grignons d'olives</i>	Jijel	Sidi Maarouf	
	<i>Margines</i>	Guelma	Sebt	

Les mélanges effectués entre les substrats sont représentés dans le tableau 5

**Tableau 5** : Les différentes mixtures réalisées

<i>Mixture 1</i>	<i>Astragalus gombiformis</i>	<i>Feuilles des palmes sèches</i>
<i>Mixture 2</i>	<i>Aristida pungens</i>	<i>Feuilles des palmes sèches</i>
<i>Mixture 3</i>	<i>juniperus phoenicea</i>	<i>Foin de vesce- avoine</i>
<i>Mixture 4</i>	<i>Carduus pycnocephalus</i>	<i>Foin de vesce avoine</i>
<i>Mixture 5</i>	<i>Satureja calamintha</i>	<i>Foin de vesce avoine</i>
<i>Mixture 6</i>	<i>Mentha pulegium</i>	<i>Foin de vesce- avoine</i>
<i>Mixture 8</i>	<i>Margines</i>	<i>Foin de vesce_ avoine</i>
<i>Mixture 9</i>	<i>Margines</i>	<i>Grignons</i>

### **2.3 Caractérisation chimique des échantillons**

Les analyses chimiques des échantillons sont réalisés selon les normes décrites par l'AOAC ( method ID 942.05). Toutes les analyses sont effectuées en triple.

#### **2.3.1 Détermination de la matière sèche**

Elle est déterminée par dessiccation dans une étuve ventilée jusqu'à poids constant. 0,5 à 1g de l'échantillon sont introduits dans un cristalliseur préalablement taré. Ce dernier est placé dans une étuve à 80°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.

#### **2.3.2 Détermination de la matière minérale**

1g d'échantillon, préalablement séché, est placé dans un creuset en porcelaine taré, puis incinéré dans un four à moufle à 550°C pendant 6 heures. La perte de poids observée au cours de la calcination correspond à la matière organique et le résidu aux cendres de l'échantillon.

### **2.3.3 Détermination de la matière azotée totale**

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

L'azote organique de l'échantillon sec et broyé (prise d'essai 1g) est transformé en azote minéral (sulfate d'ammonium), en présence d'acide sulfurique concentré à chaud (20 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 420°C pendant 4 heures) et d'un catalyseur (sélénium). Après transformation du sulfate d'ammonium en ammoniac par une base forte (NaOH, 10N), l'ammoniac est entraîné par la vapeur d'eau et repris dans une solution d'acide borique contenant un indicateur coloré. Il est alors titré par une solution d'HCl (0,1N). Les étapes de distillation et de titration sont réalisées sur un autoanalyseur (KJELTEC 1030). La teneur en azote de la matière sèche est obtenue par l'équation suivante :

$$N = \frac{\text{vol}(HCl)(ml) * 14 * [HCl]}{\text{prised'essai} * MS(\%)}$$

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

### **2.3.4 Détermination des composés de la paroi végétale**

Le fractionnement des composés de la paroi végétale est réalisé selon le procédé décrit par Van Soest et *al.* (1991).

#### **A. Estimation de la fraction NDF (Neutral Detergent Fibre)**

La fraction NDF correspond à la teneur en parois totales des fourrages (cellulose, hémicelluloses et lignine) et des cendres. La méthode au détergent neutre repose sur la solubilisation à pH = 7 des protéines par le lauryl sulfate de sodium et des substances pectiques par l'EDTA.

L'échantillon est traité par 100 ml de détergent neutre (ND solution) et porté à ébullition pendant une heure. Ce qui permet de solubiliser les polymères de glucose non cellulosique. Le résidu NDF est récupéré par filtration sur un creuset en verre fritté de porosité No.2, préalablement taré. Il est ensuite rincé à l'eau chaude plusieurs fois, puis rincé une deuxième fois à l'acétone et mis à sécher à l'étuve durant une nuit à 103°C.

**B. Estimation de la fraction ADF (Acid Detergent Fibre)**

Une solution détergente à base de bromure de céthyléthylammonium (CTAB) et d'acide sulfurique (1N) permet d'hydrolyser à chaud les constituants cytoplasmiques, les hémicelluloses et les protéines. Le résidu est recueilli, comme précédemment décrit, dans un creuset puis rincé à l'eau chaude et à l'acétone. Ce résidu, une fois séché, contient essentiellement de la cellulose et de la lignine. Il peut comporter aussi des quantités variables d'hémicelluloses, de substances pectiques et de cendres.

**C. Estimation de la fraction lignine (Acid Detergent Lignin)**

Cette méthode comporte un traitement avec le détergent acide comme précédemment décrit. Le résidu est ensuite traité par l'acide sulfurique concentré (72%) pendant trois heures. La solution d'acide est renouvelée toutes les 30 minutes. Le résidu est ensuite rincé à l'eau chaude et séché à l'étuve pendant une nuit. Ce résidu correspond à la lignine brute (lignine plus cendres). Le contenu du creuset est alors incinéré (voir section 3.1.2). Le résidu finalement obtenu représente la lignine nette. Les teneurs en hémicelluloses et en cellulose sont calculées respectivement par les différences (NDF – ADF) et (ADF – ADL).

**a. Dosage des sucres totaux****i. Principe :**

Les sucres totaux sont dosés selon la méthode de Dubois. Les glucides en présence d'acide sulfurique sont déshydratés en dérivés du furfural qui se combinent facilement avec le phénol. Le complexe formé donne une couleur jaune-orangée dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des glucides.

**ii. Extraction**

20 mg de la poudre de chaque substrat sont additionnées de 97 ml l'eau distillée et 3 ml l'acide sulfurique (97%). Le mélange est agité 3 heures à 60°C en présence d'un barreau magnétique et de billes en verre.

**iii. Dosage**

1 ml de la solution obtenue est mélangé à 1 ml d'une solution de phénol (5%) et 5 ml d'acide sulfurique (97%), les tubes à essais sont agités vigoureusement au vortex puis conservés 10 minutes à température ambiante, ils sont alors incubés 30 minutes à 30°C dans un bain marie. L'absorbance est lue à 488 nm. Les concentrations en sucres sont déduites à partir d'une courbe d'étalonnage de D-glucose (fig.9). La teneur en sucres est exprimée en pourcentage par rapport à la matière sèche.

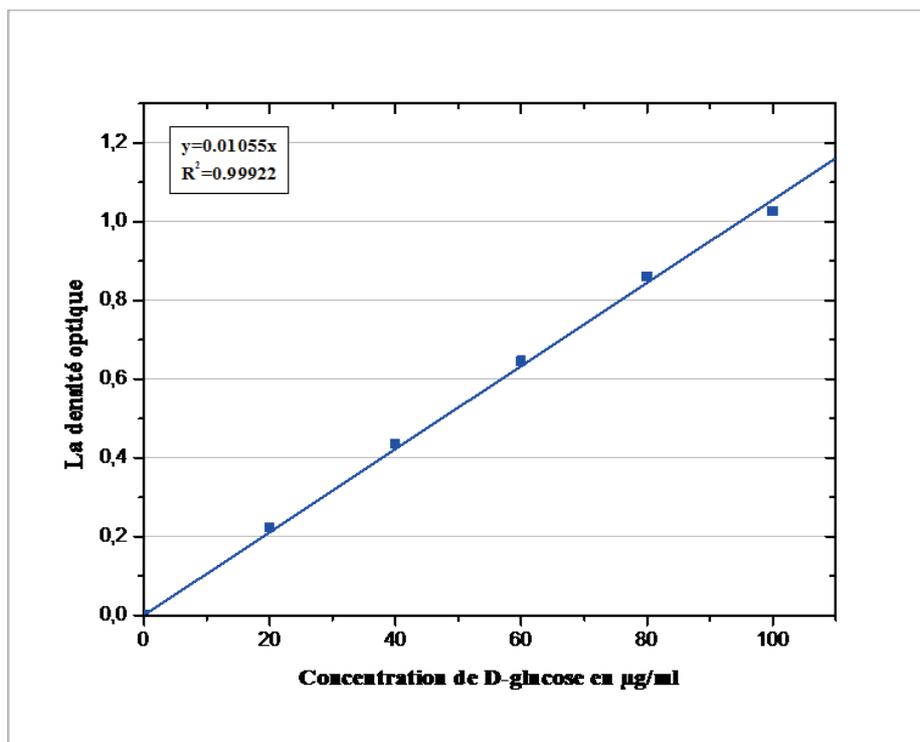


Figure 9. Courbe étalon pour la détermination de la concentration en sucres totaux des plantes médicinales et des sous-produits oléicoles.

#### 2.4. Caractérisation phytochimique des échantillons

La caractérisation phytochimique a concerné uniquement les plantes désertiques et les palmes sèches.

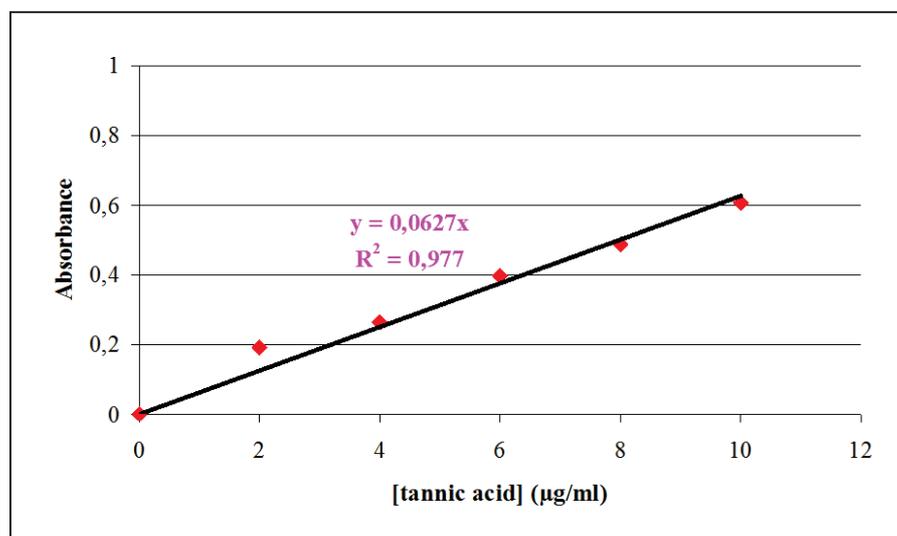
### 2.4.1. Procédé d'extraction

Le but est de quantifier les phénols totaux présents dans le fourrage qui diffusent dans la phase liquide. Pour le processus d'extraction, le solvant utilisé est une solution aqueuse d'acétone (70%).

L'extraction est réalisée selon le procédé décrit par Makkar (2005). Le matériel sec (200 mg) est traité par 10 ml d'une solution aqueuse d'acétone (70%). Le mélange est soumis à un traitement aux ultrasons pendant 20 min à température ambiante. Le contenu est ensuite transféré dans des tubes puis il est centrifugé durant 10 min à 3000 g et à 4°C. Le surnageant est collecté et maintenu dans de la glace. Tandis que le culot est remis en suspension dans 10 ml d'acétone (70%) et le même traitement est réalisé que précédemment (extraction aux ultrasons pendant 20 min et à température ambiante). Une centrifugation est ensuite effectuée (10 min, 3000 g, 4°C). Le surnageant est alors récupéré et traité comme précédemment décrit.

### 2.4.2. Détermination des phénols totaux

Elle est réalisée selon le procédé décrit par Makkar et *al.* (158). Les phénols totaux sont directement déterminés dans l'extrait. Ils sont estimés quantitativement par l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu (1N). Le milieu réactionnel est composé de 0,1 ml d'extrait, 0,5 ml d'eau distillée, 0,25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (1N) et 1,25 ml d'une solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 20%). Le mélange est agité en vortex et l'absorbance est mesurée à 750 nm après 40 min. La teneur en phénols totaux est exprimée en équivalent d'acide tannique/kg de MS (fig.10).



**Figure 10.** Courbe étalon pour la détermination des concentrations en phénols totaux et tanins totaux des échantillons désertiques.

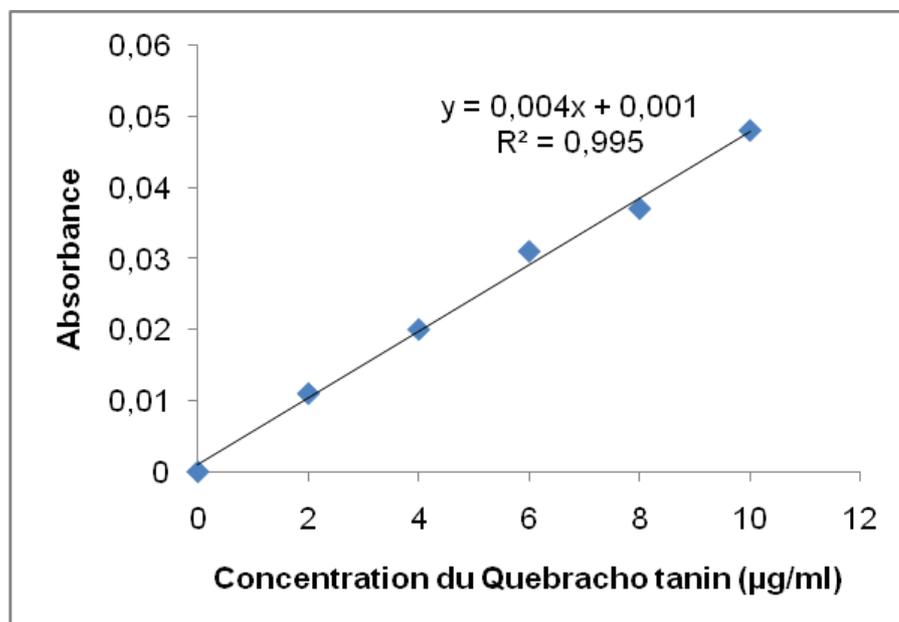
### 2.4.3. Détermination des tanins

#### a. Tanins totaux

Cette méthode se base pour la quantification des tanins totaux par leur précipitation, grâce à l'utilisation d'un chélateur chimique : le polyéthylène glycol (PEG, 6000 Da) (158). 100 mg de PEG 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 (voir section précédente). 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 (fig. 10).

#### b. Tanins condensés :

Les tanins condensés sont estimés par une réaction d'oxydation décrite par Porter et *al.* (1986). Elle consiste à mélanger 0,5 ml d'extrait, dilué avec de l'acétone (70% ) avec 3 ml d'une solution de n-butanol-HCl (95%) et 0,1 ml de sulfate d'ammonium ferreux (2%). Le mélange est ensuite scellé et porté à ébullition dans un bain marie bouillant réglé à 100°C pendant 60 min. Après refroidissement des tubes, la densité optique est lue à 550 nm. La teneur en tanins condensés, exprimée en équivalent de quebracho (fig. 11).



**Figure 11.** Courbe étalon ayant servie pour la détermination de la concentration en tanins condensés des échantillons désertiques.

### **2.5. Fermentation *in vitro* des mixtures par le microbiote ruminal**

Deux procédés de fermentation *in vitro* ont été utilisés au cours de ce travail. Il s'agit de la méthode de production de gaz *in vitro* décrite par Menke et *al.* (1979) et celle de Theodureau et *al.* (1994).

#### **2.5.1. Technique de production de gaz *in vitro***

##### **a. Principe**

La technique de production de gaz *in vitro* est une simulation de la dégradation des aliments par les microorganismes dans le rumen. Elle a été, à l'origine, développée par Menke et *al.* (1979) puis modifiée par Menke and Steingass (1988). C'est une technique rapide, simple et peu coûteuse, elle se base sur la mesure de la production de gaz (méthane et gaz carbonique) qui sont les produits fermentaires essentiels, résultant de la dégradation microbienne, en plus des gaz libérés à partir du système tampon, induit par la production des acides gras volatils (35, 176). Elle permet la prédiction des performances métaboliques du microbiote ruminal, donc de la dégradation des fourrages et elle est aussi adaptée au suivi de la cinétique de leur fermentation.

##### **b. Description des systèmes de fermentation utilisés**

- ***Système de Menke (seringue)*** : dans le procédé décrit par Menke et *al.* (1979), La fermentation est réalisée dans des seringues en polypropylène de 60 ml. Le bout de l'aiguille de la seringue est connecté à un tube en silicone de 4 à 5 cm de longueur, fermé par une pince de Mohr pour éviter la perte des gaz produits pendant la fermentation. Les pistons des seringues sont graissés avec de la vaseline ou de la graisse de silicone. Le niveau de la fermentation des substrats est suivi par l'enregistrement cinétique du volume de gaz produit, indiqué par le déplacement du piston.
- ***Système de Theodureau (batch en verre)*** : en principe, cette technique est similaire au procédé de production de gaz décrit par Menke et *al.* (1979). Elle en diffère, cependant, par le fait que les incubations ont lieu dans des flacons en verre (batch) de 120 ml de capacité (Theodureau et *al.* 1994). Ce système permet l'accumulation des gaz

fermentaires dans l'atmosphère intérieur du flacon dont la pression est mesurée à différents intervalles de temps par un baromètre, connecté à son tour à un voltmètre.

### c. Inoculum

Le jus de rumen est prélevé de trois moutons. Le contenu ruminal (phase liquide plus phase solide) est collecté manuellement à l'aide d'une louche et transféré dans des bouteilles Thermos préalablement chauffés à 39°C et saturés en CO<sub>2</sub>. Au laboratoire, le contenu ruminal est filtré à travers 04 couches de mousline (porosité de 500 µm) et barboté de CO<sub>2</sub>. Toute la manipulation est réalisée sous un flux constant de CO<sub>2</sub>.

### d. Eléments constitutifs du milieu de culture

Dans les deux procédés de fermentation, le milieu de culture est composé d'une solution tampon, d'une solution de macrominéraux, d'une solution d'oligo-éléments, d'un indicateur du potentiel d'oxydoréduction et d'une solution réductrice (tab. IV). 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 CO<sub>2</sub>, ce qui entraîne la réduction de la salive artificielle indiquée par le virage de la couleur du rose au blanc transparent. A cette étape, le jus de rumen filtré est ajouté dans les proportions 1/2 (v/v) selon le procédé de Menke *et al.* (1979) et 2/3 (v/v) selon la méthodologie proposée par Theodureau *et al.* (1994). Enfin, un barbotage en surface est maintenu pendant 10 min de manière à maintenir une atmosphère totalement anaérobie

**Tableau IV.** Composition de la salive artificielle utilisée dans les protocoles décrits par Menke et Theodureau.

Solutions	Système de Menke	Système de Theodureau
	Eléments	Eléments
Oligo-éléments	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 13,2g	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 13,2g
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O 10,0g	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O 10,0g
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 1,0g	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 1,0g
	FeCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 8,0g	FeCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 8,0g
	q.s.p. 100 ml	q.s.p. 100 ml

Tampon	NaHCO <sub>3</sub> 35,0g NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 4,0g q.s.p. 100 ml	NaHCO <sub>3</sub> 35,0g NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 4,0g q.s.p. 100 ml
Eléments minéraux	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5,7g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 6,2g MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,6g q.s.p. 100 ml	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5,7g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 6,2g MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,6g q.s.p. 100 ml
Indicateur d'oxydo-réduction	Résazurine 0,1g (C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>4</sub> ). q.s.p. 100 ml	Résazurine 0,1g C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>4</sub> ). q.s.p. 100 ml
Solution réductrice	NaOH (1N) 4 ml Na <sub>2</sub> S.9H <sub>2</sub> O 625 mg H <sub>2</sub> O 95 ml	NaOH (1N) 4 ml Na <sub>2</sub> S.9H <sub>2</sub> O 625 mg L-Cystéine 625 mg H <sub>2</sub> O 95 ml

### i. Inoculation

Dans la technique de Menke *et al.* (1979), 200 mg de mixtures sont introduites dans chaque seringue et mis à fermenter avec 30 ml de milieu de culture (10 ml de jus de rumen filtré plus 20 ml de salive artificielle). Alors que dans la technique de Theodureau *et al.* (1994), 400 mg de mixtures sont incubés avec 40 ml de milieu de culture (15 ml de jus de rumen plus 25 ml de salive artificielle) dans des batch préalablement saturés en azote. Pour chaque série d'incubation et pour chaque mixture, trois répétitions sont réalisées. Dans les mêmes conditions, trois fermenteurs sans substrat (blanc : jus de rumen plus salive artificielle) sont incubés.

## ii. Incubation

Les seringues inoculées sont incubées dans une étuve à agitation rotatoire (type GFL 3039) à 39°C et à 9 rpm. Cependant, les batch sont incubés dans des bains marie réglés à 39°C et agités d'une manière cyclique de 3 min (30 secondes agitation, et 2 minutes et 30 secondes arrêt). Le suivi de la cinétique de fermentation est réalisé par la mesure soit du volume, soit de la pression de gaz à différents intervalles de temps : 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 et 96 heures.

## 2.6. Mesure du pH et analyse des produits fermentaires

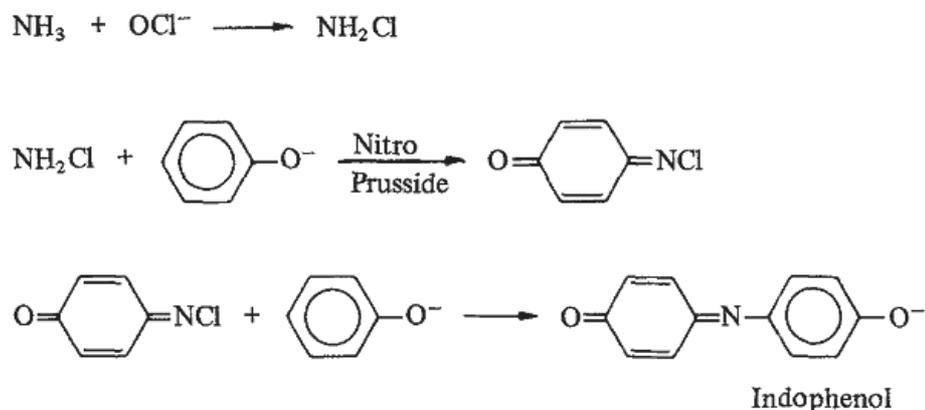
### 2.6.1. Mesure du pH

Après 24 heures de fermentation, le pH du contenu de chaque seringue est mesuré à l'aide d'un pH-mètre muni d'une électrode combinée.

