

# Digestibilité in vitro et cinétique de fermentation des feuilles de cinq arbustes fourragers du nord est algérien

L. MEBIROUK-BOUDECHICHE<sup>1\*</sup>, S. ABIDI<sup>2</sup>, M. CHERIF<sup>2</sup>, I. BOUZOURAA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'épidémiologie-surveillance, santé, productions et reproduction, expérimentation et thérapie cellulaire des animaux domestiques et sauvages, Université d'El Tarf, B.P 73, 36000, EL Tarf, ALGÉRIE

<sup>2</sup>Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, Laboratoire des Productions Animales et Fourragères, Rue Hédi Karray, 2049 Ariana, TUNISIE

Corresponding author: boudechiche.lamia@gmail.fr

## SUMMARY

The chemical composition and characteristics of the in vitro fermentation were determined for 6 shrub species collected in a pastoral area of northeastern Algeria during the grazing period (spring). Primary and secondary chemical composition was determined and the fermentation parameters in vitro were measured in 100 ml glass syringes for 72 hours to determine the gas production and methane with and without the presence of polyethylene glycol (PEG) and deduce the metabolizable energy (ME). We have established correlations between the different parameters analyzed. The levels of crude protein (MAT) are the highest for *Acacia dealbata* (15,01% DM) which is the richest in secondary compounds (35,98 and 38,32 g tannic acid equivalent / kg DM for phenols and total tannins and 10,27 g equivalent leucocyanidin / kg DM for condensed tannins), these latter being the lowest for *Lavandula stoechas* (12,28 and 6,91 g tannic acid equivalent / kg DM for total phenols and tannins equivalent leucocyanidin; 1,48 g / kg DM for condensed tannins) which has shown the most digestible after 72 hours of incubation (43,40 ml / 0.2 gDM). In the absence of PEG after 24 hours of incubation, the production of gas and methane are the lowest for *Acacia dealbata* (7,34 and 2,96 ml / 0,2 gDM respectively), the addition of PEG has significantly improved this production with rates of increase of 256,16% and 531,80% for gas and methane. It is not the same for *Phillyrea angustifolia* and *Phillyrea latifolia* for whom the PEG had a depressive effect on gas production and methane (-5,69; -16,58 for *P. angustifolia* and -3,86 ; -38,01% for *P. latifolia*)

It was concluded by the in vitro technique that some species available in the study area have anti methanogens important properties; it would be possible to value.

**Keywords:** forage shrub, chemical composition, digestibility, ruminants.

## RÉSUMÉ

### Composition chimique et fermentation in vitro des feuilles d'arbustes fourragers du nord-est algérien

La composition chimique et les caractéristiques de la fermentation in vitro ont été déterminées pour 6 espèces arbustives collectées dans une zone pastorale du nord-est algérien au cours de la période de pâturage (printemps). La composition chimique primaire et secondaire a été déterminée et les paramètres de fermentation in vitro ont été mesurés dans des seringues en verre de 100 ml pendant 72 heures afin de déterminer la production de gaz et de méthane avec et sans présence de polyéthylène glycol (PEG) et d'en déduire l'énergie métabolisable (EM). Nous avons établi des corrélations entre les différents paramètres analysés. Les teneurs en matières azotées totales (MAT) sont les plus élevées pour *Acacia dealbata* (15,01 %MS) qui est parallèlement la plus riche en composés secondaires (35,98 et 38,32 g équivalent acide tannique/kg MS pour les phénols et tanins totaux et 10,27 g équivalent leucocyanidine/kg MS pour les tanins condensés), ces derniers étant les plus bas pour *Lavandula stoechas* (12,28 et 6,91 g équivalent acide tannique/kg MS pour les phénols et tanins totaux et 1,48 g équivalent leucocyanidine/kg MS pour les tanins condensés) qui s'est montrée la plus digestible après 72h d'incubation (43,40 ml/0,2 gMS). En absence de PEG après 24h d'incubation, la production de gaz et de méthane sont les plus faibles pour *Acacia dealbata* (7,34 et 2,96 ml/0,2 g MS respectivement), l'ajout du PEG a amélioré nettement cette production avec des taux d'augmentation de 256,16 et 531,80 % pour les gaz et le méthane. Il n'en est pas de même pour *Phillyrea angustifolia* et *Phillyrea latifolia*, pour qui le PEG a eu un effet dépressif sur la production de gaz et de méthane (-5,69 ; -16,58 pour *P. angustifolia* et -3,86 ; -38,01% pour *P. latifolia*) Il a été conclu par la technique in vitro que certaines espèces disponibles dans la zone étudiée présentent des propriétés anti méthanogènes importantes, qu'il serait possible de valoriser.

**Mots clés :** Feuilles d'arbustes fourragers, composition chimique, digestibilité, ruminants.

## Introduction

Les ruminants sont les seuls mammifères capables de dégrader la cellulose et de la valoriser pour leur alimentation [43] en transformant ces matières fibreuses en protéines animales et ce, grâce au microbiote ruminal. D'autre part, la valeur nutritive des aliments des ruminants est déterminée aussi bien par la teneur de ces composés chimiques que par la vitesse et l'ampleur de leur dégradation qui se manifestent par la production de gaz ou d'autres métabolites fermentaires [14]. La méthode de digestibilité in vitro, de par sa capacité à simuler et reproduire le processus de dégradation subi dans

le tractus digestif de l'animal, permet d'évaluer cette activité métabolique.

En Algérie, l'élevage des ruminants joue un rôle fondamental dans l'économie nationale et il n'en demeure pas moins l'une des plus importantes activités agricoles dans la wilaya d'El Tarf, du fait qu'il soit un moyen de thésaurisation et d'équilibre économique pour les éleveurs de la région qui pratiquent majoritairement des élevages de type extensif ou semi-extensif. Malheureusement la productivité du cheptel demeure très faible, à cause, d'une part du déficit fourrager auquel fait face l'Algérie et d'autre part de la qualité du

fouillage qui limite les performances individuelles. En effet, la faible valeur nutritionnelle des fourrages disponibles est un des principaux facteurs limitant des productivités animales. Cependant, cette wilaya du nord-est algérien est l'une des principales wilayas forestières d'Algérie avec 166 311 ha de forêts (Direction générale des forêts) qui constituent, pour les ruminants, l'un des principaux pourvoyeurs d'unités fourragères gratuites et disponibles toute l'année, envers lesquelles les éleveurs se tournent pour pallier ce déficit. Cependant, très peu de travaux se sont penchés sur la détermination des caractéristiques nutritionnelles de cette ressource végétale [25], encore moins sur sa digestibilité et sa valeur nutritive en vue de la valoriser et d'améliorer les productivités animales.

En outre, le méthane, un gaz à effet de serre primaire est produit à partir des productions animales, représentant 37% des émissions anthropiques de méthane totales [11]. La production de méthane est essentielle pour la dégradation effective de la matière organique, mais représente également une perte d'énergie de 2 à 12% de l'énergie brute consommée [30]. Par conséquent, les stratégies qui peuvent atténuer les émissions de méthane, sont non seulement bénéfiques pour l'environnement, mais aussi pour l'animal.

