



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE EL ARBI BEN M'HIDI OUM EL BOUAGHI
DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

MEMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER

Filière : BIOCHIMIE APPLIQUEE

Option : BIOCHIMIE DES PRODUITS NATURELS D'ORIGINE VEGETALES

Présenté par :

HAOULI NOUR EL HOUDA

Thème

**CARACTERISATION PHYTOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DU
CONTENU TANNOIDE DE« *Marrubium vulgare*» et« *Urtica urens* »DE
ZONES ARIDES ET SEMI ARIDES**

Date de soutenance le : 14 /06/2015

Devant le jury composé de :

Président : Zellaguie. A	Prof - Université Larbi Ben m'hidi Om El bouaghi
Rapporteur : Arhab. R	Prof - Université Larbi Ben m'hidi Om El bouaghi
Examineur: Senoussi. M	Prof - Université Larbi Ben m'hidi Om El bouaghi
Examineur : Ghouraf. N	Prof - Université Larbi Ben m'hidi Om El bouaghi
Examineur : Djabri. B	M.C - Université Larbi Tebessi Tebessa

Année

2014/2015

Résumé

Résumé :

Cette thèse avait pour objectifs principaux l'étude de plantes des zones arides et semi arides, (*Marrubium vulgare*) et (*Urtica urens*) à travers plusieurs aspects .

L'analyse qualitative et quantitative, a permis de constater la richesse des extraits aqueux et méthanoliques en principes actifs, en particulier Polyphénols et flavonoïdes dans les extraits de *Marrubium vulgare* et *Urtica urens* et l'absence des saponines et des stéroïdes.

Les principaux éléments d'analyse de ce travail sont (composition chimique, digestibilité in vitro , production de gaz) La mesure de l'impact des tanins sur l'activité métabolique du microbiote ruminal est mesurée par la différence constatée par des essais, comparatifs de cultures avec et sans polyéthylène glycol (PEG). Dans notre étude, l'effet du PEG est plus prononcé sur la production potentielle de gaz (a + b). L'influence du PEG sur le profil fermentaire des deux substrats révèle que le PEG induit une augmentation significative ($P < 0,05$) dans la production du dioxyde de carbone (CO_2) pour *Urtica urens*. Le volume le plus élevé est enregistré pour cette plante est 20,84 ml. Par contre pour la production de méthane (CH_4), un décroissement significatif ($P < 0,05$) est observé pour les deux substrats. Les taux de réduction observés sont de 60,61% et de 16,5% respectivement pour *Urtica urens* et *Marrubium vulgare*. Ces résultats montrent que les tanins exercent un effet sur la production de méthane. Pour *Marrubium vulgare*, l'addition du polyéthylène glycol engendre une faible amélioration dans la production de gaz. Par contre, l'ajout de PEG augmente la production de gaz à partir de *Urtica urens*. La différence entre les deux substrats peut être attribuée soit à la capacité limitée du PEG à inhiber complètement les effets des tanins, qui dépend principalement de la stéréochimie et de la structure des tanins ou aussi à d'autres facteurs qui seraient plus importants dans la limitation de la fermentation in vitro que les tanins.

Abstract

This thesis main objectives were to study plants in arid and semi arid (*Marrubium vulgare*) and (*Urtica urens*) through several aspects .The qualitative and quantitative analysis revealed the wealth of aqueous and methanolic extracts of active ingredients , especially polyphenols and flavonoids in extracts of *Marrubium vulgare* and *Urtica urens* and lack saponins and steroids.

The primary analysis of this work elements (chemical composition , digestibility in vitro gas production) Measuring the impact of tannins on the metabolic activity of ruminal microbiota is measured by the difference found by testing, comparative cultures with and without polyethylene glycol (PEG). In our study, the PEG effect is more pronounced on the potential gas production (a + b).

The influence of the PEG on the fermentation profiles of the two substrates revealed that PEG induced a significant increase (P < 0.05) in the production of carbon dioxide (CO₂) for *Urtica urens* . The highest volume was recorded for this plant is 20.84 ml . By cons for producing methane (CH₄), a significant diminution (P <0.05) was observed for both substrates. The reduction rates observed are 60.61% and 16.5 % respectively for *Urtica urens* and *Marrubium vulgare* . These results show that tannins have an effect on the production of methane .

For *Marrubium vulgare* , the addition of polyethylene glycol causes a slight improvement in gas production . Against by the addition of PEG increases the production of gas from *Urtica urens* . The difference between the two substrates can be attributed either to the limited ability of PEG to completely inhibit the effect of tannins, which mainly depends on the stereochemistry and structure of tannins or also to other factors which would be greater in the limitation of the in vitro fermentation as tannins.

الملخص:

هذه الأطروحة كانت أهدافها الرئيسية دراسة النباتات في المناطق القاحلة و شبه القاحلة *Urtica* و *Marrubium Vulgare* من خلال عدة جوانب :

1- الخواص الكيميائية الدقيقة

2- تقييم إمكانيات الغذائية من خلال قياس التخمر في المختبر لجراثيم الكرش للماشية في حضور و غياب البولي إيثيلين جلايكول لتسليط الضوء على الدور المحدد للعفص

و كشف التحليل النوعي و الكمي على غناء المستخلصات المائية و الميثانولية بالمكونات النشطة. وخاصة بالبوليفينول و الفلافونويدات في كل من *Urtica urens* و *Marrubium Vulgare* و غياب الصابونين و النشطات (Stéroïdes)

التحاليل الأساسية لهذا العمل هي (التركيب الكيميائي و الهضم في المختبر و إنتاج الغاز).

قياس أثارالعفص على النشاط الأيضي لجراثيم الكرش هي بقياس الفرق بين الإختبارات مع و بدون البولي إيثيلين جلايكول (PEG) في دراستنا تأثير PGE هو أكثر وضوحا على إنتاج الغاز المحتملين (أ+ب)

تأثير PEG على التخمر للعينتين كشف أن PEG يسبب زيادة كبيرة ($P<0.05$) في إنتاج ثاني أكسيد الكربون (CO_2) عند (*Urtica urens*) أعلى حجم تداول تم تسجيلها لهذا المصنع هو 20.84 مل. في ما يخص غاز الميثان CH_4 لوحظ وجود نقص كبير ($P<0.05$) معدلات الإنخفاض الملحوظة هي 60.61% و 16.5% لكل من *Urtica urens* و *Marrubium Vulgare* على التوالي. وتشير هذه النتائج إلى الغاز على عكس إضافة PEG لـ *Urtica urens* الذي يؤدي إلى زيادة كبيرة في إنتاج الغاز الفرق بين الركائز يمكن أن يفسر إما القدرة المحدودة لـ PEG لمنع تماما تأثير العفص و التي تعتمد أساسا على الفراغية و هيكل العفص أو أيضا إلى عوامل التي من شأنها أن تكون أكبر في الحد من التخمر في المختبر كما العفص.

DEDICACE

Je dédie ce travail

A mes parents, qui m'ont tout donné sans rien en retour

Qui ont sacrifié leur vie pour que je puisse réussir et qui par leur attention, leur

Compréhension et leur soutien m'ont permis d'atteindre mes objectifs et concrétiser mes rêves.

À la pensée de mes grands parents

À toute ma famille

À mes amis et mes collègues

À tous ceux qui aiment la science

REMERCIEMENTS

Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à Mr Arhab Rabah, maître conférence à l'université Larbi ben m'hidi pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance

qu'il m'a accordé m'ont permis de réaliser ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Mr Zellagui Ammar, professeur à l'université Larbi ben m'hidi d'avoir accepté de présider le jury.

Je tiens également mes vifs remerciements à Mr Senoussi Mourad, professeur à l'université

Larbi ben m'hidi l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

J'exprime mes vifs remerciements à Mr Ghouraf Nour Eddine, professeur à

l'université Larbi ben m'hidi et Mr Djabri Belgassem pour l'honneur qu'il nous ont fait en acceptant de faire partie de jury.

Aux personnels du laboratoire de biochimie de faculté de médecine de Batna pour leur aide.

À tous mes amis.

À tous les étudiants de magistère de la promotion 2011.

À toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I Anatomie et fonction digestive de prés-estomacs des polygastriques.....	3
I-1 Anatomie	3
I-2 Les paramètres physico-chimiques de l'environnement ruminal (pH et Eh).....	5
I-3 Microbiote ruminal.....	6
I-3-1 Bactéries ruminales.....	6
I-3-1-1 Classification selon leur fonction.....	7
A Les bactéries cellulolytique.....	7
B Les bactéries amylolytiques.....	7
I-3-1-2. Classification selon leur état de présence de rumen	7
A Bactéries libres.....	7
B - Bactéries adhérentes.....	8
I-3-1-3 Autres bactéries.....	8
I-3-1-3-1 Bactéries méthanogènes.....	8
I-3-1-3-2 Bactéries pectinolytiques.....	8
I-3-1-3-3 Bactéries protéolytiques.....	8
I-1-3-2 Protozoaire.....	8
I-1-3-3 Champignons.....	9
I-1.4. Fonctions digestives.....	9
I-1-4-1 Le métabolisme azoté.....	9
I-1-4-2 Le métabolisme glucidique.....	10
I-1-4-3 Métabolisme des lipides.....	12
I-1-4-4 Le métabolisme ruminal du soufre.....	13
I-1-4-5 La méthanogènes ruminale.....	14
II -Les composés phénoliques.....	14

II -1 Classification des composés phénoliques.....	14
II -1-1 Les acides phénoliques.....	14
II -1-2 Les flavonoïdes.....	15
II -1-3 Les tanins.....	16
II -1-3-1 Définition.....	16
II -1- 3-2 classifications.....	16
A Les tanins hydrolysables.....	17
B Tanins condensés.....	18
II -1-3-3 Biosynthèse des tanins.....	19
Voie du shikimate.....	19
La voie de l'acétate malonate.....	20
II -1-3-4 Propriétés des tanins.....	20
Effets des tannins hydrolysables.....	20
Effets des tannins condensés.....	21
III-les saponines.....	23
IV -Plantes fourragères.....	23
IV-1- <i>Urtica urens</i>	24
IV-2- <i>Marrubium vulgare</i>	25

CHAPITRE II MATERIELS ET METHODES

1-matériel végétal.....	27
2- Analyse chimique des substrats.....	28
2-1 Détermination des teneurs en matière sèche et matière minérale.....	29
2-2 Analyses phytochimiques des composés secondaires.....	29
2-2-1 Analyse qualitative.....	30
A- Procédé d'extraction.....	30
2-2-2 Analyse quantitative des composés phénolique.....	31

A- Procédé d'extraction.....	31
B- Quantification des phénols totaux.....	31
C- Quantification des tanins totaux.....	32
D- Quantification des tanins condensés.....	32
E- Quantification des flavonoïdes totaux.....	33
3. Analyses biologiques des composés phénoliques.....	34
3-1- Test de précipitation des protéines ou test de diffusion radiale.....	34
A- Préparation de l'extrait.....	34
B-Préparation des boîtes de Pétri.....	34
C-Procédé d'analyse.....	34
3-2- Mise en évidence du contenu tannoïde par précipitation en présence du polyéthylène glycol (PEG) : technique de production de gaz in vitro.....	35
3-2-1- Principe de la quantification des tanins par de la technique de production de gaz in vitro.....	35
3-2-2-Description du système de fermentation.....	36
3-2-3- Matériel animal.....	37
A- Source d'inoculum.....	37
B-Préparation du milieu de culture.....	
C- Conduction de la fermentation.....	39
D- Mesure du Ph.....	41
4- Analyse statistique.....	41

CHAPITRE III RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. caractérisation chimique de <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Urtica urens</i>	43
2. caractérisation phytochimique de <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Urtica urens</i>	44
3 détermination par voie biologique du contenu tannoïde de <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Urtica urens</i>	46
3.2. Production de gaz in vitro.....	47
3-3- Impact des tanins sur le profil fermentaire.....	49
Conclusion	53

Références bibliographique

Annexes

Résumé

Liste des figures

Figure n°1 : Représentation schématique du tractus digestif d'une vache.....	3
Figure n°2 : Epithélium du réticulo-rumen.....	4
Figure n°3 : Bactéries ruminales avec grossissement 40.....	7
Figure n°4 : Vue générale du métabolisme protéique chez la vache laitière.....	10
Figure n°5 : Les différentes voies du métabolisme des glucides dans le rumen.....	11
Figure n°6 : Voies métaboliques de production et d'utilisation de l'hydrogène au cours des fermentations anaérobies dans le rumen.....	13
Figure n°7 : Squelette de base des sous classes de flavonoïdes.....	15
Figure n°8 : Structure de tanins hydrolysables.....	17
Figure n°9 : Structures chimiques des unités monomériques constitutives des tanins Condensé.....	18
Figure n°10 : La voie du shikimate.....	19
Figure n°11 : Structure des saponines du ginseng.....	23
Figure n°12 : Courbe étalon correspondant au dosage des phénols totaux.....	31
Figure n°13 : Courbe étalon correspondant au dosage des tanins totaux.....	32
Figure n°14 : Courbe étalon correspondant au dosage des tanins totaux.....	33
Figure n°15 : : Méthode de la diffusion radiale.....	35
Figure n°16 : Principe de la quantification des tanins par la méthode de production de gaz in vitro.....	36
Figure n°17 Système de fermentation en batch (Seringue en plastic de 60 ml capacité).....	36
Figure n°18 : Différentes étapes de préparation de la salive artificielle.....	39
Figure.19 : Impact des tanins sur la cinétique de la production de gaz in vitro, évalué par la différence entre le control (sans PEG) et test (avec PEG) <i>Urtica urens</i>	50
Figure 20 : Impact des tanins sur la cinétique de la production de gaz in vitro, évalué par la différence entre le control (sans PEG) et test (avec PEG) <i>Marrubium vulgare</i>	51

Liste des tableaux

Tableau n° 1 : Caractéristiques botaniques des espèces étudiées.....	27
Tableau n° 2 : Solutions utilisées dans la préparation de la salive artificielle.....	37
Tableau n° 3 : Quantités requises pour la préparation de la salive artificielle.....	38
Tableau n° 4 : Composition chimique (%) de <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Urtica urens</i>	44
Tableau n° 5 : Analyse qualitative des métabolites secondaires présents dans <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Urtica urens</i>	44
Tableau 6 : Teneur en phénols totaux (PT), tannins totaux (TT) et tannins condensés (TC) et capacité de précipitation des protéines (PPC) dans <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Urtica urens</i> (g/100 g MS).....	45
Tableau 7 : Comparaison des valeurs de pH de jus du rumen fraîchement collecté avec celles rapportées dans la bibliographie.....	47
Tableau 8 : Impact des tanins, indiqué par la présence et l'absence du PEG, sur la cinétique de la production de gaz et les paramètres cinétiques de <i>Urtica urens</i>	48
Tableau 9 : Impact des tanins, indiqué par la présence et l'absence du PEG, sur la cinétique de la production de gaz et les paramètres cinétiques de <i>Marrubium vulgare</i>	49
Tableau 10 : Impact des tanins sur les productions de méthane et de dioxyde de carbone cinétique de <i>Urtica urens</i> et de <i>Marrubium vulgare</i>	50

Liste des abréviations

AGV : acide gras volatil

AGL : acide gras libre

THs : tannins hydrolysables

TCs : tannins condensés

MS : matière sèche

CH₄: Methane

FAO: Food and Agriculture Organization

MS : Matière sèche

MM : Matière minérale

MO : Matière organique

N : Normalité

ATP : Adénosine triphosphate

PEG : Polyéthylène glycol

PVPP : vinyle polypyrrolidone

Introduction

Les plantes produisent un grand nombre de composés pour lesquels on ne sait pas toujours le rôle qu'ils jouent exactement pour la plante. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse, mais résultent de réactions chimiques ultérieures. On les appelle donc des métabolites secondaires.

On a découvert récemment que bon nombre d'entre eux exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement, ils participent aussi à la tolérance des végétaux à des stress variés (attaque de pathogènes, prédation,...) (**JOUANY, 1994**).

Les régions arides et semi-arides, caractérisées par des hautes températures et des faibles précipitations, se distinguent par leur couvert végétal de faible valeur nutritive due, principalement, à l'accumulation des métabolites secondaires. L'élevage de ruminants dans ces régions sera dépendant de la nature de cette végétation vue qu'elle constitue les ressources d'alimentation de base dans le système extensif appliqué. (**JARRIGE et al., 1995**)

La valeur alimentaire de ces plantes est étroitement liée à la biodisponibilité de ces nutriments pour l'animal via l'activité métabolique du microbiote ruminal. De même, la dégradation du tissu végétal est tributaire de l'accessibilité de ses polymères à la colonisation par les micro-organismes du rumen (**JARRIGE et al., 1995**) et influencée par la nature moléculaire des différents constituants nutritifs de cette alimentation tels que les éléments minéraux, les complexes organiques (les protéines,...), et les métabolites secondaires. Parmi ces derniers, les tannins, qui confèrent aux végétaux une protection contre les prédateurs (herbivores et insectes), réduisent à la fois la biodisponibilité des protéines des plantes et l'activité des enzymes digestives (**MAKKAR, 2005**). Dans ce concept, cette étude a pour principal objectif l'évaluation du contenu tannoïde de deux plantes : *Urtica urens* et *Marrubium vulgare*, censées riches en tanins, par usage à la fois de procédés chimiques et biologiques. Pour cela, le travail à accomplir serait dans un premier temps une analyse phytochimique (screening chimique) et dosage spectrophotométrique des phénols totaux, tanins totaux et condensés. Dans un second temps, il consiste d'évaluer leur activité biologique vis à vis du microbiote ruminal. L'étude est menée *in vitro* par la technique des gaz fermentaires en présence et en absence d'un agent chélateur des tanins qui est le polyéthylène glycol ou en boîtes de Pétri vis-à-vis du sérum albumine bovine (BSA).

*Chapitre I synthèse
bibliographique*

I Anatomie et fonctions digestives des pré-estomacs des polygastriques

I.1. Anatomie

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

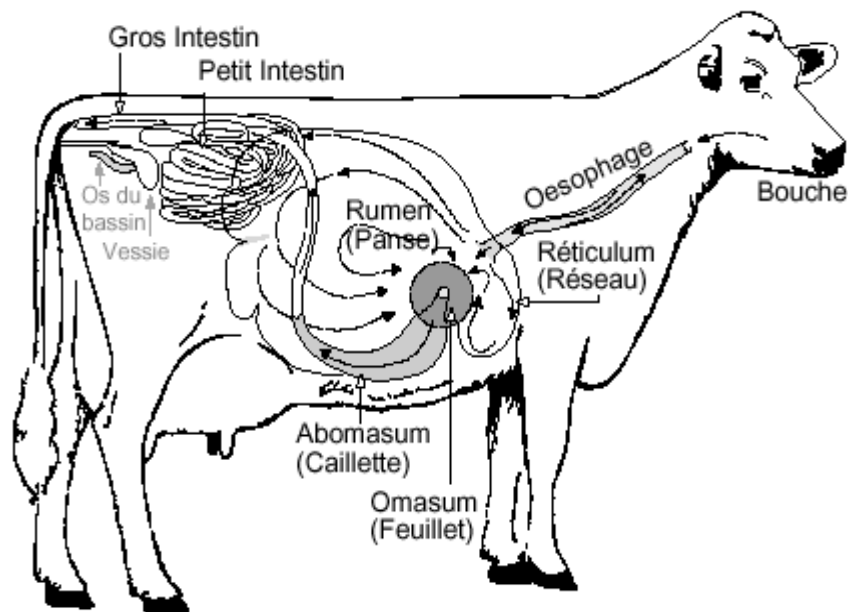


Figure 1 : Représentation schématique du tractus digestif d'une vache (d'après Babcock, 2011).

Parmi ces compartiments, le rumen est le plus volumineux : son volume varie entre 120 et 200 litres chez un bovin adulte, celui du réseau entre 7 et 12 litres, celui de l'omasum entre 9 et 16 litres et celui de l'abomasum entre 12 et 20 litres (**Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007**).