### 2.6.2. Dosage de l'ammoniaque

#### a. Principe

L'ammoniaque est dosée par une technique colorimétrique selon la méthode de Chaney et Marbach (1962) qui est basée sur la réaction de Berthelot. Le complexe indophénol de couleur bleu est formé dans un milieu alcalin lors de la présence de l'ammoniaque, l'hypochlorite de sodium et le nitroprussite de sodium comme catalyseur :



**Figure 12.** Principe de dosage de l'azote ammoniacal (N-NH<sub>3</sub>).

**b. Echantillonnage**

Après 24 heures de fermentation, 2 ml d'une solution d'acide orthophosphorique à 50 g/L sont ajoutés à 10 ml du contenu de chaque seringue (Castillejos et al. 2008), les échantillons sont ensuite centrifugés à 11000 rpm pendant 20 minutes, le surnageant est récupéré dans des tubes à essais et conservé à -20°C jusqu'à l'analyse.

**c. Dosage**

5 ml de chaque solution de dosage (A et B) (tabV) sont additionnés à 20 µl de surnageant. Après agitation les tubes à essais sont incubés à 37°C pendant 20 minutes. Leur densité optique est lue à 625 nm. La concentration de l'ammoniaque est déduite à partir d'une courbe étalon (fig. 13).

**Tableau V.** Composition des solutions de dosage de l'ammoniaque (Chaney et Marbach, 1962)

Solutions	Eléments	Quantité
A	Phénol Nitroprussite de sodium	5 g 25 mg Qsp.500 ml
B	Hydroxyde de sodium Solution d'Hypochlorite de sodium (eau de javel à 35°)	2,5 g 5 ml Qsp.500 ml

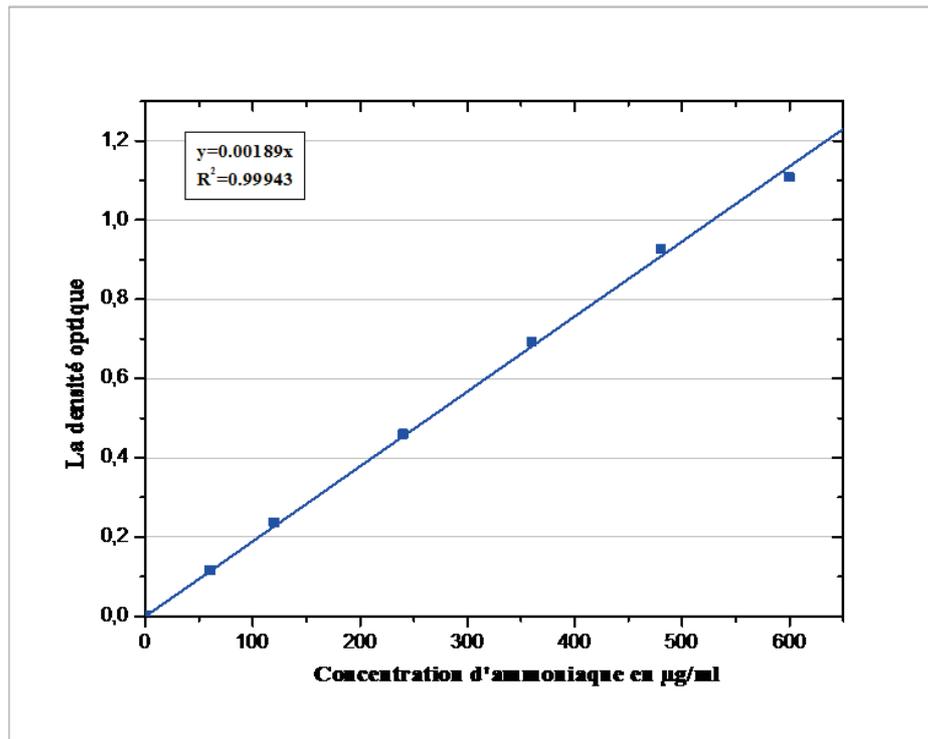


Figure 13. Courbe étalon correspondant au dosage de l'azote ammoniacal (N-NH<sub>3</sub>).

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

### a. Principe

La composition et la teneur des acides gras volatils, produits par fermentation, sont déterminées par chromatographie en phase gazeuse de type gaz-liquide (CHROPACK CP 9002) et en isotherme. Les AGV sont séparés selon leur coefficient de partage. 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

### b. Préparation des échantillons

Les échantillons sont mélangés à une solution de conservation composée d'acide crotonique (0,4g) et d'acide métaphosphorique (2g) dissous dans 100 ml d'HCl (0,5N), dans des proportions 8/5 (v/v). Les échantillons sont ensuite centrifugés à 16500 g pendant 10 min et à 4°C. Le surnageant est récupéré et conservé à -20°C jusqu'à l'analyse chromatographique.

### c. Dosage chromatographique

La colonne capillaire a une longueur de 25 m et un diamètre intérieur de 0,25 mm. Elle est remplie d'une phase stationnaire CP-WAX 58. Sa température maximale d'utilisation est de 270°C. 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.

1 ml d'échantillon, préalablement centrifugé, est additionné de 0,1 ml de la solution d'étalon interne (acide 4-méthyl valérique) et deux gouttes d'acide métaphosphorique (50%, p/v). Après homogénéisation, les flacons sont disposés sur le plateau du passeur et 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 colonne, les pics, détectés lors de l'étalonnage, permettent de connaître la surface des pics de l'étalon, de calculer la concentration molaire de chacun des composés de l'échantillon par rapport à celle de l'étalon interne selon la formule :

$$C_a = \frac{S_a}{S_e \times k_a}$$

Où : **C<sub>a</sub>** est la concentration du composé **a** dans l'échantillon, **S<sub>a</sub>** est la surface du pic correspondant au composé **a**, **S<sub>e</sub>** est la surface du pic correspondant à l'étalon interne, et **k<sub>a</sub>** le facteur de réponse du composé **a**.

### d. Calcul et expression des résultats

La production nette de gaz dans chaque seringue correspond à la production de gaz après temps d'incubation soustraite du volume de gaz enregistré à  $t_0$ , et du volume moyen de gaz produit par le tube témoin (blanc), par la relation suivante :

$$V = (V_t - V_0) - (BV_t - BV_0)$$

où : **V<sub>t</sub>** (ml) le volume de gaz enregistré au temps **t**, **V<sub>0</sub>** (ml) le volume de gaz enregistré au temps **t<sub>0</sub>**, **BV<sub>0</sub>** (ml) le volume moyen de gaz du blanc enregistré au temps **t<sub>0</sub>**, **BV<sub>T</sub>** (ml) le volume de gaz moyen du blanc enregistré au temps **t**.

Dans le système de fermentation de Theodureau et *al.* (1994), le nombre de moles de gaz est déduit de la relation universelle des gaz parfaits :

$$\Delta P \times V = nRT$$

avec :  $\Delta P$  correspond à la différence de pression enregistrée dans le batch et la pression atmosphérique,  $V$  : volume mort du batch (77,1 ml),  $R$  : la constante des gaz parfaits (0,082) et  $T$  : la température du batch (39 + 273°k).

Les paramètres cinétiques de la fermentation *in vitro* sont déduits du modèle monophasique exponentiel proposé par Orskov and Mc Donald (1979) et modélisé à la production de gaz par Blümmel and Orskov (1993). Ils sont calculés par le programme informatique Neway Exel proposé par Chen (50) :

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

où :  $y$  (ml ou mmole/g MS) est la production de gaz après chaque temps d'incubation,  $a$  (ml ou mmole/g MS) est la production de gaz à partir de la fraction soluble,  $b$  (ml ou mmole/g MS) est la production de gaz à partir de la fraction insoluble mais potentiellement fermentescible et  $c$  (%h<sup>-1</sup>) est la vitesse de production de gaz à partir de  $b$ .

Les données fermentaires sont traitées par le logiciel STATISTICA (version 6). Elles sont soumises à une analyse de la variance ANOVA à deux facteurs (mixture et dose). Les différences sont considérées significatives au seuil de 5%. Les moyennes sont classées selon la classification de Newmann-Keuls ( $\alpha = 5\%$ ).

Le choix de ce deux modèles est motivé par sa convergence. Ainsi, l'exécution du logiciel statistique SAS, par l'utilisation de programmes numériques et itératifs nous a permis l'obtention de résultats que pour ce modèle. En effet, la modélisation à partir d'une base de données est tributaire de l'exécution du programme numérique. La nature des données et la forme des fonctions mathématiques influencent particulièrement et significativement l'opération de modélisation.

L'évolution de la production de gaz est suivie selon deux paramètres : le temps d'incubation et le pourcentage de chaque substrat dans la mixture. Une analyse de variance factorielle consiste à étudier les effets du temps d'incubation, du pourcentage des plantes ajouté ainsi que de leur interaction mutuelle sur la production de gaz. Nous avons ensuite, par régression multiple, cherché l'équation donnant la meilleure estimation de la production de gaz en fonction des

variables indépendantes et de leur interaction. L'analyse statistique est établie par Statistica 10.0 de StatsoftInc, Tulsa, USA

### **3. Etude des effets associatifs de mélange de substrats fourragers**

#### **3.1. Composition chimiques des substrats singuliers et en mélange**

La composition chimique des fourrages singuliers étudiés et celle des mélanges est consignée dans **les tableaux 8, 9 et 10**. Il ressort une variation dans tous les éléments nutritifs des fourrages. Le taux de fibre le plus élevé est enregistré chez *Stipagrostis pungens* (50,94% de MS), suivi de *Astragalus gombiformis* (44,52% de MS) et les feuilles de palmes sèches (42,21% de MS). La teneur la plus élevée en protéines brutes est notée chez *Astragalus gombiformis* (12,5% de MS) suivi des feuilles du palmier (5,94% de MS). Concernant les composés phénoliques (phénols totaux, tannins totaux et les tanins condensés) sont respectivement 61,8 ; 49,1 et 36,2 g/kg de matière sèche pour les feuilles sèches de palmier suivi d'astragale puis *Stipagrostis pungens*.

La variation de la concentration des éléments minéraux et organiques dans les plantes étudiées est fortement liée avec le type de sol, le climat, le stade de la maturité et la saison de la récolte, les caractéristiques génotypiques, les facteurs influant sur les propriétés nutritionnelles des fourrages (Arhab, 2007 ; Bahman et al, 1997; Pascual et al., 2000 ; Genin et al., 2004 ; Ramirez et al., 2004 et Ammar et al., 2004b)

Selon le taux de protéines brutes, il est à remarquer qu'*Astragalus gombiformis* est parmi les fourrages de bonne valeur azotée ; en effet elle est plus riche que les fourrages vert tel que *Sétaria sphcelata* dont la teneur en matière azotée se trouve entre 47,4 et 69,2g/kg de MS (Rakotozandriny, 1993). Toutefois, *Astragalus gombiformis* est considéré comme la plante la plus digestible avec un contenu élevé en protéines brutes (125 g/kg de MS) ce qui montre que cette ressource fourragère possède un potentiel nutritif intéressant pour les ruminants (Boufennara, 2012). D'autre part, Pascual et al. (2000) et Genin et al. (2004) montrent que le taux élevé de protéines des *Astragalus gombiformis* indique son utilisation possible comme supplément de protéines pour les ruminants.

La teneur élevée de la paroi cellulaire pourrait être enregistrée en raison du climat de la zone aride. En général, des températures élevées et de faibles précipitations ont tendance à augmenter les polysaccharides de la paroi cellulaire et à diminuer les hydrates de carbone solubles (Pascual et al., 2000).

La concentration des composés phénoliques varie considérablement entre les espèces végétales, les plus hauts niveaux ont été observés dans les feuilles sèches du palmier dattier. Nos résultats pour les tanins corroborent avec ceux rapportés par Tisserand (1990). Cela pourrait être dû au fait que la méthode de diffusion radiale, basé sur la mesure de l'activité biologique potentielle

des tanins dans les aliments, dépendra de la force de liaison des tannins et de leur mode de liaison à la protéine (Frazier et *al.*, 2003), alors que les méthodes chimiques, basées sur les propriétés chimiques des tanins, n'indiquent que la nature chimique des tanins (Silanikove et *al.*, 1996).

Pour les mélanges, nous avons remarqué que l'addition des feuilles du palmier augmente le taux de matière sèche et surtout le taux des tanins (TT et TCT) des mélanges et diminue les taux des fibres et des matières azotées d'une façon proportionnelle aux pourcentages. Cela peut être expliqué par le fait que les tannins forment des complexes avec les protéines et par conséquent la chute du taux des protéines. Par ailleurs, on constate qu'au faible pourcentage des mélanges (10 et 20%) le taux des tanins condensés et totaux (7,22, 10,44 et 24,08 ; 26,86 g/kg de matière sèche respectivement) est faible tandis que le taux des matières azotées est plus élevé (118,5 et 111,9 g/kg de matière sèche) dans le mélange feuilles de palmier et *Astragalus gombiformis* comparé au ceux obtenus dans les feuilles du palmier seules.

Pour le mélange feuilles du palmier et *Stipagrostis pungens* on remarque qu'au même pourcentage d'incorporation le taux de la matière azotée est faible par rapport au mélange feuilles de palmier et *Astragalus gombiformis* (54 g/kg de matière sèche) alors que le taux des tanins est comparable pour les deux mélanges. Selon les travaux de Paterson et *al.* (1996), les fourrages dont les teneurs en MAT sont inférieures à 70 mg/g de MS exigent une supplémentation azotée pour améliorer leur ingestion par les ruminants.

**Tableau 8 :** composition chimique des substrats fourragers singuliers (en g/kg de matière sèche).

Substrats singuliers	MS	MAT	NDF	ADF	ADL	TP	TT	TCT	PPC
<i>Astragalus gombiformis</i>	551,7	125,0	614,9	445,2	78,1	34,0	21,3	4,0	ND
<i>Stipagrostis pungens</i>	797,3	53,6	794,7	509,4	84,4	2,40	1,60	3,0	ND
<i>Palmes sèches</i>	896,3	59,4	586,1	422,1	97,1	61,8	49,1	36,2	55,45

MS, matière sèche ; MAT, matières azotées totales ; NDF, neutral detergent fibre ; ADF, acid detergent fibre ; ADL, lignin determined by solubilisation of cellulose with sulphuric acid ; TP, phenols totaux ; TT, tannins totaux ; TCT, tannins condensés ; PPC, capacité de précipitation des protéines.

**Tableau 9 :** composition chimique calculée du mélange *Stipagrostis pungens* et les feuilles du palmier (exprimés en g/kg de MS)

	<i>S. pungens</i>	Feuilles	0% Palm	10%	20%	30%	40%	50%	100%
MS g/kg	797,3	896,3	797,3	807,2	817,1	827,0	836,9	846,8	896,3
MM g/kg	119,6	109,5	119,6	118,6	117,6	116,6	115,6	114,6	109,5
Azote	8,56	9,50	8,56	8,65	8,75	8,84	8,94	9,03	9,50
MAT (Nx6,25)	53,6	59,5	53,6	54,2	54,8	55,4	56,0	56,6	59,5
N-NDF	3,75	5,30	3,75	3,91	4,06	4,22	4,37	4,53	5,30
Azote libre	4,81	4,20	4,81	4,75	4,69	4,63	4,57	4,51	4,20
NDF	794,7	568,1	794,7	772,0	749,4	726,7	704,1	681,4	568,1
ADF	509,4	422,1	509,4	500,7	491,9	483,2	474,5	465,8	422,1
Hémicelluloses	285,3	164,9	285,3	273,3	261,2	249,2	237,1	225,1	164,9
ADL	84,4	97,1	84,4	85,7	86,9	88,2	89,5	90,8	97,1
Cellulose	425,0	324,0	425,0	414,9	404,8	394,7	384,6	374,5	324,0
	<i>S. pungens</i>	Feuilles	0% Palm	10%	20%	30%	40%	50%	100%
TP	2,40	61,80	2,40	8,34	14,28	20,22	26,16	32,1	61,80
TT	1,60	49,10	1,60	6,35	11,10	15,85	20,60	25,35	49,10
TCT	3,00	36,20	3,00	6,32	9,64	12,96	16,28	19,60	36,20
PPC	ND	55,45	ND	ND	ND	ND	ND	ND	55,45

**Tableau 10** : composition chimique calculée du mélange *Astragalus gombiformis* et les feuilles de palmes

	<i>A. gombiformis</i>	Feuilles	0% Palmes	10%	20%	30%	40%	50%	100%
MS g/kg	551,7	896,3	551,7	586,2	620,6	655,1	689,5	724,0	896,3
MM g/kg DM	231,7	109,5	231,7	219,5	207,3	195,0	182,8	170,6	109,5
Azote	20,00	9,50	20,00	18,95	17,90	16,85	15,80	14,75	9,50
MAT (Nx6,25)	125,0	59,5	125,0	118,5	111,9	105,4	98,8	92,3	59,5
N-NDF	6,40	5,30	6,40	6,29	6,18	6,07	5,96	5,85	5,30
Azote libre	13,60	4,20	13,60	12,66	11,72	10,78	9,84	8,90	4,20
NDF	614,9	568,1	614,9	610,2	605,5	600,9	596,2	591,5	568,1
ADF	445,20	422,1	445,2	442,9	440,6	438,3	436,0	433,7	422,1
Hémicelluloses	122,7	164,9	122,7	126,9	131,1	135,4	139,6	143,8	164,9
ADL	78,1	97,1	78,1	80,0	81,9	83,8	85,7	87,6	97,1
Cellulose	356,4	324,0	356,4	353,2	349,9	346,7	343,4	340,2	324,0
	<i>A. gombiformis</i>	Feuilles	0% Palmes	10%	20%	30%	40%	50%	100%
TP	34,00	61,80	34,00	36,78	39,56	42,34	45,12	47,9	61,80
TT	21,30	49,10	21,30	24,08	26,86	29,64	32,42	35,2	49,10
TCT	4,00	36,20	4,00	7,22	10,44	13,66	16,88	20,1	36,20
PPC	ND	55,45	ND	ND	ND	ND			55,45

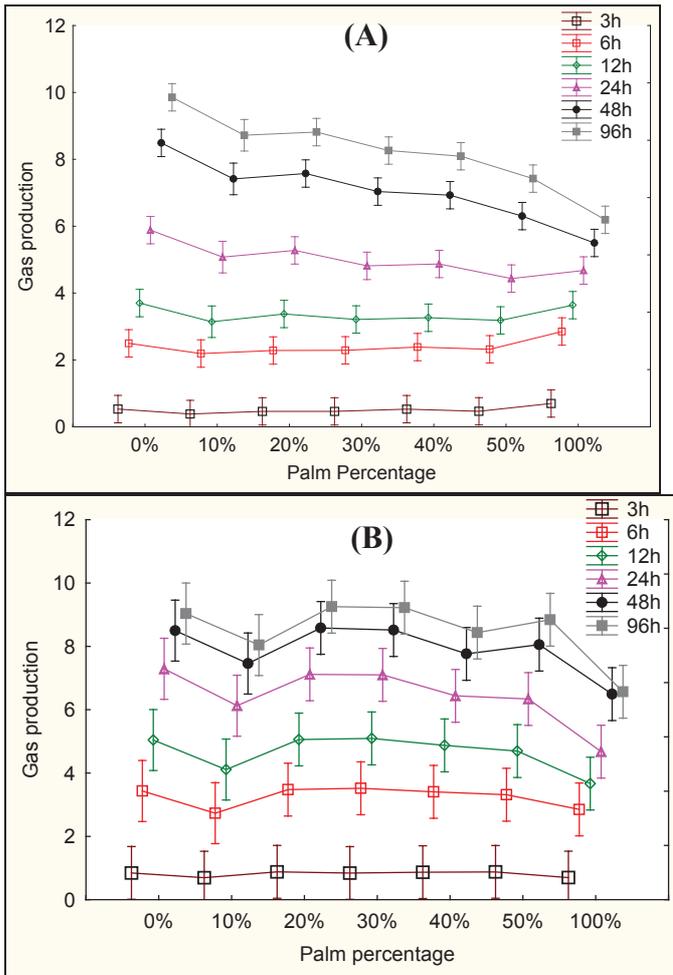
### 3.2. Fermentation in vitro des mélanges

Les figures 14 et 15 illustrent la production de gaz des mélanges des feuilles du palmier dattier, *Stipagrostis pungens* et *Astragalus gombiformis* ainsi que leurs interactions. Les résultats montrent que les feuilles de palmier inclus diminuent la production de gaz lorsqu'ils sont associées à *S. pungens* ( $P < 0,0001$ ), alors que cet effet n'était pas significatif avec *A. gombiformis* ( $P > 0,05$ ). Il ressort aussi que l'effet des mélanges des feuilles des palmiers dattier et drinn et des feuilles du palmier et *Astragalus gombiformis* ainsi que l'interaction temps\*pourcentage est très hautement significative ( $P < 0,001$ ). En effet, on constate une augmentation de la quantité de gaz produite en fonction du temps. Le volume cumulatif de gaz s'élève avec l'augmentation du temps d'incubation et le pourcentage des mélanges (Fig. 14, 15). Des différences significatives dans la production de gaz ont été mises en évidence entre les substrats pour tous les temps d'incubation. La production de gaz diminue en présence des palmes sèches, ceci pourrait être expliqué par le fait que ces dernières contiennent des substances (les tanins) qui affectent la voie hydrolytique (enzymes) du drinn (principalement les enzymes cellulosiques).