Ce constat explique les objectifs de cette étude qui vise à :

- Mesurer les caractéristiques nutritionnelles des fourrages ligneux consommés par les ruminants en Algérie ;
- Evaluer leur digestibilité en utilisant comme indicateur de digestibilité la production de gaz et de méthane ;
- Mesurer l'effet d'ajout du polyéthylène glycol sur ces paramètres, de même que sur les propriétés anti méthanogène de chaque espèce d'arbustes afin d'encourager la consommation des espèces anti méthanogènes, respectueuses de l'environnement.

## Matériel et méthodes

### DESCRIPTION DU SITE D'ÉTUDE

Tous les échantillons prélevés provenaient du maquis entourant le marais de Bourdim, sauf *Fraxinus angustifolia* qui se trouvait au sein de la végétation même du marais de Bourdim qui est une zone sylvo pastorale située à la périphérie ouest du parc national relevant de la wilaya d'El Tarf, laquelle est située au nord-est de l'Algérie (8° 11' de longitude et 36° 47' de latitude).

Du point de vue climatique, la région se situe dans l'étage bioclimatique de type sub-humide à humide chaud, avec des hivers doux et des étés secs.

Les relevés climatiques sur les 20 dernières années indiquent des précipitations moyennes annuelles de 800 à 1 200 mm, caractérisées par une grande irrégularité intra-annuelle. En effet, les précipitations mensuelles varient entre un maximum aux mois de décembre et janvier (respectivement 134,34 mm et 136,42 mm) et un minimum en juillet et août (3,97 mm et 13,34 mm). La température moyenne annuelle est de 19,24°C avec un maximum en août (27,35°C) et un minimum en janvier (12,96°C).

Le choix de ce site est motivé par la biodiversité du cortège floristique et la pression pastorale assez importante qu'on y rencontre.

### MATÉRIEL VÉGÉTAL

Les feuilles de six espèces de ligneux fourragers répartis entre quatre familles botaniques ont été échantillonnées au niveau du site d'étude (tableau I). Il s'agissait de : *Fraxinus angustifolia*, *Acacia dealbata*, *Phillyrea angustifolia*, *Phillyrea latifolia*, *Smilax aspersa* et *Lavandula stoechas*. Le choix de ces espèces a été motivé par leur abondance dans la région d'étude et par leur appétence par les petits ruminants.

L'échantillonnage a eu lieu au printemps, durant lequel nous avons réalisé deux collectes d'échantillons d'un kilo de feuilles par espèce en moyenne à chaque collecte, ces échantillons ont été séchés pendant 48 h dans une étuve ventilée réglée à 50°C. Cette température évite la dénaturation des composés chimiques de la plante (protéines, phénols, etc.) [20].

Après séchage, les échantillons des deux collectes, par espèce, ont été broyés en utilisant une grille de 1 mm et une aliquote de 200 g par espèce a été conservée dans des flacons jusqu'aux analyses ultérieures.

### COMPOSITION CHIMIQUE DES FEUILLES DES ARBUSTES FOURRAGERS

Tous les échantillons du matériel végétal prélevé ont été analysés en double pour déterminer leurs teneurs en matière sèche (MS) et en matière minérale (MM) selon les procédures

Nom vernaculaire	Nom latin	Famille botanique
Lavande sauvage	<i>Lavandula stoechas</i>	lamiacées
Frêne commun	<i>Fraxinus angustifolia</i>	oléacées
Salsepareille	<i>Smilax aspersa</i>	smilacacées
Filaire à petites feuilles	<i>Phillyrea angustifolia</i>	oléacées
Filaire à grandes feuilles	<i>Phillyrea latifolia</i>	oléacées
Acacia mimosa	<i>Acacia dealbata</i>	légumineuses

TABLEAU I : Noms des fourrages ligneux de l'étude

de l'AOAC (1990) [1]. La matière azotée totale a été dosée par la méthode de Kjeldahl (ISO 1997) [17].

Les constituants pariétaux (neutral detergent fiber, NDF – Fibre au détergent neutre ; acid detergent fiber, ADF – ligno-cellulose ; et acid detergent lignin, ADL – lignine) ont été déterminés selon la méthode de VAN SOEST et al (1991) [42].

Les phénols totaux (dosés par le réactif de Folin-Ciocalteu) et les tanins totaux ont été analysés selon la procédure décrite par MAKKAR et al (1993) [21]. Les résultats sont exprimés en équivalent d'acide tannique par kilo de matière sèche.

Les tanins condensés ont été déterminés par oxydation dans le réactif butanol-HCl en présence d'un réactif ferrique selon la technique de PORTER et al (1986) [33]. Les résultats sont exprimés en équivalent leucocyanidine par kilo de matière sèche.

Les tanins hydrolysables ont été calculés en soustrayant les tanins condensés des tanins totaux.

#### ANIMAUX ET COLLECTE DU JUS DE RUMEN POUR L'ESSAI DIGESTIBILITÉ IN VITRO

L'inoculum est constitué de jus de panse qui a été prélevé directement dans le rumen par pompage à l'aide d'une sonde gastrique [40]; les donneurs sont quatre ovins de race barbarine, nourris avec 1 kg de foin de vesce avoine et 500 g d'orge depuis plus de trois mois.

Le contenu ruminal (mélange de jus et de particules alimentaires) est immédiatement filtré à travers trois couches de gaze chirurgicale. Le filtrat qui correspond au jus de rumen est récupéré dans un thermos préchauffé avec une eau tiède d'environ 39 °C. Le thermos contenant le jus est bien fermé puis transporté au laboratoire pour les manipulations ultérieures.

De la salive artificielle est mélangée au jus de rumen (2:1, v/v) sous barbotage de CO<sub>2</sub> et agitation pendant toute la durée de la manipulation.

#### DIGESTIBILITÉ IN VITRO ET CINÉTIQUE DE PRODUCTION DE GAZ

La technique de mesure des gaz adoptée a été décrite par MENKE ET STEINGASS (1988) [27]. Elle est largement utilisée pour estimer la digestibilité des aliments pour les ruminants [27, 15], en se basant sur une simulation de la digestion dans le rumen.

La technique originale décrite par MENKE et al (1979) [26] utilise des seringues en verre de 100 ml comme matériel d'incubation. Le substrat incubé dans la seringue calibrée en présence de l'inoculum (jus de rumen et salive artificielle)

est soumis à une fermentation qui aboutit à des produits terminaux de la digestion en l'occurrence l'ammoniac, les acides gras volatils et les gaz, notamment le CO<sub>2</sub> et le méthane. La production de gaz est mesurée dans ce cas à travers le déplacement du piston de la seringue au cours du processus de fermentation.

Un échantillon de 200 mg par fourrage est introduit dans chaque seringue calibrée de 100 ml puis additionné de 30 ml d'un mélange de salive artificielle et de jus de rumen. Les seringues sont ensuite immédiatement plongées dans un bain Marie réglée à 39°C. Chaque échantillon a été incubé en double. Deux seringues dans lesquelles seul le jus de rumen et la salive artificielle ont été introduits ont servi de témoin.

Afin d'estimer la vitesse de fermentation par la mesure de la quantité de gaz produit, pour chaque seringue, la lecture du volume des gaz a eu lieu après 0, 2, 4, 6, 8, 48, 52 et 72 h d'incubation. La production nette de gaz aux différents moments est exprimée en ml/seringue.

