



République Algérienne Démocratique et Populaire



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHESCIENTIFIQUE

Université DE TEBESSA

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Ecole Doctorale Biologie Environnementale

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de MAGISTER

Option : Biologie et Ecologie Animale

Impact du contenu phénolique-extrait de margines

Issues de deux modes de trituration sur la méthanogénèse ruminale in vitro

Préparé par : AOUADI ABDELHAFID

Soutenue le : 28-05-2012

Devant le jury :

DJABRI Belgacem	Président	M.C.A.	Université de Tébessa/Tébessa
ARHAB Rabah	Rapporteur	M.C.A.	Université Larbi Ben Mhidi/OEB
HAMIDECHI Abdelhafid	Examineur	M.C.A.	Université Mentouri/Constantine
BARKAT Malika	Examineur	M.C.A.	Université Mentouri/Constantine

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2011-2012

République Algérienne Démocratique et Populaire

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHESCIENTIFIQUE**

Université DE TÉBESSA



**Faculté des Sciences Exactes et
des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département des Sciences de la Nature et de la Vie
Ecole Doctorale Biologie Environnementale**

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de MAGISTER
Option : Biologie et Ecologie Animale

Préparé par : AOUADI ABDELHAFID

Impact du contenu phénolique-extrait de margines

Issues de deux modes de trituration sur la méthanogénèse ruminale in vitro

Soutenue le : 28-05-2012

Devant le jury :

DJABRI Belgacem	M.C.A.	Université de Tébessa/Tébessa	Président
ARHAB Rabah	M.C.A.	Université Larbi Ben Mhidi/OEB	Rapporteur
HAMIDECHI Abdelhafid	M.C.A.	Université Mentouri/Constantine	Examineur
BARKAT Malika	M.C.A.	Université Mentouri/Constantine	Examineur

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2011-2012



ان مصانع استخراج زيت الزيتون اضافة الى منتوجها الاساسي المتمثل في زيت الزيتون ، تطرح نوعين من البقايا اولهما سائل (النفايات السائلة) و ثانيهما صلب (كسب الزيتون). اما النفايات السائلة التي تنتج اما عن طريق الطرد المركزي او عن طريق الترسيب عند استخراج زيت الزيتون ، فإنها ترمى في المحيط دون معالجة ، مما يؤثر سلبا على البيئة. يعود هذا التأثير بالدرجة الاولى لغنى هذه النفايات بالمركبات العضوية، خاصة المركبات الفينولية. فالهدف المحدد في هذه الدراسة هو دراسة تأثير المحتوى الفينولي لمستخلصات النفايات السائلة الناتجة عن نوعين من المعاصر تقليدية وحديثة، على انتاج غاز الميثان للمجترات مخبريا. النفايات السائلة لمعاصر الزيتون المستعملة في هذه الدراسة تم الحصول عليها من نوعين من المعاصر: صناعية (نظام ثلاث مراحل) وتقليدية متواجدة في اربع ولايات " قالمة، سكيكدة، عنابة و تبسة ". حيث يتم استخلاص المركبات الفينولية للنفايات السائلة لمعاصر الزيتون باستخدام أسيتات الإيثيل (acétate d'éthyle) هذا بعد القيام بالتخلص من الليبيدات. وبعدها نقوم باستخراج خصائص المركبات الفينولية الخام، عن طريق تحديد محتواها من فينولات كلية (PT)، الادباغ الكلية (TT)، الادباغ المكثفة (TC) و الفلافونيدات (FL) . واخيرا نتابع مراحل تخمر الكلى الجاف الممزوج ب100مكرو لتر (µl) لكل مستخلص .

اظهرت نتائج التحليل النباتي للمستخلصات الخامة للنفايات السائلة لمعاصر الزيتون ، غناها بالفينولات الكلية و الادباغ الكلية، بالمقابل تتميز باحتوائها على قيم ضئيلة من الادباغ المكثفة و الفلافونيدات. في حين ان تحليل تأثير المستخلصات الفينولية على عملية انتاج غاز الميثان، يشير الى ان المستخلصات الفينولية للنفايات السائلة لمعاصر الزيتون المضافة للكلى الجاف تعمل على خفض معتبر لانتاج غاز الميثان الكرشي للمجترات. بعد 96 ساعة من الحضان فان القيم المسجلة لانخفاض انتاج غاز الميثان هي : 52,49%، 48,46%، 43,59%، 27,79%، 18,76%، 13,90% و 5,94% بالتتالي بالنسبة ل E.M.U.M.G، E.M.U.T.G، E.M.U.T.S، E.M.U.T.T، E.M.U.T.A ، E.M.U.M.S و E.M.U.M.A. علاوة على هذا، فان الانخفاض في انتاج غاز الميثان مصحوب بانخفاض عدد الاوليات وخفض انتاج الامونياك مع زيادة معتبرة لمعاملات الهضومية. واخيرا تشير هذه النتائج الى امكانية استخدام المستخلصات الفينولية لنفايات معاصر الزيتون كإضافات غذائية في عملية خفض انتاج غاز الميثان الكرشي للمجترات.

الكلمات المفتاحية : النفايات السائلة لمعاصر الزيتون، المركبات الفينولية، الميثان، الاوليات،

النشادر، معامل الهضومية



The olive industry, in addition to the main production of olive oil, those two types of residues, firstly liquid (OMW) and the second solid (the residue). The olive oil mill wastes-water (OMW) obtained by centrifugation or sedimentation after pressing the oil of olive, are characterized by a high concentration of sugars, fats, proteins and especially phenolic compounds. Once dismissed without having undergone prior treatments, the OMW have a negative impact on the environment due to their ability to inhibit the development of plants and some microorganisms. Their phytotoxicité is mainly attributed to the presence of lipids and polyphenols. The objective set for this work is to study the effect of the phenolic content of olive oil mill wastes-water extracts from two modes of pressing on in vitro ruminal methanogens. The OMW selected for this study come from two types of mills: industrial (three-phase system) and traditional, established in four wilaya: GUELMA, SKIKDA, ANNABA and TÉBESSA. The phenolic content is extracted with ethyl acetate after defatting. The crude phenolic content was characterized by the determination of total phenols (TP), total tannins (TT), condensed tannins (TC) and total flavonoids (TF). Monitoring the fermentation of oat-vetch hay supplemented with 100 ml of each extract is made from phenolic batch system.

The phytochemical analysis of crude extracts of olive oil mill wastes-water show their wealth in total phenols (TP) and total tannins (TT). However, they characterized by their low content of condensed tannins (CT) and flavonoids (FL). While the analysis of the impact of phenolic extracts on the production of methane indicates that the addition of phenolic extracts of olive oil mill wastes-water induces a significant reduction in the ruminal methanogens ($p > 0.05$). After 96 h of incubation, méthane production is reduced by 52,49%, 48,46%, 43,59%, 27,79%, 18,76%, 13,90% and 5,94% respectively by E.M.U.T.G., E.M.U.T.S., E.M.U.T.T., E.M.U.T.A, E.M.U.M.S and E.M.U.M.A. Furthermore, this reduction is confirmed with a decrease in the number of protozoa, a reduction in the production of ammonia and an increase in the digestibility coefficients. These results indicate the potential use of phenolic compounds of olive oil mill wastes-water as food additives in the reduction of ruminal methanogens.

Keywords: OMW, phenolic compounds, methane, protozoa, ammonia, digestibility coefficient



L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile, laisse deux résidus l'un liquide (les margines) et l'autre solide (les grignons). Les margines, sous-produit obtenu par centrifugation ou sédimentation de l'huile après le pressage de l'olive, sont caractérisées par une concentration élevée en sucres, lipides, protéines et surtout en composés phénoliques. Une fois rejetées sans avoir subi des traitements préalables, ces margines auront un impact négatif sur l'environnement dû à leur pouvoir d'inhiber le développement des plantes et de certains microorganismes. Leur phytoxicité est principalement attribuée à la présence des lipides et des polyphénols. L'objectif assigné à ce travail est l'étude de l'effet du contenu phénolique extrait des margines issues de deux modes de trituration sur la méthanogènes ruminale in vitro. Les margines retenues pour la présente étude sont issus de deux type d'huileries : industrielle (système à trois phase) et traditionnelle, implantées dans quatre wilaya : GUELMA, SKIKDA, ANNABA et TEBESSA. Le contenu phénolique est extrait à l'acétate d'éthyle après délipidation. Le contenu phénolique brut a été caractérisé par la détermination des phénols totaux (PT), tanins totaux (TT), tanins condensés (TC) et flavonoïdes totaux (FT). Le suivi de la fermentation du foin de vesce-avoine complémenté de 100 µl de chaque extrait phénolique est réalisé en système batch.

L'analyse phytochimique des extraits bruts des margines montre leurs richesse en phénols totaux (PT) et en tanins totaux (TT). En revanche, ils caractérisent par leur teneur faible en tanins condensés (TC) et en flavonoïdes (FL). Tandis que, l'analyse de l'impact des extraits phénoliques sur la production de méthane indique que l'addition des extraits phénoliques des margines induisent une réduction significative dans la méthanogènes ruminale ($p > 0.05$). Après 96h d'incubation les taux de réductions de CH_4 enregistrés sont respectivement 52,49%, 48,46%, 43,59%, 27,79%, 18,76%, 13,90% et 5,94% pour E.M.U.M.G., E.M.U.T.G., E.M.U.T.S., E.M.U.T.T., E.M.U.T.A, E.M.U.M.S et E.M.U.M.A. En outre, cette réduction est corroborée à une diminution dans le nombre de protozoaires, une réduction dans de la production d'ammoniac et une augmentation dans les coefficients de digestibilité. Ces résultat indiquent la possibilité d'usage des composées phénoliques des margines comme additifs alimentaires dans la réduction de la méthanogènes ruminale.

Mots clés : margines, composés phénoliques, méthane, protozoaires, ammoniac.
coefficient de digestibilité.

Remerciements

Louange à Dieu tout puissant de m'avoir accordé la force, la patience et le sacrifice pour accomplir ce modeste travail.

Je tiens à exprimer mon profond respect et toute ma gratitude à mon directeur de thèse Monsieur ARHAB Rabah Maître de conférences à l' Université Larbi Ben Mhidi Oum El Bouaghi, je le remercie infiniment pour toute son aide, ses précieux conseils, le suivi et l'orientation dont j'ai pu bénéficier.

Je suis très honorée et tiens à remercier les membres du jury :

Mr.DJABRI Belgacem . Maître de conférences à l'université de Tébessa pour avoir accepté de présider le jury.

Monsieur HAMIDECHI Abdelhafid et BARKAT Malika. Maîtres de conférences à l'université de Constantine, qui me font l'honneur d'accepter de juger mon travail, et de faire partie de mon jury.

Je n'oublie pas de remercier M^{elle} RECHRACHE Saloua et M^{elle} SOLTANI Meriem. Pour leurs aide et leurs précieux conseil.

Enfin, que tous ceux qui m'ont accordé un soutien, une aide technique ou un conseil, trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.