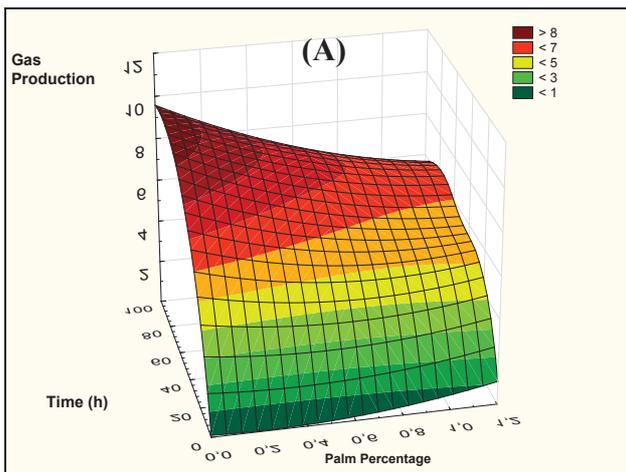
Les meilleures productions de gaz s'obtiennent à temps élevé mais pour des faibles pourcentages de palmes (10%, 20%). D'après Robinson (2009), la production de gaz est beaucoup plus prononcée au début des heures d'incubation avec des taux de mélanges de 15% à 25% ; cela prouve effectivement que l'incorporation des palmes sèches inhibe la dégradation du drinn par le microbiote ruminal. Cette situation peut être expliquée par la composition chimique des palmes sèches en tanins. En effet, cette richesse dont les effets sont bien établis sur l'activité fermentaire. Selon Sweeney et al. (2001), les tanins peuvent influencer directement le microbiote ruminal et l'activité enzymatique, en effet les tanins condensés exercent une action inhibitrice sur la croissance des microorganismes du rumen. En outre, Makkar et Becker (2009) suggèrent que les tanins totaux ont une influence sur la réduction de la production de méthane.

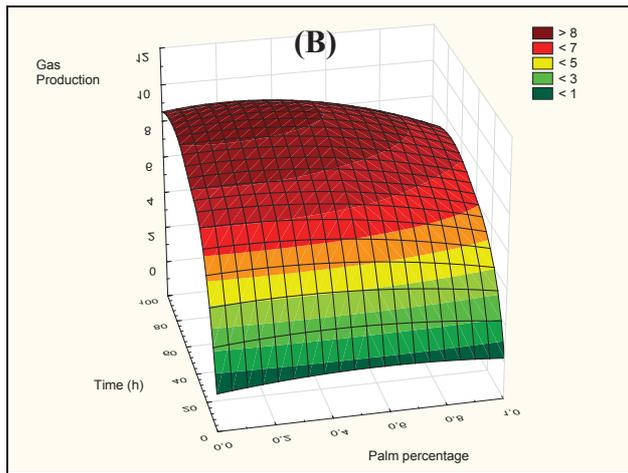
A la différence de l'association palmes–drinn, les palmes n'affectent pas la fermentation de foulet el ibel. Cela s'explique peut être par le fait que les palmes sèches riches en tanins n'affectent pas les enzymes protéolytiques ou que la composition chimique d'*Astragalus gombiformis* limite les effets des feuilles du palmier sur les paramètres fermentaires. En effet, *Astragalus gombiformis* est très riche en matière azotée et elle engendre la production en biomasse ; Liu et al. (2002) ont montré dans un système in vitro qu'une quantité d'azote est suffisante pour soutenir la croissance microbienne. De plus, il a été démontré que l'azote ne contribue que faiblement à la production de gaz. D'après Mc Sweeney (2008), la digestibilité de l'azote chez les ruminants montrent des réponses favorables lorsqu'il est fournit en supplément. Nos résultats corroborent ceux rapportés par Khazaal et al. (1993), Leon et al. (1993) et Aregheore et al. (2000). Ces auteurs rapportent que la contribution de la matière azotée totale (MAT) à la production de gaz et ne constitue pas un facteur d'influence significatif. Cette situation suggère une intensification et une stimulation de l'activité fermentaire du microbiote ruminal quand ce dernier se trouve en présence d'un aliment riche en azote et en énergie (Florence et al. (1999) ; Getachew et al. (2000) ; Tendonkeng (2004)).

Un effet positif sur la production associative de gaz a été signalé lorsque les feuilles des arbres fourragers ont été mélangés avec des régimes de concentré (Sandoval-Castro et al., 2002) et quand la paille a été mélangé avec des feuilles d'arbres (Liu et al., 2002).



**Figure 14** : production de gaz en fonction du pourcentage des feuilles du palmier dattier et *Stipagrostis pungens* (A) et *A. gombiformis* (B) à différentes périodes





**Figure 15 :** Interactions observées en fonction du pourcentage des feuilles du palmier dattier et *Stipagrostis pungens* (A) et *A. gombiformis* (B) à différentes périodes

### 3.3. Modélisation de la production de gaz

Le modèle de Sandoval (2000) a été utilisé pour la description du profil fermentaire de la production de gaz *in vitro*. De ce fait, nous avons essayé de simuler l'évolution de la production de gaz selon l'équation Production de gaz =  $a + b(1 - e^{-kt})$  en fonction des % de drinn et d'*Astragalus gombiformis*. La méthode d'estimation est celle de Levenberg-Marquardt dont les résultats se résument dans les tableaux suivant :

**Tableau 11 :** résultats de la méthode de Levenberg-Marquardt

Mélange (% Drinn)	a	b	R <sup>2</sup>	Mélange (% <i>A.gombiformis</i> )	a	b	R <sup>2</sup>
0	-3.765	8.551	0.961	0	-4.154	9.234	0.961
50	-2.896	7.958	0.937	50	-7.490	13.924	0.973
60	-3.702	9.162	0.945	60	-7.066	13.402	0.973
70	-3.276	8.764	0.936	70	-7.054	13.864	0.970
80	-3.512	9.351	0.936	80	-8.031	14.941	0.973
90	-2.432	7.935	0.905	90	-4.953	10.984	0.948
100	-4.499	10.932	0.945	100	-7.418	14.236	0.965

Nous avons noté des valeurs négatives de (a) (Orskov and Ryle, 1990). D'après plusieurs auteurs (Krishnamoorthy et al. (1991) ; Blümmel and Ørskov (1993) ; Beuvink and Kogut (1993); Schofield et al. (1994) ; Groot et al. (1996), une valeur négative de (a) est la conséquence de l'existence d'une phase de latence durant laquelle les microorganismes s'attachent et colonisent les particules alimentaires avant qu'aucune dégradation ne soit détectable. Cette situation pourrait également indiquer la difficulté du microbiote ruminal à dégrader ces deux substrats et la nécessité d'un temps d'adaptation pour qu'il entame cette dégradation. Malgré les valeurs de a négative et des R<sup>2</sup> élevées la convergence reste médiocre. En conséquence, Ce modèle mathématique ne s'applique pas aux substrats étudiés. Pour cela, nous avons proposé le modèle de la régression multiple relation de type  $Y = a + b(\text{temps}) + c(\text{Pourcent}) + d(\%*t)$  pour les deux mélanges ; les résultats obtenus sont comme suit :

**Production de gaz = 2,332 + 0,045(t) - 0,395(%Drinn) + 0,0453(%\*t)** pour le mélanges palm drinn

Alors que pour le mélange Palm : *Astragalus gombiformis*. L'équation s'écrit :

**Production de gaz = Y = 2,723 + 0,0548(t) + 0,518(%) + 0,0233(%)(t)**

Ainsi, on obtient une bonne régression linéaire avec le paramètre temps qui joue un effet très hautement significatif (P<0,001) pour les deux mélanges. L'interaction temps /pourcentage est très hautement significative pour le mélange Drinn/Palmes alors qu'elle n'est pas significative pour le mélange Palmes/*Astragalus gombiformis*.

### **3.4. Etude des effets associatifs de mélange de plantes médicinales**

#### **3.4.1. Composition chimiques des substrats singuliers et en mélange**

Les résultats de la composition chimique des plantes médicinales retenues dans cette étude sont rapportés dans le tableau 12. Il indique que les teneurs de la matière sèche oscillent entre 24,54% enregistré pour *Satureja calamintha* et 40,54 % pour *Juniperus phoenicea*. Ces teneurs sont significativement différentes (P < 1%). La variation de la teneur de la matière sèche de tous les substrats étudiés est dû probablement aux différents stades de développements lors de la récolte de ces plantes et au climat de la région d'origine, en effet *Juniperus phoenicea* est collectée au stade de maturation dont le climat de la région est continental et elle renferme la teneur la plus élevée en MS, alors que les autres plantes *Satureja calamintha*, *Mentha pulegium* et *Carduus pycnocephalus* sont collectées au début de la floraison dont le climat des régions d'origine est respectivement méditerranéen et semi continental.

Les résultats des teneurs de la matière organique observés varient de 87,55% pour *S. calamintha* à 94,86% pour *J. phoenicea* alors que les valeurs de la matière minérale varient entre 5,14% pour *J. phoenicea* et 12,45% pour *Satureja calamintha*. Ces teneurs sont significativement variables entre les substrats étudiés ( $P < 1\%$ ). Arhab (2007) montre que la variation des concentrations de la matière organique et celles de la matière minérale des plantes est fortement liées au climat, stade de la maturité le type de sol et la saison de la récolte.

La teneur des glucides obtenue varie d'une espèce à une autre avec un pourcentage le plus élevé enregistré chez *Juniperus phoenicea* de 36,86% suivi de *Satureja calamintha* avec un pourcentage de 25,58% puis *Mentha pulegium*, et *Carduus pycnocephalus* avec les pourcentages 23,78 % et 22,08 % respectivement. Wilmann et wright (1983) montrent que la variation de la teneur des sucres totaux dépend de stade de développement et les conditions culturales des plantes. D'autre part, Arhab (2007) montre que la variation du taux des sucres totaux dans les plantes dépend du climat, la saison et leur stade de développement. En outre, les températures élevées et les faibles précipitations tendent à augmenter la fraction pariétale et à diminuer le contenu soluble des végétaux (Jarrige, 1981 ; Arhab, 2007).

**Tableau 12.** Concentrations en éléments minéraux et sucres totaux (g/100 g MS) des plantes médicinales

Substrats	MS	MM	MO	ST
<i>S. calamintha</i>	26,30 <sup>c</sup> ± 1,23	12,45 <sup>a</sup> ± 0,12	87,55 <sup>d</sup> ± 0,12	25,58 <sup>b</sup> ± 0,43
<i>J. phoenicea</i>	40,54 <sup>a</sup> ± 0,54	5,14 <sup>d</sup> ± 0,22	94,86 <sup>a</sup> ± 0,22	36,90 <sup>a</sup> ± 1,69
<i>M. pulegium</i>	24,81 <sup>c</sup> ± 0,75	8,52 <sup>c</sup> ± 0,53	91,48 <sup>b</sup> ± 0,53	23,78 <sup>bc</sup> ± 1,50
<i>C.pycnocephalus</i>	33,74 <sup>b</sup> ± 1,18	10,10 <sup>b</sup> ± 0,07	89,90 <sup>c</sup> ± 0,07	22,08 <sup>c</sup> ± 1,18
S.E.M.	1,64	0,29	0,29	1,31
P	< 1‰	< 1‰	< 1‰	< 1‰

MS : matière sèche, MM : matière minérale, MO : matière organique, ST : sucres totaux,

<sup>a,b,c,d</sup> Moyennes dans une même colonne affectées d'exposants différents sont statistiquement distincts ( $P < 1\%$ ), S.E.M. : erreur standard des moyennes.

### 3.4.2. Etude *in vitro* de l'inclusion des plantes médicinales sur l'activité fermentaire du microbiote ruminal

#### 3.4.2.1. Production de gaz et paramètres cinétiques modélisés

Les valeurs de la production de gaz enregistrées pour les différentes plantes introduites dans les systèmes batch aux concentrations de 15% et 30% montrent que l'inclusion de *Carduus pycnocephalus*, *Satureja calamintha* et *Mentha pulegium* aux deux concentrations utilisées n'a aucun effet sur la production de gaz *in vitro* après 96h de fermentation ( $P > 5\%$ ). Alors qu'une

diminution significative ( $P < 1\%$ ) de la production de gaz à été enregistré après l'addition de *Juniperus phoenicea* aux mêmes doses cela est dû peut être à la présence des métabolites secondaires susceptibles d'inhiber l'activité des microorganismes du rumen. Concernant *Carduus pycnocephalus*, des résultats différents sont observés par **Bodas et al. 2009**. Ces auteurs enregistrent une diminution dans la production de gaz (2,7% par rapport au témoin. Par contre, **Goel et al. (2008)** notent une augmentation dans la production de gaz issue de la fermentation du foin supplémenté de *Carduus pycnocephalus* aux proportions de 50, 100 et 150 mg. D'autre part, d'après les résultats on constate que la vitesse de la production de gaz (c) n'est pas influencée par l'addition des différentes plantes aux concentrations de 15 et 30%. Pour la fraction (b), les résultats indiquent que l'inclusion des différentes plantes à la dose de 15% n'a aucun effet sur sa fermentation *in vitro* par le microbiote ruminal. Cependant, les mêmes plantes additionnées au foin de vesce-avoine à la concentration de 30% diminue l'activité métabolique du microbiote ruminal vis-à-vis de cette fraction ( $P < 1\%$ ). En ce qui concerne la dégradation de la fraction soluble et pour les deux doses, l'addition des quatre plantes réduit significativement sa fermentation par le microbiote ruminale ( $P < 0,05$ ). Les valeurs positives de la fraction soluble (a) sont synonymes de l'absence d'une phase de latence ou d'adaptation (Arhab, 2007), cette situation pourrait être due soit au fait que le foin de vesce-avoine est un substrat habituellement consommé par les ruminants et/ou à la métabolisation du contenu soluble des plantes étudiées.

**Tableau 13.** Production de gaz *in vitro* et les constantes cinétiques modélisées des mélanges du foin de vesce-avoine et des plantes médicinales (*Juniperus phoenicea*, *Carduus pycnocephalus*, *Satureja calamintha* et *Mentha pulegium*).

		control	<i>juniperus phoenicea</i>	<i>Carduus pycnocephalus</i>	<i>Satureja calamintha</i>	<i>Mentha pulegium</i>	S.E.M	Pr.
<b>Production de gaz</b>								
3h	15%	13.33	11.67	12.67	12.33	13.00	082	0.1956
	30%	16.00 <sup>a</sup>	12.33 <sup>b</sup>	14.00 <sup>ab</sup>	14.00 <sup>ab</sup>	12.33 <sup>a</sup>	097	0.0051
6h	15%	17.01 <sup>a</sup>	14.67 <sup>b</sup>	18.01 <sup>a</sup>	18.67 <sup>a</sup>	18.01 <sup>a</sup>	.97	0.0040
	30%	20.01	17.01	19.34	18.01	18.01	1.29	0.1036
9h	15%	18.67 <sup>a</sup>	15.67 <sup>b</sup>	18.67 <sup>a</sup>	20.33 <sup>a</sup>	19.00 <sup>a</sup>	0.82	0.0006
	30%	22.00 <sup>a</sup>	18.33 <sup>b</sup>	20.67 <sup>ab</sup>	19.33 <sup>b</sup>	19.33 <sup>b</sup>	1.03	0.0121

24h	15%	34.34 <sup>a</sup>	30.67 <sup>b</sup>	34.67 <sup>a</sup>	35.34 <sup>a</sup>	35.00 <sup>a</sup>	1.73	0.0453
	30%	38.00 <sup>a</sup>	31.67 <sup>b</sup>	36.67 <sup>a</sup>	36.67 <sup>a</sup>	35.34 <sup>a</sup>	1.88	0.0181
48h	15%	42.00 <sup>ab</sup>	40.67 <sup>b</sup>	44.67 <sup>a</sup>	42.67 <sup>ab</sup>	44.67 <sup>a</sup>	1.21	0.0093
	30%	52.00 <sup>a</sup>	43.67 <sup>b</sup>	50.00 <sup>a</sup>	48.67 <sup>a</sup>	48.67 <sup>a</sup>	1.88	0.0038
96h	15%	45.01 <sup>a</sup>	41.67 <sup>b</sup>	46.67 <sup>a</sup>	44.67 <sup>a</sup>	46.34 <sup>a</sup>	1.13	0.0023
	30%	54.67 <sup>a</sup>	43.67 <sup>b</sup>	51.34 <sup>a</sup>	51.67 <sup>a</sup>	51.34 <sup>a</sup>	1.79	0.0003
<b>Paramètres cinétiques</b>								
a	15%	7.34 <sup>a</sup>	4.41 <sup>b</sup>	6.77 <sup>ab</sup>	6.26 <sup>ab</sup>	6.97 <sup>ab</sup>	1.06	0.0482
	30%	9.59 <sup>a</sup>	6.95 <sup>b</sup>	7.70 <sup>b</sup>	7.36 <sup>b</sup>	6.49 <sup>b</sup>	0.83	0.0089
b	15%	38.44	38.71	41.19	38.94	39.55	2.28	0.6129
	30%	47.23 <sup>a</sup>	38.84 <sup>b</sup>	45.59 <sup>a</sup>	46.06 <sup>a</sup>	46.69 <sup>a</sup>	1.79	0.0012
c	15%	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.01	0.3513
	30%	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.00	0.4527

### 2-2-2- Production de méthane

La production de méthane enregistrée après 96h d'incubation des mélanges est consignée dans le tableau 14. Il montre que l'addition des plantes à une concentration de 15% n'a pas d'effet sur la production de CH<sub>4</sub> ( $P > 5\%$ ). Cependant à une concentration plus élevée (30%), la production de CH<sub>4</sub> diminue significativement ( $P < 1\%$ ). Les trois autres plantes réduisent la production de méthane avec le même niveau. La production de méthane de tous les ruminants peut être estimée à partir du type d'animal, de la quantité d'aliment ingérée et de la composition de la ration. Elle dépend de nombreux facteurs liés à l'animal (espèce, âge ...) et à l'alimentation : nature et conditionnement du fourrage, nature et pourcentage de concentré dans la ration, niveau d'alimentation et apport d'additifs ( Jarrige et al., 1995). Nos résultats corroborent ceux de plusieurs chercheurs qui montrent que la supplémentation concentré (Lovett et al., 2005), l'utilisation de probiotiques et prébiotiques (Mwenya et al., 2004; Takahashi et al., 2005), et l'ajout d'extraits de plantes (Sliwinski et al., 2002; Patra et al., 2006; Goel et al., 2008) diminuent la production de méthane .

**Tableau 14 :** production de méthane enregistrée après 96h d'incubation des mélanges du foin de vesce avoine et de plantes médicinales *Juniperus phoenicea*, *Carduus pycnocephalus*, *Satureja calamintha* et *Mentha pulegium*

Taux d'Inco.	control	<i>Juniperus phoenicea</i>	<i>Carduus pycnocephalus</i>	<i>Satureja calamintha</i>	<i>Mentha pulegium</i>	S.E.M	Pr.
15%	8.84	6.17	7.84	7.84	7.17	1.34	0.1090
30%	10.50 <sup>a</sup>	9.17 <sup>b</sup>	8.17 <sup>c</sup>	9.50 <sup>b</sup>	9.84 <sup>b</sup>	0.45	0.0001

### 2-2-3- Profil fermentaire

Le tableau 15 représente le faciès fermentaire enregistré après 24h d'incubation des mélanges du foin de vesce avoine et des plantes médicinales. Les quatre plantes utilisées comme additif au foin de la vesce avoine n'ont aucun effet sur le pH après 24h de fermentation pour les deux doses ( $P \geq 5\%$ ), ce qui suggère que la quantité d'additif utilisés est insuffisante pour entraîner des changements sur le profil fermentaire surtout celui de la production des acides gras volatils (Bodas et al. 2009 et Ko et al.2006).

Les résultats obtenus montrent que l'utilisation des quatre plantes médicinales comme additif peut modifier significativement la production d'ammoniaque après 24h d'incubation pour les deux doses étudiées ( $P < 1\%$ ). L'addition de 15% de plantes n'a aucun effet sur la production d'ammoniaque pour *Satureja calamintha* alors que les trois autres additifs diminuent l'ammoniaque ou la réduction la plus élevée est observée pour *Juniperus phoenicea*. L'addition de 30% de plantes augmente la production d'azote ammoniacal pour *Satureja calamintha* de 15%. Cependant, une diminution dans la production d'ammoniaque est notée pour le reste des plantes. La réduction la plus élevée est observée pour *Juniperus phoenicea* et *Carduus pycnocephalus*.

A la concentration de 15%, les additifs n'a aucun effet sur le nombre total des protozoaires ( $P > 5\%$ ). Cependant, à la concentration de 30%, une variation significative est enregistrée entre les différents mélanges ( $P < 5\%$ ). A cette dose, l'addition des plantes médicinales diminue le nombre de protozoaires de 8,85% pour *Carduus pycnocephalus* et de 3,47% pour *Juniperus phoenicea* L'addition des deux autres plantes (*Mentha pulegium*, *Satureja calamintha*) n'a pas d'effet sur le nombre des protozoaires.