Le rumen est divisé en 2 parties : le sac ventral contenant une partie solide avec de grosses particules alimentaires (des fibres par exemple) surmontée par une phase liquide contenant de petites particules alimentaires et le sac dorsal rempli par les gaz issus des fermentations microbiennes. L'ensemble réseau-rumen est le siège d'un véritable écosystème où une grande part des aliments ingérés par l'animal est valorisée.

Les aliments qui sont ingérés, après une mastication rapide dans la bouche, rejoignent directement le rumen. Le bol alimentaire subit alors des dégradations mécaniques (mastication au cours de la rumination) et enzymatiques (*via* les microorganismes du rumen), avant d'arriver dans l'omasum. Cette

dégradation permet de fournir l'énergie et les métabolites nécessaires aux ruminants (pour leur entretien, la croissance, la production laitière...) mais aussi aux microorganismes du système digestif.

L'énergie et les métabolites comme les acides gras volatils (AGV) produits par la dégradation microbienne de la ration ingérée par le ruminant sont soit réutilisés par les bactéries pour leur croissance ou alors, par diffusion, traversent la paroi ruminale. Les papilles qui composent la muqueuse du rumen sont hautes et nombreuses, surtout au niveau de la phase liquide (**fig. 2A**). Au niveau du réticulum, l'épithélium est garni d'arrêtes en forme d'hexagones (**fig. 2B**). Les papilles du rumen et les arrêtes du réticulum permettent d'augmenter la surface d'échange entre l'intérieur du rumen et l'hôte

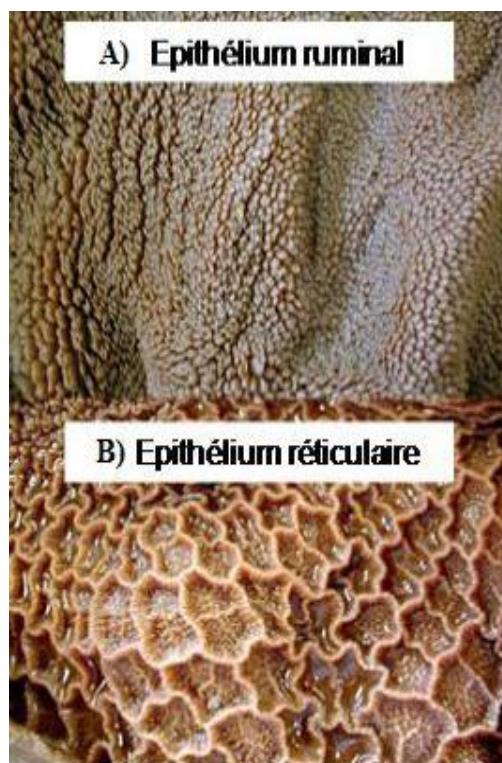


Figure 2 : Epithélium du réticulo-rumen (d'après Michelland, 2009)

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

I.2. Paramètres physico-chimiques de l'environnement ruminal (pH et E_h)

L'environnement ruminal est déterminé par un ensemble de paramètres physico-chimiques comme le pH et le potentiel redox (E_h). Le pH ruminal chez le ruminant adulte varie entre 5,5 et la neutralité en fonction des régimes de l'animal. En effet chez le ruminant recevant un régime alimentaire riche en concentrés, le pH ruminal diminue fortement durant les heures (entre 3 et 5h) qui suivent les repas principaux puis augmente jusqu'au repas suivant de par la présence de bicarbonate salivaire (Marden *et al.*, 2005 ; Brugère, 1983). La dégradation des aliments ingérés engendre une formation plus ou moins importante de produits de fermentation (dont les AGV et l'acide lactique...) selon la composition de la ration. Les produits de fermentation vont influencer directement le pH ruminal. En effet, une ration riche en amidon va engendrer un pH ruminal plus faible qu'une ration riche en fibres (Julien *et al.*, 2010a).

Le microbiote ruminal est sensible aux variations de pH, en particulier les bactéries cellulolytiques comme *Ruminococcus flavefaciens* qui produit des cellulases à un pH optimum compris entre 6,4 et 6,6 (Pettipher et Latham, 1979) et *Fibrobacter succinogenes* qui produit des endoglucanases à un pH optimal de 7. Les bactéries amylolytiques comme *Streptococcus bovis* ont une croissance optimale pour un pH compris entre 5 et 5,5 mais pour des pH inférieurs, elles disparaissent (Dawson et Allison, 1988) ; ou comme *Ruminococcus amylophilus*, produisent des amylases dont l'optimum d'activité est autour d'un pH de 6,3. Les lactobacilles se développent fortement à des pH faibles même inférieurs à 5 (Roque, 1991). Les bactéries utilisatrices de lactate ont une activité optimale pour de pH compris entre 6 et 6,5 sauf *Megasphaera elsdenii* qui résiste à des pH inférieurs à 5,5 mais est inhibée pour des pH inférieurs à 4,8 (Roque, 1991). Les bactéries qui dégradent l'urée ont une activité optimale pour des pH compris entre 7 et 8,5 (Wallace et Cotta, 1988). Les bactéries qui possèdent une activité lipolytique ont une activité optimale pour des pH supérieurs à 6,3.

(Stewart et Bryant, 1988). Les protozoaires ciliés sont sensibles aux pH acides, ainsi que les archées méthanogènes (Dawson et Alisson, 1988 ; Tiret, 2001). La composition et les modifications du milieu ruminal (substrats, pH...) influencent donc fortement le microbiote ruminal.

L'environnement ruminal est fortement anaérobie ce qui se traduit par un milieu réducteur et un potentiel redox (E_h) très négatif. Il varie en moyenne entre -220 et -110 mV chez des vaches taries (Julien *et al.*, 2010b ; Monteils *et al.*, 2011), entre -88 et -134 mV chez des vaches laitières (Marden *et al.*, 2008). Les modifications de E_h observées sont sans doute liées à l'arrivée d'oxygène dans le rumen (Andrade *et al.*, 2002) soit au moment de l'ingestion soit par diffusion depuis le sang vers le contenu ruminal.

I.3. Microbiote ruminal

Le rumen de la vache abrite 10^{10} à 10^{11} bactéries, 10^7 à 10^9 Archaea, 10^8 à 10^9 protozoaires (ciliés et flagellés), 10^3 - 10^5 zoospores de champignons et 10^9 à 10^{10} particules virales par millilitre (**Klieve et Swain, 1993**). Les bactéries constituent la fraction majoritaire de la microflore digestive (50 % de la biomasse microbienne) (**Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007**).

Toutefois, cette densité bactérienne varie en fonction des individus au sein d'une même espèce hôte mais aussi en fonction de la technique d'estimation utilisée.

I.3.1. Bactéries ruminales

La classification actuelle décompose le domaine des bactéries en un premier rang taxonomique appelé phylum. Dans les fermenteurs digestifs, 3 phyla majoritaires sont présents : les Firmicutes, les Bacteroidetes et les Proteobacteria contre 20 phyla dans les sols (**Dunbar et al., 2002**). La faible diversité retrouvée dans les écosystèmes digestifs pourrait s'expliquer par les fortes contraintes du milieu (pH, potentiel redox, anaérobiose) et la spécialisation fonctionnelle de ces écosystèmes. L'analyse de banques de séquences d'ADNr 16S issues de contenus de rumen montre que les Firmicutes sont généralement majoritaires (50 à 80% de la communauté) suivis des Bacteroidetes (10 à 40% de la communauté). Les Proteobacteria sont également présentes (3 à 5 % de la communauté) mais elles ne sont jamais dominantes chez les individus sains (**Seksik et al., 2003**). Dans le rumen de la vache, il existe une différence dans la répartition de ces phyla en fonction du compartiment : on observe 49% (dans la phase liquide) à 69% (dans la phase solide) de Firmicutes, 39% (dans la phase liquide) à 29% (dans la phase solide) de Bacteroidetes (**Tajima et al., 1999**).

I.3.1.1. Classification selon leur fonction

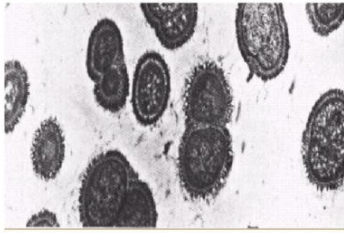
A- Bactéries cellulolytique

C'est le groupe des bactéries le plus important (**Rachedi, 2005**). Les principales bactéries cellulolytique isolées du rumen sont : *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* (**fig. 3a**), *Bactéroides succinogènes*, *Fibrobacter succinogènes*. Ces souches ruminales sont capables d'hydrolyser complètement la cellulose cristalline telle que le coton (**Fonty et al., 1995**).

B- Bactéries amylolytiques

Les espèces représentatives de ce groupe sont : *Selenomonas ruminantium* (**fig. 3b**) et *Streptococcus bovis* (**Jouany, 1994**), la plupart des bactéries hydrolysant l'amidon sont incapables d'utiliser la cellulose (**Orskov et Ryle, 1990**). *S. bovis* produit de l'acétate et de l'éthanol, quand sa croissance est normale (**Rachedi, 2005**). *Bactéroides annylophilus* ne fermente que l'amidon, les dextrines et le maltose (**Yaakoub, 2006**).

a- *Ruminococcus flavefaciens*



b- *Selenomonas ruminantium*

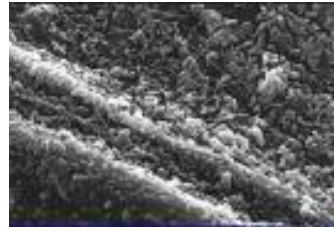


Figure 3 : Bactéries ruminales (Soltner, 1999).

I.3.1.2. Classification selon leur état de présence dans le rumen

A- Bactéries libres

Le 1/3 des bactéries se trouvent à l'état libre dans le liquide ruminale (**Yaakoub, 2006**), elles utilisent les substances libérées dans le milieu ruminal en se développant vers les régions de forte concentration en substrats préférentiels (**Rachedi, 2005**).

B- Bactéries adhérentes

Elles adhèrent soient aux particules alimentaires (70%) ou à la paroi ruminale.

I.3.1.3. Autres bactéries

A- Bactéries méthanogènes

Ce sont essentiellement *Methanobactérium ruminantium* et *M. mobile*. Elles produisent du méthane ce qui permet d'éliminer les ions H^+ en excès. D'où le rôle d'exutoire aux éléments réducteurs H^+ en milieu anaérobie. En orientant la fermentation vers la production d'acétate, elles potentialisent l'activité des bactéries cellulosiques et la croissance fongique mais cette production de CH_4 constitue une perte d'énergie pour les ruminants (**Chevallier, 2001**).

B- Bactéries pectinolytiques

Leurs principales espèces sont *Lachnospira multipara*, *Pervotellaruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvans*, *Streptococcus bovis* et quelques souche de *Spirochètes*, mais seulement quelque unes d'entre elles ont été isolées à partir de milieu sélectif contenant de la pectine purifiée comme seul substrat énergétique (**Yaakoub, 2006**).

C- Bactéries protéolytiques

Plusieurs espèces telles que *Mesgaphaera elsedinil*, peuvent croître à partir des acides aminés en absence de glucides comme source d'énergie (Wallace, 1996). Les bactéries se fixent par leur glycocalyx aux fragments végétaux. L'attaque se fait par érosion des surfaces endommagées et la surface bactérienne s'enfonce alors dans la paroi végétale (Rachedi, 2005). En effet, sur les parois intactes, les différents polymères glucidiques ne peuvent pas se lier à la surface bactérienne en raison de leur faible concentration, de leur liaison avec d'autres composants ou de leur configuration stérique incompatible avec les polymères extrêmes de la surface bactérienne (Yaakoub, 2006).

I.3.2. Protozoaires

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

Les ciliés sont 20 à 100 fois plus grands en taille que les bactéries (Kamara, 2005). Plusieurs espèces de protozoaires ciliés sont dotées d'une activité cellulolytique, hémicellulolytique et pectinolytique (Fonty, 1999). Ils assurent 10% de l'activité protéolytique et 30 à 40% de la fonction lipolytique (Brock et al., 1982).

I.3.3. Champignons

Leur concentration est estimée à 10^3 et 10^5 zoospores/ml, soit environ 10% de la biomasse microbienne (Fonty et al., 1988). Ce sont des zoospores flagellés qui sont soit monoflagellés (*Neocallimastix* et *Piromyces*) soit pluriflagellés (*Caecomyces*). Les Champignons possèdent des activités hydrolytiques à l'égard de nombreux polymères structuraux (cellulose, hémicelluloses, pectine). Les champignons semblent, en outre, capable de solubiliser *in vitro* une petite partie de la lignine des composés lignocellulosiques mais ils n'utilisent pas ces composés comme source d'énergie (Akin et Benner, 1988)

I.4. Fonctions digestives

Le microbiote ruminal est complexe et varié. La digestion résulte de l'activité des microorganismes du rumen.

I.4.1. Métabolisme azoté

Les protéines ingérées par l'animal sont dégradées par le microbiote ruminal et plus particulièrement par les bactéries et les protozoaires. Les bactéries ruminales ont une forte activité

protéolytique par rapport aux protozoaires car cette activité est présente au niveau de leur paroi cellulaire à l'inverse des protozoaires dont l'activité protéolytique est intracellulaire (Nugent et Mangan, 1981 ; Coleman, 1983). Les champignons anaérobies ont une très faible activité protéolytique (Wallace et Joblin, 1985 ; Bonnemoy et al, 1993).

La première étape du métabolisme azoté dans le rumen est la protéolyse (fig. 4). Les enzymes bactériennes agissent directement sur les protéines solubles pour produire des peptides et des acides aminés, alors que les protozoaires ingèrent les résidus protéiques (acides aminés) et les bactéries elles-mêmes (Coleman, 1975 ; Nugent et Mangan, 1981 ; Ushida et al, 1986). Ces acides aminés présents dans le rumen sont désaminés majoritairement par les protozoaires pour former l'ammoniac (NH₃) et des squelettes carbonés dont des AGV ramifiés en particulier l'isobutyrate et l'isovalérate (Mackie et White, 1990 ; Hino et Russel, 1985 ; Jouany, 1994).

L'activité uréolytique de certaines bactéries participe aussi à la production d'ammoniac, à partir d'urée alimentaire ou endogène. La deuxième étape est une synthèse protéique par les microorganismes, réutilisant en partie les produits de dégradation (peptides, acides aminés et ammoniac). Ces protéines microbiennes sont ensuite digérées dans l'intestin grêle.

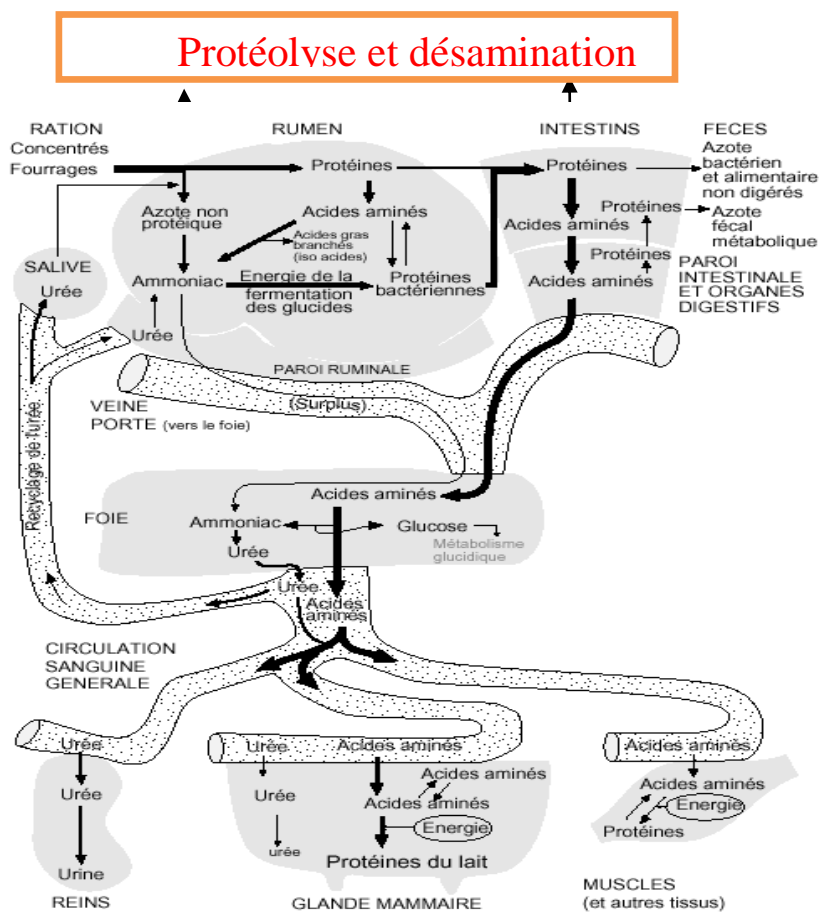


Figure 4 : Vue générale du métabolisme protéique chez la vache laitière (Jouany et al, 1995)

I.4.2. Métabolisme glucidique

Le microbiote ruminal possède un large panel d'activités enzymatiques pour hydrolyser les constituants glucidiques fibreux (cellulose, hémicelluloses, pectines) et l'amidon de la ration. L'hydrolyse produit dans un premier temps des oses simples, qui sont ensuite fermentés pour donner les composants utilisables par le métabolisme de l'animal, principalement les AGV (fig.5).

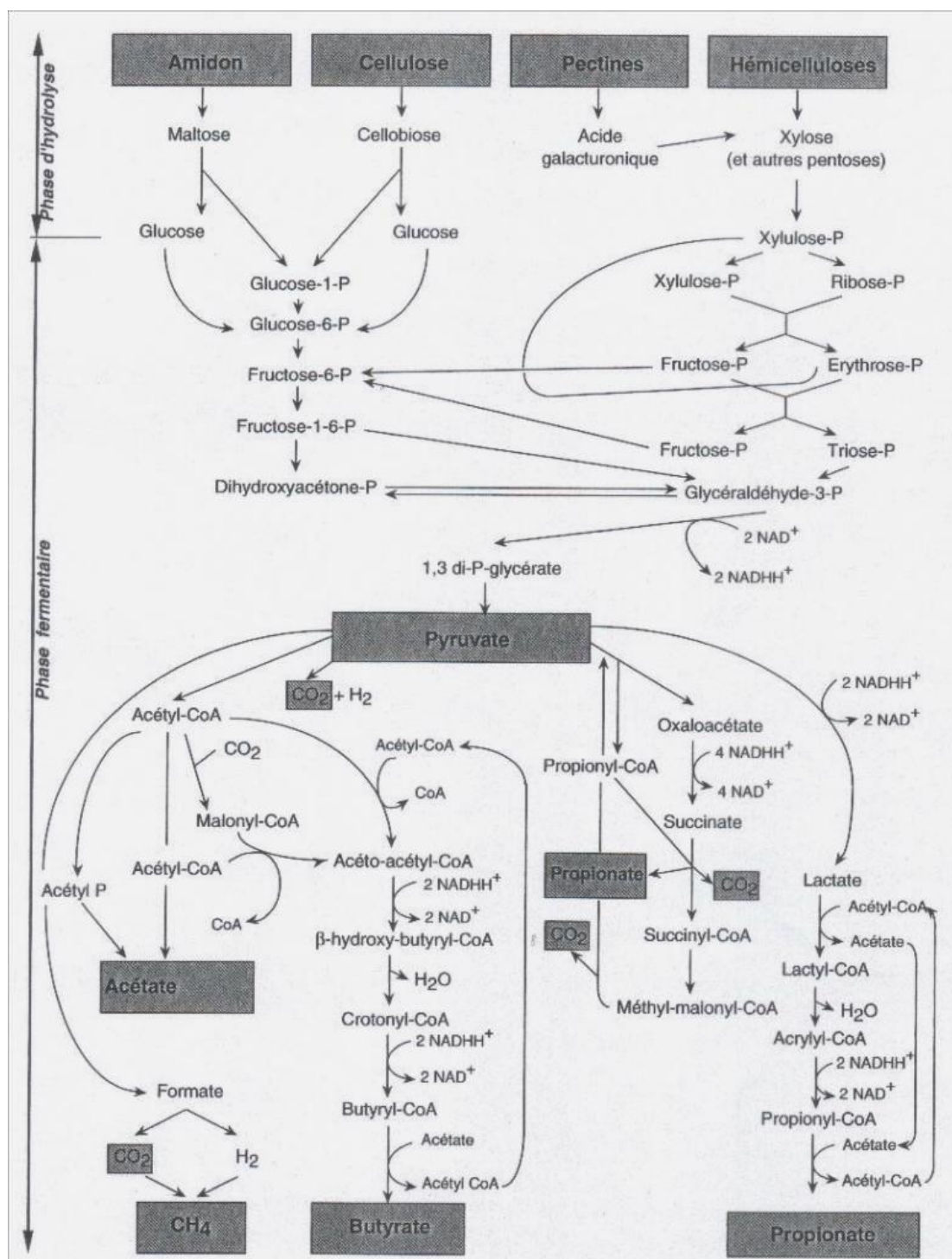


Figure 5 : Les différentes voies du métabolisme des glucides dans le rumen (Jouany, 1995).