Dédicaces

Je Dédie ce modeste travail à :

- *Mes chers parents*
- *Mes frères et soeurs*
- *Tous mes proches*
- *Mes amis*
- *A tous mes collègues de la promotion de l'École
Doctorale «Biologie Environnementale».*
- *Tous mes enseignants*
- *Tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce
mémoire*

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction

Chapitre I : Synthèse bibliographique

<u>I. Les margines</u>	<u>4</u>
<i>I.1 Origine des margines</i>	4
<i>I.1.1 les Procédés d'extraction d'huile d'olive</i>	4
<i>I.1.1.1 Procédés discontinus ou systèmes à presses</i>	4
<i>I.1.1.2 Procédés continus ou systèmes à centrifugation</i>	4
<i>I.1.2 Les principaux produits du processus d'extraction de l'huile d'olive</i>	6
<i>I.2 Caractérisation physico-chimique et microbiologique des margines</i>	6
<i>I.2.1 Caractéristiques physico-chimiques</i>	6
<i>I.2.2 Caractéristiques microbiologiques</i>	7
<i>I.3 Impact des effluents d'huileries d'olive sur l'environnement</i>	7
<i>I.3.1 Impact sur les eaux</i>	7
<i>I.3.2 Impact sur les sols</i>	8
<i>I.3.3 Impact sur les plantes</i>	8
<i>I.4 Traitement et valorisation des margines</i>	8
<i>I.4.1. Traitement des margines</i>	8
<i>I.4.1.1. procédés physiques</i>	9
<i>I.4.1.2. procédés chimiques</i>	9
<i>I.4.1.3. procédés biologiques</i>	9
<i>I.4.1.4. procédés combinés</i>	9
<i>I.4.2. Valorisation des margines</i>	9
<i>I.4.2.1. Production de biogaz</i>	9
<i>I.4.2.2. Compostage des margines</i>	11
<i>I.4.2.3. Production des protéines d'organismes unicellulaires</i>	11
<i>I.4.2.4. Production d'enzymes</i>	11
<i>I.4.2.5. Epan dage</i>	11
<i>I.4.2.6. Production d'antioxydants naturels</i>	12
<i>I.4.2.7. Utilisation en alimentation animale</i>	12

<u>II. La méthanogénèse ruminale</u>	<u>13</u>
II.1. Le méthane et l'effet de serre	13
II.1.1. les principaux gaz à effet de serre	13
II.1.2 Les différentes sources de méthane	14
II.1.2.1 le méthane d'origine naturelle	14
II.1.2.2 le méthane d'origine anthropique	15
II.2. La production de méthane digestif par les ruminants	16
II.2.1. L'écosystème ruminale	16
II.2.1.1 Les paramètres physico-chimique du rumen	16
II.2.1.2 La microbiote ruminale	17
II.2.1.3 Les interactions microbiennes dans le rumen	19
II.2.2. La dégradation anaérobie de la matière organique	21
II.2.2.1. Hydrolyse :	21
II.2.2.2. Acidogénèse	21
II.2.2.3. Acétogénèse	22
II.2.2.4. Méthanogénèse	22
II.3. Facteurs influençant la méthanogénèse ruminale	23
II.3.1. L'animal	23
II.3.2. Effet des caractéristiques du régime alimentaire	23
II.3.2.1. Matière organique digestible	23
II.3.2.2. Le temps de séjour dans le rumen et le taux d'ingestion	23
II.3.2.3. Source de carbone et voie de la fermentation	23
II.4. Comment réduire la méthanogénèse chez les ruminants	24
<u>III. Les composés phénoliques</u>	<u>25</u>
III.1. Généralités sur les composés phénoliques	25
III.1.1. Définition	25
III.1.2. Les rôles des composés phénoliques	26
III.2. Les composés phénoliques des margines	27
III.2.1. Monomères aromatiques	27
III.2.2. Les polymères phénoliques	27
III.3. Les composés phénolique dans la nutrition animale	28
III.3.1. Métabolisme des composés phénoliques	28
III.3.2. les effets des composés phénoliques sur les animaux	30
III.3.2.1. Effet toxique et antinutritionnel	30
III.3.2.2. Effets bénéfiques	32
III.4. Adaptation des animaux aux tanins	33

Chapitre II : Matériel et méthodes

<u>I. Matériels</u>	<u>36</u>
1.1 Matériel végétal	36
1.1.1. lieu et climat des régions de collecte des échantillons	36
1.1.2. échantillonnage	36
1.2. Matériel animal	36
<u>II. Méthodes</u>	<u>37</u>
II.1. Extraction et quantification des composés phénoliques	37
II.1.1 Extraction des composés phénoliques	37
II.1.2 Quantification des composés phénoliques	37
II.1.2.1 Dosage des polyphénols totaux	37
II.1.2.2 Dosage des tanins totaux	39
II.1.2.3 Dosage des tanins condensés	39
II.1.2.3 Dosage des flavonoïdes	40
II.2. Fermentations in vitro des substrats	41
II.2.1. Technique de la production de gaz in vitro	41
II.2.2. Description du système de fermentation	41
II.2.3. Préparation de la salive artificielle et de l'inoculum	41
II.2.3.1. Préparation de la salive artificielle (solution tampon)	41
II.2.3.2. Préparation de l'inoculum	42
II.2.4. Inoculation	43
II.2.5. Incubation	43
II.3. Etude des gaz produits	44
II.3.1 Etude quantitative et qualitative des gaz produits	44
II.3.1.1. Analyse quantitative des gaz	44
II.3.1.2. Analyse qualitative des gaz	44
II.3.2 Détermination des paramètres caractéristiques de la production de gaz	44
II.4. Mesure du pH et analyse des produits de fermentation	45
II.4.1. Mesure du pH	45
II.4.2. Dosage de l'azote ammoniacal	45
II.4.3. Dénombrement des protozoaires	46
II.5. détermination la digestibilité apparente	47
II.6..Analyse statistique	48

Chapitre III : Résultats et discussion

<u>I. Dosage des composés phénoliques</u>	<u>50</u>
I.1. Dosage des phénols totaux (PT)	50
I.2. Dosage des tanins totaux (TT)	50
I.3. Dosage des tanins condensés (TC)	50
I.4. Dosage des flavonoïdes (FL)	52
<u>II. Influence du contenu phénolique des margines sur l'activité ruminale</u>	<u>53</u>
II.1. Influence du contenu phénolique des margines sur la production de gaz	53
II.1.1. Volume total de la production de gaz in vitro	53
II.1.2. La cinétique de la production de gaz	55
II.1.3. Les paramètres de la production de gaz in vitro	57
II.1.4. L'Analyse qualitative des gaz produits	59
II.2. Influence du contenu phénolique des margines sur le profil fermentaire	62
III.2.2.1. pH	62
III.2.2.2. Production d'ammoniaque	63
III.2.2.3. Composition quantitative de la faune ruminale (protozoaires)	64
<u>III. Influence du contenu phénolique des margines sur la digestibilité apparente</u>	<u>66</u>

Discussion générale et conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Liste des Figures

Figures	Titres	Pages
Figure 1	<i>processus d'extraction de l'huile d'olive</i>	5
Figure 2	<i>Les principales voies de traitement des margines</i>	10
Figure 3	<i>Les microbes du rumen</i>	17
Figure 4	<i>Voies de dégradation anaérobie de la matière organique</i>	22
Figure 5	<i>Dégradation anaérobie des composés phénoliques via la voie de benzoyl CoA</i>	29
Figure 6	<i>Méthode d'extraction des polyphénols des margines</i>	38
Figure 7	<i>courbe étalon correspondant aux dosages des phénols totaux</i>	39
Figure 8	<i>courbe étalon correspondant aux dosages tannins totaux.</i>	39
Figure 9	<i>courbe étalon correspondant aux dosages tannins condensés</i>	40
Figure 10	<i>courbe étalon correspondant aux dosages flavonoïdes totaux</i>	40
Figure 11	<i>Etapes de la préparation de la salive artificielle</i>	42
Figure 12	<i>l'incubation dans une étuve à agitation rotatoire (type GFL 3033)</i>	43
Figure 13	<i>Principe de dosage de l'azote ammoniacal présent dans le milieu fermentaire.</i>	45
Figure 14	<i>courbe étalon correspondant au dosage de l'azote ammoniacal ruminale</i>	46
Figure 15	<i>Quadrillage de dénombrement de la cellule de Malassez.</i>	47
Figure 16	<i>Concentration des composés phénoliques (PT, TT, TC et FL g/l) des extraits des margines .</i>	51
Figure 17	<i>Cinétique de production de gaz des mélanges du foin de vesce-avoine et des extraits des margines obtenues par trituration traditionnelle (A) et moderne (B).</i>	56
Figure 18	<i>Cinétique de production de (CO₂ et CH₄) des mélanges du foin de vesce-avoine et des extraits des margines</i>	60
Figure 19	<i>Influence des extraits phénoliques des margines sur le pH après 24h d'incubation.</i>	62
Figure 20	<i>Influence des extraits phénoliques des margines sur la production d'ammoniaque après 24h d'incubation</i>	63
Figure 21	<i>Influence des extraits phénoliques des margines sur le nombre de protozoaires après 24h d'incubation.</i>	64
Figure 22	<i>Influence des extraits phénoliques des margines sur la digestibilité apparente (%) du foin de vesce -avoine</i>	66

Liste des Tableaux

Tableaux	Titres	Pages
Tableau 1	<i>Composition chimique de la pâte des margines obtenue par le procédé Dalmolive</i>	13
Tableau 2	<i>Sources et puits du méthane atmosphérique</i>	15
Tableau 3	<i>Traitements possibles pour diminuer la méthanogenèse ruminale</i>	24
Tableau 4	<i>Les principales classes de composés phénoliques</i>	26
Tableau 5	<i>lieu et climat des régions de collecte des échantillons</i>	36
Tableau 6	<i>Concentration des composés phénolique (PT, TT, TC et FL g/l) des extraits des margines obtenues par trituration traditionnelle et moderne.</i>	51
Tableau 7	<i>Production de gaz in vitro et les constantes cinétiques modélisées des mélanges du foin de vesce-avoine e et des extraits phénoliques des margines (100 µl) :</i>	54
Tableau 8	<i>Influence des extraits phénoliques des margines sur le profil fermentaire (productions de CH₄ et du CO₂) du foin de vesce-avoine</i>	58
Tableau 9	<i>Influence des extraits phénoliques des margines sur le facies fermentaire (pH, N-NH₃ (*10² mg/ml) et nombre de protozoaires (*10³ cellules/ml)) de la dégradation in vitro du foin de vesce -avoine.</i>	65
Tableau 10	<i>Influence des extraits phénoliques des margines sur la digestibilité apparente (%) du foin de vesce -avoine.</i>	65