**Tableau 15:** faciès fermentaire enregistré après 24h d'incubation des mélanges du foin de vesce avoine et des plantes médicinales ( pH , ammoniacque, protozoaires )

	control	<i>Juniperus phoenicea</i>	<i>Carduus pycnocephalus</i>	<i>Satureja calamintha</i>	<i>Mentha pulegium</i>	S.E.M	Pr.
<b>pH</b>							
<b>15%</b>	6.69	6.67	6.69	6.68	6.68	0.02	0.5084
<b>30%</b>	6.64	6.67	6.66	6.65	6.64	0.02	0.4978
<b>Ammoniaque mg/100ml</b>							
<b>15%</b>	17.21 <sup>a</sup>	9.61 <sup>b</sup>	12.94 <sup>ab</sup>	17.69 <sup>a</sup>	14.32 <sup>ab</sup>	2.19	0.0066
<b>30%</b>	19.26 <sup>b</sup>	9.17 <sup>d</sup>	9.54 <sup>d</sup>	22.15 <sup>a</sup>	11.46 <sup>c</sup>	1.01	<1‰
<b>Protozoaires *10<sup>2</sup> cellules /ml</b>							
<b>15%</b>	14.50	14.20	15.02	14.20	15.10	1.09	0.3524
<b>30%</b>	15.25 <sup>a</sup>	14.72 <sup>b</sup>	13.90 <sup>c</sup>	15.90 <sup>a</sup>	15.80 <sup>a</sup>	1.02	0.0354

### **3. Etude des effets associatifs de mélange de sous-produits oléicoles**

#### **3.1. Composition chimique des margines et des grignons d'olives**

Les résultats de la composition chimique des deux sous-produits sont résumés dans le tableau 16. Il ressort que les grignons d'olives présentent des teneurs élevées en matière sèche (MS) (88,04%). En revanche, les margines montrent une faible teneur (5,61%). Cette dernière est comparable à celle notée par d'autres auteurs qui signalent des teneurs proches de 7,1% (Filidei et al., 2003 et Paredes et al., 1999).

Le taux d'humidité élevé des margines peut s'expliquer par l'eau existant habituellement dans les olives d'une part et d'autre part par l'eau ajoutée au cours du processus d'extraction de l'huile d'olive (Procida et Cecon, 2006). En ce qui concerne les grignons d'olives, un pourcentage de MS plus élevé est rapporté par plusieurs auteurs soit 74% et 45 % (Nefzaoui, 1984). En effet, cette différence est principalement due à la nature du procédé utilisé pour l'extraction de l'huile d'olive.

La teneur en MM des grignons d'olives enregistrée dans notre étude (2,72%) est faible à celle mesurée par Nefzaoui, (1984) et Sansoucy, (1983) Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait

que nos grignons d'olives sont issus de variétés d'olives pauvres en éléments minéraux. Les margines présentent un taux élevé en matière minérale (29,4%). Cette teneur est supérieure à celle indiquée par (Hachicha et *al.*2008) (21.4%). La différence notée peut être expliquée par le degré de maturation et la variété des olives. De plus, la méthode d'extraction de l'huile d'olive semble être un facteur influençant la teneur en matière minérale des margines (Aissam,2003).

Les concentrations en sucres totaux (ST) des substrats étudiés sont respectivement de 16% et 41.1% pour les grignons d'olives et les margines. Pour les grignons d'olives, leur concentration en ST est nettement supérieur à celle rapporté (Mennane et *al.*,2010). Ces auteurs enregistrent une valeur de 5,4%. Cette teneur élevée est probablement due à l'état de fraîcheur des olives avant trituration. La teneur des margines en ST est supérieure à celles rapportés par plusieurs auteurs qui indiquent des moyennes en sucres totaux comprises entre 1 et 8% (Garcia-Castello et *al.*2010) . Cette valeur élevée pourrait être expliquée par l'état de fraîcheur des margines étudiées. En effet, un stockage pendant quelques mois peut conduire à une diminution de la teneur en sucres en raison de leur dégradation en acide organiques ( Hamdi ,1992) .

**Tableau 16 :** teneurs des substrats singuliers en matière sèche et leurs concentrations en éléments minéraux et sucres totaux (g/100 g MS).

Substrats	MS	MM	MO	ST
Margines	5,61 <sup>c</sup>	29,46 <sup>a</sup>	70,54 <sup>c</sup>	41,09 <sup>a</sup>
Grignons d'olives	88,04 <sup>a</sup>	2,72 <sup>b</sup>	97,28 <sup>b</sup>	16,00 <sup>c</sup>
Foin de vesce-avoine	87,28 <sup>b</sup>	1,42 <sup>c</sup>	98,58 <sup>a</sup>	25,83 <sup>b</sup>
S.E.M.	0,22	0,19	0,19	1,13
Pr.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

MS : matière sèche, MM : matière minérale, MO : matière organique, ST : sucres totaux, S.E.M. : erreur standard des moyennes. <sup>a,b,c</sup> Moyennes dans la même ligne affectées d'exposants différents sont statistiquement distincts (P < 0.001)

### **3.2. Fermentation *in vitro* des substrats singuliers et de leurs mixtures**

#### **3. 2.1. Production de gaz**

La production de gaz des substrats singuliers (margines, foin de vesce-avoine et grignons d'olives) et de leurs mélanges sont rapportés dans le tableau 17. Il montre que les margines sont nettement plus fermentescibles que le foin de vesce-avoine et les grignons d'olives (P < 0,05).

Cette production de gaz est significativement différente entre les trois substrats pour les différents temps d'incubation ( $P < 0,05$ ). Au terme de 96h d'incubation, les volumes de gaz enregistrés sont de : 55,17, 39,17 et 20,83 ml pour les margines, le foin de vesce-avoine et les grignons d'olives, respectivement. Cette différence notée pour la production de gaz produit est certainement liée à la composition chimique différente des substrats étudiés (tableau 15). En effet, La forte production de gaz résultant de la fermentation *in vitro* des margines est probablement due à leur richesse en glucides solubles et facilement fermentescibles. En revanche, la situation observée pour le foin de vesce avoine pourrait résulter de la nature hybride du foin de vesce avoine ; ce dernier est formé de l'association de deux plantes appartenant à deux familles botaniques différentes, la vesce (*vicia sativa*) qui est une légumineuse fourragère très riche en glucides mais aussi en protéines (15 à 23 %) et l'avoine (*Avena Sativa*) est une graminée riche en fibres (Adem and Fahey, 2002). La faible production de gaz résultant de la dégradation des grignons d'olives pourrait être due soit à sa structure très lignifiée et/ou à sa richesse en composés phénoliques (tanins) et en matières grasses dont l'effet négatif sur la production de gaz est largement démontré (Mc Sweeney et al.,2001) .

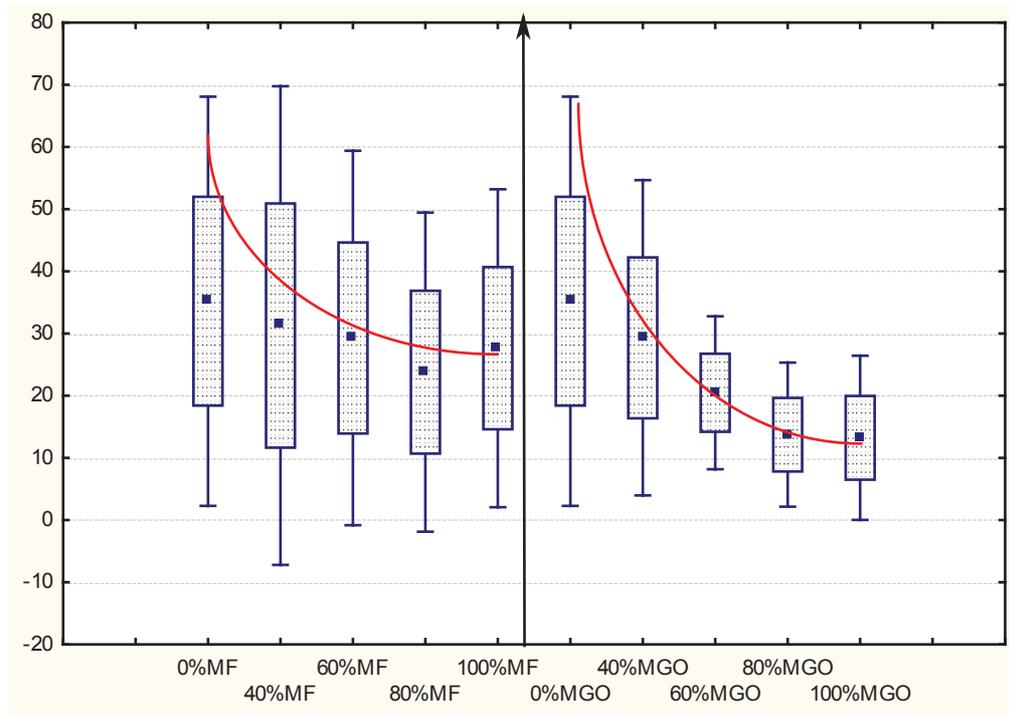
L'addition du foin de vesce-avoine et des grignons d'olives dans les mixtures induit une réduction dans la production de gaz pour les différentes doses et aux différents temps d'incubation ( $P < 0,05$ ) (fig.16). Cette réduction est dépendante de la concentration dans le cas des grignons d'olives. Ainsi et après 96h d'incubation, cette chute est de l'ordre de 16,02, 50,51 et 62,53% pour les concentrations 40, 60 et 80% de grignons d'olives ajoutés, respectivement. Cette forte et progressive diminution dans la production de gaz est probablement due à l'effet synergique des composés phénoliques présents à la fois dans les margines et les grignons d'olives (Wan Zuhainis et al.,2008). Pour le foin de vesce-avoine, une même tendance est observée mais elle est significativement plus faible ( $P < 0,05$ ). Les taux de réduction enregistrés sont de 4,78, 11,49 et 25,37% pour les doses 40, 60 et 80% de foin de vesce-avoine, respectivement. Cette diminution dans la production de gaz est probablement due à la substitution de la fraction soluble facilement fermentescible contenue dans les margines par une fraction cellulosique potentiellement dégradable dans le temps. En fait, plusieurs auteurs rapportent que la contribution du contenu protéique à la production de gaz est faible (Aregheore et al. 2000 ; Long et al. 1999 et Khazaal et al. 1993). Ainsi, le résultat obtenu pour la mixture margines plus foin de vesce-avoine pourrait être attribué également à sa teneur élevée en MAT libre et/ou à la complexion de l'ammoniac produit par désamination avec le gaz carbonique fermentaire (Krishnamoorthy et al.1995).



**Tableau 17** : production de gaz *in vitro* des substrats singuliers et des mélanges.

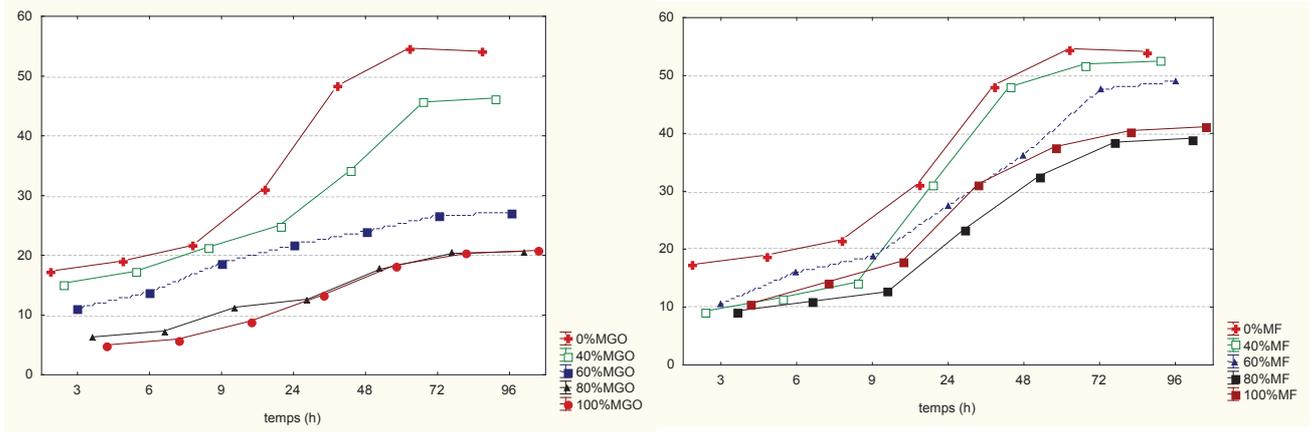
Niveau de substrat inclus	Association Margine et foin de vesce-avoine					Association margine et grignons d'olives					S.E.M.	Pr.
	100%	60%	40%	20%	0%	100%	60%	40%	20%	0%		
3 h	17,33 <sup>a</sup>	9,33 <sup>bc</sup>	10,67 <sup>b</sup>	10,67 <sup>b</sup>	9,33 <sup>bc</sup>	17,33 <sup>a</sup>	15,33 <sup>a</sup>	11,00 <sup>b</sup>	6,33 <sup>bc</sup>	5,00 <sup>c</sup>	2,02	0,0011
6 h	19,00 <sup>a</sup>	11,67 <sup>bc</sup>	15,83 <sup>ab</sup>	14,33 <sup>ab</sup>	11,00 <sup>bcd</sup>	19,00 <sup>a</sup>	17,33 <sup>a</sup>	14,00 <sup>ab</sup>	7,33 <sup>cd</sup>	6,00 <sup>d</sup>	2,48	0,0018
9 h	21,67 <sup>a</sup>	14,33 <sup>abc</sup>	18,67 <sup>ab</sup>	18,00 <sup>ab</sup>	12,67 <sup>bc</sup>	21,67 <sup>a</sup>	21,33 <sup>a</sup>	18,67 <sup>ab</sup>	11,33 <sup>c</sup>	9,00 <sup>c</sup>	2,77	0,0019
24 h	31,33 <sup>a</sup>	31,33 <sup>a</sup>	27,33 <sup>a</sup>	31,33 <sup>a</sup>	23,33 <sup>a</sup>	31,33 <sup>a</sup>	25,00 <sup>a</sup>	21,67 <sup>a</sup>	12,67 <sup>b</sup>	13,33 <sup>b</sup>	3,92	0,0010
48 h	48,33 <sup>a</sup>	48,00 <sup>a</sup>	36,00 <sup>b</sup>	37,67 <sup>b</sup>	32,67 <sup>b</sup>	48,33 <sup>a</sup>	34,33 <sup>b</sup>	24,00 <sup>c</sup>	17,67 <sup>c</sup>	18,33 <sup>c</sup>	4,00	0,0064
72 h	54,67 <sup>a</sup>	52,00 <sup>ab</sup>	47,83 <sup>ab</sup>	40,50 <sup>cd</sup>	38,50 <sup>d</sup>	54,67 <sup>a</sup>	45,67 <sup>bc</sup>	26,83 <sup>e</sup>	20,33 <sup>e</sup>	20,33 <sup>e</sup>	3,31	0,0000
96 h	55,17 <sup>d</sup>	52,50 <sup>ab</sup>	48,83 <sup>ab</sup>	41,17 <sup>cd</sup>	39,17 <sup>d</sup>	55,17 <sup>d</sup>	46,33 <sup>bc</sup>	27,33 <sup>e</sup>	20,67 <sup>e</sup>	20,83 <sup>d</sup>	3,40	0,0000

a, b, c, d, e Moyennes affectées d'exposants distincts sont statistiquement différentes (P < 0,05).



**Figure 16 :** production de gaz en fonction de deux paramètres pourcentage d'un mélange d'aliment en fonction du temps (MF : Margine plus foin de vesce-avoine, MGO : Margine plus grignon d'olive).

Les cinétiques de production de gaz des substrats singuliers et de leurs mélanges sont illustrées dans la (**fig. 17**). L'étude statistique a montré une bonne régression linéaire avec le paramètre temps qui joue un rôle très hautement significatif ( $P < 0,001$ ) pour les deux mélanges (tableau 16). Ces résultats indiquent que les trois substrats sont intensément dégradés durant les premières 48h d'incubation. Cette phase est suivie d'une période stationnaire au cours de laquelle la production de gaz est constante. Cette production cumulée durant les premières 48h d'incubation est de 64,1, 67,3 et 72,7% pour les margines, le foin de vesce-avoine et les grignons d'olives, respectivement. Un même profil de cinétique est aussi noté pour les différentes mixtures. Le profil cinétique des margines et des grignons d'olives (phase stationnaire après 48h) est distinct de celui observé dans d'autres travaux où la fermentation se stabilise au bout de 24h. Ce résultat pourrait s'expliquer par le niveau énergétique élevé des margines (contenu cellulaire). Cependant, la situation observée pour les grignons d'olives est inattendue du fait que ce substrat est riche en matière grasses et en composés phénoliques (tanins) (Arhab, 2000). Ces constituants sont considérés comme des facteurs inhibiteurs de la fermentation *in vitro* (Baaha et al., 2007).



**Figure 17 :** modélisation de la production de gaz en fonction du temps en variant le pourcentage (%) du mélange d'aliment (MF : Margine plus foin de vesce-avoine, MGO : Margine plus grignon d'olive).

**Tableau 18 :** Résultats de la méthode de multiple-régression

Margine plus foin de vesce-avoine (%) (MF)				Margine plus grignon d'olive (%) (MGO)			
	a	b	R <sup>2</sup>		a	b	R <sup>2</sup>
0	-2,562	-5,537	0,908	0	-1,814	-3,920	0,908
40	3,425	6,330	0,871	40	1,851	5,193	0,959
60	2,036	4,809	0,944	60	-1,104	-6,384	0,802
80	0,277	0,768	0,914	80	-0,523	-3,212	0,890
100	-2,234	-6,214	0,819	100	2,535	13,661	0,878

Les paramètres cinétiques de la fermentation *in vitro* des différents substrats singuliers et de leurs mélanges, déduits du modèle exponentiel d'Orskov et Mc Donald (1979), sont mentionnés dans le tableau 18 Il ressort que la production de gaz résultant de la fraction soluble est significativement distincte entre les trois substrats ( $P < 0,05$ ). La forte production est notée pour les margines (12,65 ml) et la plus faible est observée pour les grignons d'olives (2,94 ml). Les valeurs positives de la production de gaz engendrée par la fraction soluble (a) pour le foin de vesce-avoine sont également signalées par d'autres auteurs (Menke et Staingass , 1988). Ils sont synonymes d'une absence de phase de latence due à la colonisation et à la dégradation de la fraction pariétale. Cette moyenne est proche de celle rapporté par d'autres auteurs (Nefzaoui et al.1984). En revanche pour les grignons d'olives, des résultats opposés sont indiqués par Arhab,(2007)qui signale des valeurs négatives.

La production de gaz à partir de la fraction insoluble mais potentiellement fermentescible est statistiquement comparable entre les trois substrats ( $P > 0,05$ ), malgré qu'elle s'effectue à des vitesses différentes. Pour les mélanges, l'addition du foin de vesce-avoine à la margine entraîne une chute dans les valeurs de la fraction soluble (a). Celle-ci est plus prononcée pour la mixture (60% margines + 40% foin de vesce-avoine) où une diminution de 84,2% est enregistrée. Une tendance inverse est observée pour la mixture en présence des grignons d'olives où une augmentation de 11,10%. Ces constats pourraient être expliqués par la substitution de la fraction soluble par une fraction cellulosique pour le mélange margines-foin de vesce-avoine et par l'accroissement du contenu énergétique (fraction lipidique) dans le cas du mélange margines-grignons d'olives.

Les vitesses de production de gaz (c) des trois substrats à partir de la fraction (b) sont significativement différentes ( $P < 0,001$ ). Le foin de vesce avoine exprime la plus grande valeur  $5\%/h^{-1}$  suivi des grignons d'olives ( $4\%/h^{-1}$ ) et les margines avec une valeur de  $2\%/h^{-1}$ . Cette dernière concorde avec celle estimée par leulmi (2011) Concernant le foin de vesce-avoine, la vitesse moyenne mesurée est proche de celle publiée par plusieurs auteurs ( $5,72 \%/h^{-1}$  et  $6,17 \%/h^{-1}$ ) (Arhab, 2007). La vitesse de fermentation dépend de la nature du substrat et plus précisément de son contenu fibreux (Jarrige et al.,1995). En effet, elle agit sur l'ingestion des aliments car elle affecte la vitesse de passage des particules alimentaires dans le rumen. Ainsi, les trois substrats pourraient être considérés comme des aliments dont le temps de séjour est comparable à des aliments de bonne qualité (Nefzaoui, 1984).

**Tableau 19.** Paramètres cinétiques du modèle exponentiel des substrats singuliers et des mélanges.

Paramètres Cinétiques	Margines + foin de vesce-avoine					Margines + grignons d'olives					S.E.M.	Pr.
	100%	60%	40%	20%	0%	100%	60%	40%	20%	0%		
a (ml)	12,65 <sup>ab</sup>	1,99 <sup>c</sup>	8,48 <sup>abc</sup>	4,88 <sup>c</sup>	5,70 <sup>bc</sup>	12,65 <sup>ab</sup>	14,23 <sup>a</sup>	8,86 <sup>abc</sup>	5,58 <sup>bc</sup>	2,94 <sup>c</sup>	2,82	0,001
b (ml)	49,51	54,16	58,03	43,10	35,83	49,51	53,65	17,69	16,52	19,07	12,72	0,055
c (%/h)	2 <sup>bc</sup>	3 <sup>bc</sup>	2 <sup>bc</sup>	3 <sup>bc</sup>	5 <sup>ab</sup>	2 <sup>bc</sup>	1 <sup>c</sup>	6 <sup>a</sup>	3 <sup>bc</sup>	4 <sup>bc</sup>	0,01	0,001

<sup>a, b, c</sup> Moyennes affectées d'exposants distincts sont statistiquement différentes (P < 0,05).