Les enzymes qui hydrolysent les hémicelluloses sont des endoxylanases, des exoxylanases et des bêta-xylosidases qui vont permettre la formation de xylose et autres pentoses (fig. 5). Les enzymes

responsables de l'hydrolyse de la cellulose pour former du glucose sont des cellulases (endoglucanases, exoglucanases et bêta-glucosidases ; **Forano et al, 1996**). Les pectines sont hydrolysées par des enzymes extracellulaires comme l'exopectate lyase. Les amidons rapides sont partiellement dégradés dans le rumen par les amylases salivaires et extrabactériennes (**Jouany et al, 1995**). Les amidons lents sont dégradés au niveau de l'intestin.

Les oses simples produits sont ensuite fermentés en AGV (**fig. 5**). Pour cela, deux étapes sont utilisées :

- la première permet de fermenter les oses simples pour former l'acide pyruvique par les voies de la glycolyse (transformation du glucose pour produire du pyruvate et de l'ATP) et les voies des pentoses phosphates (transformation des xyloles phosphates en pyruvate) ;
- la deuxième permet de fermenter le pyruvate pour former des AGV par les voies acétate, butyrate et/ou propionate (**Andersen et al, 1999**). L'équilibre entre ces différentes voies dépend des substrats disponibles et donc des rations alimentaires ingérées par l'animal hôte.

Les AGV produits sont majoritairement absorbés par la muqueuse ruminale, puis utilisés par l'animal hôte pour ses besoins d'entretien, mais sont aussi utilisés pour la croissance du microbiote du rumen. De plus ces AGV participent à la prolifération des cellules de l'épithélium ruminal (**Sakata et Tamate, 1979**).

Ces voies fermentaires produisent également du gaz carbonique (CO₂) et de l'hydrogène (H₂) qui ne s'accumulent pas dans le rumen car ces produits sont très rapidement utilisés par les microorganismes hydrogénotrophes. Ces microorganismes sont les bactéries sulfato-réductrices, les bactéries acétogènes et surtout les archées méthanogènes.

I.4.3. Métabolisme des lipides

Les lipides sont en général apportés dans la ration sous forme estérifiée, soit sous forme de triglycérides dans les aliments concentrés, soit sous forme de glycolipides et de phospholipides dans les fourrages verts. Des formes spécifiques comme les savons d'acides gras ou des Acides gras libres (AGL) sont présentes dans certains produits commerciaux. Les glycérides sont hydrolysés grâce aux bactéries lipolytiques. De cette hydrolyse résultent des AG qui vont alors subir des transformations très diverses par d'autres microorganismes. Dans le rumen, les principales transformations des AG sont : l'isomérisation, l'hydrogénation et l'hydratation (**Van de Vossenberd et Joblin, 2003**). Environ 80% à 92% des acides linoléiques et linoléiques sont hydrogénés dans le rumen (**Doreau et Ferlay, 1994**). Après être sortis du rumen, les AG seront digérés grâce aux enzymes pancréatiques dans l'intestin grêle puis absorbés. Le degré de saturation des AG a des conséquences directes sur la nutrition et la santé des consommateurs de produits issus de ruminants. En effet, il a été montré, chez l'homme, que les AGS (acides laurique, myristique et palmitique) ont un rôle procarcinogène et pro-athérogène alors que les insaturés (acides oléique, polyinsaturés oméga 3) ont un rôle anti-carcinogène et anti-athérogène (**Williams, 2000**).

I.4.4. Métabolisme ruminal du soufre

Les ingrédients alimentaires contenant du soufre (S), les sulfates en particulier, sont réduits dans le rumen en sulfites puis en sulfures qui donnent de l'hydrogène sulfuré. Lorsque ces composés sont produits en faible quantité, ils sont utilisés en totalité par les microorganismes du rumen pour synthétiser leurs propres acides aminés soufrés. On estime que les besoins spécifiques des microorganismes du rumen en S sont couverts pour un rapport « azote/soufre » dans la ration de l'ordre de 10 à 15 (Vérité *et al*, 1986).

I.4.5. Méthanogénèse ruminale

Les fermentations anaérobies qui se déroulent naturellement dans le rumen produisent du méthane (CH₄), du dioxyde de carbone (CO₂), des AGV et de la chaleur (fig. 6).

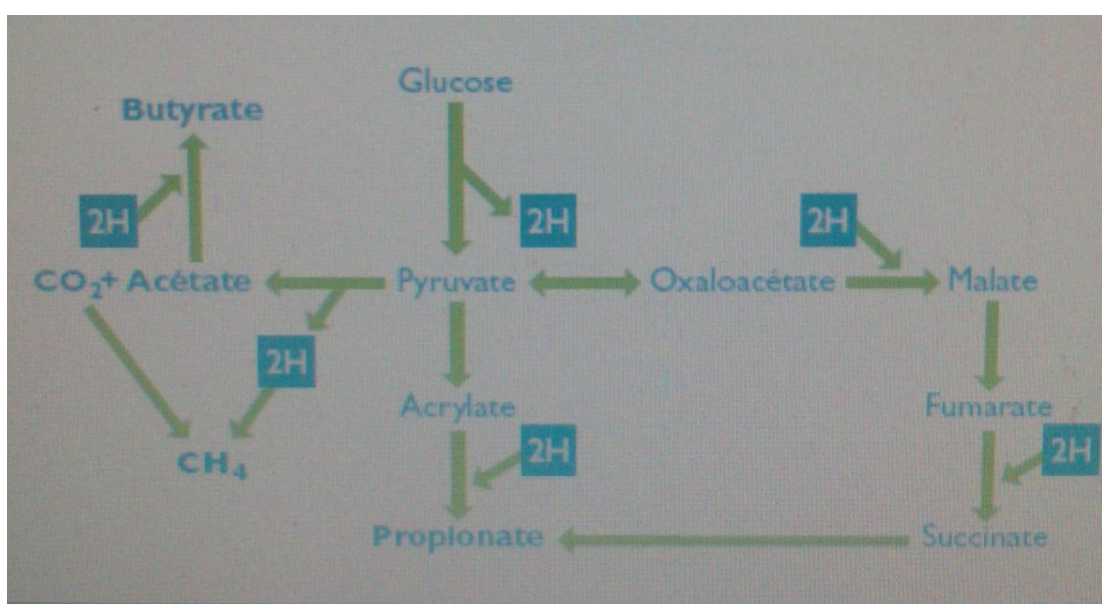


Figure 6 : Voies métaboliques de production et d'utilisation de l'hydrogène (C. Martin *et al*, 2006)

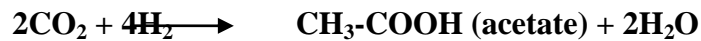
Au cours des fermentations anaérobies dans le rumen, les réactions d'oxydation par les déshydrogénases bactériennes génèrent de l'ATP nécessaire à la croissance des microorganismes et conduisent à la production d'hydrogène métabolique. Or l'accumulation d'hydrogène dans le milieu fermentaire inhibe l'action des déshydrogénases et conduit même à un arrêt des fermentations lorsque sa pression partielle devient supérieure à 1 kPa (Miller, 1995).

L'élimination nécessaire de l'hydrogène est assurée principalement par les *archaea* méthanogènes qui produisent du méthane selon la réaction suivante :



Des voies secondaires d'utilisation de l'hydrogène existent dans le rumen (synthèse de propionate ; réduction des nitrates ou des sulfates; saturation d'acides gras insaturés...) mais elles sont moins efficaces.

D'autres microorganismes comme les bactéries acétogènes (produisant de l'acétate) peuvent également fixer l'hydrogène digestif selon la réaction suivante, mais elles sont peu actives au niveau du rumen et sont davantage impliquées dans le métabolisme du gros intestin.



II. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 8000 structures connues différentes (**Bahorun, 1997**), allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins. Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

II.1. Classification des composés phénoliques

Il existe plusieurs classifications des composés phénoliques. Selon **Dacosta (2003)**, les composés phénoliques sont répartis généralement en plusieurs classes :

II.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont largement répandus chez les plantes. Ils dérivent principalement de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique. Les acides phénoliques comportent un radical COOH. Ils se trouvent souvent sous la forme de glycosides ou d'esters.

Les dérivés de l'acide benzoïque sont : l'acide hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide dihydroxybenzoïque, l'acide gallique et l'acide ellagique obtenu par oxydation de l'acide gallique. **Les dérivés de l'acide cinnamique sont :** l'acide coumarique, l'acide férulique, l'acide sinapique et l'acide caféique.

II.1.2. Les flavonoïdes

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. On estime que 2% environ du carbone organique photosynthétisé par les plantes, soit quelques 109 tonnes par an, est converti en flavonoïdes (**Lhuillier, 2007**).

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phenyl chromone portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides. Le noyau flavone est lui même un dérivé du noyau flavane de base (**Milane,**

2004). Structuralement, les flavonoïdes ont un squelette de base commun constitué de 15 atomes de carbone assemblés en trois cycles nommés A, C et B. Selon la structure du cycle intermédiaire (cycle C), les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules (fig. 7) :

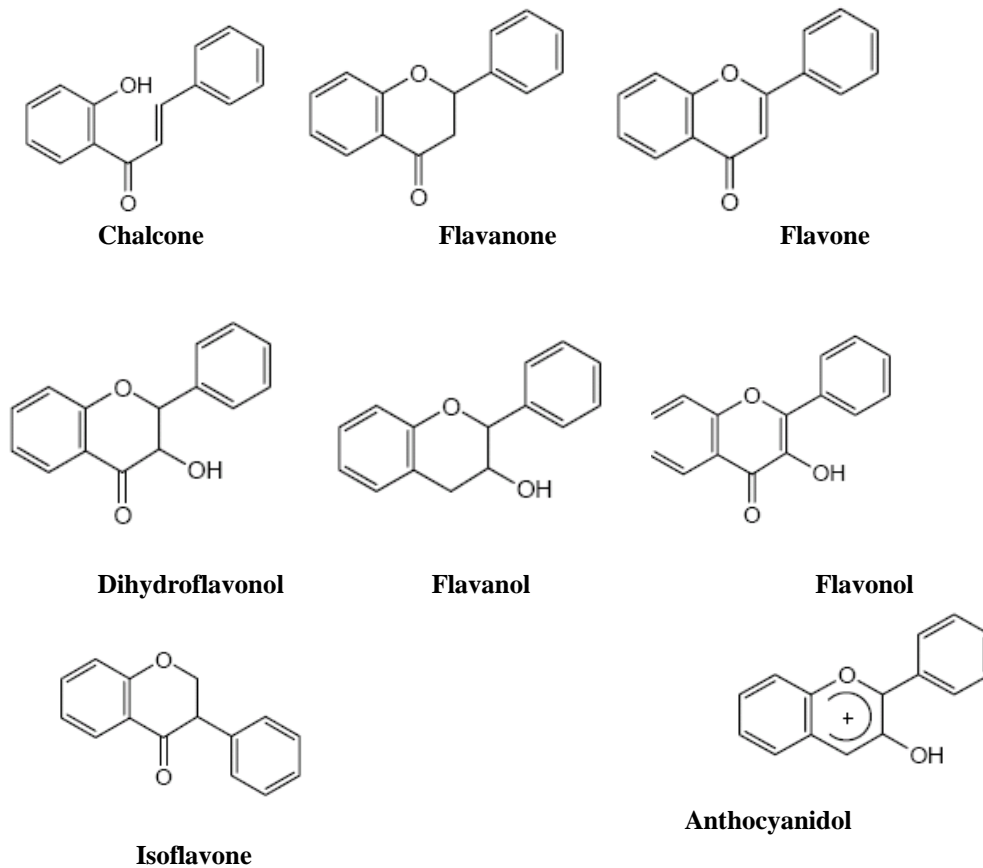


Figure 7 : Squelette de base des sous classes de flavonoïdes (**Fiorucci, 2006**)

II.1.3. Les tanins

II.1.3.1. Définition

Les tanins sont des polyphénols qu'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbres, les fruits (raisin, datte, café, cacao...) et les feuilles de thé. Les tanins sont des composés phénoliques solubles dans l'eau et les solvants polaires (**Hagerman, 2002**).

Les tanins ont la propriété de tanner la peau. C'est à dire de la rendre imputrescible ; cette propriété est liée à leur aptitude à se combiner à des macromolécules (protéines, polysaccharides...) (**Ghestem et al., 2001**). Ils présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (**Bate-Smith et Swain, 1962 ; Bruneton, 1999**). On distingue habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Bruneton, 1999**).

II.1.3.2. Classifications

A- Les tanins hydrolysables

Ce sont des esters du glucose (ou de molécules apparentées) et d'acides phénols qui sont : l'acide gallique, on parle alors de tanins galliques ou de l'acide ellagique, qui est un dimère de l'acide gallique, on parle alors de tanins ellagiques. Dans les deux cas, la fraction osidique est estérifiée par plusieurs molécules d'acide gallique ou plusieurs molécules d'acide ellagique (**Ghestem et al., 2001**) (fig. 9).

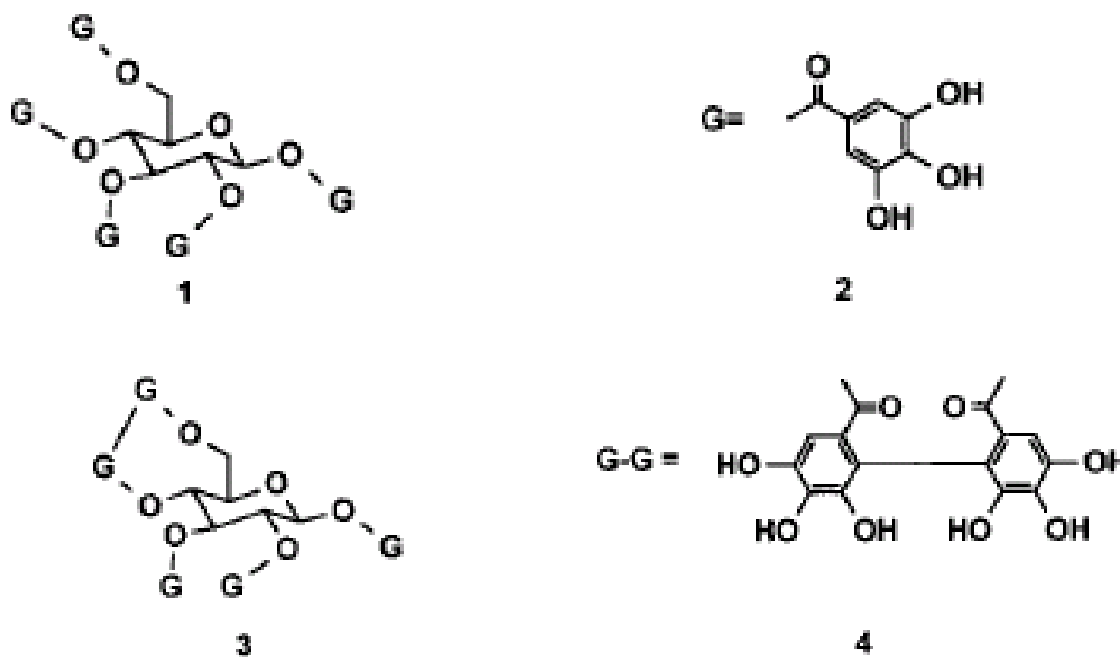


Figure8: Structure de tanins hydrolysables (**Hartzfeld et al., 2002**)

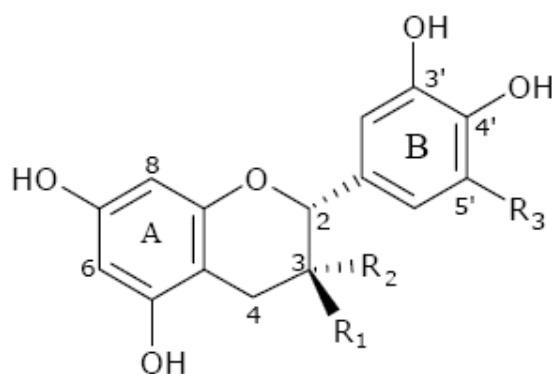
B- Tanins condensés

Des termes variés ont été utilisés dans la littérature pour décrire les tanins condensés, notamment : proanthocyanidines, tanins condensés, flavanes, polyflavanes, catéchines, substances polyphénoliques macromoléculaires, leucoanthocyanidines, proanthocyanidines condensés, proanthocyanidines polymériques, proanthocyanidines oligomériques, procyanidines, et oligomères procyanidoliques, (**Chung et al., 1998 ; Khanbabae et Vanree, 2001 ; Aron, 2007**). Les termes 'proanthocyanidines' et 'tanins condensés' sont les plus utilisés (fig. 11).

Le contenu des aliments en proanthocyanidines peut être affecté par plusieurs facteurs tels que le stockage et la cuisson. Puisque la teneur en proanthocyanidines est plus élevée généralement dans le fruit frais que le fruit séché ou cuit (**Aron, 2007**).

Les polymères de tanins condensés se forment sous l'action d'acides ou d'enzymes, ils sont formés généralement de 2 à plus de 50 sous unités monomériques (**Vermerris et Nicholson, 2006**). Les tanins condensés ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide, à chaud, par rupture de la liaison intermonomérique (**Porter et al., 1986**)

Selon **Aron (2007)**, les différentes classes de proanthocyanidines sont : Proapigeninidines, Profisetinidines, protricetinidines, propelargonidines, procyanidines, prorobinetinidines, prodelphinidines, proteracacinidines, promelacacinidines, Proluteolinidines, proguibourtinidines. Les proanthocyanidines se distinguent par leur nombre d'unités monomériques et le type de liaison les reliant entre elles. Ainsi, une trentaine de proanthocyanidines dimériques, trimériques et tétramériques ont été (**Ricardo-Da-Silva et al, 1991**) ont été identifiées.



Flavanols	R ₃	R ₁	R ₂
(+)-catéchine	H	OH	H
(-)-épicatéchine	H	H	OH
(+)-gallocatéchine	OH	OH	H
(-)-épigallocatéchine	OH	H	OH

Figure 9 : Structures chimiques des unités monomériques constitutives des tanins condensés (**Perret, 2001**)

II 1.3.3. Biosynthèse des tanins

Parmi toutes les substances secondaires synthétisées par les plantes, les tanins constituent l'un des plus importants groupes de produits phénoliques naturels, environ 2% du carbone photosynthétique sont convertis en flavonoïdes ou en substances apparentées telles que les tanins. La biosynthèse des tanins commence par la condensation de deux voies métaboliques : la voie du shikimate et la voie de l'acétate malonate.

A- Voie du shikimate

Tous les composés phénoliques sont formés via la voie du shikimate, appelée également la voie de phénylpropanoïde. Cette même voie conduit à la formation d'autres composés phénoliques tels que : les

isoflavones, les coumarines, la lignine et les acides aminés aromatiques (tryptophane, phénylalanine et tyrosine). La synthèse du noyau aromatique est achevée par la voie du shikimate, elle se fait par la condensation de l'acide phosphoenol pyruvique (PEP) et de l'érythrose-4-phosphate. Après une série de réactions successives, on aboutit l'acide shikimique (fig.11). (Leinmüller et al ,1991)

B- Voie de l'acétate malonate

Les systèmes aromatiques sont également formés par la condensation répétée d'unités acétate. La réaction entre les trois molécules (2 malonyl CoA et une molécule d'acéthyl CoA) donne une chaîne latérale qui se cyclise pour donner naissance au noyau A Enfin, les deux voies(Shikimate et acétate malonate) se condensent pour donner naissance aux différents types de flavonoïdes.