Liste des abréviations

AGV	<i>Acides gras volatils</i>
CDA	<i>Coefficients de digestibilité apparente</i>
CFC	<i>chlorofluorocarbones</i>
CH₄	<i>Méthane</i>
CO	<i>Monoxyde de carbone</i>
CO₂	<i>Dioxyde de carbone</i>
DBO	<i>Demande biologique en oxygène</i>
DCO	<i>Demande chimique en oxygène</i>
EMUMA	<i>Extrait de margine d'unité moderne du ANNABA</i>
EMUMG	<i>Extrait de margine d'unité moderne du GUELMA</i>
EMUMS	<i>Extrait de margine d'unité moderne du SKIKDA</i>
EMUTA	<i>Extrait de margine d'unité traditionnelle du ANNABA</i>
EMUTG	<i>Extrait de margine d'unité traditionnelle du GUELMA</i>
EMUTS	<i>Extrait de margine d'unité traditionnelle du SKIKDA</i>
EMUTT	<i>Extrait de margine d'unité traditionnelle du TÉBESSA</i>
FL	<i>flavonoïdes</i>
GES	<i>Gaz à effet de serre</i>
H₂	<i>Dihydrogène</i>
H₂O	<i>vapeur d'eau</i>
IR	<i>Infra Rouge</i>
MFS	<i>Methylgreen-formalin-saline</i>
MOF	<i>Matière Organique Fermentée.</i>
N₂O	<i>Protoxyde d'azote</i>
O₃	<i>Ozone</i>
PGT	<i>production de gaz total</i>
PRPS	<i>Protéines salivaires riches en proline</i>
PT	<i>Phénols totaux</i>
PVPP	<i>Polyvinylpolypyrrolidone</i>
TC	<i>Tanins condensés</i>
TT	<i>Tanins totaux</i>

Introduction



Le patrimoine oléicole mondial compte actuellement environ 750 millions d'oliviers cultivés sur une superficie de 9,23 millions d'hectares. Les pays méditerranéens comptent 715 millions d'oliviers sur une superficie d'environ 8.16 millions d'hectares, soit 95 % du patrimoine oléicole mondial. L'Algérie fait partie des principaux pays méditerranéens dont le climat est des plus propices à la culture de l'olivier. Elle se positionne après l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Tunisie qui sont par ordre d'importance, les plus gros producteurs d'huile d'olive [169]. Le patrimoine oléicole algérien est estimé à 32 millions d'oliviers, ce qui représente 4,26% du patrimoine mondial. La production annuelle en huile a atteint 35.000 tonnes et celle de l'olive de table 80.000 tonnes [14].

L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile (huile d'olive vierge et huile de grignons), laisse deux résidus l'un liquide (les margines) et l'autre solide (les grignons). De plus, l'olivier engendre des feuilles, des brindilles et du gros bois. Les margines, sous-produit obtenu par centrifugation ou sédimentation de l'huile après le pressage de l'olive, sont caractérisées par une concentration élevée en sucres, lipides, protéines et surtout en composés phénoliques. Une fois rejetées sans avoir subi des traitements préalables, ces margines auront un impact négatif sur l'environnement dû à leur pouvoir d'inhiber le développement des plantes et de certains microorganismes. Leur phytotoxicité est principalement attribuée à la présence des lipides et des polyphénols.

En Algérie, ces margines sont couramment rejetées en l'état ou déversées dans des puits individuels pouvant directement se mélanger aux eaux pluviales, aux eaux usées et inonder les fermes environnantes et/ou indirectement drainées pour finir dans la mer. Il faut également noter que 100 kg d'olives triturées donnent 40 litres de margines et qu'un seul mètre cube de margine est équivalent aux déchets domestiques de 1000 habitants. Ainsi, le traitement de ces margines avant leur rejet s'avère indispensable afin de préserver les nappes phréatiques et limiter les dégâts sur l'environnement.

D'autre part et depuis quelques années, le réchauffement progressif de notre planète, provoqué par l'effet de serre, est devenu une réalité aussi bien politique que scientifique. Cet effet est dû à l'accumulation dans l'atmosphère de gaz qui retiennent le rayonnement infrarouge. Il s'agit principalement de dioxyde de carbone, du méthane, des chlorofluorocarbures et des oxydes d'azote dont les contributions à l'effet de serre ont été estimées respectivement à 49, 18, 14 et 6% [147]. Le méthane constitue la principale voie d'élimination de l' H_2 produit dans le rumen au cours de la digestion microbienne des aliments.



Son éructation par les ruminants conduit à la fois à une perte d'énergie pour l'animal et à une aggravation de l'effet de serre par son pouvoir radiatif. En effet, sa concentration atmosphérique est passée de 0,70 à 1,68 ppm durant les deux derniers siècles [20] et continue d'augmenter chaque année de 0,6% [123]. Par ailleurs, le méthane produit essentiellement dans le rumen représente 22% de la production totale avec environ 7,5% des émissions sont attribuées au cheptel du continent africain.

Dans ce contexte, cette étude a pour objectif d'évaluer l'impact du contenu phénolique extrait des margines collectées dans quatre régions de l'Est Algérien (GUELMA, SKIKDA, ANNABA et TEBESSA) issues de deux modes d'extraction de l'huile d'olive : traditionnelle et moderne, dans la réduction de la méthanogènes ruminale *in vitro* . Elle consistera à étudier ce qui suit : extraction des composés phénoliques, détermination de leur teneur respective, leur caractérisation qualitative et leur effet sur la fermentation *in vitro* (production de gaz, méthane, et composition de la faune ruminale)

Chapitre I

Synthèse

bibliographique



I. LES MARGINES :

Les margines sont des eaux de végétation qui sont générées lors de l'extraction de l'huile d'olive vierge. Ce sont des effluents riches en matière organique (composés phénoliques, lipides, sucres, protéines...) et en sels minéraux (potassium, sodium, magnésium...). Ces margines sont souvent épandues de manière incontrôlée sur les sols agricoles ou stockées dans les cuvettes, exposant ainsi les systèmes eau sol- plante à une pollution inéluctable [179].

I.1 Origine des margines

I.1.1 les Procédés d'extraction d'huile d'olive :

Avec le développement du secteur oléicole, les systèmes traditionnels ont été remplacés par des équipements modernes. Le perfectionnement des procédés a permis d'extraire l'huile en continue à travers des phases successives alors qu'au paravent les processus étaient réalisés de manière discontinue (lavage des olives, broyage mécanique, malaxage, extractions des moûts huileux). De même, après le développement des appareils de centrifugation, la séparation de l'huile des eaux de végétation est devenue moins onéreuse [61] fig 01.

I.1.1.1 Procédés discontinus ou systèmes à presses

Les systèmes à presses sont des systèmes classiques. Ils commencent par un broyage des olives suivi du malaxage et du pressage. Le sous-produit de cette opération est le grignon brut et un moût fait d'effluents d'huileries d'olive et d'huile. La séparation des deux phases se fait par décantation. Les effluents d'huileries d'olive sont généralement rejetés dans le milieu naturel sans aucun traitement. Par contre les grignons sont utilisés par certaines huileries industrielles pour produire l'huile de grignon par une extraction au solvant ou comme combustible dans des chaudières industrielles, des fours et des bains publics [44].

I.1.1.2 Procédés continus ou systèmes à centrifugation

A. Procédé continu à trois phases

L'extraction de l'huile d'olive se fait à travers des phases successives contrairement au procédé discontinu. Les olives sont lavées, broyées, mélangées avec de l'eau chaude et malaxées pour former la pâte d'olive qui est ensuite diluée. Les phases liquides et solides sont séparées par centrifugation donnant les grignons et le moût. Le moût subit à son tour une centrifugation pour séparer l'huile des effluents d'huileries d'olive [129].

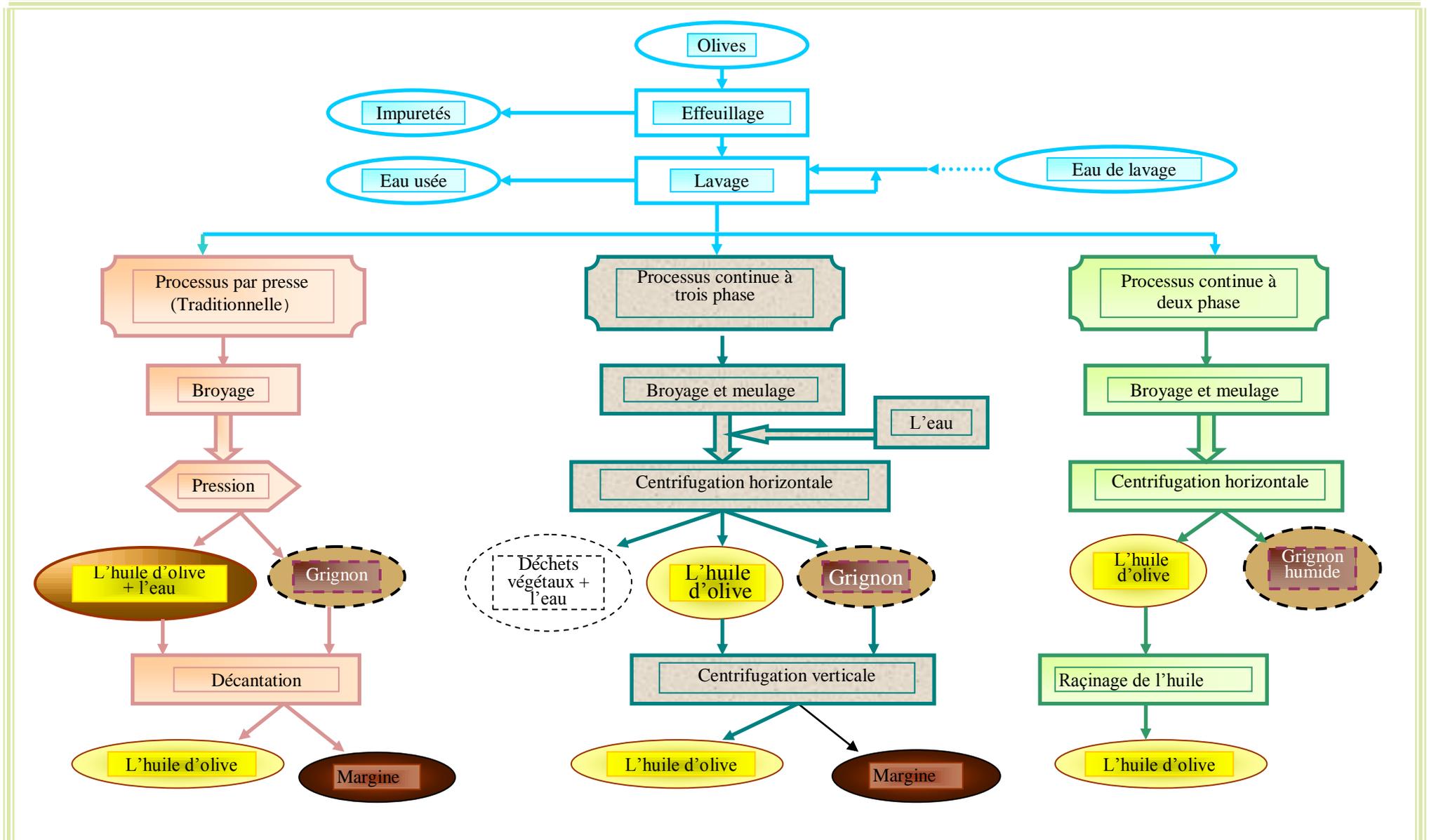


Figure n° 01: processus d'extraction de l'huile d'olive (119)



B. Procédé continu à deux phases ou procédé écologique

Variante du système précédant, ici le décanteur sépare l'huile et mélange le grignon et les eaux de végétation en une unique phase de consistance pâteuse appelée grignon humide ou grignon à deux phases. Ce système permet d'extraire une huile d'olive de bonne qualité sans production d'effluents d'huileries d'olive. Son seul inconvénient est la production de grignons humides. En effet, les grignons résultant de ce procédé contiennent 8 à 10% plus d'eau que ceux du procédé à trois phases. Il est donc indispensable d'équiper les huileries travaillant selon le procédé écologique d'une installation de séchage des grignons. Ce système écologique a été introduit en Espagne en 1992, en 1995 environ 50% des olives destinées à la production d'huile étaient triturées par ce procédé. Actuellement le gouvernement espagnol ne subventionne que les huileries qui installent le procédé écologique. Ce procédé est également utilisé au Portugal, en Italie, en France et en Grèce [79].