### **3. Analyse de la phase gazeuse**

Les gaz majoritairement produits lors des fermentations sont du méthane ( $\text{CH}_4$ ) et du gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ), leurs cinétiques de production au cours de la fermentation des substrats singuliers et de leurs mixtures sont illustrées par le tableau 20 et la figure 17. Il apparaît que la production de gaz s'oriente principalement vers une production accrue en  $\text{CO}_2$  pour les margines (83,3%). Cependant, celle résultant de la dégradation des grignons d'olives induit une forte production de  $\text{CH}_4$  (70,4%). Tandis que, le foin de vesce-avoine a un comportement intermédiaire. Pour les mélanges, les résultats montrent que l'incorporation soit du foin de vesce-avoine ou des grignons d'olives engendre un accroissement dans la production de méthane dans le pool gazeux. Cette élévation est dose dépendante.

La faible production de méthane notée pour les margines est probablement liée à sa composition chimique. Celle-ci est principalement constituée de sucres solubles fermentescibles (41,09%) dont la dégradation conduit théoriquement selon l'équation chimique de Wolin à une production accrue d'acides propionique et butyrique. Par ailleurs, celle de l'acide acétique est associée à une production importante d'hydrogène dont l'élimination engendre une production accrue de gaz sous forme de  $\text{CH}_4$ . Il faut également signaler que la margine est un sous-produit riche en composés phénoliques. Ces entités chimiques sont connues pour leur effet antagoniste vis-à-vis de la production de méthane ; Elles agissent soit directement sur les archaebactéries méthanogènes du rumen et/ou indirectement en limitant l'accessibilité des microorganismes à leurs substrats. D'autres études rapportent que les phénols simples tels que les acides p-coumarique et cinnamique diminuent fortement la production de méthane (Wan Zuhainis et al., 2008).

La forte production du  $\text{CH}_4$  pour les grignons d'olives s'explique par le fait que les grignons contiennent des substances lipidiques riches en groupement hydrogènes, sources majeurs de la réduction du  $\text{CO}_2$  en  $\text{CH}_4$ .



**Tableau 20** : Analyse qualitative et quantitative du pool gazeux des substrats singuliers et des mixtures.

Temps	Production de méthane (CH <sub>4</sub> , ml)												
	Margines + foin de vesce-avoine						Margines + Grignons d'olives					S.E.M.	Pr.
	100%	60%	40%	20%	0%		100%	60%	40%	20%	0%		
3h	2,67 <sup>e</sup>	4,33 <sup>d</sup>	5,83 <sup>d</sup>	7,67 <sup>c</sup>	7,83 <sup>c</sup>		2,67 <sup>e</sup>	8,33 <sup>c</sup>	9,33 <sup>c</sup>	15,33 <sup>b</sup>	21,33 <sup>a</sup>	0,73	0,0000
24h	4,67 <sup>e</sup>	5,50 <sup>e</sup>	8,33 <sup>cd</sup>	9,67 <sup>c</sup>	10,17 <sup>c</sup>		4,67 <sup>e</sup>	9,17 <sup>c</sup>	10,33 <sup>c</sup>	16,33 <sup>b</sup>	22,67 <sup>a</sup>	0,72	0,0000
72h	8,67 <sup>e</sup>	10,50 <sup>de</sup>	13,33 <sup>c</sup>	16,00 <sup>bc</sup>	19,33 <sup>b</sup>		8,67 <sup>e</sup>	20,33 <sup>b</sup>	20,67 <sup>b</sup>	21,33 <sup>a</sup>	23,33 <sup>a</sup>	1,01	0,0000
Temps	Production de dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> , ml)												
	100%	60%	40%	20%	0%		100%	60%	40%	20%	0%	S.E.M	Pr.
	3h	16,33 <sup>a</sup>	7,34 <sup>c</sup>	10,00 <sup>b</sup>	3,33 <sup>e</sup>	6,50 <sup>c</sup>		16,33 <sup>a</sup>	9,00 <sup>b</sup>	4,67 <sup>cd</sup>	2,00 <sup>ef</sup>	4,67 <sup>cd</sup>	0,81
24h	26,66 <sup>a</sup>	25,83 <sup>a</sup>	19,00 <sup>c</sup>	13,66 <sup>e</sup>	21,16 <sup>b</sup>		26,33 <sup>a</sup>	15,83 <sup>d</sup>	12,66 <sup>e</sup>	6,34 <sup>g</sup>	11,34 <sup>ef</sup>	0,65	0,0000
72h	46,00 <sup>a</sup>	41,50 <sup>b</sup>	34,50 <sup>c</sup>	22,50 <sup>de</sup>	21,17 <sup>de</sup>		46,00 <sup>a</sup>	25,34 <sup>d</sup>	17,00 <sup>f</sup>	9,00 <sup>g</sup>	6,16 <sup>gh</sup>	0,96	0,0000

<sup>a, b, c, d, e</sup> Moyennes affectées d'exposants distincts sont statistiquement différentes (P < 0,05).

#### **4. Profil fermentaire**

##### **4.1. pH**

Les valeurs de pH mesurées après 24h d'incubation pour les substrats singuliers et des mélanges sont représentées dans le tableau 21. Il ressort qu'elles sont statistiquement comparables ( $P > 0,05$ ) et varient entre 6,62 et 6,79. La faible valeur est notée pour les margines (6,62) et la plus élevée pour les grignons d'olives (6,76). Ces valeurs sont comprises dans la fourche idéale pour une bonne activité cellulolytique.

##### **4.2. Ammoniac (N-NH<sub>3</sub>)**

Les résultats de l'ammoniac des substrats singuliers et de leurs mixtures sont également présentés dans le tableau 21. Il s'avère que les margines sont pauvres en azote comparativement au foin de vesce-avoine et aux grignons d'olives. Cependant, la complémentation des margines par ces deux substrats aux différentes doses améliore leur contenu azoté. Selon la littérature, la dégradation de la masse protéique alimentaire conduit essentiellement à la production d'ammoniaque et de la biomasse bactérienne. De plus, de nombreux auteurs préconisent une concentration en azote ammoniacal de 80mg/100ml pour assurer une activité métabolique maximale du microbiote ruminal *in vitro* (Balti, 1974, Nefzaoui et Abdouli, 1979, Nefzaoui et al 1987). Ainsi, la teneur faible en azote ammoniacal issue de la dégradation des margines est probablement due au déséquilibre observé dans leur faune ruminale (nombre des protozoaires, résultats ci-dessous). En effet, ces derniers jouent un rôle primordial dans la protéolyse où leur activité spécifique de désamination des acides aminés est trois fois supérieure à celle des bactéries ( Nefzaoui ,2009). Il est également possible que cette faible concentration en ammoniaque observée soit due à une bonne assimilation et incorporation de l'azote par le microbiote ruminal ( Nefzaoui ,2009).

##### **4.3. Composition quantitative de la faune ruminale (protozoaires)**

La variation quantitative de la faune ruminale entre les différents substrats et leurs mixtures est également mentionnée dans le tableau 21. Le nombre des protozoaires est de  $6,92 \times 10^3$ ,  $13,00 \times 10^3$  et  $13,64 \times 10^3$  cellules/ml respectivement pour les margines, les grignons d'olives et le foin de vesce-avoine. Il faut également signaler que l'incorporation du foin de vesce-avoine et des grignons d'olives permet une bonne croissance des protozoaires, marquée par un accroissement de leur nombre total.

L'aspect quantitatif de la faune ruminale est étroitement relié avec le régime alimentaire consommé. De ce fait, le résultat obtenu pour les margines est probablement dû à leur contenu phénolique élevé. Ce dernier peut affecter négativement le métabolisme ou la croissance des protozoaires. En outre, ces composés phénoliques ont une action sur les protozoaires par leurs propriétés antiméthanogéniques qui inhibent l'activité des *Archae* bactéries. En effet, entre 9 et 25% des archaebactéries méthanogènes sont associées aux protozoaires ciliés qui leur fournissent de l'hydrogène moléculaire ( $H_2$ ) comme substrats énergétique. De même, il semble que les protozoaires sont très sensibles à la présence des acides gras polyinsaturés, notamment, les acides linoléique et oléique prépondérantes dans les résidus d'olives, car ces microorganismes n'ont pas l'amplitude de les métaboliser (Nefzaoui, 1983). Ce résultat est parfaitement corroboré à la faible production de méthane observée pour les margines (tableau20).

#### 4.4. Digestibilité de la matière sèche

La digestibilité apparente de la MS est significativement différente entre les substrats ( $P < 0,001$ ) (tableau 21). La plus grande valeur est enregistré pour les margines (83,28%) et la plus faible valeur est observée pour les grignons d'olives (25,80%). Pour les margines, ces valeurs de digestibilité sont fortement corrélées à celles de la production de gaz (résultats non montrées). Elles s'expliquent probablement par leur richesse à la fois en sucres totaux et en substances lipidiques. Pour le foin de vesce avoine, ces résultats sont supérieurs à ceux enregistrés par certains auteurs qui signalent des valeurs de 50,90 % ( Menke et Staingass, 1988). Ces valeurs supérieures obtenues dans notre étude pourraient être expliquées en partie à son contenu en matière azotées du à son origine hybride. Elles peuvent aussi être expliquées par la faible teneur du foin de vesce avoine en composés antinutritionnels ( Arhab,2007). Pour les grignons d'olives, le CD enregistré est inférieur à celui obtenu par Arhab ,(2000) qui note une valeur de 31,12 % (qui reste dans le même ordre). Ce faible taux pourrait être expliqué d'une part par la structure lignifiée des grignons d'olives et d'autre part à leur fraction azotée principalement liée à la fraction lignocellulosique (70 à 80%). En effet, l'azote lié à la fraction pariétale est généralement inaccessible aux enzymes du tractus digestif (Chang-H et al .2008 ; Zhang et al.2008) .

Pour les mixtures, l'ajout du foin de vesce-avoine ou des grignons d'olives à la margine et aux différentes concentrations entraîne une diminution dans la dégradabilité de la MS. Cette chute dans la digestibilité est positivement liée à la dose utilisée. Elles sont de 2,71, 11,98 et 21,63% respectivement pour le mélange margines-foin de vesce-avoine aux concentrations de

60, 40 et 20%. Cette diminution est encore plus importante pour le mélange obtenu avec les grignons d'olives où des taux de : 32,43, 36,97 et 63,41%.

**Tableau 21** : paramètres fermentaires (pH et ammoniac), dénombrement des protozoaires et digestibilité des substrats singuliers et des mixtures.

<b>Mélanges</b>				
Margines + foin de vesce-avoine	pH	N-NH <sub>3</sub> (10 <sup>2</sup> mg/l)	Protozoaires (10 <sup>3</sup> cellule/ml)	CD (%)
100%	6,62	3,61 <sup>d</sup>	6,92	83,28 <sup>a</sup>
60%	6,70	4,23 <sup>cd</sup>	10,75	81,02 <sup>a</sup>
40%	6,76	5,02 <sup>bc</sup>	12,42	73,30 <sup>b</sup>
20%	6,69	5,64 <sup>b</sup>	12,42	65,26 <sup>c</sup>
0%	6,71	5,72 <sup>a</sup>	13,64	59,68 <sup>d</sup>
<b>Margines + grignons d'olives</b>				
Margines + grignons d'olives	pH	N-NH <sub>3</sub> (10 <sup>2</sup> mg/l)	Protozoaires (10 <sup>3</sup> cellule/ml)	CD (%)
100%	6,62	3,61 <sup>d</sup>	6,92	83,28 <sup>a</sup>
60%	6,73	4,02 <sup>cd</sup>	10,67	56,27 <sup>de</sup>
40%	6,74	4,28 <sup>cd</sup>	11,00	52,49 <sup>e</sup>
20%	6,79	4,44 <sup>cd</sup>	11,17	30,47 <sup>f</sup>
0%	6,76	5,03 <sup>bc</sup>	13,00	25,80 <sup>f</sup>
S.E.M.	0,06	0,37	1,38	3,10
Pr.	0,54	0,046	0,55	0,0000

<sup>a, b, c, d, e, f,</sup> Moyennes affectées d'exposants distincts sont statistiquement différentes ( $P < 0,05$ ).



## CONCLUSION

## Conclusion

Les objectifs de cette étude est d'évaluer les interactions entre la dégradation microbienne des plantes autochtones de zones arides , de plantes médicinales et de sous-produits agricoles (les palmes sèches, les grignons d'olives et les margines).. Le modèle comprend les principaux effets de substrat unique et des mélanges de multiples interactions. à la lumière de cette étude il ressort que :

L'analyse *in vitro* quantitative et qualitative des gaz fermentaires a révélée une diminution de la production de méthane et de l'ammoniaque pour l'ensemble des plantes médicinales étudiées, qui est due à la richesse en métabolites secondaires

Les feuilles des palmiers dattiers peuvent être un complément alimentaire adapté pour les petits ruminants parcourant *Aristida pungens* et *Astragalus gombiformis* dans les régions arides. À des pourcentages inférieurs à 20% et à des courtes durées afin de minimiser les effets des tanins.

La description du profil fermentaire de la production de gaz *in vitro* a été bien démontrée par le modèle de la régression multiple utilisé dont l'équation :

$$Y = a + b (\text{temps}) + c(\text{Pourcent}) + d(\%*t)$$

qui a révélé une bonne régression linéaire pour les deux mélanges.par contre le modèle de Sandoval ( 2000) ne convient pas aux variétés caractéristiques des zones algériennes arides et semi arides.

La production de gaz des substrats singuliers (margines, foin de vesce-avoine et grignons d'olives) montre que les margines sont nettement plus fermentescibles que le foin de vesce-avoine et les grignons d'olives.

L'addition du foin de vesce-avoine et des grignons d'olives dans les mixtures induit une réduction dans la production de gaz pour les différentes doses et aux différents temps d'incubation

La diminution progressive dans la production de gaz est probablement due à l'effet synergique des composés phénoliques présents à la fois dans les margines et les grignons.

Pour les mixtures, l'ajout du foin de vesce-avoine ou des grignons d'olives à la margine et aux différentes concentrations entraîne une diminution dans la dégradabilité de la Matière sèche. Cette chute dans la digestibilité est positivement liée à la dose utilisée.

L'étude statistique a montré une bonne régression linéaire avec le paramètre temps qui joue un rôle hautement significatif ( $p < 0,001$ ) pour les deux mélanges.

La production du gaz diminue progressivement et hautement significative en fonction du temps avec le mélange margines grignons d'olive en comparaison avec le mélange margines foin de vesce avoine.

Comme perspective il est souhaitable d'étudier l'analyse toxicologie et l'effet bactéricide des métabolites secondaires des plantes sur le microbiote ruminal.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## Références bibliographiques

**-Adem R. et Fahey A. 2002.** Les ressources fourragères en Algérie. Déficit structure et disparité régionale. Analyse du bilan fourrager pour l'année 2001.

**Ahmed M.M.M. et El-Hag F.M. 2004.** Degradation characteristics of some Sudanese forages and tree pods *in sacco* and gas production techniques. *Small Ruminant Res.*, **54**:147-159.

**Aganga A.A. et Mosase K.W. 2001.** Tannin content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capassa*, *Zizyphus mucronata*, *Sclerocaraya sirrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **91**: 107-113.

**Aissam H. 2003.** Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. Thèse de doctorat national. Université sidi mohamed ben abdellah. Fes. 156p.

**Aman P. 1993.** Composition and structure of cell wall polysaccharides in forages. In: forage cell wall structure and digestibility. Jung H.G., Bruxton D.R., Hatfield R.D. and Ralph J. (Eds.), Madison, Wisconsin, USA, pp. 183-199.

**Ammar H., Lopez S., Gonzalez J.S., Ranilla M.J. 2004.** Seasonal variation in the chemical composition and *in vitro* digestibility of some Spanish leguminous shrubs species. *Anim. Feed Sci. Technol.* **115**:327-340

**AOAC. 1990.** In: S. Williams (Ed.), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist International, 15th AOAC International, Arlington. Virginia (USA).

**-AOAC 1999. In: Cunnif P,** (Ed.), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16th ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

**Alananbeh K.M., Bouqellah N.A., Al Kaff N.S. 2014.** Cultivation of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* on date-palm leaves mixed with other agro-wastes in Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci.* **21**:616-625.

**Arbouche S., Arbouche H.S. 2008.** Date by-products from south-east Algeria: effects of treatment with urea and thz mode of storage on their chemical composition and digestibility. *Livest. Res Rural Dev.* **20**(6):97.

**Arhab R. 2000.** Etude de la digestibilité *in vitro* de sous-produits agro-industriels et cellulosespurifiées par la microflore ruminale de camélidés. Utilisation des gaz fermentaires comme marqueurs de fermentation. Thèse de Magister, ISN. Université Mentouri de Constantine, Algérie.

**Arhab R. 2006.** Study of the *in vitro* fermentability and *in vivo* digestibility of plants of arid zones and sub-Saharan agronomy products by estimating the metabolic activity of ruminal microbiota of sheep. PhD thesis. Mentouri University of Constantine. 204p

**Arhab R. 2007.** Etude de la fermentescibilité *in vitro* et de la digestibilité *in vivo* de végétaux des zones arides et de sous produits de l'agronomie saharienne par l'estimation de l'activité métabolique du microbiote ruminal d'ovins. Thèse de Doctorat. Université Mentouri Constantine. Algérie. 204 p.

**Aregheore E.M. 2000.** Chemical composition and nutritive value of some tropical by-product feedstuffs for small ruminant *in vivo* and *in vitro* digestibility. *Anim. Feed Sci. Technol.* **85**:99-109.

**Baaha J.J., Ivan M., Hristov A.N., Koenig K.M., Rode L.M., McAllister T.A. 2007.** Effects of potential dietary antiprotozoal supplements on rumen fermentation and digestibility in heifers. *Animal Feed Science and Technology.* **137** : 126–137.

**Babayemi O.J., Hamzat R.A., Bamikole M.A., Anurudu N.F., Olomola O.O., 2006.** Preliminary Studies on Spent Tea Leaf : *In vitro* Gas Production as Affected by Chemical Composition and Secondary Metabolites. *Pakistan Journal of Nutrition.* **5** : 497–500.

**Bahman AM, Topps JH, Rooke JA. 1997.** Use of date palm leaves in high concentrate diets for lactating Friesian and Holstein cows. *J. Arid Environ.* **35**:141-146.

**Baldwin, R.L., Lucas, H.L., Cabrera, R., 1970.** Energetic relationships in the formation and utilization of fermentation end-products. In: Physiology of digestion and metabolism in the ruminant. Phillipson, A. T. (ed.). Oriel Press, Newcastle, 319-335.

**Baldwin R.L. 2000.** History and future of modelling nutrient utilization in farm animals. In: Modelling nutrient utilization in farm animals. McNamara, J.P., France, J., Beever, D.E. (eds). CAB international, pp 1-9.

**Bell A.A. 1981.** Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology.* **32**: 21-81.

**Bergoin M., 2005.** Application du concept de raffinage végétal au safran du quercy (*Crocus sativus*) pour la valorisation intégrée des potentiels aromatiques et colorants. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique. Toulouse. France. 370 p.

**Besle J.M., Corno A., Jouany J.P. 1994.** Role of the structural phenyl propanoids in forages cell wall digestion. *J. Sci. food and Agri.* **64**, 171-190.

**Beuvink J.M.W., Kogut J. 1993.** Modeling gas production kinetics of grass silages incubated with buffered ruminal fluid. *J. Anim. Sci.* **71**, 1041–1046.

**Blümmel M. and 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. digestibility in vitro techniques. *British J. Nutri.* **73**, 897-913.

**Blümmel M., Aiple K.P., Steingass H., Becker K. 1999.** A note on the stoichiometrical relationship of short chain fatty acids production and gas evolution in vitro in feedstuffs of widely differing quality. *J. Anim. Physiology and Anim. Nutri.* **81**, 157-167.

**Bodas R., Lopez S., Fernandez M., Garcia-Gonzalez R., Rodriguez A.B., Wallace R.J. et al., 2009.** Phytogetic additives to decrease *in vitro* ruminal methanogenesis. *Nutritional and foraging ecology of sheep and goats*. 85 : 279–283.

**Boufennara S, Lopez S, Bousseboua H, Bodas R, Bouazza L (2012).** Chemical composition and digestibility of some browse plant species collected from Algerian arid rangelands. *Span. J. Agric. Res.* 10(1):88-98.

**Boutigny Anne-Laure. 2007 .** Etude de l'effet de composés du grain de blé dur sur la régulation de la voie de biosynthèse des trichothécènes B : purification de composés inhibiteurs, analyse des mécanismes impliqués . thèse doctorat .université BORDEAUX 1 ECOLE DOCTORALE DE SCIENCES DU VIVANT, GEOSCIENCES, SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT . France .202p.

**Bourquin C.D. and Fahey J.G.C. 1994.** Ruminal digestion and glycolyse linkage patterns of cell wall compounds from leaf and stem fractions of alfalfa or chardgrass and wheat straw. *J. Anim. Sci.* 72, 1362-1374.

**Brugere H.. 1983.** Biochimie du rumen – Aspects physiologiques. *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires.* 3:5-22.

**Buxton D.R. and Russel J.R. 1988.** Lignin constituents and cell wall digestibility of grass and legumes stems. *Crop Sci.* 28, 553-558.

**Chapoutot, P., 1998.** Etude de la dégradation *in situ* des constituants pariétaux des aliments pour ruminants. Thèse de docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon, France.

**Carpita N.C. and Gibeaut D.M. 1993.** Structural models of primary cell wall in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3, 1-30.

**Carter E.D. 1975.** Le potentiel de développement de la production céréalière et de l'élevage en Algérie. Rapport, pp 16-66.

**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. *Animal Feed Science and Technology*. 119 : 29–41.  
(26)

**Castillejos L., Calsamiglia S., Martín-Ereso J., TerWijlen H., 2008.** *In vitro* evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. *Animal Feed Science and Technology*. 145 : 259–270.