#### EFFET DU POLYÉTHYLÈNE GLYCOL (PEG 4000) SUR LA PRODUCTION DE GAZ TOTAL ET DE MÉTHANE

Dans le but de déterminer la production de gaz et d'évaluer l'impact des tanins sur la production in vitro de gaz de la biomasse microbienne, la technique de production de gaz décrite plus haut a été utilisée. Ainsi, 200 mg de chaque échantillon a été incubé dans deux séries différentes avec quatre seringues par échantillon et par série, soit : deux seringues incubées sans ajout de Polyéthylène glycol (PEG 4000) et deux autres incubées avec addition de 0,2 g de PEG/seringue.

Après 24 h d'incubation on repère le déplacement du piston de chaque seringue qui correspond au volume de gaz produit. Après chaque incubation on injecte 4 ml de NaOH (10 N) dans chaque seringue, ce dernier absorbe le CO<sub>2</sub>, ce qui entraîne la rétraction du piston, la différence des volumes représente la quantité de méthane produite [12].

Deux seringues dans lesquelles seul le jus de rumen et la salive artificielle ont été introduits ont servi de témoin. Tout au long de l'incubation, une température de 39° C a été maintenue constante.

Après 24h d'incubation, les gaz produits et corrigés par les gaz produits par l'inoculum dans les tubes témoins ont été utilisés pour calculer la teneur en énergie métabolisable (EM) [27].

$$EM \text{ (MJ/kg MS)} = 2,2 + 0,1357 \text{ GP} + 0,0057 \text{ MAT} + 0,000859 \text{ MAT}$$

GP correspond au volume de gaz (en ml) dégagé par 200 mg de substrat au bout de 24 heures d'incubation, la teneur en MAT est exprimée en g/kg MS et l'activité biologique des tanins a été calculée en faisant le rapport entre la production

de gaz avec PEG mesurée après 24h d'incubation et celle sans PEG pour le même échantillon.

L'ajustement des données des cinétiques de dégradation a été fait conformément au modèle exponentiel proposé par ORSKOV et MCDONALD (1979) [31] qui permet de déterminer la valeur «plateau» de la production totale de gaz et sa vitesse de production. Le modèle mathématique est le suivant :  $G = a + b * (1 - e^{-ct})$

Où :

G : Production de gaz total à l'instant t (ml) ; a : production de gaz (ml) de la fraction soluble ; b : production de gaz (ml) de la fraction insoluble ; a+b : Production potentielle de gaz (ml) (asymptote de la courbe) ; C : vitesse de production de gaz (ml/h) ; t : temps d'incubation (h).

## ANALYSE STATISTIQUE DES DONNÉES

Les différents paramètres étudiés (volume total de gaz et de méthane produits après 24 h ont été soumis à une analyse de la variance selon la procédure GLM (General Linear Model) du logiciel SAS (1997). Pour estimer les paramètres de fermentation de production de gaz, le modèle NLIN a été utilisé. La procédure PROC CORR a été utilisée pour déterminer la matrice de corrélation entre les paramètres chimiques et biologiques.

## Résultats

Composition chimique, teneurs en composés phénoliques et activité biologique des tanins des feuilles des arbustes fourragers

La composition chimique du matériel végétal collecté à partir des différentes espèces fourragères est illustrée dans le tableau II.

Les feuilles de toutes les espèces arbustives de notre étude possèdent les mêmes teneurs en matière sèche ( $P > 0,05$ ), celle-ci varie de 22,46 à 43,10% respectivement pour *Smilax aspersa* et *Fraxinus angustifolia*. Les taux en matières

minérales (MM) sont peu variables. Les valeurs sont comprises entre 3,58 %MS (*Phillyrea latifolia*) et 7,97 %MS (*Lavandula stoechas*) ( $P > 0,05$ ).

Les teneurs en matières azotées totales (MAT) des feuilles de nos échantillons varient largement entre les espèces. Elles sont les plus élevées pour *Acacia dealbata* (15,01 %MS) et les plus faibles pour *Phillyrea latifolia* et *Fraxinus angustifolia* (2,00 et 2,26 %MS respectivement).

Les feuilles de toutes les espèces arbustives sont fortement pourvues en parois totales, celles-ci varient de 45,45 %MS pour *Fraxinus angustifolia* à 50,55 %MS pour *Lavandula stoechas* ( $P > 0,05$ ). Les teneurs en lignine sont tout aussi élevées (de 17,58 %MS pour *Fraxinus angustifolia* à 20,89 MS pour *Smilax aspersa* ( $P > 0,05$ )).

Les teneurs des feuilles des espèces ligneuses en composés phénoliques sont présentées dans le tableau III. Les plus fortes teneurs en tanins, phénols totaux et tanins condensés sont observées chez *Acacia dealbata* (38,32 ; 35,98 g équivalent acide tannique/kg MS et 10,27 g équivalent leucocyanidine/kg MS respectivement), tandis que *Phillyrea latifolia*, *Phillyrea angustifolia* et *Acacia dealbata* enregistrent les valeurs les plus élevées en saponines (25,15 ; 23,84 et 25,34 g équivalent diosgénin/kg MS respectivement).

En se basant sur les résultats du tableau III, l'espèce ayant l'activité anti-nutritionnelle de ses tanins la plus élevée est *Acacia dealbata* (3,56) ( $P < 0,05$ ).

## CINÉTIQUES DE PRODUCTION DE GAZ ET PARAMÈTRES DE FERMENTATION DES FEUILLES DES DIFFÉRENTS ARBUSTES FOURRAGERS

Les résultats de la production de gaz pour les différents substrats en fonction du temps sont consignés dans le tableau IV. La production de gaz in vitro est significativement différente entre les fourrages après 6, 8, 48, 52 et 72h d'incubation ( $P < 0,05$ ) et entre les temps d'incubations pour

Espèces	MS	MM	MAT	NDF	ADF	ADL
<i>Fraxinus angustifolia</i>	43,10 <sup>a</sup> ±1,06	5,29 <sup>a</sup> ±1,25	2,26 <sup>d</sup> ±0,45	45,45 <sup>a</sup> ±2,23	28,05 <sup>a</sup> ±2,34	17,58 <sup>a</sup> ±0,87
<i>Acacia dealbata</i>	40,26 <sup>a</sup> ±2,45	4,21 <sup>a</sup> ±1,12	15,01 <sup>a</sup> ±2,15	50,09 <sup>a</sup> ±1,64	29,67 <sup>a</sup> ±0,40	19,98 <sup>a</sup> ±1,89
<i>Lavandula stoechas</i>	28,79 <sup>a</sup> ±1,66	7,97 <sup>a</sup> ±0,43	4,90 <sup>c</sup> ±0,33	50,55 <sup>a</sup> ±1,08	32,91 <sup>a</sup> ±1,45	19,14 <sup>a</sup> ±0,41
<i>Smilax aspersa</i>	22,46 <sup>a</sup> ±2,22	6,3 <sup>a</sup> ±0,89	8,37 <sup>b</sup> ±1,88	51,92 <sup>a</sup> ±1,55	34,38 <sup>a</sup> ±2,32	20,89 <sup>a</sup> ±1,13
<i>Phillyrea angustifolia</i>	36,30 <sup>a</sup> ±0,02	4,51 <sup>a</sup> ±0,45	6,89 <sup>b</sup> ±0,66	50,05 <sup>a</sup> ±0,44	32,84 <sup>a</sup> ±0,74	20,54 <sup>a</sup> ±1,06
<i>Phillyrea latifolia</i>	40,06 <sup>a</sup> ±1,59	3,58 <sup>a</sup> ±1,71	2,00 <sup>d</sup> ±0,01	45,57 <sup>a</sup> ±1,20	29,06 <sup>a</sup> ±2,35	19,54 <sup>a</sup> ±1,15
P	0,568	0,105	0,0001	0,145	0,299	0,547

MS : matière sèche (%) - MM : matières minérales - MAT : matières azotées totales - NDF : Neutral Detergent Fiber - ADF : Acid Detergent Fiber - ADL : Acid Detergent Lignin.