I.1.2 Les principaux produits du processus d'extraction de l'huile d'olive :

Le processus de trituration des olives produit principalement l'huile d'olive vierge et l'huile de grignon (huile secondaire extraite par des solvants organiques) et engendre deux résidus l'un liquide, les margines et l'autre solide, les grignons. Les olives contiennent environ 20% d'huile, 30% de grignons et 50% d'eau de végétation [41].

Les margines sont composées de 40 à 50% de l'eau végétal qui provient du fruit (olive) et le reste de l'eau de fabrication ajoutée lors du processus de trituration [129].

I.2 Caractérisation physico-chimique et microbiologique des margines

I.2.1 Caractéristiques physico-chimiques

Les margines présentent une composition plus au moins variable. Elle dépend de la qualité des olives, de leur degré de maturité, du système d'extraction et de la qualité d'eau rajoutée lors de la phase d'extraction de l'huile. Les effluents sont généralement constitués de : 83.2% d'eau, 15% de substances organiques et de 1.8% de substances minérales [52]. Ces effluents se présentent comme un liquide aqueux, de couleur brun-rougeâtre à noir. Ils ont un pH acide (4.2 à 5.9) et une salinité élevée exprimée en conductivité électrique (18 à 50 mS/cm) [35,95] due surtout aux ions potassium, chlorure, calcium et magnésium. Les effluents d'huileries d'olive ont un pouvoir polluant très important avec une demande biologique en oxygène (DBO) de 100 g/L et une demande chimique en oxygène (DCO) de 200 g/L [10]. Ces valeurs sont 200 à 400 fois supérieures à celles des eaux municipales [37]. La matière organique des effluents d'huileries d'olive est constituée par des polysaccharides (13-53%), des protéines (8- 16%), des polyphénols (2-15%), des lipides (1-14%), des polyalcools (3-10%)



et des acides organiques (3-10%) [52]. Cette composition résulte de la dégradation des tissus de l'olive au cours de la trituration et de l'extraction de l'huile [37].

1.2.2 Caractéristiques microbiologiques

Les études microbiologiques effectuées sur plusieurs échantillons de margines ont confirmé l'absence totale de micro-organismes pathogènes. Donc, ces effluents ne posent aucun problème hygiénico-sanitaire [143]. Des analyses microbiologiques ont montré que les levures et les champignons sont capables de s'y développer mieux que les bactéries [3]. Ces micro-organismes supportent la salinité élevée et le pH acide caractéristiques de ces effluents, et résistent plus que les bactéries aux substances phénoliques. Parmi les levures, on trouve *Trichosporium cutaneum*, *Cryptococcus albidus* ainsi que les genres *Rhodotorula sp.*, *Candida sp.* et *Saccharomyces sp.* [142,3]. La flore fongique se compose essentiellement d'*Aspergillus flavius*, *Aspergillus candidus*, *Penicillium negricans*, et *Alternaria sp.* La flore bactérienne regroupe les bactéries qui résistent aux polyphénols particulièrement les bactéries à Gram-négatif. Le genre *Pseudomonas sp.* ainsi que *Bacillus megaterium* ont été décrits. Une étude microbiologique menée par [125] sur les margines Marocaines a noté la présence des levures et des champignons (*Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Geotrichum candidum*). La caractérisation microbiologique des margines de quatre stations d'évaporation en Espagne a révélé la présence d'un nombre variable de bactéries, de levures et de champignons [115].

1.3 Impact des effluents d'huileries d'olive sur l'environnement

Le rejet des margines est un problème majeur dans les pays du bassin méditerranéen. Ces eaux fortement polluées causent de sérieux dégâts environnementaux. L'absence de méthodes de traitements adaptées pousse les propriétaires de moulins à huile à rejeter ces eaux dans la nature sans aucun contrôle ou à surcharger le réseau d'égouts avec des substances toxiques. La concentration et la charge en matières organiques ne peut qu'entraîner un dysfonctionnement des stations d'épuration [44].

1.3.1 Impact sur les eaux

Les margines sont peu dégradables à cause des substances phytotoxiques et antimicrobiennes (phénols, acides gras, etc.) qu'ils contiennent. Souvent rejetés dans des récepteurs naturels sans aucun traitement préalable, les margines nuisent fortement à la qualité des eaux de surfaces. La coloration des eaux naturelles due aux tannins est l'un des effets les plus visibles de la pollution. La très forte charge en DCO et surtout en DBO empêche les eaux de s'auto-épurer et la pollution peut s'étendre sur de très longues distances [110]. Les polyphénols contenus dans les margines, rejetés dans les cours d'eau de faible débit où l'échange de l'air est limité, exercent une action antagoniste sur la flore et la faune aquatique



en causant souvent leur mort. Ces substances peuvent capter facilement l'oxygène dissout, ce qui finit par rendre le milieu totalement anoxique et provoquant ainsi la mort de tous les êtres vivants par asphyxie [143]. L'épandage des margines sur les sols peut également poser des problèmes environnementaux. Les eaux souterraines peuvent être polluées, ce qui affecte la qualité de l'eau potable [55]. Aussi, l'épandage des margines, très riches en éléments azotés, peut causer une pollution par les nitrates des nappes situées dans la zone ou à proximité de la zone d'épandage et souiller la qualité de l'eau potable [15] ; or dans le bassin méditerranéen, les ressources en eau sont rares et leur préservation, tant quantitativement que qualitativement est capitale. Les lipides présents dans les margines peuvent avoir aussi un impact négatif sur les eaux. Ils forment un film impénétrable à la surface des rivières et ses bords empêchant ainsi la pénétration de la lumière et de l'oxygène [128].

1.3.2 Impact sur les sols

L'épandage direct des margines sur les sols provoque un colmatage des sols et une diminution de leur qualité. Ces déchets sont à l'origine de l'augmentation de la salinité des sols [51] et de la diminution du pH, qui pourrait être à l'origine du changement des caractéristiques physico-chimiques. De même, les substances toxiques contenues dans ces margines se fixent dans les sols. Certaines de ces substances telles que les phénols peuvent inhiber l'activité microbienne et détruire la microflore du sol [103].

1.3.3 Impact sur les plantes

Les composés phénoliques sont les responsables majeurs de la phytotoxicité des margines. L'application directe des margines bruts diminue les rendements en matière sèche des tomates et du soja [150] et inhibe la germination de quelques graines comme le pin, la tomate et l'atriplex [39, 126]. Les résidus de pesticides présents dans les effluents d'huileries d'olive peuvent également être nocifs pour les plantes. Par conséquent, l'utilisation agronomique par épandage direct des déchets d'huileries d'olive a de mauvaises répercussions sur les eaux, les sols, les microorganismes et les plantes. D'où la nécessité de traiter ces effluents afin de palier aux problèmes environnementaux qu'ils engendrent. Dans ce sens, plusieurs travaux ont été effectués pour remédier à ce problème [44].

1.4. Traitement et Valorisation des margines

1.4.1. Traitement des margines

Jusqu'à nos jours, le traitement des margines constitue un problème complexe vue la qualité et la quantité des substances chimiques qu'elles renferment. En effet, l'application d'un traitement simple s'avère insuffisant et incomplet [143,71]. Plusieurs systèmes d'épuration des margines sont cités dans la littérature. Les procédés de traitement dont nous



avons pris connaissance sont nombreux, et il serait difficile de les décrire dans cette synthèse bibliographique. Toutefois, les procédés de traitement envisageables pour l'élimination de la charge polluante des margines peuvent être classés selon trois catégories, et peuvent être utilisés seuls ou combinés (fig 02)

1.4.1.1. procédés physiques

Les procédés de traitement physique des margines sont des opérations de séparation de matières minérales et organiques solubles et insolubles de leur phase aqueuse [2].

1.4.1.2. procédés chimiques

Traitement chimique des margines est réalisé afin de réduire l'intensité de leur coloration [31,9]. Il peut être utilisé en tant que prétraitement ou traitement de finition après épuration biologique. Ces techniques sont basées généralement sur les phénomènes de coagulation-floculation ou d'adsorption [2].

1.4.1.3. procédés biologiques

La biodégradation pourrait être définie comme étant la décomposition de la matière par le biais d'un agent biologique en particulier, les micro-organismes. Ces derniers jouent un rôle très important dans le processus de dépollution et permettent la réduction de la toxicité des éléments polluants engendrés par l'activité naturelle ou humaine [143]. La dégradation biologique à l'opposé des procédés physico-chimiques est considérée comme une méthode plus saine, efficace et moins coûteuse pour la réduction des polluants [71].

1.4.1.4 .procédés combinés

Les margines ne peuvent être traitées par un simple procédé biologique, physique ou chimique. Une série de traitements s'avère nécessaire pour réduire la forte concentration en DCO et la toxicité de ces effluents [2]. Le choix du système de traitement approprié est lié à plusieurs facteurs locaux, à savoir le système utilisé pour l'extraction d'huile, la possibilité de stockage et le rapport entre la charge produite par les huileries et la population locale [61].