**Chaney A. L., Marbach E.P. 1962.** Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*, 8:130–132.

**Chang-H K., Shin J. L., Jong K. H., Wan Y. K., Sung S. L. 2008.** Effects of emulsified octadecanic acids on gas production and cellulolysis by the rumen anaerobic fungus, *Piromyces communis* M014. *Anaerobie*, 14 : 19–28.

**Chapoutot, P., Giger-Reverdin, S., Dorléans, M., Sauvant, D., 2003.** Comparaison de la dégradabilité *in sacco* et *in vitro* (méthode enzymatique) de l'amidon des aliments pour les ruminants. *soumis pour publication Renc. Rech. Ruminants*.

**Chen X.B. 1997.** Neway Excel: A utility for processing data of feed degradability and *in vitro* gas production. Rowett Research Institute, Aberdeen, UK .

**Chenost M. 1970.** Utilisation de la technique de digestibilité *in vitro* pour prévoir la valeur alimentaire des fourrages.

**Cone J.W., Van Gelder A.H., Visscher G.J.W., Outshoorn L. 1996.** Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Anim. Feed Sci. Technol.* **61** : 113-128.

**Dalzell S.A. and Kerven G.L. 1988.** A rapid method for the measurement of Leucaena Spp. Proanthocyanidins by the proanthocyanidin (butanol/HCl) assay. *J. of the Sci. food and Agri.* **78** : 405-416

**Demarquilly, C., Faverdin, P., Geay, Y., Vérité, R., Vermorel, M., 1996.** Bases rationnelles de l'alimentation des ruminants. INRA Prod. Anim., hors série, 71-80.

**Dixon RM, Stockdale C.R. 1999.** Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilisation. *Aust. J. Agric. Res.* **50**:757-774.

**Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry.* **28**: 350–356.

**Elhag M.G. and Elkhanjari H.H. 1992.** Dates and sardines as potential animal feed resources. *World Animal Review.* **73**: 1-13.

**Fadil K., Chahlaoui A., Ouahbi A., Zaid A., Borja R. 2003.** Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. *International biodeterioration & biodegradation.* **51**: 37-41.

**Fadeli E. 1977.** Lipids of olives. *Process Chemistry of Fats and other lipids.* **15** : 57-74.

**Fadeli E. et Camurati F. 1981.** *In* : Séminaire International sur la Valorisation des Sous-produits de l'olivier. *PNUDFAO. Monastir, Tunisie, Décembre 1981, 111-113.*

**Fiestas J.A., Borja R. 1992.** Use and treatment of olive mill wastewater : current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites.* **43**, 101-106.

**Fiestas Ros de Ursenos J.A. 1981.** Différentes utilisations des margines : Actes séminaire international sur la valorisation des sous-produits de l'olivier. *FAO-UNDP. Tunisie, pp 93-110.*

**Fiestas J.A., Borja R. 1992.** Use and treatment of olive mill wastewater: current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites.* **43** : 101-106.

**Fiestas Ros de Ursenos J.A. 1981.** Différentes utilisations des margines : Actes séminaire international sur la valorisation des sous-produits de l'olivier. *FAO-UNDP. Tunisie, pp 93-110.*

**Florence VN, Ndlovu LR, Dzowela BH 1999.** Relationships between *in vitro* gas production characteristics, chemical composition and *in vivo* quality measures in goats fed tree fodder supplements. *Small Ruminant Res.* **31**:117-126.

**Fonty G, Joblin K. M. 1991.** Rumen anaerobic fungi: their role and interaction with others rumen microorganisms in relation to their fiber digestion. **In: Tsuda T., Sasaki Y., and Okawasashima R.** Ed: Physiological aspects of seventh international symposium on ruminant physiology. Academic press. San Diego: 655- 661.

**Fonty G., Jouany J.P., Forano E., Gouet Ph. 1995.** L'écosystème microbien du réticulo-rumen. In : Nutrition des ruminants domestique, Ingestion et Digestion. Jarrige R., Ruckesusch Y. and Journet M. (Eds.), Paris, pp. 299-348.

**Fonty G., forano E., Gaudet G., Komisarczuks et Gouet Ph.1988.** Données nouvelles sur les bactéries cellulolytiques. *Reproduction Nutrition and Develloppement.* **28**: 19-32).

**Fonty G., Senaud J., Jouany J.P., Gouet P.H.,1988** establishment of ciliate protozoa in the rumen of conventional and conventionalized lambs ; influence of diet and management conditions .*Can.J.Microbiol.* **34**:235-241.

**Fjord N.J. 1889.** 2det aars fodringsforsøg med malkekøer. Sammenligning mellem kraftfoder og roer. In: Syttende beretning fra den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskoles Laboratorium for landøkonomiske Forsøg. J. H. Schuboths Boghandel, København.

**Franci O, Antongiovanni M, Acciaioli A, Bruni R, Martini A (1997).** Response surface analyses of the associative effects of lucerne hay, wheat straw and maize gluten feed on growing lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **67**:279-290.

**Frazier R.A, Papadopoulou A., Mueller-Harvey I., Kisson D., Green R.J. 2003.** Probing protein-tannin interactions by isothermal titration microcalorimetry. *J. Agric. Food Chem.* **51**:5189-5195.

**Friend J. 1981.** Plant phenolics, lignification and plant disease. *Progress in Phytochemistry,* **7**: 197-261.

**Frutos P., Hervas G., Ramos G., Giraldez F.J., Mantecon A.R. 2002.** Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. *Anim. Feed Sci. Technol.* **95** : 215–226.

**Garcia-Castello E., Cassano A., Criscuoli A., Conidi C., Drioli E. 2010.** Recovery and concentration of polyphenols from olive mill wastewaters by integrated membrane system. *water research.* **44** : 3883-3892.

**Gaste F. 1988.** La mesure du pH ruminal des bovins, une nouvelle méthode. Thèse Vétérinaire Nantes.

**Genin D., Kadria A., Khorchani T., Sakkal K., Belgacem F., Hamadi M. 2004.** Valorisation of date palm by-products for livestock feeding in southern Tunisia. Potentialities and traditional utilization. In: Ben Salem H, Nefzaoui A, Morand-Fehr P (Eds.), Nutrition and feeding strategies of sheep and goats under harsh climates. CIHEAM, Cahiers Options Méditerranéennes. **59**:221-226.

**Getachew G., Makkar H.P.S., Becker K. 2000.** Tannins in tropical browses: Effects on *in vitro* microbial fermentation and microbial protein synthesis in media containing different amounts of nitrogen. *J. Agric. Food Chem.* **48**:3581-3588.

**Goel G., Makkar H.P.S., Becker K., 2008.** Effect of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* and Fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. *Animal Feed Science and Technology.* **147** : 72–89.

**Goering H.K. and Van Soest P.J. 1970.** Forage fiber analysis. Agricultural Handbook N° 379. Agricultural Research service, USDA, Washington. DC, pp.20

**Gouet Ph. 1986.** Le fermenteur du rumen : établissement et fonctions de l'écosystème microbien. Société Française de Buïatrie : Approche nouvelle de la pathologie du réticulorumen. 49-65.

**Groot J.C.J., Cone J.W., Williams B.A., Debersaques F.M.A., Lantinga E.A. 1996.** Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* **64** : 77–89.

**Guimaraes-Beelen P.M., Berchieilli T.T., Bellen R. and Medeiros A.N. 2006.** Influence of condensed tannins from Brazilian semi-arid legumes on ruminal degradability, microbial colonization and ruminal enzymatic activity in Saanen goats. *Small Ruminant Research.* **61**: 35-44.

**Hachicha S., Sallemi F., Medhioub K., Hachicha R., Ammar E. 2008.** Quality assessment of composts prepared with olive mill wastewater and agricultural wastes. *Waste Management,* **28** : 2593–26.

**Hachicha R., Hachicha S., Trabelsi I., Steve Woodward B. et Mechichi T. 2009.** Evolution of the fatty fraction during co-composting of olive oil industry wastes with animal manure: Maturity assessment of the end product. *Chemosphere.* **75**: 1382-1386.

**Haddad S.G. 2000.** Associative effects of supplementing barley strawdiets with alfalfa hay on rumen environment and nutrient intake and digestibility for ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* **87**:163-171.

**Hamrit S. 1995 .** Situation des fourrages en Algérie . Awamia 89 Juin 1995. Pp 97\_107 Algérie

**Hamdi M. 1992.** Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion. *Applied Biochemistry Biotechnoogy.* **37** : 155.

**Hamdi M., Ellouz P. 1993.** Treatment of detoxified olive mill wastewater's by anaerobic filter and aerobic fluized bed processes. *Environmental Technology.***14** : 183-188.

**Hennessy D.W., Kohun P.J., Williamson P.J., Brown D.A., Nolan J.V. 1995.** The effect of nitrogen and protein supplementation on feed intake, growth and digestive function of steers with different Bos indicus, Bos taurus genotypes when fed a low quality grass hay. *Aust. J. Agric. Res.* **46**:1121-1136.

**Hong D., Ragland D., Adeola O. 2001.** Additivity and associative effects of metabolizable energy and amino acid digestibility in barley and canola meal for white pekin ducks. *Poult. Sci.* **80**:1600-1606.

**Hong D, Ragland D, Adeola O 2002.** Additivity and associative effects of metabolizable energy and amino acid digestibility of corn, soybean meal, and wheat red dog for white pekin ducks. *J. Anim. Sci.* **80**:3222-3229.

**Jarrige R. 1980.** Digestion. Chemical methods for predicting the energy and protein value of forages. *Annales de Zootechnie.* **29** : 299-323.

**Jarrige R., Grenet E., Demarquilly C., Besle J.M. 1995.** Les constituants de l'appareil digestif des plantes fouragères. In : Nutrition des ruminants domestiques : Ingestion et digestion. Jarrige R., Ruckebush Y., Demarquilly C., Farce H.M., Journet M. (Eds.), INRA, Paris. Pp :25-82.

**Jouany J.P. 1994.** Les fermentations dans le rumen et leur optimization. INRA. Productions animals. **7**(3): 207-225

**Jouany J.P et Ushida K. 1998.** The role of protozoa in feed digestion. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, **12**: 113-128). Et sont très sensibles à la non nutrition et peuvent disparaître en 2 à 3 jours de diète.

**Julkunen-Tiitto R 1985.** Phenolics constituents in the leaves of northern willows: methods of analysis of certain phenols. *J. Agric. Sci.* **131**:221-228

**Jung H.G. et Buxton D.R. 1994.** Forage quality variations among maize inbred: Relationship of cell wall composition and in vitro degradability of stems internodes. *J. Sci. Food and Agri.* **66**:313-322.

**Khazaal K., Dentinho M.T., Riberio J.M., Orskov E.R. 1993.** A comparison of gas production during incubation with rumen contents *in vitro* and nylon bag degradability as predictors of the apparent digestibility *in vivo* and the voluntary intake of hays. *Anim. Prod.* **57**:105-112.

**Khazaal K.A., Dentinho M.T., Ribeiro J.M. & Orskov E.R. 1995.** Prediction of apparent digestibility and voluntary intake of hay fed to sheep: Comparison between using fibre components, *in vitro* digestibility or characteristics of gas production or nylon bag degradation. *Animal Science*. **61**: 527-538.

**Krishnamoorthy U., Soller H., Steingass H., Menke K.H., 1991.** A comparative study on rumen of energy supplements *in vitro*. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **65**: 28–35.

**Kondo T., Mizono K., Kato T. 1990.** Cell-wall-bound p-coumaric and ferulic acids in Italian ryegrass. *Canadian J. Plant Sci.* **71**: 495-499.

**Lee GJ., Hennessy D.W., Nolan J.V., Leng R.A. 1987.** Responses to nitrogen and maize supplements by young cattle offered a low-quality pasture hay. *Aust. J. Agric. Res.* **38**:195-207.

**Levenberg K 1944.** A Method for the Solution of Certain Non-Linear Problems in Least Squares. *Q. Appl. Math.* **2**:164-168.

**Jouany J.P. Broudiscou L. Prins R A and Komisarczuk-BONY S. 1994 b.** Métabolisme et nutrition de la population microbienne du rumen. In: Nutrition des ruminants domestiques Jouany J.P. (Eds), INRA, Paris pp. 350-381.

**Jouany J-P., Broudiscou L., Prins R.A., Komisarczuk-Bony S. 1995.** Métabolisme et nutrition de la population microbienne du rumen ». In Nutrition des Ruminants Domestiques (R. Jarrige, Y. Ruckebush, C. Demarquilly, M-H Farce, M. Journet Eds), INRA Editions, Versailles, France, pp.349-381.

**Jouany J.P and Ushida K. 1998.** The role of protozoa in feed digestion. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, **12**: 113-128). Et sont très sensibles à la non nutrition et peuvent disparaître en 2 à 3 jours de diète. France, pp.349-381.

**Julkunen-Tiitto R 1985.** Phenolics constituents in the leaves of northern willows: methods of analysis of certain phenols. *J. Agric. Sci.* **131**:221-228

**Jung H.G. et Buxton D.R. 1994.** Forage quality variations among maize imbred: Relationship of cell wall composition and in vitro degradability of stems internodes. *J. Sci. Food and Agri.* **66**: 313-322.

**Khazaal K., Dentinho M.T., Riberio J.M., Orskov E.R. 1993.** A comparison of gas production during incubation with rumen contents *in vitro* and nylon bag degradability as predictors of the apparent digestibility *in vivo* and the voluntary intake of hays. *Anim. Prod.* **57**:105-112.

**Khazaal K.A., Dentinho M.T., Ribeiro J.M. et Orskov E.R. 1995.** Prediction of apparent digestibility and voluntary intake of hay fed to sheep: Comparison between using fibre components, *in vitro* digestibility or characteristics of gas production or nylon bag degradation. *Animal Science.* **61**: 527-538.

**Krishnamoorthy U., Soller H., Steingass H., Menke K.H., 1991.** A comparative study on rumen of energy supplements in vitro. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **65**: 28–35.

**Kondo T., Mizono K., Kato T. 1990.** Cell-wall-bound p-coumaric and ferulic acids in Italian ryegrass. *Canadian J. Plant Sci.* **71**: 495-499.

**Lee G.J., Hennessy D.W., Nolan J.V., Leng R.A. 1987.** Responses to nitrogen and maize supplements by young cattle offered a low-quality pasture hay. *Aust. J. Agric. Res.* **38**:195-207.

**Levenberg K. 1944.** A Method for the Solution of Certain Non-Linear Problems in Least Squares. *Q. Appl. Math.* **2**:164-168.

**Leinmuller E., Steingass H., Menke K.H. 1991.** Tannins in ruminant feedstuffs. *Anim. Research and Development.* **33** : 9-53.

**Leulmi N. (2011).** La valorisation nutritionnelle des margines et de leur impact sur la réduction de la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. *Mémoire de Magister.* Université Mentouri Constantine, 75p.

**Liu J.X., Susenbeth A., et Sudekum K.H. 2002.** *In vitro* gas production measurements to evaluate interactions between untreated and chemically treated rice straws, grass hay, and mulberry leaves. *J. Anim. Sci.* **80**:517-524.

**Long R.J., Apori S.O., Castro F.B. et Orskov E.R. 1999.** Feed value of native forages of the Tibetan Plateau of China. *Anim. Feed Sci. Technol.* **80**:101-113.

**Lopez-Guisa J.M. ,Weimer P.J., Frensh A.D. 1990.** Effect of cellulose fibre structure on kinetics of its digestion by mixed ruminal microorganisms in vivo. *Applied Environmental Microbiology.* **56**(8): 2421-2429.

**Mehrez A.Z. et Orskov E.R. 1977.** The use of a Dacron bag technique to determine rate of degradation of protein and energy in the rumen. *J. of Sci. Agri. Cambridge.* **88** : 645-650.

**Makkar H.P.S., Blümmel M., Borowy N.K. et Becker K. 1993.** Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.* **61**:161-165.

## ANNEXES

Full Length Research Paper

# Study of associative effects of date palm leaves mixed with *Aristida pungens* and *Astragalus gombiformis* on the aptitudes of ruminal microbiota in small ruminants

Deffairi Djamila\* and Arhab Rabah

Department of Food Sciences, Blida University, Algeria.

Received 22 September 2015, Accepted 27 June, 2016

The objectives of this trial were to evaluate interactions between microbial degradation of three substrates: date palm leaves as tannin-rich substrate, *Astragalus gombiformis* (as nitrogen source) and *Aristida pungens* (as carbon source). The model included the principal effects of single substrate and mixtures of multiple interactions. The forages were fermented alone or mixed with date palm leaves in various combinations (0, 10, 20, 30, 40 and 50%), in buffered rumen fluid using *in vitro* gas techniques. Gas production (mmol/g of dry matter) at 3, 6, 9, 24, 48 and 72 h of incubation was measured from all feed combinations. Treatments were carried out in triplicate and data were submitted to analysis of variance using a mixed procedure with repetition considered as the random effect. The interactions between feeds were evaluated on the basis of differences between single and mixed substrates on the different variables measured. The results showed that the included palm leaves reduced gas production when associated with *A. pungens* ( $p < 0.0001$ ), whereas this effect was less significant with *A. gombiformis*. This effect was more pronounced at earlier times of incubations. The *in vitro* organic matter digestibility decreased linearly with the increasing inclusion of date palm leaves in the mixtures. It is concluded that date palm leaves may be a suitable feed supplement for small ruminants browsing *A. pungens* and *A. gombiformis* in arid regions. The present results also showed that the inclusion level should be lower than 20% and for a short period in order to minimise tannins effect. The description of the fermentation profile of *in vitro* gas production showed that Sandoval model was poor and not appropriate for the characteristic varieties of arid and semi-arid areas in Algeria and the multiple regression models revealed a good linear regression for both mixtures.

**Key words:** Date palm leaves, forage, semi-arid zone, associative effects, rumen, *in vitro* fermentation.

## INTRODUCTION

The problem of forage availability and quality of animal feed are aggravated in arid, semi-arid and tropical

regions and because of the scarcity and irregular rainfall that limit the growth of herbaceous species and biomass

\*Corresponding author. Email: deffairi.reu@Yahoo.fr.

yield in rangelands. Thus, breeding in these regions have to survive the shortage of insufficient resources for most parts of the year (Robles et al., 2008; Boufennara et al., 2012). In semi-arid regions, and in the dry season, crude protein content of the herbaceous rangeland vegetation decreases significantly which induces a prolonged period of under-nutrition of livestock (Yayneshet et al., 2009). In developing countries where food resources for food and feed are deficient, only low quality forages, crop residues and agro-industrial by-products available are used for feeding ruminants. Under these conditions, the use of supplementation is inevitable. This pathway provides to the rumen microorganisms the nutritive elements necessary for their growth, thus ensuring the favorable conditions for cellulolysis in the rumen (Moujahed et al., 2000).

In Algeria, the rangelands represent two-thirds of the total land widespread, mainly in the arid regions. Some species may be crucial for grazing ruminants where these plants contain anti-nutritional secondary compounds (phenolics and tannins) with potential side effects such as inhibition of rumen microbial fermentation, as well as decreased feed digestibility and animal performance (Min et al., 2003; Waghorn and McNabb, 2003; Mueller-Harvey, 2006).

In oasis areas, local farmers often offer date-palm leaves as a supplement for ruminants in spite of their high tannin content (Arhab et al., 2006). The anti-nutritive effect of dry leaves of the date palm has been studied in animal models of ruminants and mono-gastric and it seems that both reduced digestibility and toxicity may limit the potential of this plant as a feed supplement. The nutritional value of date palm crop residues has been quite extensively studied due to their high availability in the countries where date production is important (Alananbeh et al., 2015). Both the energy and protein values of these by-products are low as compared to that of cereal straw (Arbouche et al., 2008). However, no study has been conducted on the associative effect of palm leaves with other forage on *in vitro* fermentation.

The influence of different feed ingredients on rumen microbial activity can be variable and contradictory. For instance, increasing the level of cereal grain supplementation reduced ruminal fermentation of fiber (Mould et al., 1983a), whereas supplementation of alfalfa hay with corn stalks resulted in positive associative effects on N utilization that caused reduced intake of corn stalk (Wang et al., 2008). Rations formulated for ruminants are generally a mixture of individual feeds, and its net (NE) or metabolizable (ME) energy value is generally calculated by adding up the energy values of the individual feeds in it, on the hypothesis that the NE or ME value of individual feeds will be unchanged when they are fed in combination with other feeds. This assumption may not be true, as some published reports indicated that a level of association exists among feeds in rations (Dixon and

Stockdale, 1999; Franci et al., 1997; Haddad, 2000; Hong et al., 2001, 2002; Mould et al., 1983a, b; Wang et al., 2008). However, while associative effects are often discussed in ruminant nutrition, at least theoretically, they are seldom taken into account in feed formulation. While the meaning of an associative effect is clear (the sum of the parts being less, or more, than the combination of the parts), reasons for an associative effect are not clear. On the other hand, a true associative effect does not relate to correction of a known nutrient deficiency, such as fermentable N, but to unknown (or obscure) nutrient interactions.

In 1979, Menke et al. proposed an estimation of the energy value of feedstuffs from their *in vitro* gas production associated with chemical parameters. The gas test (HFT or Hohenheimer Futterwert Test) method is based on the assumption that the accumulated 24 h gas production by a substrate, incubated in a syringe with rumen liquor and a nutritive solution, is proportional to the amount of digestible carbohydrates, and thus highly correlated to the energy value of feedstuffs or to the *in vivo* organic matter digestibility (OMD).

The objectives of this study were to (i) investigate the associative effects on fermentation abilities of ruminal microbiota of sheep and gas production of plant leaves of the date palm and characteristics of two perennial plants in arid zones: *Astragalus gombiformis* and *Aristida pungens* (*Stipagrostis pungens*) mixed with different combinations and (ii) establish an interaction between the main components of different substrates.