TABLEAU II : Composition chimique des feuilles des fourrages ligneux (% de MS) (moyenne ± erreur standard de la moyenne ESM)

un même fourrage ( $P < 0,0001$ ). Après 72 heures d'incubation, *Lavandula stoechas* enregistre la plus grande quantité de gaz (43,40 ml/0,2 g MS), elle est suivie par *Phillyrea latifolia* (40,59 ml/0,2 g MS), tandis que *Acacia dealbata* donne la

plus faible quantité de gaz en fin d'incubation (33,54 ml/0,2 g MS). *Phillyrea latifolia* est la plante la plus fermentée par le microbiote ruminal, jusqu'à 48 heures (bien que la différence ne soit pas significative). Dépassé ce temps et jusqu'à 72

Espèces	Sap	PT	TT	TC	Activité biologique*
<i>Fraxinus angustifolia</i>	14,95 <sup>c</sup> ±0,02	18,92 <sup>b</sup> ±0,40	11,08 <sup>b</sup> ±0,27	2,78 <sup>b</sup> ±0,50	1,13 <sup>b</sup> ± 0,17
<i>Acacia dealbata</i>	25,34 <sup>a</sup> ±0,25	35,98 <sup>c</sup> ±0,16	38,32 <sup>a</sup> ±0,17	10,27 <sup>a</sup> ±0,12	3,56 <sup>a</sup> ± 1,24
<i>Lavandula stoechas</i>	21,47 <sup>b</sup> ±0,07	12,28 <sup>a</sup> ±1,94	6,91 <sup>c</sup> ±1,80	1,48 <sup>b</sup> ±1,06	1,15 <sup>b</sup> ± 0,09
<i>Smilax aspersa</i>	14,32 <sup>c</sup> ±0,04	14,88 <sup>a</sup> ±3,19	12,17 <sup>b</sup> ±2,01	6,75 <sup>b</sup> ±1,45	1,18 <sup>b</sup> ± 0,17
<i>Phillyrea angustifolia</i>	23,84 <sup>a</sup> ±2,21	29,28 <sup>b</sup> ±0,97	18,43 <sup>b</sup> ±0,74	2,79 <sup>b</sup> ±2,56	0,94 <sup>b</sup> ± 0,12
<i>Phillyrea latifolia</i>	25,15 <sup>a</sup> ±0,07	24,92 <sup>b</sup> ±2,22	8,99 <sup>c</sup> ±2,68	2,96 <sup>b</sup> ±2,27	0,96 <sup>b</sup> ± 0,03
P	0,0001	0,03	0,02	0,01	< 0,0001

Sap : Saponines (en g équivalent diosgénine/kg MS) - PhT : Phénols totaux (en g équivalent acide tannique/kg MS) - TT : Tanins totaux (en g équivalent acide tannique/kg MS) - TC : Tanins condensés (en g équivalent leucocyanidine/kg MS)

\* L'activité biologique des tanins est le rapport entre la production de gaz avec PEG mesurée après 24h d'incubation vs. Contrôle (i.e., gaz PEG / gaz contrôle).

TABLEAU III : Composants phénoliques et activité biologique des tanins des feuilles des ligneux fourragers (moyenne ± erreur standard de la moyenne ESM)

Espèces	2 h	4 h	6 h	8 h	48 h	52 h	72 h
<i>Fraxinus angustifolia</i>	3,85 <sup>a</sup> ± 0,46	6,74 <sup>a</sup> ±2,90	9,62 <sup>a</sup> ±2,83	11,53 <sup>a</sup> ± 3,04	27,84 <sup>b</sup> ± 2,86	35,50 <sup>b</sup> ± 3,08	38,39 <sup>b</sup> ± 2,51
<i>Acacia dealbata</i>	2,58 <sup>a</sup> ± 0,04	4,30 <sup>a</sup> ±0,07	5,16 <sup>b</sup> ± 0,08	5,18 <sup>b</sup> ± 2,51	26,66 <sup>b</sup> ± 1,65	33,54 <sup>b</sup> ± 1,76	33,54 <sup>c</sup> ± 1,76
<i>Lavandula stoechas</i>	4,02 <sup>a</sup> ±1,30	8,06 <sup>a</sup> ±1,18	11,10 <sup>a</sup> ± 1,08	12,09 <sup>a</sup> ± 1,48	32,26 <sup>a</sup> ± 2,70	41,38 <sup>a</sup> ± 2,98	43,40 <sup>a</sup> ± 2,92
<i>Smilax aspersa</i>	4,57 <sup>a</sup> ±1,35	9,13 <sup>a</sup> ±1,40	12,78 <sup>a</sup> ± 2,75	12,78 <sup>a</sup> ± 2,75	29,19 <sup>b</sup> ± 2,96	34,68 <sup>b</sup> ± 2,61	36,50 <sup>b</sup> ± 2,63
<i>Phillyrea angustifolia</i>	2,70 <sup>a</sup> ±0,04	5,41 <sup>a</sup> ±1,34	9,02 <sup>a</sup> ± 2,66	11,71 <sup>a</sup> ± 1,42	27,02 <sup>b</sup> ± 0,91	34,22 <sup>b</sup> ± 3,00	36,93 <sup>b</sup> ± 2,31
<i>Phillyrea latifolia</i>	3,13 <sup>a</sup> ±0,15	7,30 <sup>a</sup> ±0,34	12,52 <sup>a</sup> ± 0,60	13,53 <sup>a</sup> ± 0,80	31,30 <sup>b</sup> ± 1,49	37,49 <sup>b</sup> ± 1,15	40,59 <sup>b</sup> ± 2,47
P	0,166	0,155	0,04	0,03	0,02	0,03	0,03

TABLEAU IV : Évolution de la production de gaz en fonction du temps des différents arbustes fourragers (ml/0,2 gMS) (moyenne ± erreur standard de la moyenne ESM)