1.4.2. Valorisation des margines

Les margines sont riches en matière organique, en sels minéraux notamment en potassium, en magnésium et en phosphore. De nombreux travaux ont été réalisés pour la valorisation et l'utilisation de ces effluents, parmi ces applications on peut citer :

1.4.2.1. Production de biogaz

L'application du processus de la digestion anaérobie aux margines permet de transformer environ 80% des substances organiques en biogaz (65 à 70% de méthane). Ainsi, la fermentation méthanique permet la dépollution des margines tout en produisant de l'énergie

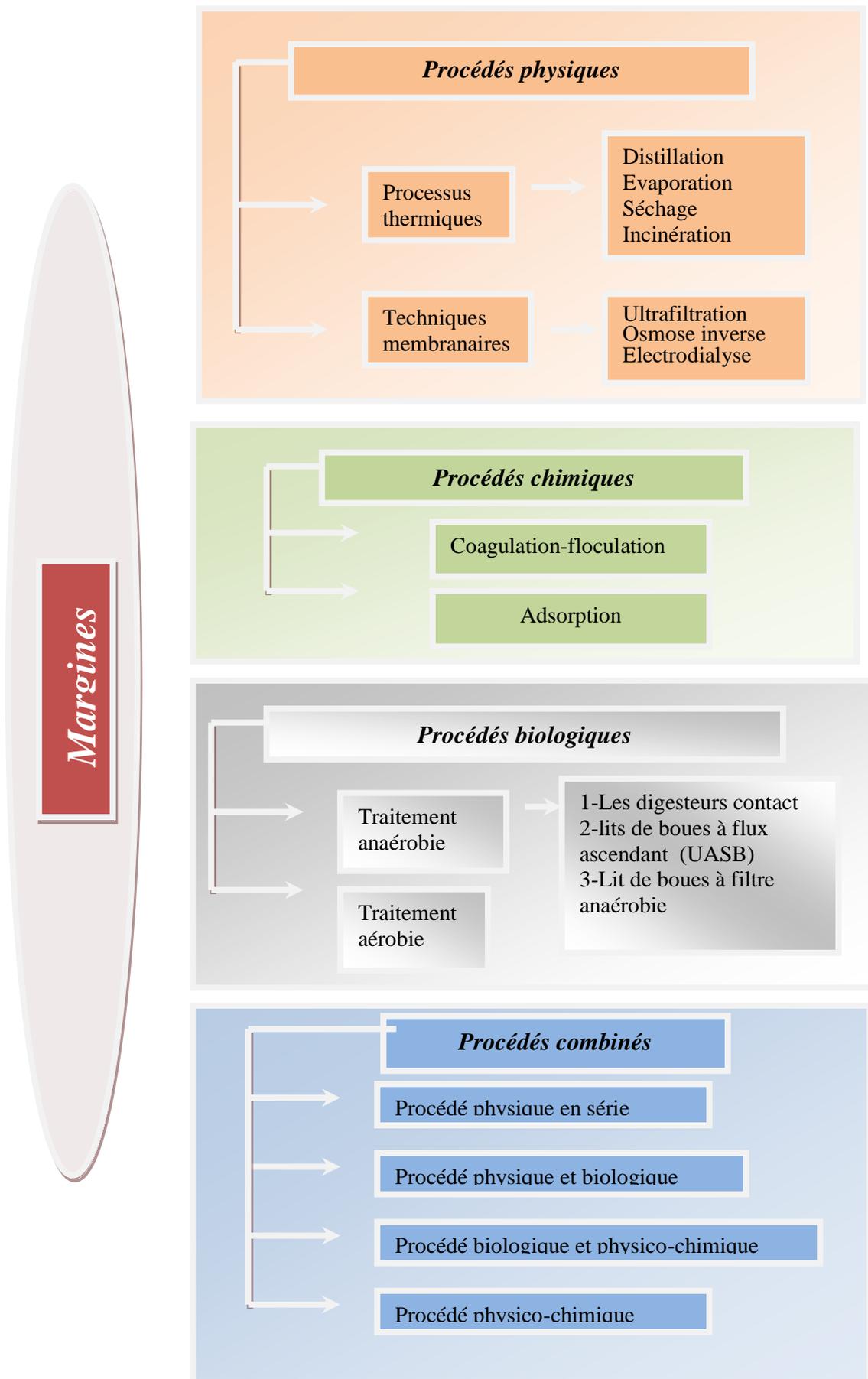


Figure n°2: Les principales voies de traitement des margines



[129,97]. La production de biogaz par digestion anaérobie des margines a été étudiée par [124]. La réduction de la DCO et le taux de biogaz produit ont atteint respectivement 42% et 207 l.kg-1 de matière organique digérée. ERGÜDER (2000) [46] ont montré que le traitement anaérobie d'un litre de margines permet un rendement élevé de l'ordre de 85,4 à 93,4% et une production de 57,1 l ($\pm 1,5$) de gaz méthanique.

I.4.2.2. Compostage des margines

Les margines peuvent être utilisées pour obtenir un compost fertilisant pour les sols [137]. Le compostage des margines a été réalisé traditionnellement en Espagne dans des bassins d'évaporation [51,52]. La technique consiste à ajouter aux margines toutes sortes de résidus secs, agricoles ou forestiers, et le mélange subit une fermentation aérobie anaérobie. Ensuite, un séchage partiel et un conditionnement sous forme de pellette sont effectués. Le produit ainsi obtenu est utilisé comme engrais. L'avantage du compost formé à partir des margines est l'absence des micro-organismes pathogènes avec des concentrations élevée phosphore et en potassium contrairement aux résidus solides urbains [166]. Ont mis en oeuvre un procédé permettant la biotransformation des margines en engrais. Les margines sont mélangées avec la paille de blé, et compostées sous aération forcée.

I.4.2.3. Production des protéines d'organismes unicellulaires (POU)

L'obtention des protéines unicellulaire constitue une des solutions optimales pour la valorisation des effluents d'huileries d'olive. La plupart des procédés appliqués sont basés sur l'utilisation des levures capables de transformer les substances organiques en biomasse à haut contenu en protéines et vitamines de grande valeur pour l'alimentation animale et même humaine [43].

I.4.2.4. Production d'enzymes

Les effluents d'huileries d'olive peuvent être utilisés comme milieu pour la production d'enzymes en utilisant des microorganismes. Cultivées sur les effluents d'huileries d'olive, *Cryptococcus albidus* permet une production de 13 UI/ml de pectinases en 48 heures. Cette production peut être améliorée à 29.6 UI/ml en éliminant les phénols par floculation-clarification [61]. La réutilisation de ces enzymes pectinolytiques dans le processus mécanique d'extraction de l'huile d'olive permet d'augmenter le rendement en huile [140].

I.4.2.5. Epannage

La valorisation des margines par épandage a été largement étudiée par plusieurs auteurs [120,143, 79, 166]. Les margines peuvent être utilisées dans l'irrigation en raison de leur richesse en eau et en minéraux nutritifs [49]. Un mètre cube de margines apporte 3,5 à 11 kg de K₂O; 0,6 à 2 kg de P₂O₅ et 0,15 à 0,5 kg de MgO par hectare de terrain irrigué. Cependant,



cette technique présente certains inconvénients : Problèmes du stockage vu que la période oléicole coïncide avec la période pluviale, Colmatage du sol [143], L'acidité et la salinité élevées peuvent provoquer des brûlures sur les plantes [120], Contamination des eaux souterraines [50,143], Inhibition de la germination due à l'effet phytotoxique exercé par les composés phénoliques sur les plantes [120,143], Modification de la composition de la flore du sol [139], Modification des caractéristiques physico-chimiques du sol [156, 181] et Coût élevé de transfert des margines des huileries vers les terres agricoles. Quoique le potassium et le phosphore contenus dans les margines puissent remplacer ceux des engrais chimiques, l'acidité, la forte salinité et la haute conductivité, ainsi que le contenu en composés phénoliques sont à l'origine d'une limitation de toute utilisation efficace des margines comme fertilisant. Pour résoudre partiellement ce problème, [26] ont développé une méthode automatique pour la détermination et la récupération des anions inorganiques totaux présents dans les margines après 10 minutes. Cette technique repose sur l'utilisation de la dialyse couplée à la chromatographie d'échange ionique sans l'addition de réactifs qui risquent d'infecter les quantités d'anions solubles.

1.4.2.6. Production d'antioxydants naturels

L'huile d'olive est classée parmi les huiles végétales les plus résistantes à l'autoxydation. Cette stabilité oxydative est fortement liée à la teneur en composés phénoliques totaux. Cette résistance à l'oxydation des huiles vierges diminue assez rapidement quand on élimine les polyphénols par extraction au méthanol [118].

Des chercheurs ont proposé d'extraire les composés phénoliques des effluents d'huileries d'olive pour les valoriser en tant qu'antioxydants naturels. Parmi les composés les plus utilisés on peut citer l'acide caféique, le tyrosol et l'acide 4-hydroxybenzoïque. Ces derniers sont des précurseurs très utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique [89].

1.4.2.7. Utilisation en alimentation animale

Les margines ont été utilisées directement comme aliment pour le bétail [45]. Cependant, cette pratique reste à risque, en raison des taux élevés en sodium et en composés phénoliques pouvant engendrer un effet antitrypsique. De même, elles ont été fournies aux volailles à la place de l'eau potable [48]. Cette expérience a montré qu'il y avait un léger abaissement du taux de mortalité de ces animaux.

L'apport des margines déshydratées a provoqué des diarrhées chez les ruminants [149, 148]. Le procédé Dalmolive décrit par [104] semble remédier au problème. Il consiste à mélanger 50 kg de margines avec 20 kg de grignons et 12,6 kg de divers résidus et sous



produits agricoles pour réduire l'effet inhibiteur des composés phénoliques. Ceci produit 29 kg d'aliments en pellettes dont la composition est indiquée dans le tableau 1.

Tableau n°1 : Composition chimique de la pâte des margines obtenue par le procédé Dalmolive [104].

<i>Composant</i>	<i>Valeurs % de la matière sèche totale</i>
Matière azotée totale	21.6
Matière grasse	4.0
Cellulose brute	13.1
Matière minérale	8.9
Extrait non azotée	52.5
Matière azotée digestible	17.2

II. LA METHANOGENESE RUMINALE

II.1. Le méthane et l'effet de serre

II.1.1.les principaux gaz à effet de serre

L'effet de serre est un phénomène naturel lié à l'absorption par des composés présents dans l'atmosphère : CO₂, CH₄, H₂O, O₃, N₂O, CFC, des rayonnements Infra Rouge (IR) de grande longueur d'onde renvoyés, par la surface terrestre. Une partie du rayonnement IR n'est donc pas renvoyé vers l'espace. Il y a alors absorption d'énergie transformée en chaleur. En réalité la présence des gaz à effet de serre est essentielle pour maintenir la vie sur terre. En effet, sans ces gaz, notre planète aurait une température moyenne de -18°C au lieu de 15°C, puisque toute la chaleur provenant du soleil aurait été reflétée dans l'espace par la surface terrestre [123]. Les principaux gaz à effet de serre (GES) sont :

✚ **La vapeur d'eau (H₂O)** : est la plus répandue des gaz à effet de serre et en plus celui qui a l'effet le plus important.

✚ **Le dioxyde de carbone (CO₂)** : est le gaz le plus impliqué dans le phénomène du réchauffement de la terre. Ce dernier provient de plusieurs sources : la respiration des animaux et des végétaux, l'utilisation des combustibles fossiles (charbon, pétrole...) et la combustion ou la décomposition des plantes et des arbres. C'est le principal gaz à effet de serre influencé par l'activité humaine.