## MATERIALS AND METHODS

### Forage material

Forages were collected from El Oued, located in South-East area of Algeria. The climate of this region is arid with a mean annual rainfall of 75 mm, and average temperature of 1°C in January and 43°C in July.

The studied forages consisted of two native species of North Africa: *A. gombiformis* (Foulet el lbel), rich in protein (Arhab, 2006), *A. pungens* (*Stipagrostis pungens*) (drinn) rich in fibers (Arhab, 2006) and a by-product of the date palm: the leaves, rich in tannins (Arhab, 2006). These plants were harvested at a mature stage while date palm leaves were harvested at senescence. About six to ten specimens of each plant species were sampled to obtain a representative sample of the plant biomass.

The aerial part of the plants, leaves, thin branches (young stems) and some flowers (when existing) were clipped with scissors and taken immediately to the laboratory where the samples from the different specimens were pooled and dried in an circulating air oven at 60°C for 48 h. The samples were then coarsely ground in a laboratory using a chopper and were then ground again and passed through a 1 mm screen; the latter are mixed with the leaves of date palm at different percentages (0, 10, 20, 30, 40, 50 and 100%).

### Animal material

The experiment was conducted on three Texel (origin of these

sheep Texel island) (breed of sheep), aged 12 months and an average live weight of 82 kg, deemed healthy by veterinary control, castrated and fitted with ruminal fistula. The animals were housed in individual pens. These subjects received a daily ration of 1200 g of oat vetch hay in two equal meals (8:00 am and 4:00 pm) with free access to water. Two weeks adaptation period were planned to allow a good adaptation of ruminal microbiota.

## Analysis methods

### Chemical analysis

The determination of the dry matter (DM) and organic matter of samples was conducted following the methods of AOAC (1999, 942.05 method ID). The analysis of the compounds of the plant cell wall was performed as described by Van Soest et al. (1991). The crude protein content of plants on one hand and content of crude protein associated with the fraction of neutral detergent fiber (NDF neutral detergent fiber) on the other were determined by the Kjeldahl method.

All determinations were conducted in triplicate and expressed as a percentage of DM. Phenolics were determined by addition of two or three drops of ferric chloride ( $\text{FeCl}_3$ ) in 1 ml of the methanol extract that was diluted in 50% of distilled water. The change in color indicated the presence of phenolic compounds as follows: no change indicates absence of phenolic compounds, dark blue indicates presence of phenols or hydrolysable tannins, and dark green indicates presence of condensed tannins. The method followed was Folin-Ciocalteu as described in Julkunen-Tiitto (1985).

### Quantitative analysis of phenolic compounds

Total phenols (TP) and total condensed tannins (TCT) was dosed separately.

**Total Phenols (TP):** The phenolic compounds analysis was carried out in three replicates. The dried plant material (200 mg) was extracted with acetone (10 ml, 70% v/v), then the solution was subjected, at ambient temperature for 20 min, to ultrasonic treatment. The content was centrifuged (4°C, 10 min and 3000 g) and stored in ice for analysis, then the centrifugate was treated as described above. The total phenols were estimated using Folin Ciocalteu reaction (Makkar et al., 1993). Tannic acid was used to perform calibration curve. TP was quantified as tannic acid equivalents and expressed as tannic acid eqg/kg DM.

**Tanins:** For the total condensed tannins (TCT), 0.5 ml of extract was treated with n-Butanol HCl (3 ml, 95%) in the presence of ferric ammonium sulfate (0.1 ml). The reactants were heated for 1 h in a boiling water bath. Absorbance was read at 550 nm. TCT were expressed as leucocyanidin using the equation:

$$\text{TCT} = A \times 78.26 \times (\text{dilution factor}) / (\text{weight of sample on DM})$$

where: A is the absorbance at 550 nm assuming that E1% efficiency, 1 cm, 550 nm is 460 leucocyanidin (Porter et al., 1986). Total tannins (TT) were determined as the difference in total phenolic compounds (measured by Folin-Ciocalteu reagent) before and after treatment with insoluble polyvinylpyrrolidone (Makkar et al., 1993).

### In vitro study

The *in vitro* fermentation inoculum was obtained from the filtered

rumen juice taken from three sheep. This juice was mixed to obtain a homogeneous inoculum. Ruminal fluid was collected 1 h before the morning meal, placed in a container preheated to 39°C and saturated with  $\text{CO}_2$ . This container was sealed immediately and transported to the laboratory for further analysis within 2 h of collection (Menke et al., 1979).

Sheep rumen fluid was mixed well, then filtered through four layers of muslin and bubbled with  $\text{CO}_2$  at 39°C. All the handling was carried out under a constant stream of  $\text{CO}_2$ . The activity of ruminal microbiota requires an anaerobic and the solution was bubbled with a continuous flow of  $\text{CO}_2$ , resulting in the reduction of artificial saliva indicated by the color change from pink to transparent.

### In vitro fermentation of forages by rumen microbiota

The technique followed was that of Theodorou et al. (1994). *In vitro* gas production technique is a simulation of food degradation by the rumen microflora. At the end of fermentation, the gas is measured using a pressure transducer (Delta Ohm DTP704-2BGI, Herter Instruments SL). It is a simple and inexpensive technique, based on the measurement of gas production.

### In vitro gas production

The method of Theodorou et al. (1994) was used for gas production. Four hundred milligrams of each feed were weighed into bottles of 125 ml serum and incubated in a water bath at 39°C with 15 ml of ruminal fluid and 25 ml of artificial saliva (Van Soest, 1994). Monitoring fermentation kinetics was performed by measuring the gas pressure produced at different incubation hours: 3, 6, 9, 24, 48 and 72 h.

### Statistical analysis

The evolution of gas production was followed according to the incubation time and the percentage of *A. pungens* or *A. gombiformis* in nutrient mixtures. A factorial ANOVA (the factorial ANOVA is based on design S <A\*B> treating the effects of two crossed factors. The groups are assumed to be independent in each of the conditions defined by the intersection of two factors. The sources of variation to take into account are the factors A (time) and B (percentage) and optionally AB (time\*percentage) interaction) was performed to find out the effects of the incubation time, the percentage of added plants and their mutual interaction on gas production. A fermentation profile model from the literature, based on Levenberg-Marquardt algorithm (Levenberg, 1944; Marquardt, 1963) which is an improvement of the Gauss-Newton method for the resolution of nonlinear least-squares regression problems, was tested. Then, a multiple regression was performed to determine the equation giving the best estimate of gas production based on the independent variables and their interaction. Statistical analyses were conducted with Statistica 10, Statsoft Inc, Tulsa, USA.

## RESULTS AND DISCUSSION

### The chemical composition of forages

The chemical composition of the substrates is shown in Table 1. There was a change in all nutrient elements of forages. The highest fiber content was recorded in *A. pungens* (*Stipagrostis pungens*) (509.4 g/kg DM),

**Table 1.** Chemical composition of simple fodder (in g/kg DM).

Forages	DM	CP	NDF	ADF	ADL	TP	TT	TCT	PPC
<i>A. gombiformis</i>	551.7	125.0	614.9	445.2	78.1	34.0	21.3	4.0	ND
<i>A. pungens</i>	797.3	53.6	794.7	509.4	84.4	2.4	1.6	3	ND
Date palm leaves	896.3	59.5	586.1	422.1	97.1	61.8	49.1	36.2	55.5

DM, Dry matter; CP, crude protein; NDF, neutral detergent fibre; ADF, acid detergent fibre; ADL, lignin determined by solubilisation of cellulose with sulphuric acid; TP, total phenols; TT, total tannins; TCT, total condensed tannins; PPC, protein precipitating capacity.

followed by *A. gombiformis* (445.2 g/kg DM) and the leaves of dry palms (422.1 g/kg DM). The highest crude protein content was noted in *A. gombiformis* (125 g/kg DM) followed by palm leaves (45.9 g/kg DM). Regarding phenolic compounds (total phenols, TT and TCT) were 61.8, 49.1 and 36.2 g/kg DM for dry palm leaves, by *Astragalus* and *A. pungens*, respectively. The change in the mineral and organic elements concentration for the studied plants was strongly associated with the type of soil, climate, stage of maturity and harvest season genotypic characteristics, and the factors affecting the nutritional properties of forages (Arhab, 2007; Bahman et al., 1997; Pascual et al., 2000; Genin et al., 2004; Ramirez et al., 2004; Ammar et al., 2004).

According to the level of crude protein, *A. gombiformis* had high nitrogen level; in fact it was richer than the green forage such as *Setaria sphacelata* in which nitrogen content was between 47.4 and 69.2 g/kg of DM (Rakotozandriny, 1993). However, *A. gombiformis* is considered as the most digestible plant with a high content of crude protein (125 g/kg DM), which shows that the forage resource has an interesting nutritional potential for ruminants (Boufennara, 2012). On the other hand, Pascual et al. (2000) and Genin et al. (2004) showed that the high level of protein in *A. gombiformis* indicates its possible use as a protein supplement for ruminants.

The high content of the cell wall could be preserved because of the climate in the arid zone. In general, high temperatures and low rainfall tend to increase cell wall polysaccharides and decrease the soluble carbohydrates (Pascual et al., 2000).

The concentration of phenolic compounds varies considerably among plant species, the highest levels were observed in the dry leaves of the date palm. This could be due to the fact that the radial diffusion method, based on the measurement of the potential biological activity of tannins in food, will depend on the bonding force of the tannins and their mode of binding to the protein (Frazier et al., 2003), while chemical methods, based on the chemical properties of tannins, indicate the chemical nature of tannins (Silanikove et al., 1996).

### Chemical composition of mixtures

For mixtures, it was noticed that the addition of palm

leaves increased the DM level especially the level of tannins (TT and TCT) of mixtures and reduced the levels of fiber and crude protein in proportion to percentages (Tables 2 and 3). This can be explained by the ability of tannins to form complexes with proteins and therefore the fall of the levels of proteins (Dalzell and Kerven, 1998).

Furthermore, it was found that for less percentage of mixtures (10-20%), TCT and TT levels were low, 7.22-10.44 and 24.08-26.86 g/kg DM, respectively, while the level of total nitrogen contents was higher (118.5 and 111.9 g/kg DM) in the palm leaves mixture and *A. gombiformis* as compared to those obtained in the leaves of date palm only.

For the mixture of date palm leaves and *A. pungens*, it was noted that at the same percentage of incorporation, the level of the nitrogen material was low as compared to the first mixture (54.2-54.8 g/kg DM) while the tannins levels were similar for both mixtures. According to a research carried out by Paterson et al. (1996), forages which have MAT contents below 70 mg/g DM require nitrogen supplementation to improve their ingestion by ruminants.

### Gas production

The gas production of mixture of the date palm leaves with *A. pungens* (*S. pungens*) or *A. gombiformis* at different percentages of fermentation for individual substrates and mixtures are presented in Figures 1 and 2. The results of factorial ANOVA showed that adding palm leaves decreased gas production when they were associated with *A. pungens*, with significant effects ( $P < 0.0001$ ), whereas, this effect was significant but less pronounced with *A. gombiformis*. For the mixture of the leaves of date palms with palm *A. pungens*, a highly significant effect of time ( $F=1341.6$ ,  $p<0.0001$ ), percentage ( $F=23.64$ ,  $p<0.0001$ ) and interaction of time with percentage ( $F=7.28$ ,  $p<0.0001$ ) was found.

For the mixture of the leaves of date palms with *A. gombiformis*, there was a highly significant effect of time ( $F=323.5$ ,  $p<0.0001$ ), percentage ( $F=10.84$ ,  $p<0.0001$ ) while no effect of interaction of time with percentage ( $F=0.78$ ,  $p=0.785>0.05$ ) was found.

Indeed, there is an increase in the amount of gas generated as a function of time. The cumulative volume

**Table 2.** Chemical composition of the mixture (*Aristida* and palm leaves).

	<i>A. pungens</i>	Feuilles	0% Palm	10%	20%	30%	40%	50%	100%
MS g/kg	7973	8963	797,3	807,2	817,1	827	836,9	846,8	896,3
MM g/kg	119,6	109,5	119,6	118,6	117,6	116,6	115,6	114,6	109,5
Azote	8,56	9,5	8,56	8,65	8,75	8,84	8,94	9,03	9,5
MAT (Nx6,25)	53,6	59,5	53,6	54,2	54,8	55,4	56	56,6	59,5
N-NDF	3,75	5,3	3,75	3,91	4,06	4,22	4,37	4,53	5,3
Azote libre	4,81	4,2	4,81	4,75	4,69	4,63	4,57	4,51	4,2
NDF	794,7	568,1	794,7	772	749,4	726,7	704,1	681,4	568,1
ADF	509,4	422,1	509,4	500,7	491,9	483,2	474,5	465,8	422,1
Hémicelluloses	285,3	164,9	285,3	273,3	261,2	249,2	237,1	225,1	164,9
ADL	84,4	97,1	84,4	85,7	86,9	88,2	89,5	90,8	97,1
Cellulose	425	324	425	414,9	404,8	394,7	384,6	374,5	324
TP	2,4	61,8	2,4	8,34	14,28	20,22	26,16	32,1	61,8
TT	1,6	49,1	1,6	6,35	11,1	15,85	20,6	25,35	49,1
TCT	3	36,2	3	6,32	9,64	12,96	16,28	19,6	36,2
PPC	ND	55,45	ND						55,45

**Table 3.** The chemical composition of mixture of *A. gombiformis* and palm leaves.

	<i>A. gombiformis</i>	Feuilles	0% Palm	10%	20%	30%	40%	50%	100%
MS g/kg	551,7	896,3	551,7	586,2	620,6	655,1	689,5	724	896,3
MM g/kg DM	231,7	109,5	231,7	219,5	207,3	195	182,8	170,6	109,5
Azote	20	9,5	20	18,95	17,9	16,85	15,8	14,75	9,5
MAT (Nx6,25)	125	59,5	125	118,5	111,9	105,4	98,8	92,3	59,5
N-NDF	6,4	5,3	6,4	6,29	6,18	6,07	5,96	5,85	5,3
Azote libre	13,6	4,2	13,6	12,66	11,72	10,78	9,84	8,9	4,2
NDF	614,9	568,1	614,9	610,2	605,5	600,9	596,2	591,5	568,1
ADF	445,2	422,1	445,2	442,9	440,6	438,3	436	433,7	422,1
Hémicelluloses	122,7	164,9	122,7	126,9	131,1	135,4	139,6	143,8	164,9
ADL	78,1	97,1	78,1	80	81,9	83,8	85,7	87,6	97,1
Cellulose	356,4	324	356,4	353,2	349,9	346,7	343,4	340,2	324
TP	34	61,8	34	36,78	39,56	42,34	45,12	47,9	61,8
TT	21,3	49,1	21,3	24,08	26,86	29,64	32,42	35,2	49,1
TCT	4	36,2	4	7,22	10,44	13,66	16,88	20,1	36,2
PPC	ND	55,45	ND						55,45

of gas increased with the increase of incubation time (Figures 1 and 2). Significant differences in gas production were found between the substrates for all the incubation times. Gas production decreased in the presence of dry palms; this could be explained by the fact that they contained substances (tannins) that affect the hydrolytic way (enzymes) of *A. pungens* (mainly cellulose enzymes) (Sweeney et al., 2001). The best gas production can be obtained at high time but for low palm percentages (10 and 20%); according to Robinson et al. (2009). Gas production was much more pronounced in the early hours of incubation with mixture levels of 15 to

25%; this effectively proves that the incorporation of dry palms inhibited *A. pungens* degradation by ruminal microbiota. This can be explained by the chemical composition of dry palms in tannins. Indeed, effects of this are well established on fermentation activity. According to McSweeney et al. (2001), tannins can directly influence the ruminal microbiota and enzyme activity; in fact, condensed tannins exert an inhibitory action on growth of rumen microorganisms. Furthermore, Makkar and Becker (2009) suggested that TT have an influence on the reduction of methane production.

Unlike the association of palms-drinn, palms did not

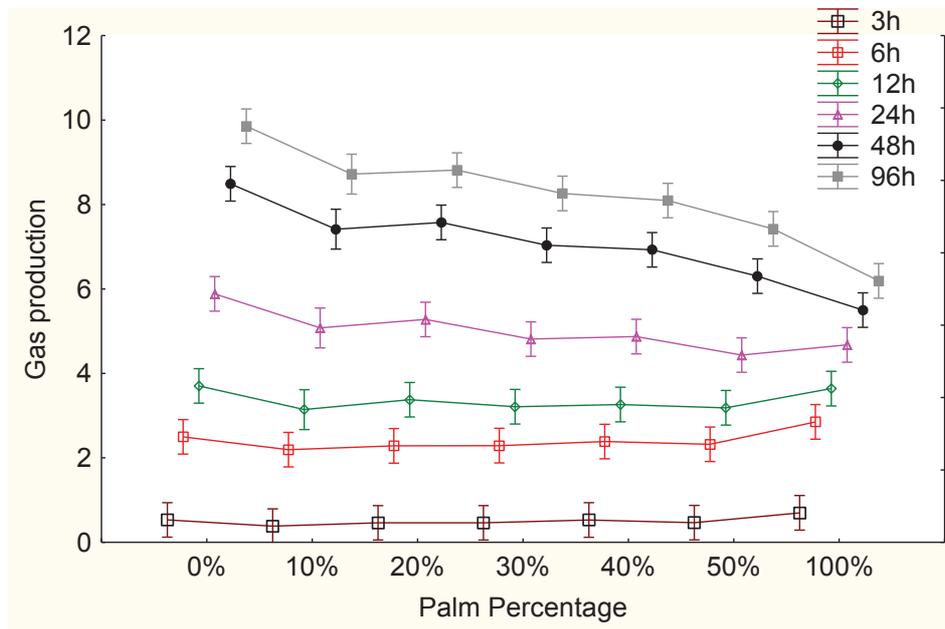


Figure 1. Gas production based on percentage of date palm leaves and *A. pungens* (*S. pungens*) at different times.

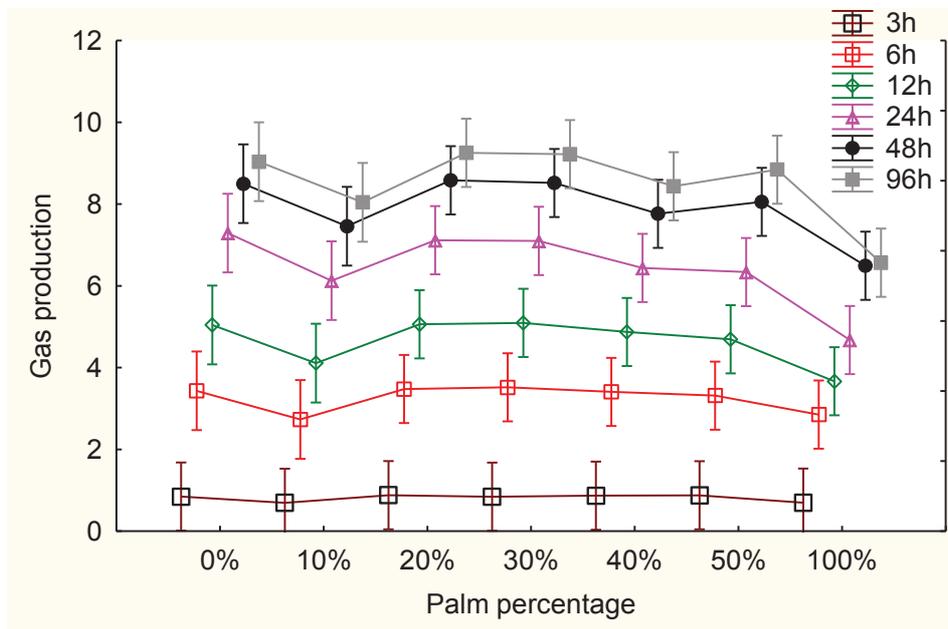


Figure 2. Gas production based on percentage of date palm and *A. gombiformis* at different times.

affect the fermentation of *A. gombiformis*. This may be explained by the fact that dry palms, rich in tannins, do not affect the proteolytic enzymes (specificity of action

and structure), or that the chemical composition of *A. gombiformis* limits the effects of palm leaves on the fermentation parameters. *A. gombiformis* is rich in

**Table 4.** Results of the Levenberg-Marquardt estimation method with convergence criteria at  $10^{-9}$ .

Mixture (% Drinn)	a	b	R <sup>2</sup>	Mixture (% <i>A. gombiformis</i> )	a	b	R <sup>2</sup>
0	-3.765	8.551	0.961	0	-4.154	9.234	0.961
50	-2.896	7.958	0.937	50	-7.490	13.924	0.973
60	-3.702	9.162	0.945	60	-7.066	13.402	0.973
70	-3.276	8.764	0.936	70	-7.054	13.864	0.970
80	-3.512	9.351	0.936	80	-8.031	14.941	0.973
90	-2.432	7.935	0.905	90	-4.953	10.984	0.948
100	-4.499	10.932	0.945	100	-7.418	14.236	0.965

a and b are the two coefficients of  $(\text{Gas prod})=a+b(1-e^{-kt})$ , where k is the hourly rate of the gas production (%.t), t the time (h), R<sup>2</sup> is the coefficient of determination.

nitrogen matter, it generates the production of biomass. Indeed, the degradation of crude protein of *A. gombiformis* generates biomass production. Liu et al. (2002) demonstrated in an *in vitro* system, that an amount of nitrogen is sufficient to sustain microbial growth. In addition, it has been shown that the nitrogen can make only a small contribution to gas production. According to McSweeney (2001), the nitrogen digestibility in ruminants reported favorable responses when providing as supplement. Wang et al. (2008) had shown that supplementation with nitrogen increase digestibility of forage.