Espèces	a (ml/0,2 gMS)	b (ml/0,2 gMS)	a + b (ml/0,2 gMS)	c (h <sup>-1</sup> )
<i>Fraxinus angustifolia</i>	3,64 <sup>b</sup> ± 2,29	46,39 <sup>b</sup> ± 1,09	50,03 <sup>a</sup> ± 2,93	0,019 <sup>c</sup> ± 0,01
<i>Acacia dealbata</i>	-0,22 <sup>f</sup> ± 1,46	43,27 <sup>c</sup> ± 2,50	43,00 <sup>b</sup> ± 2,28	0,022 <sup>d</sup> ± 0,01
<i>Lavandula stoechas</i>	3,49 <sup>c</sup> ± 2,00	49,95 <sup>a</sup> ± 0,97	53,44 <sup>a</sup> ± 1,86	0,022 <sup>d</sup> ± 0,01
<i>Smilax aspersa</i>	3,76 <sup>a</sup> ± 1,60	33,46 <sup>c</sup> ± 3,09	37,22 <sup>c</sup> ± 1,56	0,041 <sup>a</sup> ± 0,01
<i>Phillyrea angustifolia</i>	2,32 <sup>e</sup> ± 1,94	40,87 <sup>d</sup> ± 2,31	43,20 <sup>b</sup> ± 2,05	0,025 <sup>c</sup> ± 0,01
<i>Phillyrea latifolia</i>	2,58 <sup>d</sup> ± 1,90	39,78 <sup>d</sup> ± 2,17	42,35 <sup>b</sup> ± 1,58	0,035 <sup>b</sup> ± 0,01
P	0,0001	0,0001	0,001	0,0001

TABLEAU V : Paramètres de fermentation des feuilles des différents arbustes fourragers (moyenne ± erreur standard de la moyenne ESM)

heures d'incubation, c'est *Lavandula stoechas* qui prend le dessus et se montre plus dégradable que tous les autres substrats en produisant le plus grand volume de gaz.

Les paramètres cinétiques de la fermentation *in vitro* des différents substrats, déduits à partir du modèle exponentiel d'ORSKOV et MC DONALD (1979) [31], sont mentionnés dans le tableau V. Ils révèlent, comme pour le modèle biologique, que la valeur la plus élevée du volume de gaz est enregistrée pour les feuilles de *Lavandula stoechas* (53,44 ml/0,2 g MS), suivie de *Fraxinus angustifolia* (50,03 ml/0,2 g MS), par contre *Smilax aspersa* affiche la valeur la plus faible (37,22 ml/0,2 g MS).

Les feuilles de *Smilax aspersa* sont les plus rapidement fermentées par le microbiote ruminal (0,041 (h<sup>-1</sup>) suivie par *Phillyrea latifolia* (0,035 h<sup>-1</sup>) alors que *Fraxinus angustifolia* affiche la plus faible vitesse (0,019 ml/0,2 g MS) (tableau V).

#### EFFET DU PEG SUR LA PRODUCTION DE MÉTHANE ET DE GAZ IN VITRO

Les productions de gaz et de méthane de nos substrats, en présence et en absence de PEG, sont présentées dans le tableau VI.

La production totale de gaz à 24 h d'incubation observe des différences très hautement significatives ( $P < 0,001$ ) entre les feuilles des différentes espèces. Ainsi, *Acacia dealbata* produit le volume de gaz le moins élevé après 24h d'incubation (7,34 ml/0,2 g MS). L'ajout du PEG a amélioré la production de gaz pour *Fraxinus angustifolia*, *Acacia dealbata*, *Lavandula stoechas* et *Smilax aspersa* avec des taux d'augmentation de 13,03 ; 256,16 ; 15,03 et 17,96 %, respectivement.

Cependant, les résultats du tableau VI montrent que l'addition du PEG ne s'accompagne pas toujours d'une augmentation du volume de gaz produit. En effet, *Phillyrea angustifolia* et *Phillyrea latifolia* affichent des taux négatifs (-5,69 et -3,86 % respectivement).

La concentration du méthane est très variable entre les substrats ( $P < 0,05$ ). La production de méthane en absence de PEG varie de 2,96 ml/0,2 g MS pour *Acacia dealbata* à 10,02 ml/0,2 g MS pour *Phillyrea latifolia*, alors qu'elle oscille de 6,18 ml/0,2 g MS pour *Phillyrea latifolia* à 13,37 l/0,2 g MS pour *Smilax aspersa* en présence de PEG. L'action du PEG a influencé considérablement la plupart des substrats en favorisant l'augmentation de leur production de méthane, ainsi, le taux le plus important a été enregistré par *Acacia dealbata* (+531,80%), suivie par *Lavandula stoechas* (+124,79%).

Espèces	Production totale de gaz (ml/0,2 g MS)			Production de méthane CH <sub>4</sub> (ml/0,2 g MS)		
	- PEG	+ PEG	Taux d'augmentation (%)	- PEG	+ PEG	Taux d'augmentation (%)
<i>Fraxinus angustifolia</i>	23,21 <sup>a</sup> ± 1,94	26,14 <sup>ab</sup> ± 2,23	13,03 <sup>b</sup> ± 1,80	6,31 <sup>ab</sup> ± 3,19	9,01 <sup>a</sup> ± 2,20	35,65 <sup>b</sup> ± 1,04
<i>Acacia dealbata</i>	7,34 <sup>b</sup> ± 1,01	22,44 <sup>ab</sup> ± 1,24	256,16 <sup>a</sup> ± 1,39	2,96 <sup>b</sup> ± 2,02	11,40 <sup>a</sup> ± 1,74	531,80 <sup>a</sup> ± 2,22
<i>Lavandula stoechas</i>	20,32 <sup>a</sup> ± 0,51	23,17 <sup>ab</sup> ± 2,72	15,03 <sup>b</sup> ± 2,15	3,60 <sup>b</sup> ± 1,03	7,43 <sup>a</sup> ± 0,55	124,79 <sup>b</sup> ± 3,22
<i>Smilax aspersa</i>	27,09 <sup>a</sup> ± 2,80	31,45 <sup>a</sup> ± 0,74	17,96 <sup>b</sup> ± 1,85	9,46 <sup>a</sup> ± 1,01	13,37 <sup>a</sup> ± 1,68	45,62 <sup>b</sup> ± 2,56
<i>Phillyrea angustifolia</i>	25,36 <sup>a</sup> ± 1,06	23,88 <sup>ab</sup> ± 2,78	-5,69 <sup>c</sup> ± 1,91	9,44 <sup>a</sup> ± 2,45	6,76 <sup>a</sup> ± 0,27	-16,58 <sup>c</sup> ± 1,69
<i>Phillyrea latifolia</i>	22,52 <sup>a</sup> ± 1,61	21,58 <sup>b</sup> ± 1,11	-3,86 <sup>c</sup> ± 1,50	10,02 <sup>a</sup> ± 1,66	6,18 <sup>a</sup> ± 1,50	-38,01 <sup>c</sup> ± 1,64
<b>P</b>	0,0001	0,04	0,0001	0,0009	0,06	0,01

TABLEAU VI : Effet des tanins sur la production de méthane et de gaz *in vitro* en présence (+ PEG) et en absence (-PEG) de PEG (moyenne ± erreur standard de la moyenne ESM)

Espèces	Énergie métabolisable (MJ/kg MS)
<i>Fraxinus angustifolia</i>	3,21 <sup>b</sup> ± 0,41
<i>Acacia dealbata</i>	3,55 <sup>ab</sup> ± 0,30
<i>Lavandula stoechas</i>	3,01 <sup>b</sup> ± 0,14
<i>Smilax aspersa</i>	4,18 <sup>a</sup> ± 0,28
<i>Phillyrea angustifolia</i>	3,93 <sup>a</sup> ± 0,50
<i>Phillyrea latifolia</i>	3,68 <sup>ab</sup> ± 0,37
<b>P</b>	0,001

TABLEAU VII : Valeurs des énergies métabolisables des feuilles des arbustes fourragers (moyenne ± erreur standard de la moyenne ESM)

## ÉNERGIE MÉTABOLISABLE

Les énergies métabolisables dégagées par les différents substrats sont présentées dans le tableau VII.