✚ **Le méthane (CH₄)** : est le plus puissant des gaz à effet de serre, il se forme quand un composé organique animal ou végétal se décompose en absence d'oxygène par l'action d'archaebactéries. Une grande quantité de méthane présente dans l'atmosphère est d'origine naturelle et provient surtout des zones humides (marécages, marais,...). Mais d'importantes quantités de méthane proviennent aussi des décharges publiques, des rizières et du bétail.



✚ *L'Oxyde nitreux (NO_2)* : provient principalement de la combustion incomplète des sols agricoles dégradés. La part "humaine" intervient dans le domaine de l'agriculture par l'utilisation des engrais azotés.

✚ *Le Monoxyde de carbone (CO)* : est un gaz qui agit indirectement sur l'effet de serre. Il influence certains cycles chimiques atmosphériques qui créent ou détruisent d'autres gaz à effet de serre, tels que l'ozone de la troposphère ou le méthane. Ce gaz est produit par les carburants et les combustibles.

✚ *L'Oxyde d'azote (NO_x), l'anhydride sulfureux (SO_2), l'ozone (O_3) et les chlorofluorocarbones (CFC-11 et CFC-12)* sont des gaz, produits par l'industrie abiotique, comme l'utilisation de combustibles fossiles, l'industrie chimique et certains appareils ménagers [25].

II.1.2 Les différentes sources de méthane

Les émissions de méthane ont plusieurs sources naturelles et anthropogéniques (tableau 2). L'augmentation de la concentration du méthane dans l'atmosphère est principalement liée à celle des populations, puisque seulement 30% des émissions sont d'origines naturelles. Tandis que le reste, c'est-à-dire les 70%, proviennent de sources anthropogènes [122]. Les niveaux des émissions de méthane provenant d'une source peuvent varier considérablement d'un pays ou une région à l'autre, selon de nombreux facteurs tels que les caractéristiques de production climatiques, industriels et agricoles.

I.1.2.1 le méthane d'origine naturelle

Le méthane est le principal constituant du gaz naturel, et plus précisément, du gaz biogénique. Ce dernier est issu de la fermentation par des bactéries de sédiments organiques. Les gisements biogéniques sont le plus souvent petits et situés à de faibles profondeurs. Ils représentent à eux seuls 20% des réserves de gaz sur notre planète. Le méthane est ainsi le seul hydrocarbure classique qui peut être obtenu grâce à un processus biologique naturel.

Les bactéries productrices de méthane sont qualifiées de méthanogènes. Elles se développent dans les milieux anaérobies, c'est-à-dire dépourvus de dioxygène. En effet, ce gaz peut leur être fatal, même à l'état de trace. Ces conditions strictes sont respectées dans les sédiments des eaux douces et des eaux marines, dans les rizières, dans les sources d'eau chaude d'origine volcanique, dans le tube digestif des animaux, etc.... Aujourd'hui, plus de 50% du méthane issu de ces bactéries provient des ruminants et des termites des régions tropicales [81].



Tableau n° 02 : Sources et puits du méthane atmosphérique [183]

Sources de méthane	Estimation Tg (CH4).an-1	Incertitude
<u>Naturelles</u>		
Zones inondées naturelles	110	100-200
Tropical	66	
Tempéré	5,4	
Boréal	38	
Termites	23	10-50
Océans	10	05-20
Eaux naturelles	5	01-25
Hydrates de gaz	5	0-25
Total naturelles	150	
<u>Anthropiques</u>		
Mines de charbon, gaz naturel et industrie pétrolière	100	70-120
Rizières	60	20-150
Animaux domestiques	80	65-100
Excréments d'animaux	25	10-20
Traitement des déchets	25	20-75
Décharges d'ordures	30	20-72
Combustion de la biomasse	20	20-80
Total anthropiques	340	
Total naturelles + anthropique	490	400-610
<u>Puits de méthane</u>		
Réactions CH4 + OH	440	390-490
Dépôt au sol	30	5-55
Oxydation dans la stratosphère	10	5-15
Augmentation annuelle	40	30-50
Total	520	430-610

1.1.2.2 le méthane d'origine anthropique

Les sources anthropiques de méthane proviennent principalement des activités agricoles telles que l'élevage de bétail et la culture du riz. La décomposition de la matière organique au niveau des décharges produit également du méthane. Ces sources anthropiques représentent environ les 2/3 des émissions totales de ce gaz [122]. Ces sources sont assez bien connues et leur production semble dépassée le potentiel d'utilisation, ce qui provoque l'accumulation du CH4 dans l'atmosphère comme l'illustre.

La participation du bétail aux émissions anthropogéniques varie localement selon l'importance du cheptel. Mondialement, la quantité de méthane émise par le bétail a été diversement estimée. Par exemple et en million de tonnes (MT) :85-130 MT, 77MT [107],



60MT [165], 75, 120MT [158]. Compte tenu du fait que le bétail mondial ne décroît pas, il est raisonnable d'estimer qu'à l'heure actuelle une bonne centaine de million de tonnes de CH₄ sont fournies chaque année par les animaux d'élevage. Le total des émissions anthropogéniques, quant à lui, a été estimé à 340MT [38], 375MT [122] et 371MT [159]. Ces chiffres montrent que les animaux d'élevage participeraient de 26 à 29% aux émissions anthropogéniques [25]

II.2. La production de méthane digestif par les ruminants

La dégradation anaérobie est la voie microbienne qui, en absence d'oxygène moléculaire, minéralise la matière organique en produisant un biogaz carboné. Ce mécanisme nécessite des conditions physico-chimiques « annexe 1 » adéquates pour que les groupes microbiens successifs impliqués soient actifs.

II.2.1. L'écosystème ruminale

I.2.1.1. Les paramètres physico-chimiques du rumen

A. La Température : Se situe entre 39 et 40°C, cependant elle peut atteindre la valeur de 41°C lors d'activité fermentaire intense [33]. Le métabolisme ruminal intense se traduit par une production de chaleur qui permet aux animaux ruminants de résister efficacement aux basses températures [151].

B. Le pH : Le rumen se caractérise par un important pouvoir tampon (pH = 6 à 7), qui est le résultat de l'association de trois facteurs :

- L'apport de minéraux (bicarbonates et phosphates) de la salive.
- L'absorption des produits terminaux de la fermentation à travers l'épithélium du rumen, et leur évacuation avec le flux sortant du rumen.
- Le propre pouvoir tampon des aliments ingérés [33,60, 83,90].

Les fluctuations du pH sont donc limitées, mais des valeurs inférieures à 6 peuvent apparaître lors de l'ingestion d'aliments riches en glucides solubles et en amidon altérant ainsi la digestion des fibres [133,134,135].

C. Le Potentiel d'oxido-reduction : Le rumen se caractérise par une absence d'oxygène, et un potentiel redox très bas, inférieur à -350 mv [60,83].

D. La Pression osmotique : La pression osmotique du rumen est voisine de celle du sang, et à chaque fois qu'une variation survient, suite à l'hydratation ou à l'ingestion d'aliments, l'équilibre est rétabli grâce à la perméabilité de la paroi ruminale à l'eau qui stabilise la teneur en eau du jus ruminale à 85-90% [33,83].

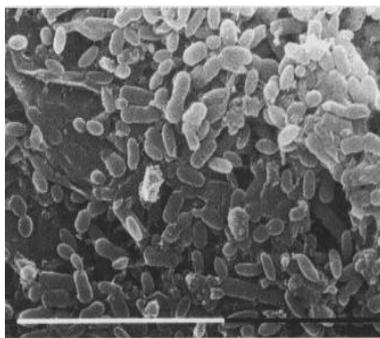


E. la Phase gazeuse : Le mélange de gaz est fait principalement de 65% de CO₂ et de 35% de méthane (CH₄). D'autres gaz comme l'hydrogène (H₂), le sulfure d'hydrogène (H₂S) et l'oxygène (O₂) sont présents mais en quantités négligeables [83].

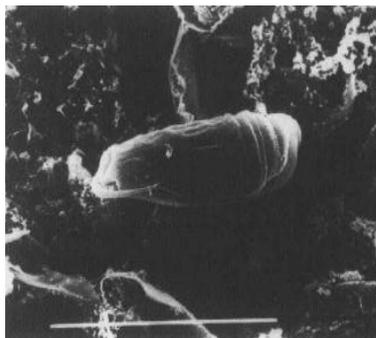
Toutes ces caractéristiques de l'environnement ruminal sont propices au développement d'une population microbienne diversifiée constituée de bactéries, de champignons et de protozoaires, tous anaérobies.

II.2.1.2. La microbiote ruminale

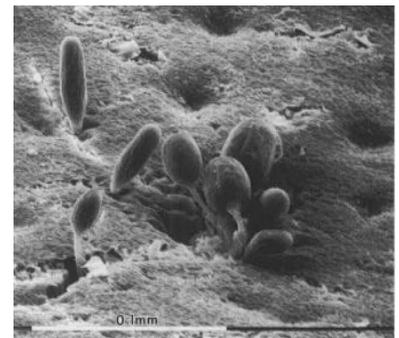
Dans le rumen se développent trois principaux groupes microbiens spécifiques et anaérobies bactéries, protozoaires et champignons.



Bactéries fixées sur la muqueuse du rumen (barre = 0,01 mm) (cliché E. Grenet / B. Martinie).



Protozoaire entodiniomorphe (*Epidinium caudatum*), sur une tige de maïs (barre = 0,1 mm) (cliché E. Grenet / B. Martinie).



Champignons fixés sur des pellicules de soja (barre = 0,1 mm) (cliché E. Grenet / B. Martinie).

Figure n°3: Les microbes du rumen (83)

A. Les bactéries :

La population bactérienne est de loin la plus complexe (plus de 200 espèces), la plus dense (de l'ordre de 10 milliards de bactéries par millilitre du contenu du rumen), elles représentent la moitié de la biomasse microbienne [80, 60]. La majorité est constituée d'anaérobies stricts, mais il existe également des anaérobies facultatifs qui représentent 107-108 cellules/g du contenu du rumen. La taille des bactéries du rumen est généralement de 0.5 _ 10 μ m. Les bactéries Gram- sont les prédominantes, les Gram+ sont ainsi présentes, et jouent des rôles très importants [86].

Les bactéries ruminales ont été classifiées en quatre groupes, en fonction de leur localisation dans le rumen [56] : Les bactéries vivant libres, associées à la phase liquide ruminale, les bactéries associées avec les particules alimentaires, les bactéries associées à l'épithélium ruminal et les bactéries attachées à la surface des protozoaires

En plus, les bactéries ont été classées selon leur aptitude à dégrader et à fermenter les substrats en : Les bactéries cellulolytiques, les bactéries pectinolytiques, les bactéries amylolytiques, les bactéries utilisatrices de glucides simples, les bactéries utilisatrices



d'acides, les bactéries protéolytiques, les bactéries lipolytiques, les bactéries uréolytiques, les bactéries de grande taille et les bactéries méthanogènes (Archaea).