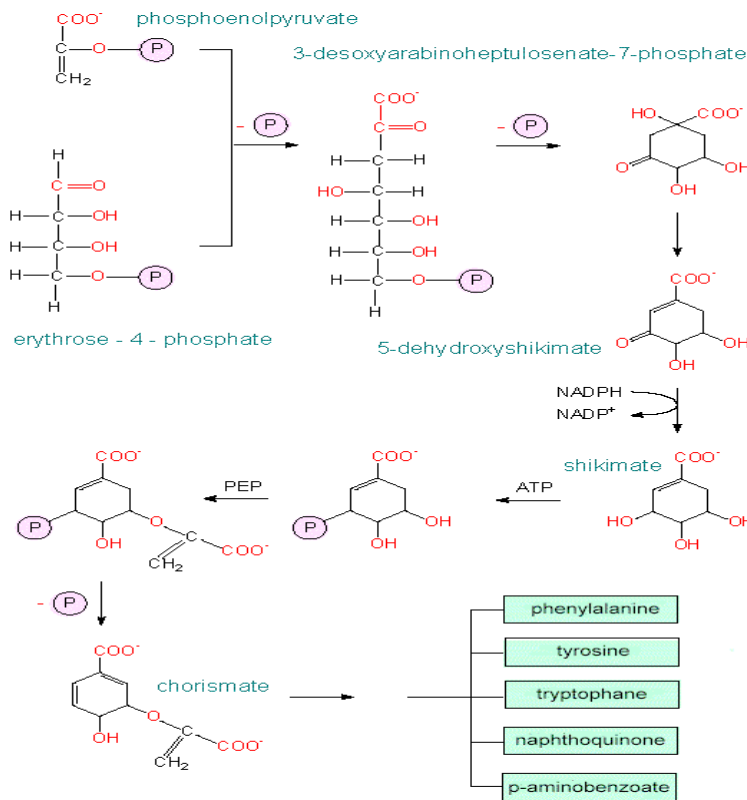


Figure 10 : La voie du shikimate (Leinmüller et al ,1991)

II.1.3.4. Propriétés des tanins

Les tanins étaient anciennement utilisés dans l'industrie du cuir (tannage) car en se liant aux protéines constitutives des peaux d'animaux, les tanins rendent le cuir solide, imputrescible et résistant aux microorganismes. Ils sont généralement non cristallisables, solubles dans l'eau, l'alcool, l'acétone et peu ou pas soluble dans l'éther. Ils précipitent en présence de protéines (gélatine et albumine), d'alcaloïdes et de certains colorants.

Les tanins forment avec les métaux lourds, et notamment les sels de fer, des précipités de couleur très foncée : noirs, bruns, bleus sombres, utilisés pour cette raison dans la fabrication de certaines encres. Ils sont également utilisés comme coagulants dans le caoutchouc.

Les propriétés biologiques des tanins sont principalement liées à leur capacité à former des complexes avec les macromolécules, en particulier les protéines. C'est pourquoi ils sont utilisés dans le traitement des aliments et la clarification des vins, des bières et des jus de fruits. Ils font également partie des formulations des agents de conservation du bois.

En solutions alcooliques, ils donnent avec le chlorure ferrique, très dilué, une coloration bleue (tanins galliques) ou verte (tanins catéchiqes). (**Zhu et al. , 1992**)

A- Effets des tannins chez les ruminants

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

Les THs peuvent être responsables d'intoxications sévères voire mortelles (**Jean-Blain, 1998**). A l'inverse, les TCs sont en général considérés comme étant moins toxiques, rarement responsables de cas létaux, en particulier chez les ruminants.

- **Effets des tannins hydrolysables** : les intoxications sévères de diverses espèces animales après ingestion excessive de plantes riches en THs ont été attribuées surtout à la présence de gallotannins (**Reed, 1995; Butter et al, 1999; Norton, 1999**). Chez les ruminants, les THs hydrolysés par des bactéries ruminales provoquent la libération d'acides galliques qui sont ensuite décarboxylés en pyrogallol, convertis ensuite en résorcinol (**Singh et al., 2001; Min et al., 2003**). Ces métabolites (résorcinol et punicalagin), qui sont hépato- et néphro-toxiques, sont ensuite absorbés dans le sang (**Mueller-Harvey, 2006**). Toutefois, il a été montré que la toxicité des THs dépendait de la qualité (structure chimique, PM) et de la quantité (dose) des THs ingérés (**Zhu et al, 1992; Frutos et al, 2004**).
- **Effets des tannins condensés** : Pour les TCs, le principe énoncé par Paracelse, (« la dose seule fait le poison ») reste valide, puisque des effets néfastes sur la production et la santé des animaux ont été observés uniquement lors d'ingestion massive de ressources riches en TCs. A l'inverse des THs, les TCs sont rarement associés à une toxicité aiguë chez les ruminants (**Butter et al, 1999**). Un apport faible à modéré a été associé à des effets favorables alors que l'ingestion de teneur élevée en TCs aboutit à des effets néfastes sur les paramètres zootechniques, la physiologie digestive et la santé des animaux. En

conséquence, trois types de conséquences zootechniques peuvent être identifiés selon la teneur en TCs de la ration (**Aerts et al. 1999**)

- Absence d'effet sur l'ingestion volontaire d'aliments

La mastication des plantes par l'animal provoque la rupture des parois des cellules végétales ce qui libère en conséquence les TCs des vacuoles dans la bouche de l'animal. En raison de la sensation d'astringence associée, cette libération induit des effets sur l'ingestion volontaire d'aliments et peut modifier les fonctions ruminales et post-ruminales. Toutefois, pour les légumineuses tempérées dont la teneur en TCs est faible à modérée (<4 à 5% de la MS), la consommation d'aliments est peu modifiée (**Waghorn et al, 1987; Terrill et al, 1992a**) et provoque par ailleurs des effets plutôt favorables sur les processus physiologiques post-ingestifs.

- Effets sur la digestion des aliments

Les TCs affectent les différentes étapes de la digestion au niveau ruminal et post-ruminal, ce qui explique leurs conséquences associées sur les divers aspects de la production des grands et des petits ruminants.

- Effets sur les fermentations intra-ruminales:

Le rumen se caractérise par un pH de 6 à 7. A cette gamme de pH, les complexes entre TCs et protéines sont stables (**Aerts et al, 1999; Butter et al, 1999**) et contribueraient à protéger les protéines des dégradations ruminales. La formation de complexes entre TCs et protéines alimentaires ou leur fixation aux enzymes bactériennes réduisent globalement la protéolyse ruminale. L'une des premières conséquences de ces phénomènes est de limiter la production et l'excrétion de méthane et d'ammoniaque (**Mc Nabb et al, 1993; Theodorou et al, 1999**)

- Effets post-ruminaux

La protection de la dégradation des protéines alimentaires dans le rumen conduit à une augmentation du flux de protéines assimilables (PDIA) dans l'intestin et en conséquence, une absorption accrue d'acides aminés (**Mc Nabb et al, 1993; Barry et Mc Nabb, 1999**) Selon **Butter et al. (1999)**, le pH acide de l'abomasum induit une dissociation des complexes TCs-protéines et la libération des protéines et des acides aminés, permettant ainsi leur digestion et leur absorption au niveau intestinal (**Zimmer et Cordesse, 1996; Butter et al, 1999**). Une augmentation de 50% du flux d'azote post-ruminal a ainsi été mesurée chez des moutons consommant du lotier corniculé par rapport à des témoins (**Waghorn et al, 1987**).

- Amélioration des productions

Il a été montré que la consommation de plantes contenant des TCs (*L. corniculatus*) en quantité modérée influe sur la croissance d'agneaux (Aerts et al., 1999) ou de veaux (Moore et al., 2003). L'ingestion à faible niveau de TCs influence aussi le niveau de production et la qualité du lait (Aerts et al., 1999; Min et al., 2003; Molle et al., 2003). Ainsi, la consommation de lotier corniculé (*L. corniculatus*) ou de Sulla (*H. coronarium*) a été associée à une augmentation de production laitière chez les bovins ou chez les ovins (Min et al., 2003; Leto et al., 2002). Par ailleurs, une augmentation du taux protéique de 10% chez des vaches et de 12% chez des brebis ingérant des TCs, ainsi que du taux de lactose (14% chez les brebis), a été constatée par rapport aux animaux témoins (Aerts et al., 1999). Enfin, un apport modéré de TCs, (de 2 à 4% de la ration), a été associé à une augmentation de la production de laine. Par exemple, la consommation de lotier corniculé a induit une augmentation de 11% de la production chez des ovins, qui serait liée à une absorption accrue d'acides aminés, en particulier de cystéine, indispensable pour la synthèse de la laine (Mc Nabb et al., 1993).

- Amélioration des performances reproductives

Seules quelques études ont examiné les effets potentiels des TCs sur la reproduction des ruminants. La plupart d'entre elles ont montré que la consommation d'une légumineuse fourragère, notamment du lotier corniculé, riche en TCs induisait une augmentation du taux d'ovulation des brebis (Min et al., 2001). Ainsi, une corrélation positive entre le nombre de jours de pâture sur du lotier corniculé (2 à 3% TCs) et le taux d'ovulation des brebis a été mentionnée (Ramírez-Restrepo et Barry, 2005b).

III .Les saponines

Sous ce nom est désigné une vaste famille de glycosides triterpéniques ou stéroïdiens qui se trouvent dans de nombreuses plantes. Ils sont composés de deux parties :

- une partie hydrophile, formée d'un ou de plusieurs sucres, eux-mêmes de nature variée
- et une partie aglycone et lipophile (dite sapogénine), qui est soit un résidu de triterpène, soit un résidu de stéroïde.

Les saponines sont retrouvées dans le soja, l'ail, les haricots blancs, les épinards, les tomates, les pommes de terre, les graines d'avoine, la luzerne (Dacosta, 2003).

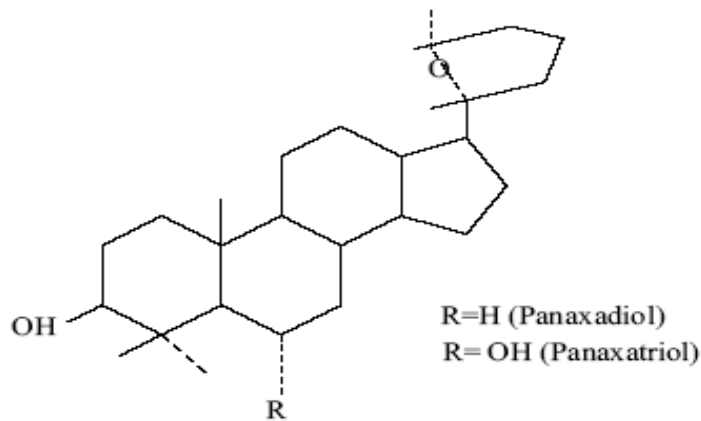


Figure 11: Structure des saponines du ginseng (**Packer, 2001**)

IV . Plantes fourragères

Parmi les plantes fourragères :

IV. 1. *Urtica urens*

L'Ortie est une des rares plantes que l'on peut reconnaître les fermés. Qui ne s'est jamais laissé surprendre par son contact irritant? Considérée comme une «mauvaise herbe », l'Ortie est en réalité une Plante riche en vitamines et minéraux et pourvue de nombreuses vertus médicinales. Elle est également employée dans d'autres domaines comme l'agriculture, l'art culinaire ou encore le textile. (**Francine Draghi, 2005**)

L'Ortie est une plante qui «aime» le voisinage des habitations, les décombres et lieux incultes: c'est une plante qualifiée de «rudérale ».

Elle pousse sur les terres humifères et légères; on la rencontre dans les haies, les chemins, les coupes des bois, dans les champs et les jardins bien fumés... Elle est inféodée à la présence de l'Homme.

Elle «aime» les sols frais et légers, 'ensoleillement lui semble indifférent puisqu'on la trouve aussi bien en plein soleil à l'abri d'une façade qu'au fond d'un vallon ombragé.

Elle supporte tous les sols, surtout ceux contenant des matières organiques

fraîches; elle fait partie des plantes nitrophiles.

Symbole de milieux riches et fertiles, l'Ortie ne pousse jamais seule, mais en grands massifs compacts à l'abri desquels s'installe de nombreux insectes. L'ortie, distribuée à l'état frais ou après dessiccation, améliore l'appétit chez les bovins. De ce fait, ils s'engraissent plus vite et sont en meilleure santé. L'ingestion d'orties sous toutes ses formes accroît la sécrétion lactée des vaches (pouvoir galactogène). En hiver, elle élève le taux de crème et donne un goût agréable au beurre, qui devient jaune et léger comme en plein été. Une proportion de 25 % d'Ortie et de 75 % de fourrage classique semble un bon dosage. (Bertrand Bernard, 2002)



Urtica urens

IV .2. *Marrubium vulgare*:

Le Marrube vulgaire est une plante, d'aspect blanchâtre à odeur forte et désagréable. L'espèce *Marrubium vulgare*, appelée localement Marriouth, est largement utilisée en médecine traditionnelle. Au Maroc la décoction de la plante est employée comme antidiabétique, seule ou associée au Fenugrec, à la Globulaire turbith, à l'Ivette, à l'Armoise blanche, au Lupin blanc, au Thym. La décoction est prescrite également comme anti-typhoïdique, anti-diarrhéique, fébrifuge, anti-ictérique, expectorant, tonique et stimulant (pour les malades

alités). Les diabétiques édulcorée généralement la décoction avec le miel ou les raisins secs .En usage externe, la plante hachée et couramment utilisée en cataplasmes sur le front et les tempes contre les fièvres, et sur les abcès. Alors que dans le "Jbel Bou Iblane" le Marrube est mâché contre les maux de dents. En médecine traditionnelle Tunisienne on reconnaît au Marrube un certain nombre de propriétés : le décocté préparé à partir de la plante entière est utilisé dans l'hypertension, les hémorroïdes et aussi antirhumatismal, analeptique cardiaque, antiseptique pulmonaire. Il est réputé pour purifier le lait des femmes qui allaitent. Il est utilisé en bain de bouche et en usage externe dans le traitement des brûlures (**M-K.Boukef 2002**)




Marrubium vulgare


Chapitre II Matériels Et Méthodes

1. Matériel végétal

Deux plantes pastorales ont été choisies pour une caractérisation chimique et biologique de leurs contenus en tanins, il s'agit de *Marrubium vulgare* famille des Lamiacées et *Urtica urens* familles d'Urticacées. Les échantillons de ces deux plantes ont été collectés durant le mois d'Avril 2013, dans la région de Batna pour *Marrubium vulgare* et de la région de Mila pour *Urtica urens*, par coupure à la main (partie aérienne). Ces échantillons sont ensuite séchés à l'air libre et à l'ombre, moulus et tamisés en particules de 1-mm par un broyeur électrique. Les plantes sont conservées dans des récipients fermés jusqu'à leur utilisation, les caractéristiques des deux plantes sont mentionnées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques botaniques des espèces étudiées.

Plante	Description botanique	Position systématique
 <p>Nom vernaculaire : Marriouth (Al kadi, 1989)</p>	<p><i>Marrubium vulgare</i> : Plante vivace de 3 à 80 cm, tomenteuse-blanchâtre, à odeur pénétrante ; tiges épaisses, simples ou peu rameuses ; feuilles pétiolées, ovales-orbiculaires, en cœur ou en coin à la base, irrégulièrement crénelées ridées, tomenteuses, vertes en dessus ; fleurs blanches, en verticilles axillaires nombreux, multiflores, très compacts, espacés sur les tiges ; bractéoles en alène, glabres et crochues au sommet, ainsi que les 6-10 dents inégales du calice.</p>	<p>Royaume : Plantes Sous royaume : Tracheobiontes Embranchement : Spermatophytes Division : Magnoliophytes Classe : Magnolipsides Sous classe : Asteridae Ordre : Lamiales Famille : lamiaceae Genre : <i>Marrubium</i> Espèce : <i>Marrubium vulgare</i></p>

Plante	Description botanique	Position systématique
 <p data-bbox="132 913 300 943">Ortie brulante</p> <p data-bbox="132 1021 612 1099">Nom vernaculaire : Horrig (Mahmoudi yahia, 2011)</p>	<p data-bbox="639 327 1018 1585"><i>Urtica urens</i> : Plante annuelle de 20-60 cm, hérissée, d'un vert clair - tige dressée, souvent rameuse dès la base - feuilles assez petites, ovales, arrondies ou atténuées à la base, incisées-dentées - pétiole plus court ou aussi long que le limbe, à 2 stipules lancéolées - fleurs monoïques, les mâles et les femelles mêlées, les femelles bien plus nombreuses, en grappes subsessiles, souvent géminées, simples, plus courtes que le pétiole - périanthe peu accrescent et peu hispide - graines de 1 12 à 2 mm Décombres et lieux cultivés, dans toute la France et la Corse. Europe - Asie - Afrique et Amérique septentrionales. (Mahmoudi yahia ,2011)</p>	<p data-bbox="1045 327 1318 622">Règne : Plantae Classe : Magnoliopsida Ordres : Rosales Famille : Urticaceae Genre : Urtica Espèce : <i>Urtica urens</i></p>

2. Analyse chimique des substrats

2.1. Détermination des teneurs en matière sèche et matière minérale

La matière sèche est déterminée après dessiccation d'1g de chaque échantillon dans une étuve réglée à 105°C jusqu'à poids constant. La différence de poids correspond à la perte d'humidité et le résidu représente donc la teneur en matière sèche. Le taux de la matière sèche est calculé par la différence entre le poids frais et le poids sec.

$$\%MS = \frac{p3 - P1}{P2 - P1} \times 100$$

Avec : **P1** : poids du creuset vide, **P2** : poids du creuset + 1g de l'échantillon, **P3** : poids du creuset + résidu de l'échantillon et **MS (%)** : pourcentage de matière sèche.

La teneur en eau est calculée selon la relation suivante : **Teneur en eau (H%) = 100 - MS%**.

Les cendres (matière minérale) sont déterminées par incinération d'1g d'échantillon sec dans un four à moufle à 550°C pendant 5 heures (**AOAC, 1990**). La matière organique correspond à la différence entre la prise d'essai et les cendres qui en résultent. La teneur en matière minérale est déterminée à partir de l'équation suivante :

$$\%MM = \frac{P4 - P1}{P3 - P1} \times 100$$

Avec : **P1** : poids du creuset vide, **P3** : poids du creuset + résidu sec de l'échantillon, **P4** : poids du creuset + résidu après incinération et **MM (%)** : pourcentage de matière minérale. La teneur en matière organique est calculée comme suit :

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

2.2. Analyses phytochimiques des composés secondaires

2.2.1. Analyse qualitative

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

A- Procédé d'extraction

L'extraction des composés secondaires est réalisée par une solution aqueuse de méthanol à 80% (v/v). 15g d'échantillon sec sont traités pendant 40 min par 30 ml de méthanol. L'extraction est répétée trois fois et le mélange obtenu est filtré. Le résidu est incubé dans de l'eau chaude pendant 20 min puis filtré à son tour. L'opération d'extraction permet l'obtention de deux phases : une phase polaire correspondant à la fraction aqueuse et une phase apolaire représentée par la phase méthanolique. Les deux phases sont utilisées pour les différentes analyses.

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

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

- **Phénols totaux** : 1 ml de l'extrait méthanolique est dilué par addition de 2 ml d'eau distillée. Deux à trois gouttes de chlorure ferrique (FeCl_3 à 2%) sont ajoutés et le virage de couleur indique la présence de composés phénoliques comme suit :

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

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

2.2.2. Analyse quantitative des composés phénolique

A- Procédé d'extraction

Le but est de quantifier les phénols totaux 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 et al. (1993)**. Le matériel sec (200 mg) est traité par 10 ml d'une solution aqueuse d'acétone (70%). Le contenu est ensuite transféré dans des tubes puis il est centrifugé durant 10 min à 3000g 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. Une centrifugation est ensuite effectuée (10 min, 3000g, 4°C). Le surnageant est alors récupéré et traité comme précédemment décrit.