*Smilax aspersa* est l'espèce qui enregistre la valeur en énergie métabolisable la plus élevée, cette dernière étant la portion de l'énergie de l'aliment qui peut être utilisée par l'animal. En outre, la matrice de corrélation indique une corrélation significativement positive entre les teneurs en énergie métabolisable et celles en méthane ( $r=0,84$  et  $p=0,0001$ ).

## Discussion

### COMPOSITION CHIMIQUE, TENEURS EN COMPOSÉS PHÉNOLIQUES ET ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DES TANINS DES FEUILLES DES ARBUSTES FOURRAGERS

Les variations, en matières minérales (MM) entre les espèces fourragères seraient sans doute imputables à la famille botanique [6], au type de sol et au stade de maturité [38]. *Acacia dealbata* enregistre la teneur la plus élevée en MAT du fait que cette espèce appartienne à la famille des légumineuses, capables de fixer l'azote atmosphérique grâce aux Rhizobia au niveau de leurs nodosités. Les teneurs en MAT des feuilles des ligneux fourragers de la présente étude sont inférieures à celles enregistrées par MEBIROUK-BOUDECHICHE et al (2014) [25] et CABIDDU et al (2000) [7] pour d'autres arbustes fourragers algériens et méditerranéens, cependant, hormis *Acacia dealbata* et *Smilax aspersa*, toutes les autres espèces enregistrent des teneurs inférieures au niveau minimum requis (7-8% MS) pour un fonctionnement du rumen et une alimentation convenables des ruminants [41]. Selon PATERSON et al (1996) [32], les aliments dont les teneurs en protéines brutes sont inférieures à 70 mg/ g MS exigent une supplémentation en azote afin d'améliorer leur ingestion et digestion par les ruminants du fait qu'ils ne fournissent pas les minima d'azote nécessaire au microbiote ruminal.

Les teneurs en parois totales (NDF, ADF et ADL) de nos échantillons sont proches de celles avancées par CABIDDU et al (2000) [7] pour des espèces méditerranéennes. En général, les feuilles des arbustes fourragers sont fortement pourvues en parois totales qui sont susceptibles de constituer un facteur limitant à leur digestibilité.

*Acacia dealbata* est l'espèce la plus riche en facteurs anti nutritionnels, ainsi, les tanins chez cette espèce seraient la cause de la formation de complexes protéines- tanins chez ce fourrage, précipitant et diminuant ainsi la digestibilité de ses protéines qui ne seraient de ce fait plus profitables à l'animal hôte.

En outre, les teneurs en tanins totaux et tanins condensés sont positivement et significativement corrélées à leurs activités biologiques ( $r= 0,83$  et  $P< 0,0001$  ;  $0,77$  et  $P<0,0001$

respectivement), ainsi, les effets positif ou négatif des tanins totaux dans les feuilles des ligneux fourragers de la présente étude dépend, entre autres, de leur concentration.

Il en est de même pour les tanins condensés qui pourraient exercer une action inhibitrice sur la croissance des microorganismes du rumen [24] des animaux ingérant *Acacia dealbata*.

### CINÉTIQUES DE PRODUCTION DE GAZ ET PARAMÈTRES DE FERMENTATION DES FEUILLES DES DIFFÉRENTS ARBUSTES FOURRAGERS

La variation de la production de gaz est associée à la composition des substrats et leurs teneurs en composés phénoliques et tanins condensés, variables en fonction de l'espèce et de la famille botanique. En effet, *Lavandula stoechas* est l'espèce la moins riche en composés secondaires alors qu'*Acacia dealbata* en est l'espèce la plus pourvue (tableau III), ce qui a eu pour conséquence une diminution de la digestibilité de cette dernière se répercutant sur la diminution du volume de gaz produit. En outre, la matrice de corrélation a révélé des corrélations significativement négatives entre les teneurs en phénols, tanins totaux, tanins condensés et la production de gaz ( $-0,54$  ;  $-0,71$  et  $-0,57$  avec  $p= 0,006$  ;  $0,0001$  et  $0,004$ , respectivement).

La fermentation in vitro d'*Acacia dealbata* est tributaire d'une phase de latence, indiquée par la valeur négative de la fraction soluble (a) ( $-0,22$  ml/0 ,2 g MS), ce qui explique en partie sa faible dégradation. Cette phase de latence semble due au temps nécessaire aux microorganismes cellulolytiques à adhérer et coloniser les fibres alimentaires. En outre, l'estimation de la production de gaz à partir de la fraction insoluble montre clairement que les feuilles de *Lavandula stoechas* et *Fraxinus angustifolia* se caractérisent par une bonne fermentescibilité des constituants de leurs parois cellulaires par le microbiote ruminal. *Fraxinus angustifolia* affiche la plus faible vitesse, ce qui est probablement dû aux tanins qui inhibent les enzymes.

L'ingestion d'un fourrage est en partie expliquée par la vitesse de production de gaz (c), laquelle affecte la vitesse de passage des aliments dans le rumen, alors que la production potentielle de gaz (a+b) est associée à la dégradabilité de l'aliment [18]. Ainsi, les valeurs obtenues pour *Lavandula stoechas* et *Fraxinus angustifolia* par le modèle d'ORSKOV et McDONALD (1979) [31] indiquent une meilleure disponibilité des nutriments pour le microbiote ruminal des ruminants pâturant ces fourrages. La fraction insoluble mais potentiellement dégradable (b) reflète la proportion de la matière sèche qui est dégradée dans le rumen à une vitesse mesurable. Cette fraction de l'aliment fournit la source majeure des sucres lentement fermentescibles par le microbiote ruminal [31]. Parmi les échantillons d'étude, les feuilles de *Lavandula stoechas* sont celles qui fournissent le plus cette catégorie de glucides.

## EFFET DU PEG SUR LA PRODUCTION DE MÉTHANE ET DE GAZ IN VITRO

En absence de PEG, La production totale de gaz à 24 h d'incubation est la plus faible pour *Acacia dealbata*, espèce la plus riche en matières azotées totales et en tanins qui ont formé des complexes tanins-protéines, diminuant ainsi la digestibilité de l'espèce qui s'en trouve meilleure pour les autres substrats. En effet, SOMMART et al (2000) [37] ont reporté que le volume de gaz produit est un bon paramètre de prédiction de la digestibilité, des produits finaux de fermentation et de la synthèse des protéines microbiennes des substrats par les microbes du rumen en système in vitro.