■ **Les Archaea (bactéries méthanogènes) :** la méthanogénèse biologique est le résultat de l'activité de microorganismes anaérobies stricts, les Méthanogènes qui appartiennent tous au groupe des *Archaea* [177] et qui peuvent être différenciés d'autres microorganismes par le fait qu'elles produisent le CH₄ comme produit catabolique majeur [16]. Ce groupe se distingue des autres bactéries par une génétique très différente. Les méthanogènes du rumen se développent uniquement dans un environnement dont le potentiel redox est inférieur à -300mv [160]. L'équipement enzymatique des archaebactéries méthanogènes est sensible à l'oxygène même à l'état de traces. Des conditions d'anaérobiose stricte sont donc nécessaires pour l'expression de leur métabolisme. Il existe deux groupes de méthanogènes :

- ▶ méthanogènes acétoclastes convertissant l'acétate en dioxyde de carbone et méthane.
- ▶ méthanogènes hydrogénophiles ayant comme substrats uniques le dioxyde de carbone et le dihydrogène pour former du méthane et de l'eau.

Plusieurs espèces méthanogènes ont été isolées chez les ruminants mais quelques unes seulement ont été trouvées en nombre élevé [161]. Il est probablement admis que la majorité des espèces méthanogènes du rumen ne sont pas encore identifiées [144]. Les espèces méthanogènes les plus communes, isolées à partir du rumen, appartiennent aux genres :

Methanobrevibacter, *Methanomicrobium*, *Methanobacterium* et *Methanosarcinia*. Le statut taxonomique des méthanogènes isolées du rumen n'a pas été établi de manière adéquate et nécessite une analyse à l'échelle moléculaire pour plus de clarification [116]. Les méthanogènes sont fréquemment retrouvés en association avec les protozoaires [54, 96, 167, 168, 91, 162]. Des études récentes utilisant l'ARNr 16s de différentes familles de méthanogènes ont montré que certaines vivent à l'état libre dans le fluide ruminal [153].

B. Les protozoaires :

Ce sont des organismes eucaryotes unicellulaires mobiles. On distingue :

■ **Les protozoaires ciliés :** Ce sont les protozoaires les plus importants par leur nombre et leur influence sur la digestion, leur concentration est de 10⁴ à 10⁶/ml. Ils sont présents à l'état libre ou sont fixés aux particules végétales. Ils sont 20 à 100 fois plus grands en taille que les bactéries. On distingue les holotriches et les entodiniomorphes, ces derniers ont une grande capacité à ingérer des particules solides de petite taille (grains d'amidon et fibres cellulosiques), ils ingèrent aussi continuellement des bactéries [60].



■ **Les protozoaires flagellés** : leur concentration est plus faible (10^3 à 10^4 /ml), ce sont des organismes pouvant aussi ingérer des bactéries [57,133]. Bien que les protozoaires produisent des enzymes qui participent directement à la digestion, leur présence n'est pas indispensable à la vie des ruminants [60]. Leur culture sur milieu synthétique est particulièrement difficile du fait de leurs exigences nutritionnelles et de leur sensibilité aux changements physico-chimiques du milieu.

La fonction cellulolytique a été observée chez plusieurs espèces de protozoaires ciliés. Cependant la production de cellulases par des bactéries intracellulaires n'est pas à exclure. Les activités hémicellulolytique et pectinolytique sont observées chez une dizaine d'espèces [57]. 10% de l'activité protéolytique et 30 à 40% de la fonction lipolytique sont assurées par les protozoaires ciliés [60, 133]. La plupart des protozoaires utilisent l'amidon qu'ils stockent sous forme de polymères insolubles : amylopectines (qui représentent le 1/3 des glucides solubles ingérés) [178, 19,33]. La transmission des protozoaires ciliés d'un animal à un autre se fait par la salive, néanmoins leur développement nécessite l'établissement préalable de la microflore bactérienne et fongique [60].

C. Les champignons :

Les champignons apparaissent à 8 jours, avant que l'animal n'ingère d'aliments solides. Ils représentent 8% de la biomasse microbienne totale du rumen. Les principaux genres sont : *Neocallimastix* et *Piromyces* [60].

Les champignons sont généralement localisés sur les tissus à parois épaisses et/ou lignifiées [66,67]. Ils sont dotés d'une activité cellulolytique, hémicellulolytique et protéolytique mais ils ne dégradent pas les pectines et la lignine [19].

II.2.1.3. Les interactions microbiennes dans le rumen

Les interactions mutuelles entre les différentes espèces de microorganismes sont hautement complexes, on y trouve tous les genres de la vie communautaire :

A. Les interactions entre espèces bactériennes

■ **Nutrition croisée ou complémentarité nutritionnelle** : Un exemple est illustré par la dépendance des bactéries cellulolytiques ruminales vis-à-vis d'espèces bactériennes protéolytiques. La satisfaction des besoins des bactéries cellulolytiques en ammoniacal qu'elles utilisent comme source préférentiel d'azote, et en acides gras à chaîne courte dépend de l'activité des espèces protéolytiques et uéolytiques; en retour les bactéries cellulolytiques fournissent aux protéolytiques les oses fermentescibles nécessaires à leur croissance [57].



■ **Production d'acide propionique :** De nombreuses espèces produisent du succinate ou du lactate alors que ces deux acides ne sont, dans les conditions normales d'alimentation, présent qu'à l'état de traces voire absent dans le rumen. Dans l'écosystème ruminal, ces deux métabolites sont, en effet, utilisés comme source de carbone et d'énergie par des espèces bactériennes spécifiques qui les transforment en acide propionique en raison du rôle de ce dernier dans la néoglucogenèse [59, 60]

■ **Transfert inter espèces d'hydrogène :** Le mécanisme de transfert d'H₂ et ses conséquences est bien illustré par l'interaction entre *R. albus* et les *Archea* méthanogènes. En l'absence d'utilisateurs d'H₂, le métabolisme de bactérie cellulolytique est dévié vers la production de composés réduits (lactate, éthanol, succinate, butyrate). En présence d'utilisateurs d'H₂, le métabolisme est dévié vers la production d'acétate. Les deux partenaires profitent de cette interaction puisque *R. albus* gagne une molécule d'ATP par mole d'hexose fermentée au cours de la méthanogénèse [178]. Dans le rumen, un transfert interspécies d'hydrogène existe également entre cilié et *Archea* où les méthanogènes vivent fixées sur les cellules de protozoaires [91].

■ **Compétition entre espèces cellulolytiques :** Les principales espèces cellulolytiques du rumen requiert, pour être efficace, un contact physique avec le substrat. Par ailleurs, des phénomènes de compétition pour les sites d'adhésion à la cellulose ont été décrit *in vitro* entre *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* ou *Fibrobacter succinogenes*. Ces espèces pourraient interagir entre elles, probablement via la production de bactériocines, en particulier lorsqu'elles se trouvent en conditions nutritionnelles limitantes [56].

B. Les interactions bactéries-protozoaires (interaction de type prédateurproie)

Les protozoaires sont capables d'ingérer des bactéries à des taux pouvant atteindre 105 cellules bactériennes par protozoaires / heure. Il semble que les protozoaires soient capables de trier sélectivement les espèces qu'ils vont ingérer ; les bactéries qui sont digérées dans les vacuoles cytoplasmiques, constituent pour ceux-ci la principale source d'azote [91].

La prédation à l'encontre des bactéries contribue au recyclage d'azote et de carbone dans l'écosystème ruminal. Ce phénomène contribue également à la régulation des populations bactériennes [59].

C. Les interactions bactéries-champignons

Les champignons anaérobies du rumen sont fortement producteurs d'hydrogène et vont interagir avec les bactéries hydrogénotrophes. Le lactate produit par tout les espèces de champignons n'est plus retrouvé dans leurs co-culture avec une souche se *Selenomonas*



ruminantium [27, 56]. Les champignons du rumen interagissent également avec les bactéries cellulolytiques. Les cocultures de *N. frontalis* avec *R. albus* ou *R. flavefaciens* sont moins efficaces dans la dégradation de la cellulose que la monoculture fongique. [18,17].

D. Les interactions protozoaires-champignons

Des études récentes montrent que la taille des populations fongiques est affectée par les activités des protozoaires. Des protozoaires sont souvent observés sur le matériel végétal au niveau des sites de fixation des sporocystes matures des champignons, ce qui laisse supposer qu'ils peuvent se nourrir de zoospores lorsque celles-ci sont libérées. Bien qu'il n'existe pas de preuve directe de la prédation des zoospores fongiques par les protozoaires, il a été montré que le nombre de zoospores dans le rumen est augmenté chez les animaux défaunés [58].

II.2.2. La dégradation anaérobie de la matière organique

Le métabolisme anaérobie est mis en évidence par la production de composés gazeux le méthane (CH₄) et de dioxyde de carbone (CO₂). Le processus de biodégradation anaérobie de la matière organique se déroule en quatre étapes biochimiques réalisées par trois groupes bactériens formant une chaîne trophique (fig).

II.2.2.1. Hydrolyse :

Cette première étape est réductrice et il s'agit plus généralement d'une dépolymérisation [136]. Les exo-enzymes les plus rencontrées sont des hydrolases. Les liaisons covalentes susceptibles d'être clivées sont des liaisons de type esters, osidiques et peptidiques appartenant respectivement aux lipides, glucides et protéines. L'hydrolyse des polysaccharides libère des oses. L'hydrolyse des protéines conduit à la formation de peptides, d'acides aminés, de dioxyde de carbone, d'azote ammoniacal et de composés sulfurés. L'hydrolyse des lipides conduit essentiellement à la formation d'acides gras volatils et d'acides gras à longues chaînes (LCFA). Ainsi, tous les substrats organiques peuvent subir une hydrolyse. Les produits solubles issus des dépolymérisations s'ajoutent à la fraction déjà soluble de la matière organique. Cette mise en solution et la taille des particules autorisent leurs transports à travers les membranes microbiennes pour servir de substrat métabolique initial.

II.2.2.2. Acidogenèse :

Les produits d'hydrolyse sont métabolisés pour libérer les acides gras volatils (acides acétique, propionique, butyrique, valérique, caproïque, ...), des alcools et de l'hydrogène (H₂). Les micro-organismes rencontrés sont généralement de mêmes genres que ceux de la phase d'hydrolyse. C'est pourquoi ces deux phases sont généralement considérées comme une seule [122].



II.2.2.3. Acétogenèse :

Au cours de cette étape, l'oxydation des substrats (surtout les acides propionique et butyrique et l'éthanol) est couplée à la formation d'hydrogène et d'acétate. Lorsque la pression partielle en hydrogène s'élève, cette oxydation est thermodynamiquement impossible (réaction endergonique). Par conséquent, la croissance de la flore acétogène et l'utilisation du substrat dépendent strictement de l'élimination de l'hydrogène du milieu par les microorganismes méthaniques. Cette association syntrophique avec des bactéries méthanogènes hydrogénéophiles permet de rendre les réactions endergoniques possibles [122].