B- Quantification des phénols totaux

Elle est réalisée selon le procédé décrit par **Makkar et al. (1993)**. 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 (Na_2CO_3 , 20%). Le mélange est agité au vortex et l'absorbance est mesurée à 750 nm après 40 min. La teneur en phénols totaux est exprimée en équivalent d'acide tannique (fig. 12).

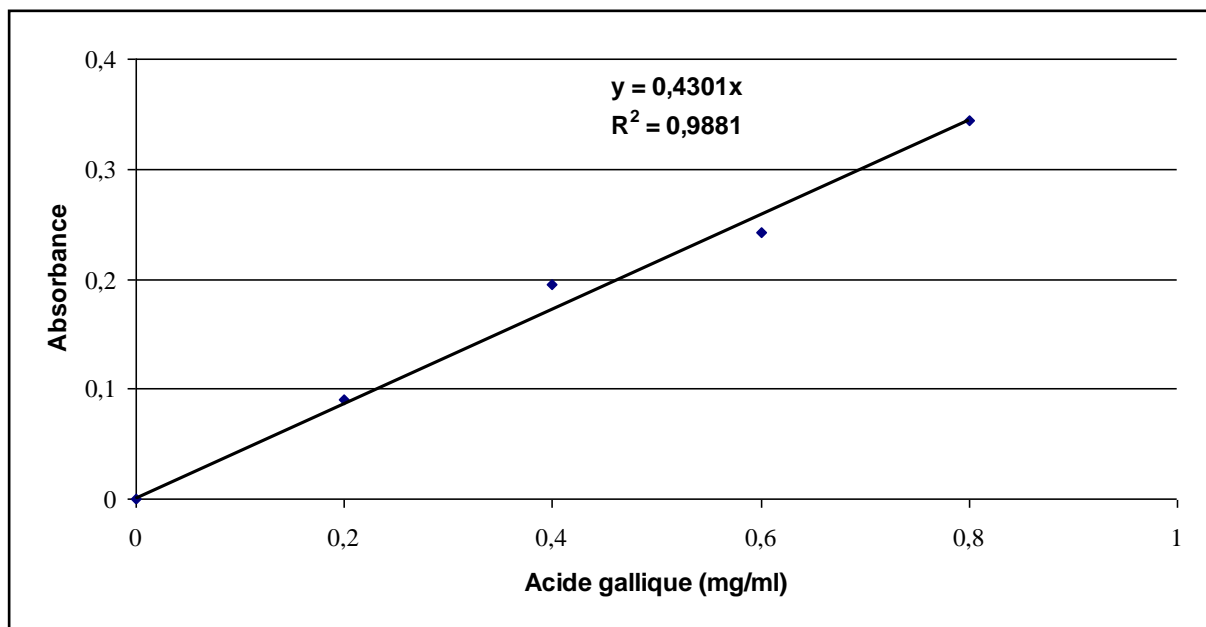


Figure 12 : Courbe étalon correspondant au dosage des phénols totaux.

C- Quantification des tanins totaux

Cette méthode se base pour la quantification des tanins totaux par leur précipitation, grâce à l'utilisation d'un chélateur chimique : le polyvinylpyrrolidone (PVPP) (**Makkar et al., 1993**).

100 mg de PVPP sont introduits dans des tubes à essai et 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 3000g pendant 10 min. Après centrifugation, le surnageant comporte uniquement les phénols simples autres que les tanins. Leur contenu est alors mesuré, 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 d'acide tannique (fig. 13).

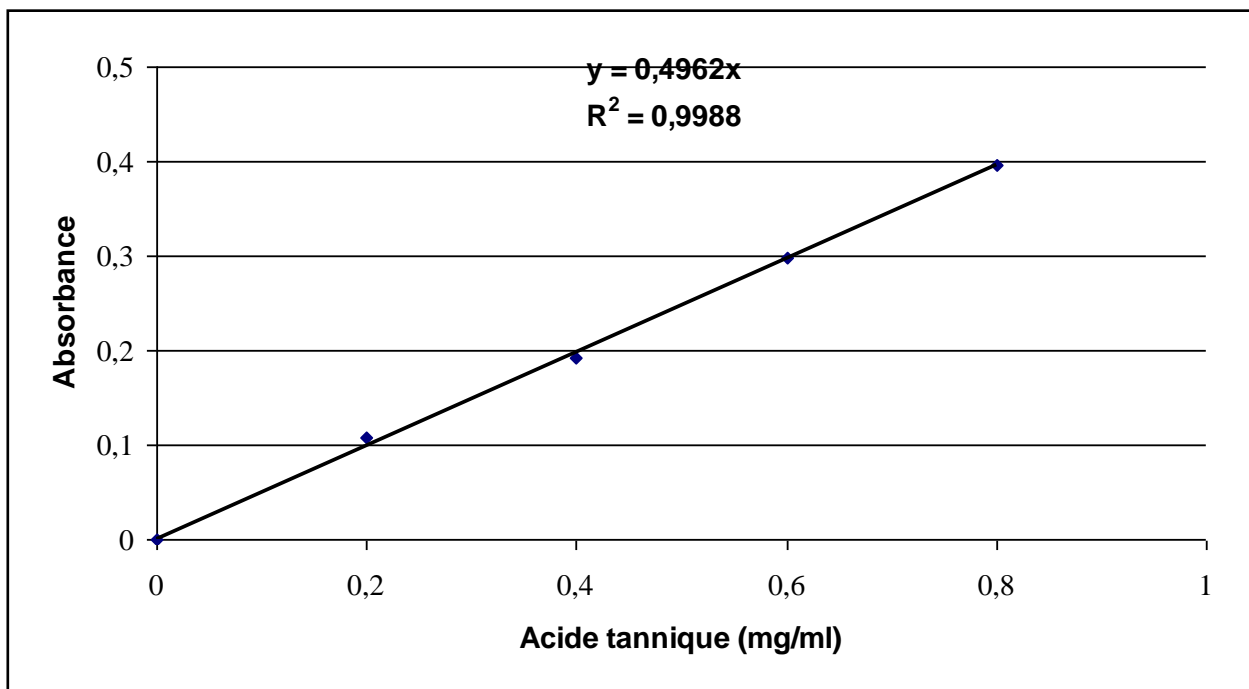


Figure 13 : Courbe étalon correspondant au dosage des tanins totaux.

D- Quantification des tanins condensés

Les tannins condensés sont dosés par la méthode n-butanol-HCl décrite par **Makkar et al. (1993)**. Pour cela, 0,5 ml de l'extrait sont mélangés avec 3 ml de la solution n-butanol-HCl (95/5 ; HCl 2N) et 0,1 ml d'une solution ferrique (2%). Le mélange est incubé une heure dans un bain marie à 100°C. La concentration des tanins condensés est déterminée par la lecture de la densité optique du mélange réactionnel à 550 nm et calculée par référence à une courbe d'étalonnage préparée à partir des concentrations connues de quebracho (fig.14)

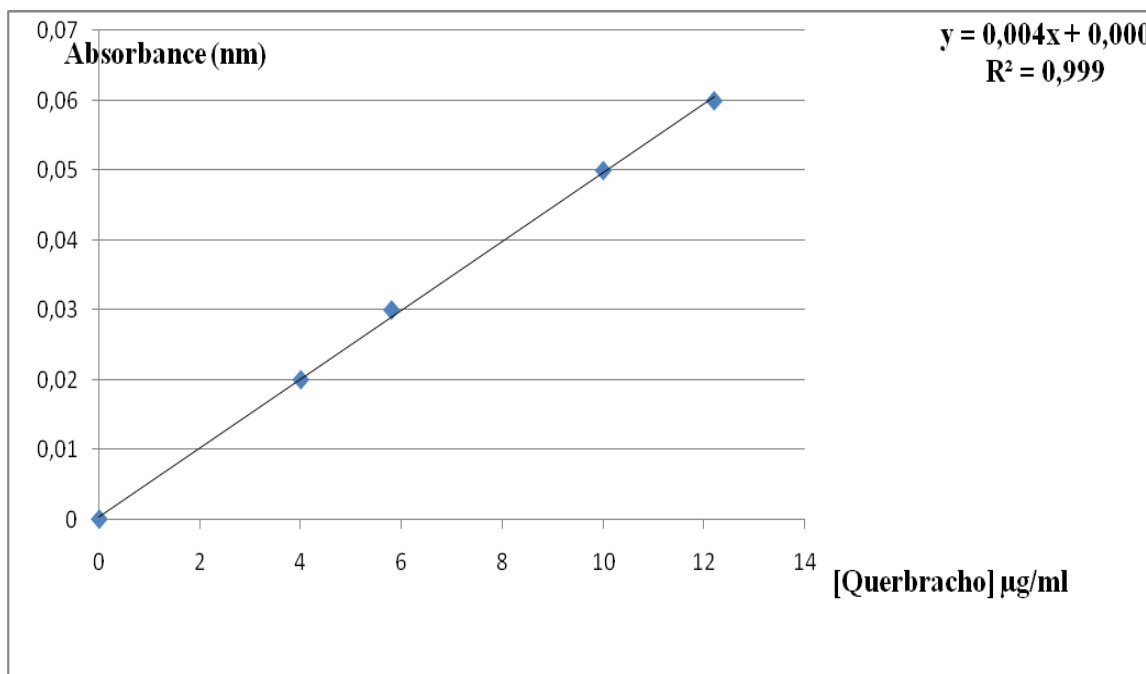
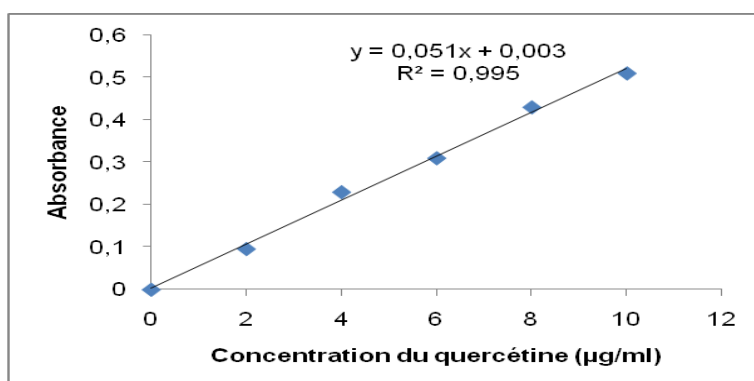


Figure 14 : Courbe étalon correspondant aux dosages des tanins condensés.

E- Quantification des flavonoïdes totaux

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) cité par **Djeridane et al. (2006)** et **Boudiaf (2006)** est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits. 1 ml de chaque extrait et du témoin (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance est lue à 570 nm après 15 minutes d'incubation.



3. Analyses biologiques des composés phénoliques

L'analyse biologique des composés secondaires (tanins) présents dans les deux plantes a été réalisée sur la base des tests de précipitations des protéines *in vitro*.

3.1. Test de précipitation des protéines ou test de diffusion radiale

Ce test est réalisé selon la méthode décrite par **Hagerman (1987)**. Il détermine indirectement la teneur des tanins totaux en mesurant leur capacité à précipiter les protéines, en particulier le sérum albumine bovine (BSA).

A. Préparation de l'extrait

500 mg d'échantillon sec sont traités par un double volume de 5 ml d'une solution aqueuse d'acétone (70%). Le mélange est homogénéisé en vortex pendant une minute à vitesse moyenne puis transféré dans des tubes coniques et centrifugé à 2000 rpm et à 4°C pendant 10 min.

B. Préparation des boîtes de Pétri

L'agarose (2,5g) est dissoute dans 250 ml de solution tampon d'acétate (pH = 5, 0,05M). La solution est portée à ébullition jusqu'à dissolution complète de l'agarose. Elle est ensuite refroidie par son maintien dans un bain marie réglé à 45°C. 250 mg de BSA sont alors ajoutés dans la solution (cette solution est suffisante pour préparer approximativement 20 boîtes de Pétri). 10 ml de la solution sont ensuite transférés dans chaque boîte de Pétri, maintenue en position plane. Ces boîtes sont conservées à 4°C pendant deux à trois semaines sans perte de la sensibilité de l'essai.

C. Procédé d'analyse

24 µl de l'extrait sont introduits dans les puits creusés dans le gel. Deux extraits sont placés sur deux boîtes différentes (fig. 15). Après diffusion de l'échantillon dans le gel d'agarose, les boîtes de Pétri sont scellées avec du parafilm et incubées à 30°C pendant 3 jours. Après 72 heures d'incubation, les boîtes de Pétri sont retirées et le diamètre des plages de précipitation formées est mesuré (fig. 15). La quantité des tanins totaux est proportionnelle à la surface de précipitation.

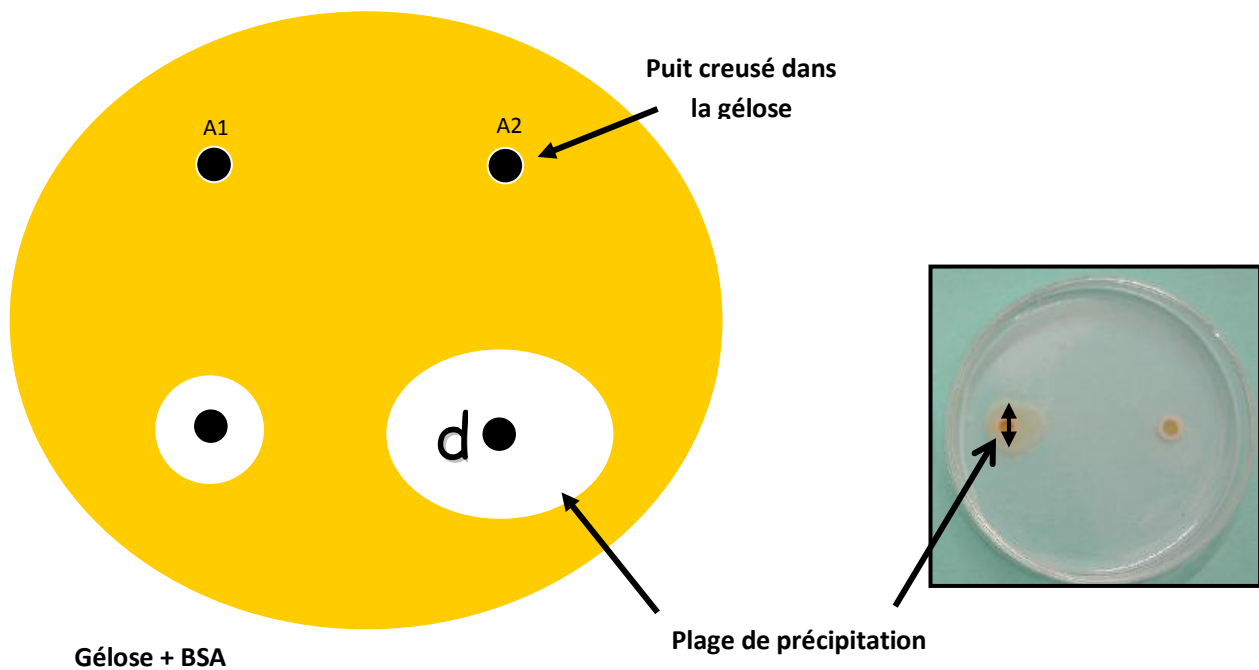


Figure 15 : Méthode de la diffusion radiale

3.2. Mise en évidence du contenu tannoïde par précipitation en présence du polyéthylène glycol (PEG) : technique de production de gaz *in vitro*

3.2.1. Principe de la quantification des tanins par de la technique de production de gaz *in vitro*

La fermentation des deux plantes, effectuée en présence et en absence du PEG, est étudiée par la technique de production de gaz *in vitro* développée par **Menke et Steingass (1988)**. La dégradation des aliments dans le rumen engendre la production de gaz qui est directement proportionnelle à l'intensité de l'activité enzymatique du microbiote ruminale. L'impact des composés phénoliques sur l'activité des enzymes est mesuré par les différences enregistrées entre les productions de gaz cumulées de la dégradation des plantes incubées sans PEG ou avec PEG (fig. 16).

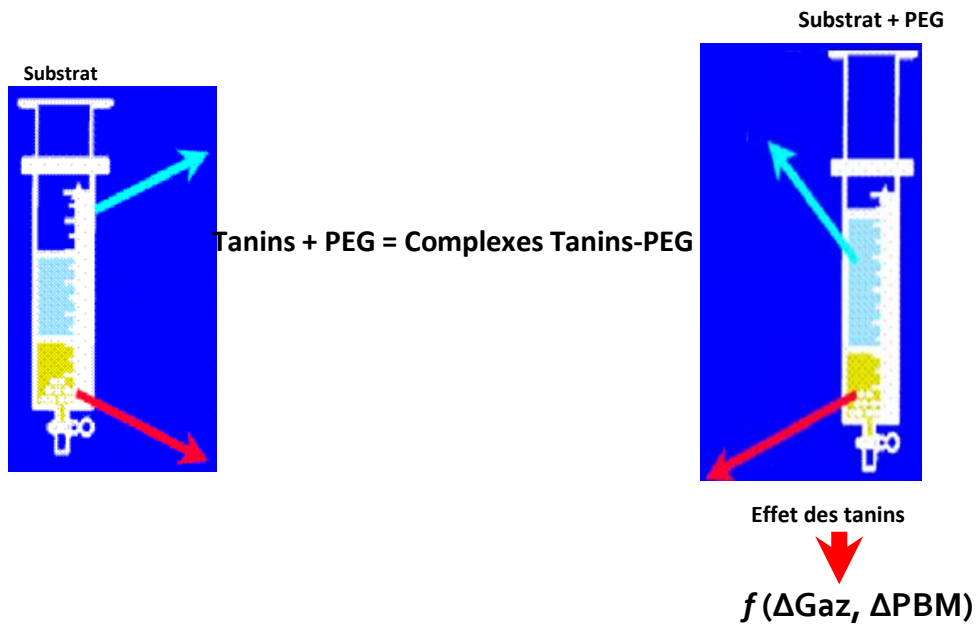


Figure 16 : Principe de la quantification des tanins par la méthode de production de gaz *in vitro*

3.2.2. Description du système de fermentation

La fermentation a lieu en système batch dans des seringues en polypropylène de 60 ml de capacité dont le bout connecté à un tuyau en téflon et fermé avec une pince de MOHR. Les pistons des seringues doivent être lubrifiés avec de la silicone qui facilite leur mouvement et empêche la sortie des gaz (fig. 17).



Figure 17 : Système de fermentation en batch (Seringue en plastic de 60 ml capacité).

3.2.3. Matériel animal

A Source d inoculum

Le prélèvement du jus de rumen (inoculum ; microbiote ruminal) est effectué sur trois bovins sacrifiés à l'abattoir municipal de Batna et dont le régime alimentaire est libre et non défini. Le liquide ruminal collecté est filtré à travers quatre couches de gaze chirurgicale et stockés dans des Thermos préalablement préchauffées à 39°C et saturés en CO₂. Au laboratoire, le filtrat est placé dans un bain marie réglé à 39°C et maintenu sous un flux continu de CO₂.

B. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture bactérienne est obtenu en mélangeant un volume de jus de rumen filtré avec 2 volumes de salive artificielle (tab. 2, 3). Cette solution, préparée la veille, est un mélange composé de cinq solutions (solution de couleur bleue) : la solution A (solution des microminéraux), la solution B (solution tampon, NaHCO₃), la solution C (solution des macrominéraux), la solution D (indicateur du potentiel d'oxydoréduction, la résazurine) et la solution E (solution réductrice introduite le jour de la manipulation, Na₂S. 9H₂O). Le brassage du milieu est maintenu à 39°C avec un barbotage en profondeur par un flux continu de CO₂ jusqu'au virage de la coloration bleu vers le rose qui devient à la fin incolore, indiquant ainsi la réduction du milieu de culture. Un barbotage en surface est effectué pendant 15 min pour maintenir une atmosphère totalement anaérobie (fig. 18).