Comme attendu, l'addition du PEG a augmenté la production totale de gaz pour la plupart des fourrages, notamment pour *Acacia dealbata* (+256,16%), *Smilax aspersa* (+17,96%), *Lavandula stoechas* (+15%) et *Fraxinus angustifolia* (+13,03%). L'effet de cette addition est d'autant plus marqué pour *Acacia dealbata*. Ceci peut être expliqué par le fait que le polyéthylène glycol (PEG) est un polymère synthétique possédant une grande affinité pour les tanins (EWITT et FORD, 1982 in [19] qui les rend inertes par la formation de complexes PEG-tanins [22]. Il possède également la faculté de prévenir la formation de complexes protéines-tanins et de libérer ces complexes déjà présents dans le milieu [4]. L'activité des tanins des substrats étudiés est ainsi mesurée par l'augmentation de la production de gaz sous l'effet du PEG [23].

L'amélioration de la production de gaz *in vitro* des substrats incubés en présence de PEG a aussi été rapportée par d'autres auteurs pour différents fourrages [3, 9, 35,36].

Cependant, l'effet dépressif du PEG sur *Phillyrea angustifolia* et *Phillyrea latifolia* qui ont affiché des taux négatifs a aussi été rapporté par SINGH et al (2005) [36] qui ont signalé une réduction de la production de gaz, après addition du PEG, chez *Leucaena leucocephala* (-18,59%) et pour la paille de riz (-7,39%) après 24 heures d'incubation. Ce résultat pourrait être imputable, pour *Phillyrea angustifolia* et *Phillyrea latifolia*, aux teneurs élevées des deux espèces en saponines (tableau III) qui ont un effet négatif sur la méthanogénèse en diminuant la dégradation des protéines dans le rumen, ce qui limite la quantité d'hydrogène disponible pour la méthanogénèse et réduisant ainsi la population de protozoaires productrice de méthane. Cependant, ceci n'est pas systématique [10], et la preuve en est qu'*Acacia dealbata*, malgré ses teneurs élevées en saponines, n'enregistre pas de diminution de volume de gaz après ajout du PEG.

Le tableau VI montre aussi que l'addition du PEG a eu un effet moins marqué sur la production de gaz pour *Lavandula stoechas* et *Fraxinus angustifolia* et ce malgré le contenu élevé en tanins de cette dernière espèce. Ce résultat peut s'expliquer probablement par la capacité limitée du PEG à la fois d'inhiber complètement les effets des tanins [2, 13],

son action dépendrait principalement de la stéréochimie et de la structure des tanins et d'autres facteurs qui seraient plus importants dans la limitation de la fermentation in vitro des tanins comme la quantité d'azote libre limitée pour le microbiote ruminal [28].

Quant à l'effet limité du PEG sur la production de gaz de *Lavandula stoechas*, il serait sans doute imputable à sa faible teneur en tanins totaux (6,91 g équivalent acide tannique/kg MS).

Sur la base de cette analyse, les effets variables positifs ou négatifs des tanins dans les plantes dépendent non seulement de leur concentration mais également de leur type et de leurs activités biologiques [15, 5].

L'augmentation de la production de méthane après ajout du PEG est la résultante de l'effet bloquant du PEG sur les tanins, c'est donc un bon indicateur de l'activité biologique des tanins sur la fermentation du microbiote ruminal. Cependant, l'effet du PEG est dépressif sur les feuilles de *Phillyrea angustifolia* et *Phillyrea latifolia* qui notent une réduction de la production de méthane (-16,58 et -38,01 % respectivement). Ce qui encourage le traitement de ces espèces par le PEG afin de les doter de propriétés anti méthanogènes.

Plusieurs auteurs ont rapporté que les tanins des plantes réduisent la méthanogénèse ruminale [8, 34, 39], alors que d'autres auteurs affirment le contraire. Par exemple, OLIVEIRA et al (2007) [29]. rapportent l'absence d'effet des tanins pour des aliments contenant du sorgho avec une forte ou faible concentration de tanins sur la production de méthane.

## Conclusion

L'évaluation de la fermentescibilité *in vitro* des feuilles des arbustes fourragers montre une augmentation relative de la production de gaz et de méthane à la suite de l'ajout du PEG chez la plupart des échantillons, qui représente le produit le plus utilisé pour améliorer la valeur alimentaire des fourrages riches en tanins. *Fraxinus angustifolia* serait un important fourrage à pâturer ou à affourager aux animaux du fait de ses propriétés anti méthanogènes, il en est de même pour *Phillyrea latifolia* et *Phillyrea angustifolia* après ajout du PEG du fait de leurs faibles teneurs en méthane, ce qui serait un avantage pour l'environnement. Enfin, les fortes corrélations entre les différentes méthodes d'analyse et les valeurs observées avec l'essai biologique avec PEG soutiennent l'idée que la technique in vitro de production de gaz avec et sans PEG, s'avère être un outil simple, efficace et utile pour examiner les effets potentiels des tanins dans les fourrages compte tenu des difficultés et du coût des approches *in vivo* dans les conditions de pâturage.