Our results are consistent with those reported by Aregheore et al. (2000), Long et al. (1999) and Khazaal et al. (1993). These authors report that the contribution of the total nitrogenous matter (MTA) on gas production is not a significant influencing factor. This suggests an intensification and stimulation of rumen fermentation activity of the microbiota when the latter is in the presence of a food rich in nitrogen and energy (Tendonkeng, 2004; Getachew et al., 2000 and Florence et al., 1999).

Otherwise, supplementation with greater amounts of energy-rich feeds with a source of protein could reduce the time taken to finish cattle for market and increase profitability. Numerous reports in the literature indicate substantial increases in live weight (LW) gain by supplementing cattle consuming low digestibility forages with energy and protein supplements (Hennessy and Murrison, 1982; Lee et al., 1987; Hennessy et al., 1995).

A positive effect on associative gas production has been reported when the leaves of forage trees were mixed with concentrate diets (Sandoval-Castro et al., 2002) and when the straw was mixed with tree leaves (Liu et al., 2002).

### Modeling of gas production

The model of Sandoval-Castro (2000) was used for the

description of the fermentation profile of the *in vitro* gas production. Therefore, the authors tried to stimulate the development of gas production according to the equation:  $(\text{Gas Prod}) = a + b(1 - e^{-kt})$  based on the percentage of *A. pungens* or *A. gombiformis*. The estimation method is that of Levenberg-Marquardt where a and b were two coefficients to be determined, k the hourly rate of gas production (%.t) and t the time. The results are summarized in Table 4. The coefficients determination R<sup>2</sup> were always >0.90. Negative values of "a" (Orskov and Ryle, 1990) were noted. According to several authors, a negative value of "a" is the result of the existence of a latent phase during which microorganisms attach and colonize food particles before any damage is detectable (Ahmed and El-Hag, 2004). This could also indicate the difficulty of ruminal microbiota to degrade these substrates and the need for an adjustment period so that it begins this degradation.

Despite the values of negative "a" and high coefficients of determination R<sup>2</sup>>0.90, the convergence remained mediocre. Accordingly, this theoretical model remains poor, inflexible and not suitable for varieties of arid and semi arid areas. This mathematical model does not apply to plants of Saharan zones. That is why the authors proposed the model of multiple regression (Figures 3 and 4) with a relationship type  $\text{Gas Production} = a + bt + cP + dPt$  for the two mixtures where a, b, c and d are constant coefficients to be determined, t the time (h) and P the percentage of *A. pungens* or *A. gombiformis*. The analysis showed a good regression with multiple r = 0.896, with highly significant effects of t and interaction Pt (p<0.0001), but with non sensible effect of the percentage (p=0.365).  $\text{Gas Production} = 2.332 + 0.045t - 0.395P + 0.0453Pt$  for mixtures of leaves palm/*A. pungens*. For the palm mixture with *A. gombiformis*, a good regression with multiple r = 0.799, with significance of t (p<0.001), but with no sensible effect of P or interaction Pt (p=0.41 and p=0.10 respectively) was found. The equation was  $\text{Gas Production} = 2.723 + 0.0548t + 0.518P + 0.0233Pt$ . So, the regression model can be considered as available

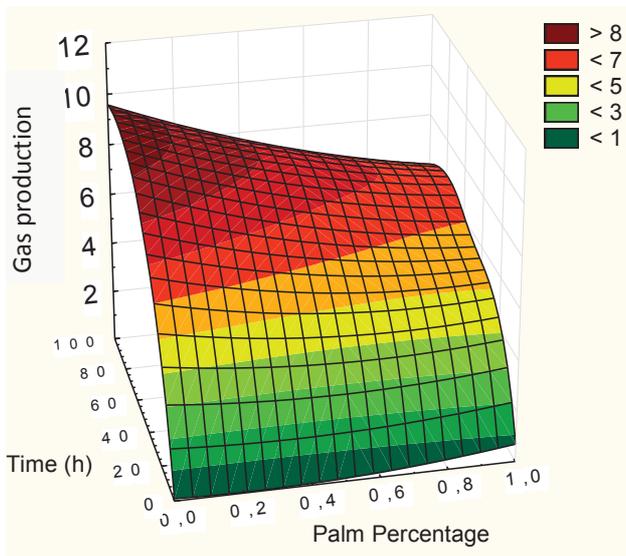


Figure 3. Rate of gas production of dry palm leaves and *A. pungens* mixtures.

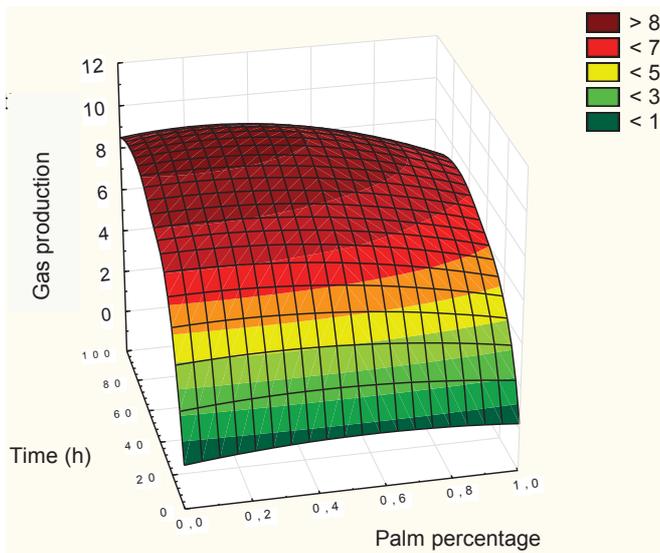


Figure 4. Rate of gas production of dry palm leaves and *A. gombiformis* mixtures.

for both mixtures.

## Conclusion

This study has shown that associative effects on *in vitro* gas production are consistently higher when the leaves of the date palm were incubated with *A. gombiformis* than

with *A. pungens* (*S. pungens*). In addition, palm leaves can be a food supplement suitable for small ruminants browsing *A. gombiformis* or *A. pungens* (*S. pungens*) in arid regions. The present study results also demonstrated that the percentages of the incorporated palm leaves had to be less than 20% and for short periods in order to minimize the effect of tannins. The description of the fermentation profile of *in vitro* gas production revealed that Sandoval (2000) model is poor and therefore not appropriate for the characteristics of varieties of arid and semi-arid areas in Algeria, whereas the model of multiple regression has revealed a good linear regression for the two types of mixtures.

## Conflict of Interests

The authors have not declared any conflict of interests.

## REFERENCES

- Ahmed MMM, El-Hag FM (2004). Degradation characteristics of some Sudanese forages and tree pods *in sacco* and gas production techniques. *Small Ruminant Res* 54:147-159.
- Ammar H, Lopez S, Gonzalez JS, Ranilla MJ (2004). Seasonal variation in the chemical composition and *in vitro* digestibility of some Spanish leguminous shrubs species. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115:327-340.
- AOAC (1999). In: Cunniff P, (Ed.), *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 16<sup>th</sup> ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- Alananbeh KM, Bouqellah NA, Al Kaff NS (2014). Cultivation of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* on date-palm leaves mixed with other agro-wastes in Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci.* 21:616-625.
- Arbouche S, Arbouche HS (2008). Date by-products from south-east Algeria: effects of treatment with urea and thz mode of storage on their chemical composition and digestibility. *Livest. Res Rural Dev.* 20(6):97.
- Aregheore EM (2000). Chemical composition and nutritive value of some tropical by-product feedstuffs for small ruminant *in vivo* and *in vitro* digestibility. *Anim. Feed Sci. Technol.* 85:99-109.
- Arhab R (2006). Study of the *in vitro* fermentability and *in vivo* digestibility of plants of arid zones and sub-Saharan agronomy products by estimating the metabolic activity of ruminal microbiota of sheep. PhD thesis. Mentouri University of Constantine.
- Arhab R (2007). Etude de la fermentescibilité *in vitro* et de la digestibilité *in vivo* de végétaux des zones arides et de sous produits de l'agronomie saharienne par l'estimation de l'activité métabolique du microbiote ruminal d'ovins. Thèse de Doctorat. Université Mentouri Constantine. Algérie. 204 p.
- Bahman AM, Topps JH, Rooke JA (1997). Use of date palm leaves in high concentrate diets for lactating Friesian and Holstein cows. *J. Arid Environ.* 35:141-146.
- Boufennara S, Lopez S, Bousseboua H, Bodas R, Bouazza L (2012). Chemical composition and digestibility of some browse plant species collected from Algerian arid rangelands. *Span. J. Agric. Res.* 10(1):88-98.
- Dixon RM, Stockdale CR (1999). Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilisation. *Aust. J. Agric. Res.* 50:757-774.
- Florence VN, Ndlovu LR, Dzowela BH (1999). Relationships between *in vitro* gas production characteristics, chemical composition and *in vivo* quality measures in goats fed tree fodder supplements. *Small Ruminant Res.* 31:117-126.
- Franci O, Antongiovanni M, Acciaoli A, Bruni R, Martini A (1997).

- Response surface analyses of the associative effects of lucerne hay, wheat straw and maize gluten feed on growing lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 67:279-290.
- Frazier RA, Papadopoulou A, Mueller-Harvey I, Kisson D, Green RJ (2003). Probing protein-tannin interactions by isothermal titration microcalorimetry. *J. Agric. Food Chem.* 51:5189-5195.
- Genin D, Kadria A, Khorchani T, Sakkal K, Belgacem F, Hamadi M (2004). Valorisation of date palm by-products for livestock feeding in southern Tunisia. Potentialities and traditional utilization. In: Ben Salem H, Nefzaoui A, Morand-Fehr P (Eds.), *Nutrition and feeding strategies of sheep and goats under harsh climates*. CIHEAM, Cahiers Options Méditerranéennes 59:221-226.
- Getachew G, Makkar HPS, Becker K (2000). Tannins in tropical browses: Effects on *in vitro* microbial fermentation and microbial protein synthesis in media containing different amounts of nitrogen. *J. Agric. Food Chem.* 48:3581-3588.
- Haddad SG (2000). Associative effects of supplementing barley strawdiets with alfalfa hay on rumen environment and nutrient intake and digestibility for ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87:163-171.
- Hennessy DW, Murrison RD (1982). Cottonseed meal and molasses as sources of protein and energy for cattle offered low quality hay from pastures of the north coast of New South Wales. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 22:140-146.
- Hennessy DW, Kohun PJ, Williamson PJ, Brown DA, Nolan JV (1995). The effect of nitrogen and protein supplementation on feed intake, growth and digestive function of steers with different *Bos indicus*, *Bos taurus* genotypes when fed a low quality grass hay. *Aust. J. Agric. Res.* 46:1121-1136.
- Hong D, Ragland D, Adeola O (2001). Additivity and associative effects of metabolizable energy and amino acid digestibility in barley and canola meal for white pekin ducks. *Poult. Sci.* 80:1600-1606.
- Hong D, Ragland D, Adeola O (2002). Additivity and associative effects of metabolizable energy and amino acid digestibility of corn, soybean meal, and wheat red dog for white pekin ducks. *J. Anim. Sci.* 80:3222-3229.
- Julkunen-Tiitto R (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods of analysis of certain phenols. *J. Agric. Sci.* 131:221-228.
- Khazaal K, Dentinho MT, Riberio JM, Orskov ER (1993). A comparison of gas production during incubation with rumen contents *in vitro* and nylon bag degradability as predictors of the apparent digestibility *in vivo* and the voluntary intake of hays. *Anim. Prod.* 57:105-112.
- Lee GJ, Hennessy DW, Nolan JV, Leng RA (1987). Responses to nitrogen and maize supplements by young cattle offered a low-quality pasture hay. *Aust. J. Agric. Res.* 38:195-207.
- Levenberg K (1944). A Method for the Solution of Certain Non-Linear Problems in Least Squares. *Q. Appl. Math.* 2:164-168.
- Long RJ, Apori SO, Castro FB, Orskov ER (1999). Feed value of native forages of the Tibetan Plateau of China. *Anim. Feed Sci. Technol.* 80:101-113.
- Liu JX, Susenbeth A, Sudekum KH (2002). *In vitro* gas production measurements to evaluate interactions between untreated and chemically treated rice straws, grass hay, and mulberry leaves. *J. Anim. Sci.* 80:517-524.
- Makkar HPS, Blümmel M, Borowy NK, Becker K (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.* 61:161-165.
- Makkar HPS, Becker K (2009). Tannins determined by various methods as predictors of methane production reduction potential of plants by an *in vitro* rumen fermentation system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 150:230-237.
- Marquardt DW (1963). An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 11:431-441.
- McSweeney CS, Palmer B, McNeill DM, Krause DO (2001). Microbial interaction with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91:83-93.
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Shneider W (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. *J. Agric. Sci. Casab.* 97:217-222.
- Min BR, Barry TN, Attwood GT, McNabb WC (2003). The effect of condensed tannins on the nutritive and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 106:3-19.
- Moujahed N, Kayouli C, Thewis A, Beckers Y, Rezgui S (2000). Effects of multinutrient blocks and polyethylene glycol 4000 supplies on intake and digestion by sheep fed *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage-based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 88:219-238.
- Mould FL, Orskov ER, Mann SO (1983a). Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis *in vivo* and dry matter digestion of various roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:15-30.
- Mould FL, Orskov ER, Gauld SA (1983b). Associative effects of mixed feeds. II. The effect of dietary addition of bicarbonate salts on the voluntary intake and digestibility of diets containing various proportions of hay and barley. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:31-47.
- Mueller-Harvey I (2006). Unraveling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 86:2010-2037.
- Orskov ER, Ryle M (1990). Energy nutrition of rumen microorganisms. In: Elsevier Science (Eds.), *Energy Nutrition in Ruminants*, New York, USA., pp. 10-28.
- Pascual JJ, Fernandez C, Diaz JR, Garces C, Rubert-Aleman J (2000). Voluntary intake and *in vitro* digestibility of different date-palm fractions by Murciano-Granadina (*Capra hircus*). *J. Arid Environ.* 45:183-189.
- Paterson J, Cohran R, Klopfenstein T (1996). Degradable and undegradable protein response of cattle consuming forage based diets. *Proc 3<sup>rd</sup> Grazing Livestock Nutrition Conference* (Iundkins MB, MC Collum III FT eds.), *Proc. West Sec. Am. Soc. Anim. Sci.* 47(Supp. 1):94-103.
- Porter LJ, Hrstich LN, Chan BG (1986). The conversion of procyanidin and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25:223-230.
- Rakotozandriny JN, Ratsimbazafy B, Rakotavoa LH (1993). Etude typologique de la valeur nutritive de quelques fourrages chez le bovin à Antsirabe Terre malgache. 23:77-90.
- Ramirez RG, Haenlein GFW, Garcia-Castillo CG, Nunez-Gonzalez MA (2004). Protein, lignin and mineral contents and *in situ* dry matter digestibility of native Mexican grasses consumed by range goats. *Small Ruminant Res.* 52:261-269.
- Robinson PH, Getachew G, Cone JW (2009). Evaluation of the extent of associative effects of two groups of four feeds using an *in vitro* gas production procedure. *Anim. Feed Sci. Technol.* 150:9-17.
- Robles AB, Ruiz-Mirazo J, Ramos ME, Gonzalez-Rebollar JL (2008). Roles of livestock grazing in sustainable use, naturalness promotion in naturalization of marginal ecosystems of southeastern Spain (Andalusia). In: Rigueiro-Rodríguez A, McAdam J, Mosquera-Losada MR, (Eds.), *Agroforestry in Europe, Current status and future prospects series*, Adv Agroforestry, Springer, Netherlands, 6:211-231.
- Sandoval-Castro CA, Capetillo-Leal C, Cetina-Gongora R, Ramirez-Aviles L (2002). A mixture simplex design to study associative effects with an *in vitro* gas production technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 101:191-200.
- Silanikove N, Shinder D, Gilboa N, Eyal M, Nitsan Z (1996). Binding of polyethylene glycol to samples of forages plants as an assay of tannins and their negative effects on ruminal degradation. *J. Agric. Food Chem.* 44:3230-3234.
- Tendonkeng PE, Kana JR, Tendonkeng F, Betfiang ME (2004). Digestibilité *in vitro* de *Calliandra calothyrsus* en présence du Polyéthylène glycol et de *Brachiaria ruziziensis*, *Trypasacum laxum* ou *Pennisetum purpureum* au Cameroun. *Livest. Res. Rural Dev.* 16:7.
- Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:185-197.
- Van Soest PJ (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY.
- Van Soest PJ, Roberston JB, Lewis BA (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.

- Waghorn GC, McNabb WC (2003). Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminant. *Proc. Nutr. Soc.* 62:383-392.
- Wang D, Fang J, Xing F, Yang L (2008). Alfalfa as a supplement of driedcornstalk diets: Associative effects on intake, digestibility, nitrogen metabolism, rumen environment and hematological parameters in sheep. *Livest. Sci.* 113:87-97.
- Yaynesht T, Eik L, Moe S (2009). Seasonal variation in the chemical composition and dry matter degradability of exclosure forages in the semi-arid region of Northern Ethiopia. *Anim. Feed Sci. Technol.* 148:12-33.

**Annexe 5 : Composition des solutions de dosage de l'ammoniaque [28].**

<b>Solutions</b>	<b>Eléments</b>	<b>Quantité</b>
<b>A</b>	Phénol	5 g
	Nitroprusside de sodium	25 mg
		Qsp.500 ml
<b>B</b>	Hydroxyde de sodium	2,5 g
	Solution d'Hypochlorite de sodium (eau de javel à 35°)	5 ml
		Qsp.500 ml

**Annexe 6 : Composition de la solution MFS (methylgreen-formalin-saline) [76].**

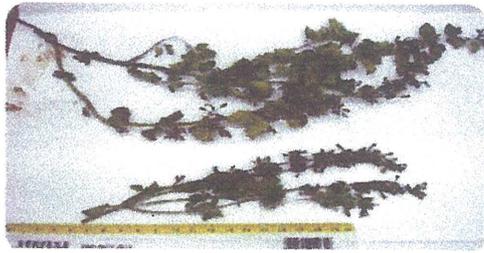
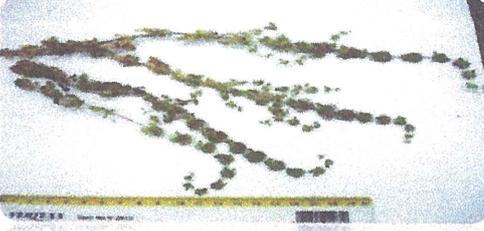
<b>Composés</b>	<b>Quantité</b>
Formaldéhyde à 35%	100 ml
Eau distillée	900 ml
Vert de méthyle	0,6 g
Chlorure de sodium	8 g
	Qsp.1000 ml

**Annexe 3 : Composition de la salive artificielle [74].**

Solutions	Eléments	Quantité
Solution A (Solution des microminéraux) (g/100 ml)	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O MnCl <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O FeCl <sub>3</sub> . 6 H <sub>2</sub> O Eau distillée	13,2 g 10 g 1 g 0,8 g 100 ml
Solution B (Solution tampon) (g/l)	NaHCO <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> Eau distillée	35,0 g 4 g 1000 ml
Solution C (Solution des macrominéraux) (g/l)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 12 H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O Eau distillée	5,7 g 6,2 g 0,6 g 1000 ml
Solution D (Solution indicatrice du potentiel Redox) (g/100 ml)	Résazurine (C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>4</sub> ) Eau distillée	0,1 g 100 ml
Solution E (Solution réductrice) (g/99 ml)	Na <sub>2</sub> S. 9 H <sub>2</sub> O NaOH (1N) Eau distillée	0,625 g 4 ml 95 ml

Composants	Quantité
Solution A	0,1 ml
Solution B	200 ml
Solution C	200 ml
Solution D	1 ml
Solution E	99 ml
Eau distillée	400 ml

Annexe 1 : Description botanique des plantes.

<p><b>Famille :</b> <i>Lamiaceae</i>.  <b>Espèce :</b> <i>Satureja calamintha ssp. Nepeta (L) Briq.</i>  <b>Nom vernaculaire AR:</b> nabta.  <b>FR :</b> Calament.  <b>Description :</b> Plante vivace velue de 40-80 cm d'hauteur, a fleurs lilas violacées. Elle se développe dans les régions septentrionales.</p>	
<p><b>Famille :</b> <i>Lamiaceae</i>.  <b>Espèce :</b> <i>Mentha pulegium L.</i>  <b>Nom vernaculaire AR:</b> Fliou.  <b>FR:</b> Menthe pouliot.  <b>Description :</b> Plante herbacée vivace de 10-30 cm d'hauteur, a odeur aromatique forte. Elle se développe dans les lieux humides et inondés dans l'hiver.</p>	
<p><b>Famille :</b> <i>Cupressaceae</i>.  <b>Espèce :</b> <i>Juniperus phoenicea L.</i>  <b>Nom vernaculaire AR:</b> Araar.  <b>FR:</b> Genévrier.  <b>Description :</b> Arbuste aromatique a fruits rouges, assez commun dans les rocailles calcaires des régions méditerranéennes.</p>	
<p><b>Famille :</b> <i>Asteraceae</i>.  <b>Espèce :</b> <i>Carduus pycnocephalus L.</i>  <b>Nom vernaculaire AR:</b> chouk el hmar  <b>FR:</b> Chardon  <b>Description :</b> Plante épineuse de 30-100 cm d'hauteur, elle est commune dans les terrains incultes des régions méditerranéennes.</p>	
<p>Le foin de la vesce avoine représente une association de culture entre deux plantes différentes, la première c'est l'avoine (<i>Avena sativa L.</i>) qui est une céréale graminée, la deuxième c'est la vesce (<i>Vicia sativa L.</i>) qui est une légumineuse annuelle.</p>	