Tableau 2 : Solutions utilisées dans la préparation de la salive artificielle (Menke et Steingass, 1988)

Solutions	Composition	Quantité
Solution des éléments majeurs	Na ₂ HPO ₄	5,7g
	KH ₂ PO ₄	6,2g
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,6g
	Eau distillée	1000ml
Solution des éléments traces	CaCl ₂ ×2H ₂ O	13,2g
	MnCl ₂ ×4H ₂ O	10,0g
	COCl ₂ ×6H ₂ O	1g
	FeCl ₂ ×6H ₂ O	0,8g
	Eau distillée	100 ml
Solution tampon	NaHCO ₃	35g
	(NH ₄)HCO ₃	4g
	Eau distillée	1000ml
Solution de résazurine	C ₁₂ H ₆ NO ₄	100mg

	Eau distillée	100ml
Solution réductrice	Na ₂ S×7H ₂ O	285mg
	NaOH (1N)	2 ml
	Eau distillée	47,5 ml

Tableau 3 : Quantités requises pour la préparation de la salive artificielle.

Solution	Pour 1 litre de la salive artificielle
Eau distillée	474 ,0 ml
Solution d'éléments traces	0,12 ml
Solution tampon	237,0 ml
Solution d'éléments majeurs	237,0ml
Solution de résazurine	1 ,22 ml
Solution réductrice	50ml

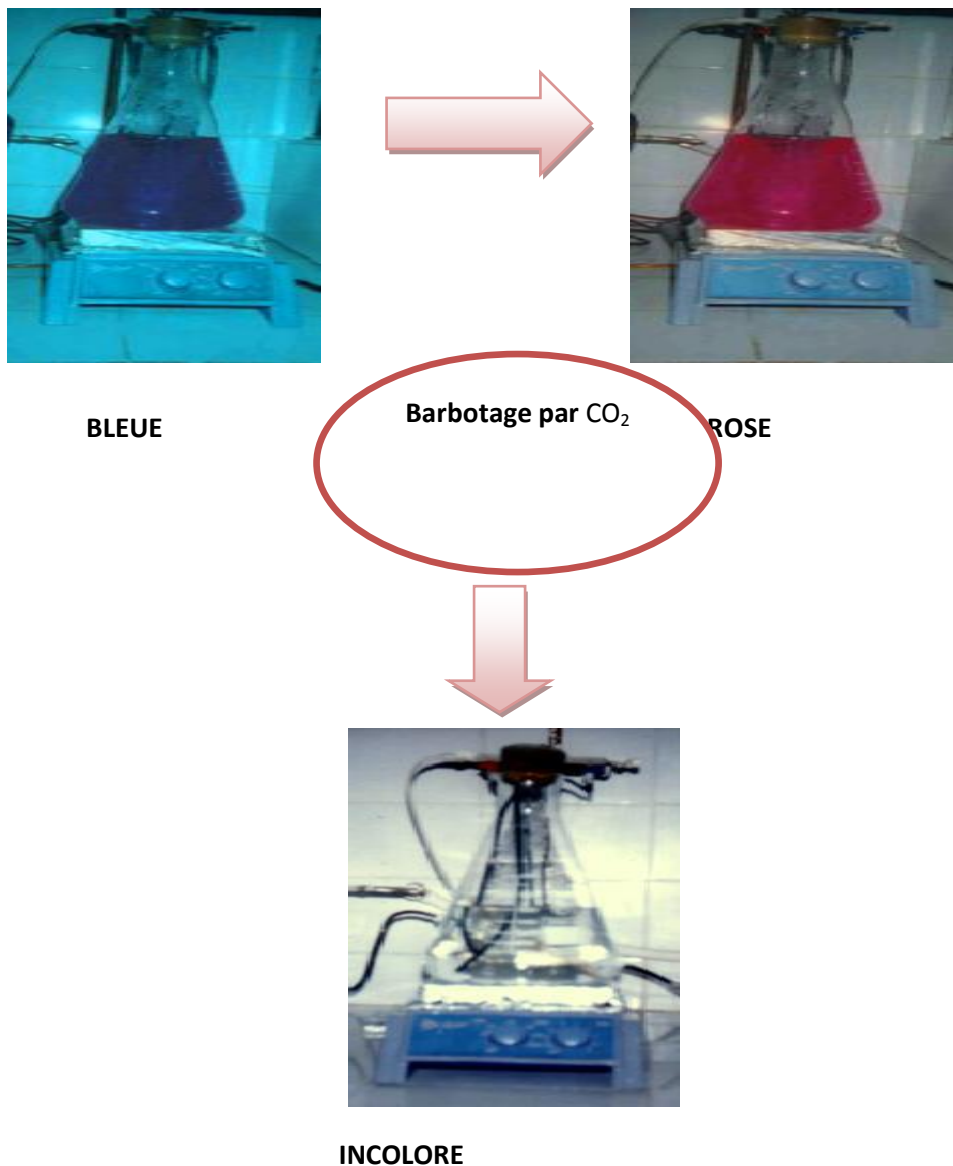


Figure 18 : Différentes étapes de préparation de la salive artificielle.

C.. Conduction de la fermentation

Pour chaque plante étudiée, six seringues contenant 200 mg de substrat sont incubées ; trois en présence de 1g de polyéthylène glycol (PEG, PM : 4000 Da) et trois seringues sans PEG.

Dans les mêmes conditions, six seringues témoins sans substrat (uniquement le milieu de culture) sont simultanément incubées en présence et en absence de PEG. Les seringues inoculées sont horizontalement incubées dans un bain marie pendant 24 heures à 39°C. Le suivi de la cinétique de fermentation est réalisé par la mesure du volume total des gaz produits lors de la fermentation. Il est indiqué par le déplacement du piston sous la pression des gaz libérés à différents intervalles de temps : 2, 4, 6, 8 et 24 heures.

D..Paramètres fermentaires mesurés

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

La production réelle de gaz dans chaque seringue correspond à la production de gaz après 24 heures soustraite du volume initial enregistré à t_0 et celui du volume de gaz moyen produit par le blanc. Elle est donnée par la formule suivante :

$$\text{GP (ml)} = V_t - V_0 - V_b$$

Avec : **GP (ml)** : production de gaz nette à chaque temps d'incubation, **V_t (ml)** : volume de gaz enregistré à chaque temps d'incubation, **V_0 (ml)** : volume de gaz enregistré au temps t_0 et **V_b (ml)** : Volume du moyen de gaz enregistré dans les seringues témoins.

L'analyse qualitative du pool gazeux (CH_4 , CO_2) engendré par la dégradation des substrats est réalisée selon la méthodologie décrite par **Jouany (1994)**. Elle est effectuée par un traitement à la soude (NaOH , 10N) ; Pour chaque intervalle de temps, les gaz sont transférés dans des seringues vides où sont injectées de manière étanche 4ml de soude. Cette solution basique réagit avec le CO_2 en entraînant la rétraction du piston (ce volume correspond au volume de CO_2).

'analyse qualitative et quantitative des gaz fermentés est réalisée selon la méthodologie décrite par (**Jouany , 1994**). Elle consiste à injecter 4 ml d'une solution alcaline d'hydroxyde de sodium (NaOH 10N). Ce dernier absorbe le CO_2 , ce qui entraîne la rétraction du piston. Par différence entre le volume total de gaz produit et le volume de CO_2 , la production de méthane est déduite.

$$\text{VCH}_4 = \text{V NaOH} - \text{V liq}$$

Et

$$\text{VCO}_2 = \text{Vt} - \text{VCH}_4$$

VCH₄ : volume de méthane ;

V NaOH : volume enregistré après injection de la soude ;

V liq : volume de liquide ;

VCO₂ : volume de gaz carbonique ;

V t : volume total de gaz produit.

D- Mesure du Ph

A la fin de chaque fermentation, le pH de chaque seringue est mesuré par un pHmètre.

4- ANALYSE STATISTIQUE

Les données expérimentales sont traitées par logiciel STATISTICA version 6.

*Chapitre III Résultats Et
Discussion*

1. CARACTÉRISATION CHIMIQUE DE *MARRUBIUM VULGARE* ET *URTICA URENS*

Les résultats des analyses chimiques effectuées sur les deux plantes sont consignés dans le tableau 4. Il ressort que les deux plantes présentent des teneurs en matière sèche (MS) significativement différentes ($P < 0,05$). La teneur en matière sèche de nos échantillons est de l'ordre de 38,22 % pour le marrube et de 28,22% pour l'ortie. Les taux de MS enregistrés dans cette étude sont comparables à celui rapporté par **NAJAR *et al.* (2011)** qui a signalé une teneur de 35,97%. Cependant, *Urtica urens* contient un taux de MS relativement proche à quelques espèces fourragères telles que *Anacyclus clavatus* (Astéracée prélevée en début de floraison de la région de Tlidjène, Wilaya de Tébessa) (**GHERSSI, 2011**). Ces discordances peuvent être expliquées d'une part par les différences dues aux espèces botaniques surtout en ce qui concerne le type et le développement du système racinaire permettant un plus grand contact avec le sol et par conséquent de pouvoir puiser l'eau et les nutriments en profondeur et sur une plus grande surface (**FELKER *et al.*, 1980**). D'autre part, le stade végétatif lors de la récolte peut expliquer cette variabilité sachant que la teneur en matière sèche augmente avec l'évolution du stade végétatif et le vieillissement de la plante jusqu'à atteindre l'état d'aliment sec (**BLAIN, 2002**).

Le taux en matière minérale (MM) contenu dans les deux plantes est variable (tab. 4). *Marrubium vulgare* renferme la plus forte teneur avec 4,5% par rapport à *Urtica urens* avec 2,6%. La teneur en MM de *Marrubium vulgare* est comparable à celle rapportée par d'autres auteurs travaillant sur *Rosmarinus officinalis* où une teneur de 5,7% est notée (**FLORET et PONTANIER (1982)** ; **BEN M'HAMED (1990)** in **ZERDOUM et BOUDJEZZA (2011)**). Tandis que la teneur en matière minérale obtenue pour *Urtica urens* (2,6%) est comparable à celle obtenue par dans les travaux de (**WETHERILT, 1992**) qui est signalent une teneur de 1,6%. Les variations de taux de matière minérale de nos échantillons, comparés à certains travaux antérieurs, peuvent être dues à certains facteurs écologiques comme l'âge de la plante, la période du cycle végétatif ou même à des facteurs génétiques

Tableau 4. Composition chimique (%) de *Marrubium vulgare* et *Urtica urens*

Substrats	MS	H	MO	MM
<i>Marrubium vulgare</i>	38,22 ±0,48	61,77 ±0,48	95,5 ±0,7	4,5±0,7
<i>Urtica urens</i>	28,22± 0,48	71,77 ± 0,48	97,35±0,07	2,65±0,07

MS : matière sèche, **H** : humidité, **MO** : matière organique, **MM** : matière minérale.

2. CARACTÉRISATION PHYTOCHIMIQUE DE *MARRUBIUM VULGARE* ET *URTICA URENS*

L'analyse qualitative de métabolites secondaires présents dans les deux plantes est présentée dans le tableau 5. Il apparaît que les deux plantes renferment des composés secondaires à des concentrations variables, indiquées par l'intensité de la couleur développée au cours des réactions photochimiques (phénols et stéroïdes) et par la hauteur de la mousse formée dans le cas des saponines. Cette dernière est quasiment inexistante dans nos deux plantes à savoir *Marrubium vulgare* et *Urtica urens*. De même, on observe l'inexistence de stéroïdes dans nos substrats. L'analyse qualitative révèle, par contre, la présence de composés phénoliques à différents niveaux. Cette analyse est confortée par l'analyse quantitative des composés phénoliques, à savoir les phénols totaux, les tanins totaux et les tanins condensés (tab 6).

Tableau 5. Analyse qualitative des métabolites secondaires présents dans *Marrubium vulgare* et *Urtica urens*

	Phénols totaux	Tanins	Saponines	Stéroïdes
<i>Marrubium vulgare</i>	+	+	-	-
<i>Urtica urens</i>	++	++	-	-

- : absence, + : présence, ± : teneur moyenne, ++ : teneur élevée.

Les deux plantes renferment des taux significativement variables ($P < 0,05$). L'ordre décroissant de la teneur des substrats en phénols totaux est le suivant : *Urtica urens* (0,716%), *Marrubium vulgare* (0,239%). De même, la concentration la plus élevée en tanins totaux est notée pour *Urtica urens* (0,4673%). la même tendance est également enregistrée pour les tanins condensés où *Urtica urens* renferme la teneur la plus élevée (1,446%).

Toutefois, la concentration des TC reste faible, ce qui montre la richesse des plantes en tanins hydrolysables (TH).

Tableau 6. Teneur en phénols totaux (PT), tannins totaux (TT) et tannins condensés (TC) et capacité de précipitation des protéines (PPC) dans *Marrubium vulgare* et *Urtica urens* (g/100 g MS)

	PT	TT	TC	PPC
<i>Marrubium vulgare</i>	0.239 ± 0,005	0,3653 ± 0,017	0,4316 ± 0,07	ND
<i>Urtica urens</i>	0.716 ± 0,035	0,4673 ± 0,03	1,446 ± 0,25	ND

Les différences observées entre les substrats sont probablement dues à la composition chimique des plantes. En effet, le taux de tanins des substrats, dont dépend la dégradabilité, est susceptible d'être influencé par le mode de culture, le stade phénologique (avec le temps les plantes ont tendance à durcir par lignification et leur valeur nutritive décline), la nature du sol, le climat au moment du prélèvement (température et pluviométrie), de même que par la constitution de l'échantillon (proportion tiges-feuilles-fleurs). Le traitement de ces prélèvements en vue de l'expérimentation (mode de séchage, de broyage et de stockage) est aussi susceptible de faire varier les résultats (**BOUKARY–MORI, 2000**). En outre, ces différences observées peuvent partiellement être attribuées aux facteurs génotypiques qui contrôlent la biosynthèse et l'accumulation de ces métabolites secondaires dans la plante. Sachant que l'accumulation des métabolites primaires et secondaires est une propriété physiologique de la plante et elle varie à travers les espèces et les familles végétales (**RUBANZA et al, 2005**). La faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tout les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines etc. (**VUORELA, 2005 ; GOMEZ-CARAVACA et al., 2006**).

Pour le test de diffusion radiale (PPC), qui est une estimation quantitative indirecte des tanins totaux, il s'avère que la sérum albumine bovine n'est pas précipitée par les tanins présents dans les deux plantes étudiées. Une tendance analogue est également observée par (**Vitti et al, 2005 ; Singh et al ; Jouany J.P, 1996; Ndlovu and Nherera, 1997**). L'avantage des méthodes de précipitation des protéines est la mesure de l'activité biologique des tanins présents dans les substrats, alors que les méthodes colorimétriques basées sur les propriétés chimiques, indiquent seulement la nature chimique des tanins (**Singh et al, 2005**). Ainsi, les taux quasiment nuls de la PPC pourraient s'expliquer soit par les faibles taux de tanins condensés que renferment les substrats étudiés, soit par l'incompatibilité structurale des tanins présents dans ces plantes et la sérum albumine bovine.

Les discordances enregistrées entre les deux méthodes d'estimation de la quantité de tanins totaux montrent que les différences de conditions expérimentales affectent significativement les résultats finaux.

3. DÉTERMINATION PAR VOIE BIOLOGIQUE DU CONTENU TANNŌIDE DE *MARRUBIUM VULGARE* ET *URTICA URENS*

3.1. Faciès fermentaire de l'inoculum

Le pH est un paramètre très important dans la régulation et l'optimisation des fermentations ruminales. La moyenne du pH du jus de rumen fraîchement collecté, qui nous a servi d'inoculum, est de 6,48. Cette valeur indique des conditions physico-chimiques favorables à une bonne activité fermentaire du microbiote ruminal (tab. 7). Cette valeur est proche à celles de **(CHENOST ,2001 ; DRIS ,2008 ; NDLOVU ; NHERERA ,1997)**. Après addition de la salive artificielle, une légère augmentation de pH a été constatée. Le pH de la salive artificielle préparée (milieu de culture) a atteint une valeur moyenne de 6,94. Cette augmentation de pH peut être expliquée par l'effet tampon de la salive artificielle qui contribue à la neutralisation de l'acidité du milieu **(HUNTINGTON et GIVENS, 1997 ; KHAZAL et al., 1995)**.

Tableau 7. Comparaison des valeurs de pH de jus du rumen fraîchement collecté avec celles rapportées dans la bibliographie.

	Jus de rumen	Ndlovu et Nherera (1997)	Dris (2008)	Chenost (2001)	Rachedi (2005)	Boultifat (2009)	Yaakoub (2006)	Laadjimi (2008)	Ly (1997)
Valeur de pH	6,48	6,41	6,42	6,42	6,67	6,67	6,85	6,9	6,92

3.2. Production de gaz *in vitro*

La production de gaz par nos substrats, après 24 heures d'incubation en présence et en absence de PEG, est présentée dans le tableau 8. En absence de PEG, le volume de gaz le plus faible est enregistré pour *Urtica urens* (16,3 ml) et le plus élevé pour *Marrubium vulgare* (18 ml) ($P < 0,05$). Comme attendu, l'addition du PEG augmente la production de gaz des deux substrats et cette augmentation est plus prononcée pour *Urtica urens*. Elle varie entre 61,54 et 29% et de 48,7 et 1,8%, respectivement pour *Urtica urens* et *Marrubium vulgare*. L'amélioration de la production de gaz *in vitro* des substrats incubés en présence de PEG a été aussi rapportée par d'autres auteurs pour différents substrats **(Baba A.S.H et al, 2002 ; Combolat et al ,2005 ; Rubanza et al, 2005 ; Singh et al, 2005)**. Le polyéthylène glycol est un polymère synthétique possédant une grande affinité

pour les tanins, il les rend inertes par la formation de complexes PEG-tanins (Makkar ,H.P.Set *al*,1995 ; Seresinhi T *et al* , 2003). Il a également la capacité de prévenir la formation de complexes protéines-tanins et de libérer ces complexes déjà présents dans le milieu (Barry T.N *et al*, 1999 ; Combolat *et al* ,2005 ; Rubanza *et al*, 2005). Pour *Marrubium vulgare*, l'addition du polyéthylène glycol engendre une faible amélioration dans la production de gaz. Par contre, l'ajout de PEG augmente la production de gaz à partir de *Urtica urens*. La différence entre les deux substrats peut être attribuée soit à la capacité limité du PEG à inhiber complètement les effets des tanins (Baba A.S.H *et al*, 2002 ; Frutos P *et al* ,2002), qui dépend principalement de la stéréochimie et de la structure des tanins ou aussi à d'autres facteurs qui seraient plus importants dans la limitation de la fermentation *in vitro* que les tanins (Ndlovu and Nherera, 1997).

La cinétique de production de gaz des substrats étudiés, en présence et en absence du PEG, résulte dans une augmentation dans le volume de gaz aux différents temps d'incubation pour les deux plantes. L'effet du PEG sur les constantes cinétiques modélisées de la production de gaz *in vitro* est controversé. Certains auteurs indiquent que l'effet est exclusivement significatif sur la production de gaz à partir de la fraction insoluble (b) contrairement à la production de gaz à partir de la fraction soluble (a) et la vitesse (c) (Combolat *et al* ,2005) Alors que, d'autres travaux mentionnent une influence significative du PEG sur les paramètres de la production de gaz *in vitro* (Ahmed M.M.M.*et al* , 2004 ; Mc Sweeney C.S. *et al* ,2001) Dans notre étude, l'effet du PEG est plus prononcé sur la production potentielle de gaz (a + b). L'effet des tanins sur la dégradation ruminale des nutriments dépend principalement du degré de complexation des composés phénoliques avec les composants de la plante : protéines, polysaccharides et minéraux, ainsi que de leurs effets sur la composition du microbiote ruminal et sur son activité enzymatique (Mc Sweeney C.S. *et al* ,2001) Pour *Urtica urens*, l'inclusion du PEG engendre à la fois une augmentation dans la production potentielle de gaz. Ce résultat suggère que les tanins dans cette situation sont liés à la fraction pariétale de l'aliment, la présence du PEG favorise l'adhésion des bactéries et/ou stimule l'activité des enzymes fibrolytiques. Cependant, l'addition du PEG au système de fermentation induit une diminution dans la vitesse de production de gaz. Ce résultat a été aussi signalé par (Frutos P *et al* ,2002 ; Guimarães-Beelen *et al*,2006) qui notent que pour les substrats dont la vitesse a été réduite, la colonisation bactérienne est limitée. Ce constat indique que les complexes formés entre les tanins et le PEG génèrent un encombrement stérique ne permettant pas et/ou limitant la fixation des bactéries fibrolytiques aux particules alimentaires.