## Références

1. - AOAC.: Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, 1990, 15<sup>th</sup> Edition, Washington, D.C. USA.
2. - BABA A.S.H., CASTRO F.B., ORSKOV E.R. : Partitioning of energy and degradability of browse plants in vitro and the implication of blocking the effects by the addition of polyethylene glycol. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2002, **95**, 93-104.
3. - BARBER G.D., GIVENS D.I. KRIDIS M.S., OFFER N.W., MURRAY I. : Prediction of the organic matter digestibility of grass silage. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 1990, **28**, 115-128.
4. - BARRY T.N., MCNABB W.C. : The implication of condensed tannins on nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British J. Nutri.*, 1999, **81**, 263-272.
5. - BARRY T N, MANLEY T R., DUNCAN S J. : The role of condensed tannins in the nutritional value of Lotus pedunculatus for sheep. Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. *British J. Nutri.*, 1986, **55**, 123-137.
6. - BAUMONT R., AUFRÈRE J., MESCHY F. : La valeur alimentaire des fourrages : rôle des pratiques de culture, de récolte et de conservation., *Fourrages*, 2009, **198**, 153-173.
7. - CABIDDU A, DECANDIA M, SITZIA M, MOLLE G. : A note on the chemical composition and tannin content of some Mediterranean shrubs browsed by Sarda goats. *Cahiers Opt Méditerran.*, 2000, **52**, 175-178.
8. - CARULLA J.E., KREUZER M., MACHMÜLLER A., HESS H.D. : Supplementation of Acacia mearnsii tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, 2005, **56**, 961-970.
9. - CANBOLAT O., KAMALAK A., OZSKOSE E., OZKAN C.O., SAHIN M., KARABAY P. : Effect of polyethylene glycol on in vitro gas production, metabolizable energy and organic matter digestibility of Quercus cerris leaves. *Livestock Research for Ruminant Devlop.*, 2005, Volume 17, Article 42, <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/canb17042.htm>
10. - DOREAU M., MARTIN C., EUGÈNE M., POPOVA M., MORGAVI D.P. : Leviers d'action pour réduire la production de méthane entérique par les ruminants. *INRA Prod. Anim.*? 2011, **24**, 461-474.
11. - FAO.: World Agriculture: toward 2030/2050, interim Report, Rome, Italy, 2006.
12. - FIEVEZ V., BABAYEMI O.J., DEMEYER D. : Estimation of direct and indirect gas production in syringes: a tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. *Anim. Feed Sci. Technol.*? 2005, **123**, 197-210.
13. - FRUTOS P., HERVAS G., GIRALDEZ F.J., MANTECON A.R. : An in vitro study on the ability of polyethylene glycol to inhibit the effect of quebracho tannins and tannic acid on rumen fermentation in sheep, goats, cows and deers. *Australian J. Agri. Research.*? 2004, **55**, 1125-1132.
14. - GETACHEW G., BLUMMEL M., MAKKAR H.P.S., BECKER K./ In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 1998, **72**, 261-281.
15. - GETACHEW G., ROBINSON P.H., DePETERS E.J., TAYLOR S.J. : Relationships between chemical composition, dry matter degradation and in vitro gas production of several ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2004, **111**, 57-71.
16. - HAGERMAN A.E., ROBBINS C.T., WEERASURIYA Y., WILSON T.C., MCARTHUR C.: Tannins chemistry in relation to digestion. *J. Range Manage*, 1992, **45**, 57-62.
17. - ISO : INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDARDIZATION. : Aliments des animaux -- Détermination de la teneur en azote et calcul de la teneur en protéines brutes -- Méthode Kjeldahl, 1997.
18. - KHAZAAL K., DENTINHO M.T., RIBERIO J.M., ORSKOV E.R. : 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. *Anim. Sci.*, 1995, **61**, 527-538.
19. - LARWENCE A., HAMMOUDA A., SALAH A., ABADA S., OUCHAÏ N. : Valeur alimentaire des marcs de raisin. III. - Rôle des tanins condensés dans la faible valeur nutritive des marcs de raisin chez le mouton : effet d'une addition de polyéthylène glycol 4 000. *Ann zootech.*, 1984, **33**, 533-543.
20. - MAKKAR H.P.S., SINGH B.: Composition, tannin levels and in-sacco dry matter digestibility of fresh and fallen oak (Quercus incana) leaves. *Bioresource Technol.*, 1991, **37**, 185-187.
21. - MAKKAR H.P.S., BLUEMEL M., BOROWY N.K., BECKER K.: Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.*, 1993, **61**, 161-165.
22. - MAKKAR H.P.S., BLUMMEL M., BECKER K.: Formation of complexes between poly vinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and their implication in gas production and true digestibility in vitro techniques. *British J. Nutri.*? 1995, **73**, 897-913.
23. - MAKKAR H.P.S. BECKER K.: 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.*, 2009, **150**, 230-237.
24. - MC SWEENEY C.S., PALMER B., MC NEIL M., KRAUSE D.O. : Microbial interactions with tannins: Nutritional consequences for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2001, **91**, 83-93.
25. - MEBIROUK-BOUDECHICHE L., CHERIF M., BOUDECHICHE L., SAMMAR F. : Teneurs en

- composés primaires et secondaires des feuilles d'arbustes fourragers de la région humide d'Algérie. *Revue Méd. Vét.*, 2014, **165**, 344-352
26. - MENKE K. H., RAAB L., SALEWSKI A., STEINGASS H., FRITZ D., SCHNEIDER W. : The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *The Journal of Agricultural Science*, 1979, **93**, 217-222.
27. - MENKE KH, STEINGASS H. : Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.*, 1988, **28**, 7-55.
28. - NDOLVU L.R., NHERERA F.V.: Chemical composition and relationship to in vitro gas production of Zimbabwean browsable indigenous tree species. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 1997, **69**, 121-129.
29. - OLIVEIRA S.G., BERCHIELLI T.T., PEDREIRA M.S., PRIMAVESI O., FRIGETTO R., LIMA M.A.: Effect of tannin levels in sorghum silage and concentrate supplementation on apparent digestibility and methane emission in beef cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2007, **135**, 236-248.
30. - OLIVARES-PALMA SM, MEALE SJ, PEREIRA LG, MACHADO FS, CARNEIRO H, LOPES FC, MAURÍCIO RM, CHAVES AV. : In vitro Fermentation, Digestion Kinetics and Methane Production of Oilseed Press Cakes from Biodiesel Production. *Asian-Australas J. Anim Sci.*, 2013, **26**, 1102-1110
31. - ORSKOV ER., McDONALD I. : The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. *J. Agric. Sci. (Cambridge)*, 1979, **92**, 499-503.
32. - PATERSON J, COHRAN R, KLOPFENSTEIN T, 1996. Degradable and undegradable protein response of cattle consuming forage- based diets. Proc 3rd Grazing Livestock Nutrition Conference (Iudkins MB, Mc Collum III FT, eds.). *Proc. West Sec. Am. Soc. Anim. Sci.*, **47** (Suppl 1), 94-103.
33. - PORTER L.J., HRSTICH L.N., CHEN B. G.: The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. *Phytochemistry*, 1986, **25**, 223-230.
34. - PUCHALA R., MIN, B.R., GOETSCH A.L., SAHLU T.: The effect of a condensed tannins containing forage on methane emission by goats. *J. Anim. Sci.*, 2005, **83**, 182-186.
35. - RUBANZA C.D.K., SHEM M.N., OTSYINA R., BAKENGESA S.S., ICHINOHE T., FUJIHARA T.: Polyphenolics and tannins effect on in vitro digestibility of selected Acacia species leaves. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2005, **119**, 129-142.
36. - SINGH B., SAHO A., SHARMA R., BHAT T.K: Effect of polyethylene glycol on gas production parameters and nitrogen disappearance of some tree forages. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2005, **123**, 351- 364.
37. - SOMMART K, PARKER DS, ROWLINSON P, WANAPAT M. : Fermentation characteristics and microbial protein synthesis in an in vitro system using cassava, rice straw and dried ruzi grass as substrates. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 2000, **13**, 1084-1093
38. - SPEAR J.W.: Mineral in forages. In: G.C. FAHEY, Jr et al (éd): Forage quality, Evaluation and utilization, WI. *American society of agronomy, Madison*, 1994, 281- 317.
39. - TAVENDALE M.H., MEAGHER L.P., PACHECO D., WALKER N., ATTWOOD, G.T., SIVAKUMARAN S.: Methane production from in vitro rumen incubation with Lotus pedunculatus and Medicago sativa , and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2005, **123/124**, 403-419.
40. - TISSERAND J. L., ZELTER S.Z., DUMAY C., DUMONT SAINT-PRIEST M.: Essai de normalisation d'une technique de mesure de la digestion des fourrages in vitro (rumen artificiel). *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*, 1965, **5**, 101-111.
41. - VAN SOEST P.J.: Nutritional Ecology of the Ruminant, 476 pages, 2<sup>nd</sup> edn, Cornell University Press, Ithaca, NY, 1994.
42. - VAN SOEST P.J., ROBERTSON J.B., LEWIS B.A.: Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition, *J. Dairy Sci.*, 1991, **74**, 3583-3597.
43. - VIGNAU-LOUSTAU L., HUYGHE C. : Stratégies fourragères, 336 pages, *La France Agricole éditions*, Paris, 2008.