Tableau 8. Impact des tanins, indiqué par la présence et l'absence du PEG, sur la cinétique de la production de gaz et les paramètres cinétiques de *Urtica urens*

<i>Urtica urens</i>	2h	4h	6h	8h	a	b	c	RSD
- PEG	3,33 ± 0,57	7,33 ± 1,15	11,6±	16,3	± -0,65	ND	0,162	0,042

			2,51	1,5					
+ PEG	8,66 ± 1,52	15,33 ± 4,5	19,0 ± 4,58	23,0 ± 6,00	± 2,29	19,33	0,1008	0,37	
Réduction (%)	61,54%	52,18%	38,63%	29%					

Tableau 9. Impact des tanins, indiqué par la présence et l'absence du PEG, sur la cinétique de la production de gaz et les paramètres cinétiques de *Marrubium vulgare*

<i>Marrubium vulgare</i>	2h	4h	6h	8h	a	b	c	RSD
- PEG	3,33 ± 1,15	8,33 ± 0,57	13 ± 2,00	18 ± 3,00	-5,64	41,36	0,1043	0,85
+ PEG	6,5 ± 2,12	9,66 ± 3,51	14,66 ± 5,03	18,33 ± 5,13	-0,14	38,81	0,092	0,113
Réduction (%)	48,77%	13,76%	11,32%	1,8%				

a,b,c Les moyennes dans la même ligne avec une lettre différente sont différentes (P<0,05).

3.3. Impact des tanins sur le profil fermentaire

La production de méthane (CH₄) et de dioxyde de carbone (CO₂) est le résultat de la dégradation anaérobie de la biomasse végétale incubée avec les microorganismes présents dans le jus de rumen (GETACHEW et al., 1998). L'influence du PEG sur le profil fermentaire des deux substrats est présentée dans les figure 21 et 22 . Elle révèle que le PEG induit une augmentation significative (P < 0,05) dans la production du dioxyde de carbone (CO₂) pour *Urtica urens*. Le volume le plus élevé est enregistré pour cette plante est 20,84 ml. Par contre pour la production de méthane (CH₄), un décroissement significatif (P < 0,05) est observé pour les deux substrats. Les taux de réduction observés sont de 60,61% et de 16,5% respectivement pour *Urtica urens* et *Marrubium vulgare*. Ces résultats sont similaires à ceux avancés par d'autres travaux qui montrent que les tanins exercent un effet sur la production de méthane comme dans le cas de *Medicago Sativa* et *Carduus pycnocephalus* (GOEL et al., 2008). Cependant, d'autres publications rapportent que l'incorporation du PEG conduit aussi à une augmentation dans la production du CH₄ (MICHAEL et al., 2005 in LEULMI, 2011). Ces

différences de réponse au traitement par PEG peuvent être attribuées à plusieurs facteurs : le taux de tanins présents dans les substrats, leur structure chimique, leur degré de polymérisation et l'interaction structure-activité biologique des tanins (TENDONKENG *et al.*, 2004).

Tableau 10. Impact des tanins sur les productions de méthane et de dioxyde de carbone cinétique de *Urtica urens* et de *Marrubium vulgare*

Substrats	Dioxyde de carbone (ml)		Méthane (ml)	
	- PEG	+ PEG	- PEG	+ PEG
<i>Urtica urens</i>	10,67 ± 1,73	20,83 ± 0,50	5,51 ± 0,50	2,17 ± 0,50
<i>Marrubium vulgare</i>	13,0 ± 2,0	13,04 ± 2,5	6,0 ± 0,50	5,01 ± 0,19

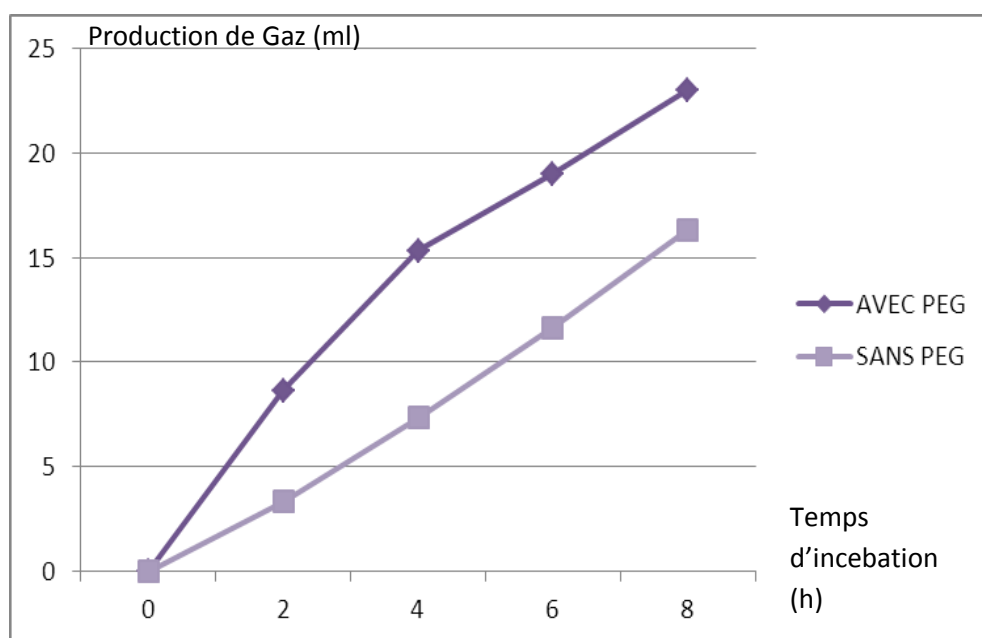


Figure 19 :Impact des tanins sur la cinétique de la production de gaz in vitro, évalué par la différence entre le control (sans PEG) et test (avec PEG) *Urtica urens* .

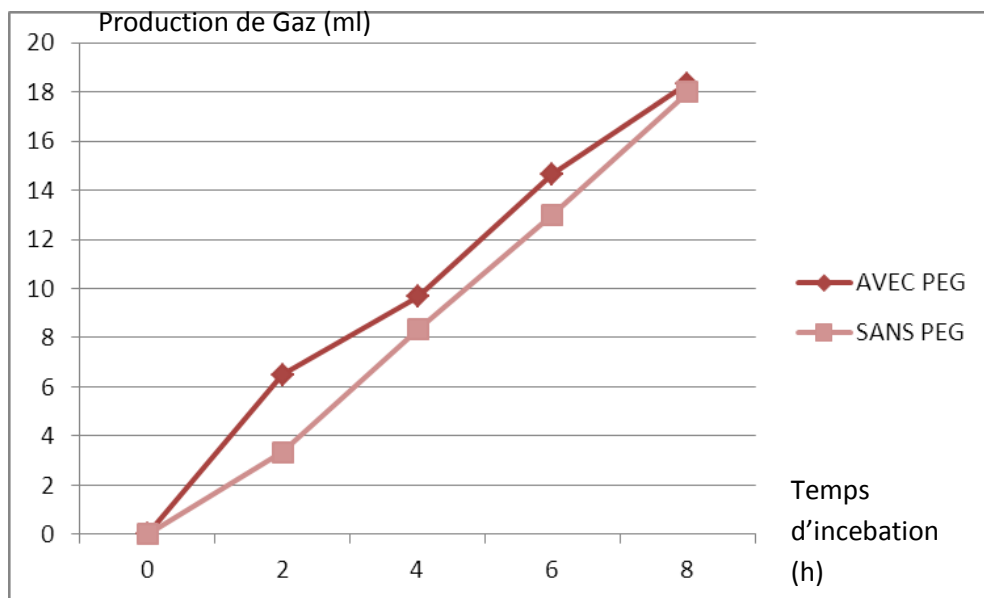


Figure 20 :Impact des tanins sur la cinétique de la production de gaz in vitro, évalué par la différence entre le control (sans PEG) et test (avec PEG) *Marrubium vulgare*.

conclusion

Conclusion :

Ce mémoire avait pour objectifs principaux l'étude de substrats des zones arides et semi arides (*Marrubium vulgare*) et *urtica urens*, à travers plusieurs aspects : 1/ la caractérisation chimique précise de plantes de régions arides et semi arides, 2/ l'évaluation de leur potentiel nutritif par la mesure de leur fermentescibilité in vitro et in par le microbiote ruminal d bovins ; 3/ L'estimation de l'action anti nutritionnelle de composants phénoliques de ces substrats et leur impact sur l'activité et le profil fermentaire du microbiote ruminal. L'activité biologique du microbiote ruminal, mesurée à travers les effets spécifiques des tanins par l'utilisation du PEG, montre que les tanins influencent à différents degrés la production de gaz les processus de production de gaz et de dégradation des aliments sont différemment affectés par les tanins.

L'augmentation de la production du méthane par addition de PEG est fortement corrélée positivement et significativement aux tanins condensés libres et totaux. Ce résultat suggère que le test des tanins couplé à la production de gaz peut être utilisé pour identifier les plantes possédant des activités anti- méthanogènes. De plus, il serait intéressant de compléter cette étude par la recherche et le développement de nouveaux procédés permettant d'élucider la relation entre les structures des tanins et leurs effets biologiques. En outre, il est essentiel d'estimer la capacité des tanins présents dans les fourrages à enrober les protéines pour une meilleure valorisation animale de l'azote contenu dans les fourrages. De même que l'addition du PEG engendre une augmentation de la biomasse bactérienne pour les substrats riches en tanins et affecte différemment le facteur de partition, selon la nature des fourrages et leur composition chimique en composés phénoliques. Cette étude confirme que l'emploi du PEG, combiné à la technique de production de gaz in vitro et les digestibilités in vitro, peuvent être un moyen simple et rapide pour le classement préliminaire de toutes sortes de fourrages, sans passer par les fastidieuses et coûteuses études zootechniques. Ces

méthodes peu onéreuses, constituent aussi des outils très intéressants pour la détection des composés phénoliques et leur impact sur le processus de la digestion animale

Références
Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A -

- Ahmed M.M.M. and Elhag F.M. 2004. Degradation characteristics of some Sudanese forages and tree pods using in sacco and gas production techniques. *Small Ruminant Research*, 54: 147-156.
- Aron P. M., 2007. Composition of Flavonoid Phenolic Polymers Isolated from red wine during maceration and significance of flavan-3-ols in foods pertaining to biological activity. Thèse master. Oregon State University, 194.
- Akin D.E., Benner R. 1988. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 1117-1125p.
- Andrade, P. V. D., S. Giger-Reverdin, and D. Sauvant. 2002. Relationship between two parameters (pH and redox potential) characterizing rumen status. Influence of diets. Page 332 in Proc. 9th Rencontres Recherches Ruminants, Paris, France. Institut de l'Elevage- INRA, Paris, France.
- Anderson K., T. Nagaraja, J. Morrill, T. Avery, S. Galitzer and J. Boyer. 1987. Ruminal microbial development in conventionally or early-weaned calves. *J. Anim. Sci.* 64 : 1215-1226.
- ARTHUR P.F., DONOGHUE K.A., HERD R.M., HEGARTY R.S. The role of animal genetic improvement in reducing greenhouse gas emissions from beef cattle. Matching genetics and environment: a new look at an old topic. Proceedings of the 18th Conference of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics, Barossa Valley, South Australia, Australia, 2009, p472-475.
- Andersen J.B., J. Sehested and K.L. Invartsen. 1999. Effect of dry cow feeding strategy on rumen pH, concentration of volatile fatty acids and rumen epithelium development. *Acta Agriculturae Scandinavica* 49 : 149-155.
- Al kadi, A. A.
Usage de quelques plantes dans la médecine populaire en libie,1989,Vol11-2.
- Abdel-Hameed, E.S., (2009) Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chem.* 114:1271-1277.
- Ammar H., Lopez S., Gonzalez J.S. 2005. Assessment of the digestibility of some Mediterranean shrubs by in vitro techniques. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119, 323–331.
- Arhab R., 2006. Etude de la fermentescibilité in vitro et de la digestibilité in vivo de végétaux des zones arides et de sous produits de l'agronomie saharienne par l'estimation de l'activité métabolique du microbiote ruminale d'ovins. Thèse de doctorat. Université Mentouri de Constantine.

B –

- **Barry T.N. and McNabb W.C.** 1999. The implication of condensed tannins on nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition*, 81: 263-272.
- **Baba A.S.H., Castro F.B. and Orskov E.R.** 2002. Partitioning of energy and degradability of browse plants in vitro and the implication of blocking the effects by the addition of polyethylene glycol. *Animal Feed Science Technology*, 95: 93-104.
- **Bahorun, T.** (1997) Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d’approvisionnement potentielle. *Food and agricultural research council, Réduit, Mauritius*. 83-94.
- **Babcock Institute**, 2011. <http://babcock.wisc.edu/node/126>. Wisconsin University, USA.
- **Brugère H.** 1983. Biochimie du rumen – Aspects physiologiques. *Bull. GTV*. 3 : 5-22.
- **Bonnemoy F., G. Fonty, V. Michel and P. Gouet.** 1993. Effect of anaerobic fungi on the ruminal proteolysis in gnotobiotic lambs. *Reprod. Nutr. Develop.* 33 : 551-555.
- **Boudiaf, K.,** (2006) Etude des effets anti-xanthine oxydoreductase et anti-radicalaires des extraits des graines de *Nigella sativa*. Mémoire de magister .Setif.
- **Bertrand Bernard** Les secrets de l'Ortie.- 7ème édition
Editions de Terran, 2002.- 128p.- (Collection Le Compagnon Végétal; n01).
- **Bruneton, J.** (1999) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème Edition. Tec & Doc (Ed). Paris, 575p.
- **Bruneton, J.** (1999) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème Edition. Tec & Doc (Ed). Paris, 575p.
- **Boukary mori** 2000 université de liège mémoire présenté en vue d l obtention du des en gestion animal en milieu tropical 61p.
- **Boultifat L.** (2009). Evaluation de la contribution spécifique des fractions soluble et insoluble de sous-produits de l’agronomie saharienne à la méthanogénèse ruminale d’ovins. Thèse de Magister en microbiologie appliquée. Université de Constantine. 68p.
- **Beauchemin K.A., McGinn S.M., Martinez T.F., McAllister T.A.,** 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 85, 1990–1996.
- **Barber G.D., Givens D.I. Kridis M.S., Offer N.W. and Murray I.** 1990. Prediction of the organic matter digestibility of grass silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 28, 115-128.

C –

- **C. Martin, D. Morgavi, M. Doreau, J.P. Jouany** ,2006 fourrage. *187*, 283-300

- Chung, K.-T., Wong T. Y., et al., 1998. "Tannins and human health: a review." *Food Sci., Nutr.*, 38(6): 421-464.
 - Chaucheyras-Durand F. and G. Fonty. 2002. Influence of a probiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077) on microbial colonization and fermentation in the rumen of newborn lambs. *Microb. Ecol. Health Dis.* 14 : 30–36.
 - Coleman G.S. 1983. Hydrolysis of fraction 1 leaf protein and casein by rumen entodiniomorphid protozoa. *J. Appl. Bacteriol.* 55 : 111-118.
 - **Combolat O.**, Kamalak A., Ozskose E., Ozkan C.O., Sahin M. and Karabay P. 2005. Effect of polyethylene glycol on in vitro gas production, metabolizable energy and organic matter digestibility of quercus cerris leaves. *Livestock Research for Rural Development*, 17 (4): <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/4/canb17042.htm>.
 - Coleman G.S., 1975. The interrelationship between rumen ciliate protozoa and bacteria. In :Mc Donald W., Warner A.C.I. (Eds.). *Digestion and metabolism in the ruminant*. The university of New England publ, Armidale, USA, pp. 149-164.
 - CITEPA. Inventaire des émissions de gaz à effet de serre en France au titre de la Convention Cadre des Nations Unies sur les Changements Climatiques. Format UNFCCC-CRF, 2006, CITEPA - Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, Paris, France.
 - Coss. et Germ 1879. - - taxinomie, marrubium vaillantii, tératologie, virescence, marrubium vulgare , p. 282-287 - Société Botanique de France, Bull. Soc. bot. Fr., Compte rendus des séances, Tome 26 - Fascicule 1 - Saisie : Jean TIMBAL - Art. n°8727.
 - COSTE, 1899-1906. Flore illustrée France, (3 vol.).
 - Chenost A. Kayouli B. (1997). Utilisation des fourrages grossiers en régions chaudes. In : Etude FAO production et Santé Animales. FAO Ed. Rome : 135 p.
 - Carulla J.E., Kreuzer M., Machmüller A., Hess H.D. 2005. Supplementation of Acacia mearnsii tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 56, 961–970.
 - **Combolat O.**, Kamalak A., Orskov E., Ozkan C.O., Sahin M., Karabay P. 2005. Effect of polyethylene glycol on in vitro gas production, metabolizable energy and organic matter digestibility of quercus cerris leaves. *Livestock Research for ruminal Devlop.* 17 (4) [on line]. Available in <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/canb17042.htm>. [5 May 2004]
- D –**
- **Dacosta Y.**, 2003. Les phytonutriments bioactifs. Editions Yves Dacosta. Paris, 317 p.
 - **Dr François Laporte** , 2007 biochimie_biochimie des lipides chapitre4 stéroïdes ,faculté de médecine de Grenoble (ujf) ,année universitaire 2007 /2008

- **Dunbar, J., Barns, S.M., Ticknor, L.O. & Kuske, C.R. (2002)** Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3035 - 3045.
- **Dawson K.A. and M.J. Allison. 1988.** Digestive disorders and nutritional toxicity. In : Hobson PN, (eds.). *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Science Publisher, New York, 445-459. p527.
- **Doreau, M. & Ferlay, A. (1994)** Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 45, 379-396.
- **Djeridane, A., Yous, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006)** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97: 654-660.
- **Djeridane, A., Yous, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006)** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97: 654-660.
- **Dris D. (2008).** Influence d'extrait végétaux (*Thymelaea hirsuta* et *Sonchus maritimus*) sur la méthanogenèse et de la digestibilité ruminale in vitro. Thèse de magistère en Biochimie Appliqué, Université Cheikh Larbi Tebessi de Tébessa, 70p.
- **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.

F-

- **Fonty G. and F. Chaucheyras-Durand. 2007.** Les ecosystèmes digestifs, ed. E.T. Doc. Lavoisier. (pp. 168 to 170 and 311).
- **Fonty, G., Gouet, P., Jouany, J. & Senaud, J. (1987)** Establishment of the Microflora and Anaerobic Fungi in the Rumen of Lambs. *Journal of General Microbiology*, 133, 1835-1843.
- **Fonty G., Forano E. 1999.** Ecologie de la dégradation et de la fermentation des polysides constitutifs des parois végétales dans le rumen. *Cahier Agriculture*, 8 (1) : 21-35.
- **Fonty G., Grenet E., Fevre M., Breton A., Gouet Ph. 1988.** Ecologie et fonctions des champignons anaérobies du rumen. *Reproduction Nutrition Développement*, 1 : 1-18.
- **FAO. Livestock's long shadow; environmental issues and options. Rapport 2006, 408 pages.**
- **Forano E., V. Broussolle and R. Durand. 1996.** Degradation of plant cell wall polysaccharides by rumen bacteria and fungi. *Annales de Zootechnie* 45 : Suppl. 1.

- Fiorucci S., 2006. Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat. Université Nice-Sophia Antipolis, 212 p.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008) Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*. 331: 372-379.
- 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.

G –

- Gherissi B. 2011. Evaluation in vitro de la valeur nutritive des fourrages pastoraux prélevés dans la région de Tlidjène Wilaya de Tébessa. Diplôme de Magister en Sciences Vétérinaires. université el taref. 107p.
- Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A. M., 2001. Le préparateur en pharmacie. Ed. Médicales Internationales. Paris, pp 108-119.
- Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1220-1234.
- Getachew G., Makkar H.P.S. and Becker K. 1998b. The in vitro gas coupled with ammonia nitrogen measurement for evaluation of nitrogen degradability in low quality roughages using incubation medium of different buffering capacity. *J. food Sci. and Agri.* 77, 87-95.
- Guimarães-Beelen P.M., Berchielli T.T., Beelen R. and Medeiros A.N. 2006. Influence of condensed tannins from Brazilian semi-arid legumes on ruminal degradability, microbial colonization and ruminal enzymatic activity in Saanen goats. *Small Ruminant Research*, 61: 35-44.

H –

- Hartzfeld P.W., Forkner R., Hunter M D., Hagerman A E., 2002. Determination of Hydrolyzable Tannins (Gallotannins and Ellagitannins) after Reaction with Potassium Iodate. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1785-1790.
- Hino T. and J.B. Russel. 1985. Effect of reducing-equivalent disposal and NADH / NAD on deamination of amino acids by intact rumen micro-organisms and their cell extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 : 1368-1374.
- HEGARTY R.S., GOOPY J.P., HERD R.M., McCORKELL B. Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. *Journal of Animal Science*, 2007, 85, 1479-1486.
- Huntington J.A. and Givens D.I. (1997). The effect of inoculum concentration and method of inoculation on the gas production profile high temperature dried grass. *Proceed. Brit. Societ. Anim Sci.*, 192-200p.
- HOUMANI Z., 1997.- Multiplication and utilization of ornamental tree in central Algeria. *Cahiers, Options Méditer.* 23 : 33-42.

J –

- Julien, C., J.P. Marden, C. Bonnefont, R. Moncoulon, E. Auclair, V. Monteils and C. Bayourthe. 2010a. Effects of varying proportions of concentrates on ruminal reducing power and bacterial community structure in dry dairy cows fed hay-based diets. *Animal*. DOI : 10.1017/S1751731110000972.
- Jouany J.P. 1996. Effect of rumen Protozoa on nitrogen utilisation by ruminants. *Journal of Nutrition*, 126: 1335-1346.
- Jouany J.P. 1994. Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA Prod. Anim.* 7 :207-225.
- Joany J.P., B. Lassalas and G. Bertin 1995. In vitro study of the dose effect of *Saccharomyces cerevisiae* on rumen digestion of a mixed diet. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 3.
- JOUANY J.-P., BROUDISCOU L., PRINS R., KOMISARCZUK-BONY S. Métabolisme et nutrition de la population microbienne du rumen. JARRIGE R., RUCKEBUSH Y., DEMARQUILLY C., FARCE M.-H.,
- JOURNET M. éditeurs : *Nutrition des Ruminants Domestiques ; Ingestion et Digestion*, Versailles, France. INRA Editions, 1995, p349-381.

K –

- Khanbabaee, K., Van-Ree T., 2001. Tannins: Classification and Definition. *Nat. Product Reports*, 16: 641-649.
- Krause, Smith, Ryan, Mackie & McSweeney. (1999) Use of 16S-rRNA Based Techniques to Investigate the Ecological Succession of Microbial Populations in the Immature Lamb Rumen: Tracking of a Specific Strain of Inoculated *Ruminococcus* and Interactions with Other Microbial Populations in Vivo. *Microbial Ecology*, 38, 365-376.
- Klieve, A.V. & Swain, R.A. (1993) Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pulsedfield gel electrophoresis and laser densitometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2299-2303.
- Kamara D.N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, 89 (1): 124-131.
- Khazal K., Deinho M.T., Ribero J.M. and Orskov E.R. (1995). Prediction of apparent digestibility and voluntary intake of hays feed to sheep: comparison between using fiber components in vitro digestibility or characteristics of gas production or nylon bag degradation. *J. Anim. Sci.*, 61: 527-1709p.
- Kayouli C., Jouany J.P., Demeyer D.I., Ali A., Hatdardillat C. 1993. Comparative studies on the degradation and mean retention time of solid and liquid phases in the forestomachs of dromadaires and sheep fed on low-quagages from Tunisia. *Anim. Feed Sci. Technol.* 40, 343-355.

L –

- Lhuillier, A. (2007) Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat. Toulouse.
 - Lévêque, C. (2001) Ecologie. De l'écosystème à la biosphère, Dunod.
 - Lesmeister K.E. and A.J. Heinrichs. 2004. Effects of Corn Processing on Growth Characteristics, Rumen Development, and Rumen Parameters in Neonatal Dairy Calves. *J. Dairy Sci.* 87 : 3439–3450.
 - **Leinmüller** E., Steingass H. and Menke K.H. 1991. Tannins in Ruminant feed stuff. Institute of Animal Nutrition, University of Hohenheim (Germany).
 - Laurent, L. (1991) Eléments minéraux. In : Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Volume 4. Lavoisier (Ed). Paris, pp78-98.
 - Ly J. and Preston T.R. (1997). An approach to the estimation of washing losses in leaves of tropical trees. *Livst. Resea. Riral. Dev.*, 9 (3): 5-9p.
 - Laadjimi K., (2008). Evaluation des interactions fermentaires entres fourrages : estimation de leur fermentescibilité *in vitro* par le microbiote ruminal d'ovins. Thèse de magister en Biochimie appliquée. Université Cheikh Larbi Tébéssi de Tébessa, 80p.
 - Longuo H.F., Chehma A., Ouled Belkher A. 1989. Quelques aspects botaniques et nutritionnels des pâturages des dromadaires en Algérie. In : Séminaire sur la digestion, la nutrition et l'alimentation des dromadaires. CIHEAM, Cahiers Options Méditerranéennes. 2, 101-113.
- M –**
- Martin S., Andriantsitohaina R. (2002) Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie.* 51: 304-315.
 - Milane H., 2004. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg, 268 p.
 - McDonald, P., Edwards, R., Greenhalgh, J. & Morgan, C. (1981) *Animal Nutrition*. New York,USA: Longman.
 - Marden, J.P., Bayourthe, C., Enjalbert, F. and R. Moncoulon. 2005. A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 88 : 277–281.
 - Monteils V., M. Rey, L. Cauquil, A. Troegeler-Meynadier, M. Silberberg, and S. Combes. 2011. Random changes in the heifer rumen in bacterial community structure, physicochemical and fermentation parameters, and *in vitro* fiber degradation. *Livest. Sci.* 141 : 104–112.
 - Marden J.P., C. Julien, V. Monteils, E. Auclair, R. Moncoulon and C. Bayourthe. 2008. How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows? *J. Dairy Sci.* 91 : 3528–3535.

- Mackie R.I. and B.A. White. 1990. Symposium : Rumen microbial ecology and nutrition. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism : potential impact on nutrient output. J. dairy Sci. 73 : 2971-2995.
- MILLER T. Ecology of methane production and hydrogen sinks in the rumen. T W. ENGELHARD, S. LEONARD-MAREK, REVES G., D. GIESECKE editors. Ruminant Physiology : Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction, Stuttgart, Germany. Ferdinand Enke Verlag, 1995, p. 317-331.
- MARTIN C., ROUEL J., JOUANY J-P., DOREAU M., CHILLIARD Y. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. Journal of Animal Science, 2008, 86, 2642-2650.
- Makkar, h.p.s, blummel, m, borowy, N, K becker, K, 1993. gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods j,sci, food agric 61-161-165
- Makkar, h.p.s blummel M.becker, K. 1995 formation of complexes between polyvinylpyrrolidone or polyethylene glycols and the true digestibility in vitro technique br.J. nutr 73 897,913.
- Mc Sweeney C.S., Palmer B., Mc Neil M., Krause D.O. 2001. Microbial interactions with tannins: Nutritional consequences for ruminants. Anim. Feed Sci. Technol. 91, 83-93.
- Maisuthisakul, P., Pasuk, S., Ritthiruangdej, P. (2008) Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. J Food Composition and Analysis. 21: 229-240.
- Mahmoudi yahia la thérapeutique par les plantes en Algérie édition palais du livre Blida ; 2011

N –

- Ndlovu L.R. and Nherera F.V. 1997. Chemical composition and relationship to in vitro gas production of Zimbabwean browsable indigenous tree species. Animal Feed Science and Technology, 69: 121-129.
- Nugent J.H.A., J.L. Mangan. 1981. Characteristics of the rumen proteolysis of fraction 1 (18S) protein from lucerne (*Medicago sativa* L). Br. J Nutr. 46 : 39-58.
- Note sur le *Marrubium vaillantii* Coss. et Germ. - 1879 - taxinomie, *marrubium vaillantii*, tératologie, virescence, *marrubium vulgare*, p. 282-287 - Société Botanique de France, Bull. Soc. bot. Fr., Compte rendus des séances.
- Ndlovu L R and Nherera F V 1997 Chemical composition and relationship to in vitro gas production of Zimbabwean browsable indigenous tree species. Animal Feed Science Technology, 69:121-129.

O –

- Orskov E.R. et Ryle M., (1990). Manipulation of rumen microorganismes. In: Energy nutrition in ruminants. Ed: Elsevier Science., 499-503p.

- Oliveira S.G., Berchielli T.T., Pedreira M.S., Primavesi O., Frighetto R., Lima M.A. 2007. Effect of tannin levels in sorghum silage and concentrate supplementation on apparent digestibility and methane emission in beef cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 135, 236–248.

P –

- Porter L. J., Hirtstich L. N., Chang B. G. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidins and delphinidins. *Phytochemistry*, 25 (1), 223-230.
- Packer L. 2001. Flavonoids and other polyphenols. Ed Academic Press, California, 483 p.
- Pettipher G.L. and M.J. Latham. 1979. Production of enzymes degrading plant cell walls and fermentation of cellobiose by *Ruminococcus flavefaciens* in batch and continuous culture. *J. General Microbiol.* 110 : 29-38.
- PINARES-PATINO C.S., D'HOOR C.S., JOUANY J-P., MARTIN C. Effects of stocking rate on methane and carbon dioxide emissions from grazing cattle. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2007, 121(1-2), 30-46.
- Podsedek, A. (2007) Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT.* 40:1-11.
- Puchala R., Min, B.R., Goetsch A.L., Sahlu T. 2005. The effect of a condensed tannin- containing forage on methane emission by goats. *J. Anim. Sci.* 83, 182–186.

R –

- Ricardo-da-Silva J. M., Rigaud J., Cheynier V., Cheminat A., Moutounet M., 1991. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry*, 30(4): 1259-1264.
- Roque J.L. 1991. Anomalies de la digestion microbienne ruminale. Aspects pathologiques. Thèse Med. Vet., Toulouse. p99.
- Rachedi K., (2005). Etude de la fermentesibilité *in vitro* de plantes présahariennes par la microflore ruminale d'ovin. Evaluation de la contribution spécifique des différentes fractions pariétales au pool des produits fermentaires. Thèse de magister en biochimie appliquée. Université Mentouri de Constantine, 82p.
- Rubanza al ; 2005 anim feed sci technol 119(1 /2) 129 142.

S –

- Singh B., Saho A., Sharma R. and Bhat T.K., 2005. Effect of polyethylene glycol on gas production parameters and nitrogen disappearance of some tree forages. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124: 351-364.

- Seresinhi T. and Iben C. 2003. In vitro quality assessment of two tropical shrub legumes in relation to their extractable tannins content. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 87: 109-115.
 - Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R. & Doré, J. (2003) Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, 52, 237-242.
 - Stewart C.S. and M.P Bryant. 1988. The rumen bacteria. In : Hobson PN, (eds.). *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Science Publisher, New York, 21-75. p527.
 - Sahoo A., D N. Kamra and N.N. Pathak. 2005. Pre- and postweaning attributes in faunated and ciliate-free calves fed calf starter with or without fish meal. *J. Dairy Sci.* 88 : 2027– 2036.
 - Sites internet(2) :propriétés des tanins
<http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin.html>
 - Sites internet
N° 1 : Figure 3 : métabolisme et devenir des protéines dans le système digestif du ruminant :<http://babcock.wisc.edu/node/144> (15/05/2012).
 - Sakata T. and H. Tamate. 1979. Rumen Epithelium Cell Proliferation Accelerated by Propionate and Acetate. *J. Dairy Sci.* 62 : 49-52.
 - Soltner D., (1999). *Alimentation des animaux domestiques. Sciences et techniques agricoles Tome I*, 21 édition, 176 p.
 - Singh B., Saho A., Sharma R., Bhat T.K. 2005. Effect of polyethylene glycol on gas production parameters and nitrogen disappearance of some tree forages. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 123, 351-364.
 - Shofield P., Mbugua D.M., Pell A.N. 2001. Analysis of condensed tannin: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91, 21-40.
 - Sliwinski B.J., Soliva Carla R., Machmuller A., Krenzer M. 2002. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 101, 101-114
- T –**
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Ogata, K., Nakamura, M., Matsui, H. & Benno, Y. (1999) Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiology Ecology*, 29, 159-169.
 - Tiret L. 2001. *Physiologie de la digestion*. Polycopié, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique de Physiologie et Thérapeutique. p69.
 - Tavendale M.H., Meagher L.P., Pacheco D., Walker N., Attwood, G.T., Sivakumaran S. 2005. 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.* 123/124, 403–419.

- **Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T. (2007)** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.* (in press).
- **Turkmen, N., Velioglu, Y. S, Sari, F., Polat, G. (2007)** Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules.* 12:484-496.

V –

- **Vermerris W., Nicholson R., 2006.** Phenolic compound biochemistry. Ed Springer, Gainesville. U.S.A, 285 p.
- **VERITE R., DURAND M., JOUANY J-P.** Influences des facteurs alimentaires sur la protéosynthèse microbienne dans le rumen. *Reproduction Nutrition Développement*, 1986, 26(1B), 181-201.
- **VERMOREL M., JOUANY J-P., EUGENE M., SAUVANT D., NOBLET J., DOURMAD J-Y.** Evaluation quantitative des émissions de méthane entérique par les animaux d'élevage en 2007 en France. *INRA Productions Animales*, 2008, 21(5), 403-418.
- **Vitti D.M.S.S., Abdalla A.L., Bueno I.C.S., Silva Filho J.C., Costa C., Bueno M.S., Nozella E.F., Longo C., Vieira E.Q., Cabral Filho S.L.S., Godoy P.B. and Mueller-Harvey I. 2005.** Do all tannins have similar nutritional effects? A comparison of three Brazilian fodder legumes. *Animal Feed Science and Technology*, 119: 345–361.
- **Van de Vossenbergh, J.L.C.M. & Joblin, K.N. (2003)** Biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids to stearic acid by a strain of *Butyrivibrio hungatei* from the bovine rumen. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 424-428.
- **Vuorela, S. (2005)** Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. Helsinki.

W -

- **Welch, J.G. (1982)** Rumination, Particle Size and Passage from the Rumen. *J. Anim Sci.*, 54, 885-894.
- **Wallace R.J. and M.A. Cotta. 1988.** Metabolism of nitrogen-containing compound. In : Hobson P.N., (eds.). *The rumen microbial ecosystem.* Elsevier Science Publishing, New York, 217-249. (p. 527).
- **Wallace R.J. and K.N. Joblin. 1985.** Proteolytic activity of a rumen anaerobic fungus. *FEMS Microbial Lett.* 29 : 19-25.
- **Williams, C.M. (2000)** Dietary fatty acids and human health. *Annales de Zootechnie*, 49, 16.
- **WETHERILT H.** Evaluation of *Urtica* species as potential sources of important nutrients. In : *Food Science and Human Nutrition / ed. par Charalambous G.* Elsevier Science Publishers, 1992, 15-25.

Y –

- Yaakoub F, (2006). Evaluation *in vitro* de la dégradation des principaux fourrages des zones arides. Thèse de magister en Nutrition. Université El-Hadj Lakhdar de Batna ,150p.

ANNEXES

Analyse des phénols totaux (Méthode de Folin-Ciocalteu)

ces tests sont basés sur le principe de l'oxydoréduction et l'utilisation du réactif Folin Ciocalteu , une autre méthode utilisant le réactif chlorure ferrique est basée sur la propriété du métal complexant des composés phénolique la méthode de Folin Ciocalteu selon le procédé de(**julkunen tiitto ,1985**) est largement utilisée pour les phénols totaux en raison de sa haute sensibilité et de sa reproductibilité ,pendant la présence d'agent réducteurs interfère dans le dosage des molécules phénoliques

Cette méthode suppose que les composés phénoliques qui se lient à des protéines sont les mêmes que ceux qui se lient au vinyle polypyrrolidone (PVPP). Les phénols totaux sont mesurés dans un extrait de plante par la méthode de Folin-Ciocalteu avant et après traitement avec PVPP. Cependant, la présence d'agents réducteurs interfère dans le dosage

Réactifs

- Folin-Ciocalteu réactif 1N (Sigma).
- Carbonate sodique $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Biochem).
- Standard: Acide tannique.

- Préparation des Solutions

- Solutions FN (1) (réactif Folin 1N): le réactif Folin-Ciocalteu commercial (2N) est dilué à la moitié en ajoutant le même volume d'eau distillée (100 g réactif commercial + 100 ml eau).

La solution est conservée dans une bouteille de verre foncé dans le réfrigérateur à 4°C. Quand il est frais, il présente une couleur dorée. Dans le cas où sa couleur vire au vert, il ne faut pas l'utiliser.

- Partie étalon
- Préparation de la solution mère
- Solutions (2) à 20% de carbonate sodique: 40g de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ sont pesés et dissouts dans approximativement 150 ml d'eau distillée dans une fiole jaugée de 200 ml puis la solution est complétée au trait de jauge avec l'eau distillée.

Une solution mère initiale d'acide tannique est préparée en dissolvant 25 mg d'acide tannique dans 25 ml d'eau distillée. Une solution fille (solution T) est préparée en diluant 1 ml de la

solution mère avec 9 ml d'eau

Tableau 1. Préparation de la gamme standard

Tube	μL de solution T	μL eau	μL Réactif folin	ml Solution carbonate
Blanc	0	500	250	1,25
T1	20	480	250	1,25
T2	40	460	250	1,25
T3	60	440	250	1,25
T4	80	420	250	1,25
T5	100	400	250	1,25
T6	150	350	250	1,25
T7	200	300	250	1,25
T8	250	250	250	1,25

Préparation de la gamme standard

A partir de la solution fille T, une gamme étalon est préparée selon le tableau 9.

- Partie essai

- 50 μL d'EXT (extrait original) sont extraits dans des tubes à essais puis 0,45 ml d'eau distillée sont ajoutés. Il faut noter que trois répétitions sont réalisées pour chaque substrat.

- 250 μL du RÉACTIF Folin sont introduits à tous les tubes. Après 4 min, 1,25 ml de la solution de carbonate sodique sont ajoutés. Les tubes sont ensuite agités énergiquement dans un vortex

- Les tubes sont laissés dans un tiroir à l'abri de la lumière et à température ambiante.

-Après 40 min, la densité optique est lue à 725 nm.

Remarque: la lecture doit être effectuée entre 40 et 60 min

Le polyéthylène glycol PEG :

On appelle polyéthylène glycol ou PEG des polyéthers linéaires de masse molaire inférieure à 20 000 g.mol⁻¹ fabriqués à partir de monomères d'éthylène glycol. Leurs propriétés hydrosolubles et liposolubles en font des produits utilisés dans un grand nombre d'industries (médical, cosmétique, etc.). On les appelle également macrogol dans le domaine médical. On a l'habitude d'indiquer la masse molaire moyenne du polymère après le nom, par exemple PEG-2000 (2 000 g.mol⁻¹)

le PEG est un polymère synthétique possédant une grande affinité pour les tanins. Il forme des complexes

stables avec ces molécules et permet de prévenir la précipitation des protéines. De plus,

l'action des tanins est tributaire de leur taux et de leur structure.