II.2.2.4. Méthanogenèse :

La méthanogenèse implique la consommation d'hydrogène et la réduction par paliers du dioxyde de carbone [58]. Un certain nombre de substrats peut être utilisé pour la méthanogenèse (acétate, formate, alcools de petite taille issus de la dégradation des pectines, ...), mais le dioxyde de carbone et l'hydrogène sont néanmoins les principaux substrats impliqués. Ainsi, la majorité du dihydrogène provenant de la dégradation des glucides termine en méthane.

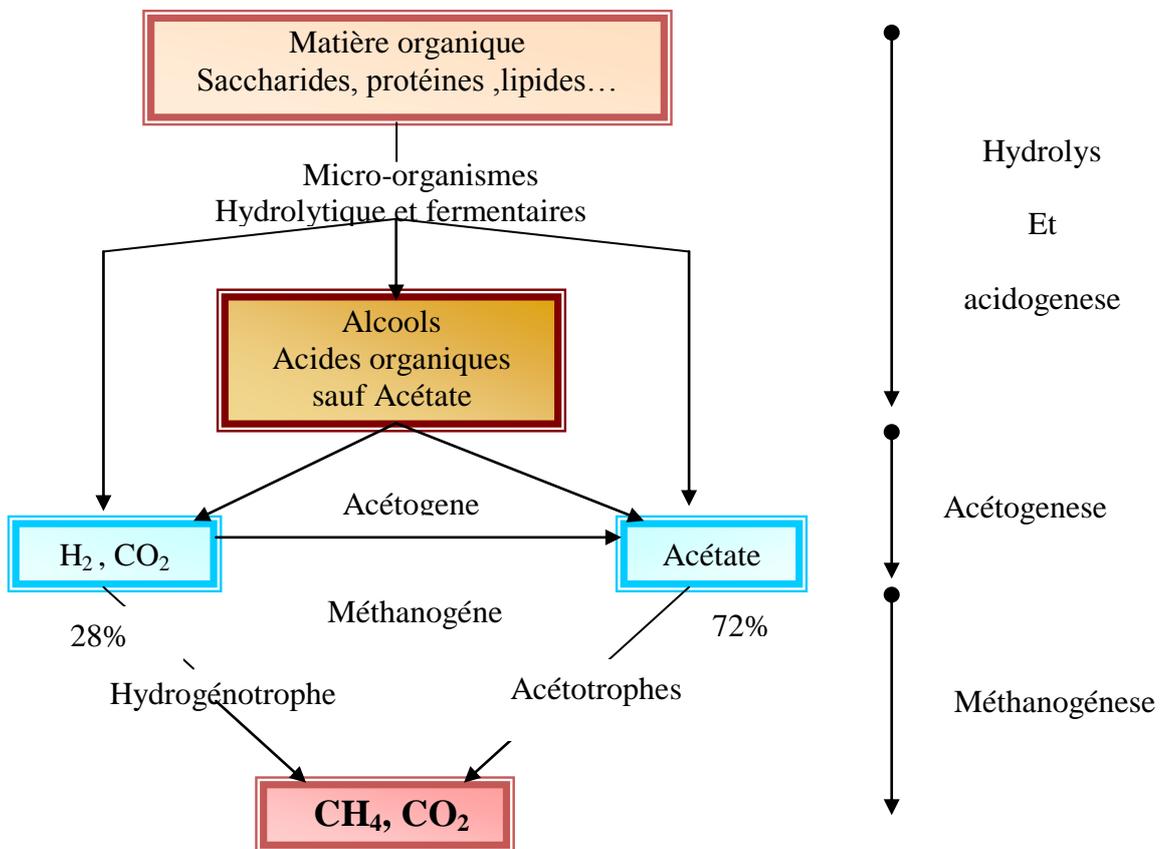


Figure n°4. Voies de dégradation anaérobie de la matière organique, [154]



II.3. Facteurs influençant la méthanogénèse ruminale

De nombreux facteurs influencent le profil fermentaire et donc la méthanogénèse dans le rumen, parmi ces facteurs citons :

II.3.1. L'animal

Il a été montré que la méthanogénèse présentait des variations significatives, lorsque le contenu du rumen est prélevé avant le repas, sur plusieurs moutons alimentés avec une même ration à base de foin. Ces profils différents sont sans doute liés à des populations microbiennes ruminales différentes, dont la nature pourrait être déterminée par la cinétique de salivation et donc de vidange du rumen. Le pH et l'activité des protozoaires sont également deux paramètres non seulement déterminés par la nature et le niveau de l'alimentation mais aussi par le contrôle, via l'animal, de la cinétique et du volume du contenu du rumen. De même TEACHER et *al.* 1984 [164] ont montré que la population de protozoaires peut varier énormément entre animaux nourris avec la même ration. La présence de protozoaires est associée à des taux de méthanogénèse importants et un renouvellement élevé des protéines microbiennes dans le rumen mais ils assurent aussi une limitation des productions d'AGV et donc de chute du pH, en raison du stockage temporaire de glucides solubles et d'amidon [127]

II.3.2. Effet des caractéristiques du régime alimentaire

II.3.2.1. Matière organique digestible

L'émission de méthane est étroitement liée à la quantité de la matière organique ruminale fermentée ou à la quantité de la matière organique digestible, puisque plus de 50% de la digestion se déroule dans le rumen. Quand la digestibilité de l'énergie augmente de 10%, les pertes d'énergie sous forme de méthane augmentent de 0,47 points dans le cas d'un régime à base d'aliment grossier et de 0,74 points dans le cas d'un régime mixte [21].

II.3.2.2. Le temps de séjour dans le rumen et le taux d'ingestion

Une réduction de la production du méthane est envisagée quand le temps de séjour de l'aliment dans le rumen est réduit, puisque la digestion ruminale décroît et les archaebactéries méthanogènes sont moins compétitives dans de telles conditions. De plus, une vitesse de passage rapide favorise la production du propionate et l'utilisation convenable de l'hydrogène

II.3.2.3. Source de carbone et voie de la fermentation

Puisque les proportions des AGV sont influencées par la composition de la matière organique du régime alimentaire, principalement par la nature et la vitesse de fermentation des carbohydrates, toutes ces caractéristiques alimentaires auront de larges effets sur la



production de méthane. Un régime riche en amidon, qui favorise donc la production du propionate, diminuera le ratio méthane/MOF dans le rumen. L'effet d'un tel régime sur le pH ruminal peut aussi expliquer l'effet observé sur l'émission de méthane. Au contraire, un régime à base d'aliment grossier entraîne une augmentation de ce ratio (méthane /MOF).

D'autres caractéristiques du régime alimentaire peuvent aussi influencer la production de méthane elle s'accroît quand des fourrages secs et matures sont utilisés comme aliment ou quand ces fourrages sont hachés de manière grossière plutôt que d'être finement moulus . Elle décroît quand ces fourrages sont préservés en silots [121]. Il a été montré que les traitements alcalins utilisés pour stimuler la dégradation des constituants de la paroi cellulaire, entraînent une augmentation de la perte d'énergie sous forme de méthane.

II.4. Comment réduire la méthanogenèse chez les ruminants

Diverses voies sont explorées dans le but de réduire la production de méthane : additifs (de type antibiotique, chimique ou naturel) qui inhibent les micro-organismes méthanogènes et/ou modifient les orientations métaboliques du rumen ; manipulations biotechnologiques (sélection des micro-organismes du rumen ou vaccination contre les micro-organismes méthanogènes) [105].

Tableau n° 3 - Traitements possibles pour diminuer la méthanogenèse ruminale [182]

<i>Traitement</i>	<i>Microbes ciblés (mode d'action)</i>	<i>Effecacité (facteurs limitans)</i>
<i>Additifs d'origine chimique</i>		
Antibiotiques ionophores (interdits en Europe depuis le 01/06)	Bactéries Gram ⁺ et archaea	Transitoire
Analogues halogénés de ch ₄	Archaea	Transitoire ; toxicité
Extraits de plants,huiles essentielles	Bactéries , protozoaires, archaea	A démontrer in vivo
Acides aminés soufrés ou thiopeptide	Accepteurs d'électron	A démontrer in vivo ; coût
Sulfates, nitrates, fumarate.	Accepteurs d'électron	Aléatoire ;coût
Acides gras	Archaea et accepteurs d'électron	Efficacité démontré
<i>Probiotiques</i>		
Levures ou bactéries vivantes	Acétogènes	A démontrer in vivo
Bactéries oxydatives	Oxydation de ch ₄ en co ₂	A démontrer in vivo
<i>Procédés biotechnologiques</i>		
Défaunation du rumen	Protozoaires	Transitoire
Bactériocines	Bactéries Gram ⁺ et archaea	A démontrer in vivo
Sélection d'animaux ch ₄	?	Permanence de l'effet à démontrer



De nombreux essais sont actuellement conduits dans le monde sur les extraits des métabolites secondaires des plantes, utilisés comme moyen de manipuler la fonction digestive des ruminants. Certaines plantes ou extraits de plantes peuvent en effet modifier l'orientation des fermentations ruminales par leurs propriétés bactéricides et avoir des effets voisins de ceux obtenus avec les antibiotiques. Contrairement aux antibiotiques et aux additifs chimiques, ce type de produit bénéficie d'une bonne image en raison d'une origine naturelle. Les études sur les extraits végétaux ont été réalisées essentiellement *in vitro*. [105]

III. LES COMPOSÉES PHENOLIQUES

III.1. Généralités sur les composées phénoliques

III.1.1. Définition

Les composées phénoliques sont des molécules aromatiques synthétisées par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales ; c'est pourquoi 80% des composés phénoliques sont essentiellement localisés dans les tissus épidermiques de la plante. Ce sont des phytoconstituants, généralement des pigments, responsables des tintes, automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruits (jaune, orange, rouge...). Ils sont associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation... [170].

Ils constituent un groupe de substances variées et ubiquistes. En font partie les flavonoïdes, les tanins les dérivés phénylpropanoïdes tels que les lignanes, les esters et amides hydroxybenzoïques, les stilbènes, les coumarines, les acides hydroxybenzoïques, les xanthones et de nouveaux composés sont identifiés continuellement [98,78,62]. Bien qu'étant très diversifiés, ils ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Ils sont divisés en plusieurs catégories « tableau »:

- ✗ les acides phénoliques
- ✗ les flavonoïdes
- ✗ les tanins obtenus par polymérisation des flavonoïdes
- ✗ les lignanes avec les isoflavones sont nommés phyto-oestrogènes [155].
- ✗ Les anthocyanes : donnent des couleurs très variées : bleu, rouge, mauve, rose ou rouge [176].



III.1.2. Les rôles des composées phénoliques

Comme toutes les composées secondaires, les phénols sont impliqués étroitement dans les rôles défensifs de la plante :

☒ Dissuader les prédateurs :

a- par les odeurs repoussant les herbivores, ex : les polyphénols des pélagoniums.

b- les plantes toxiques “ éduquent ” les herbivores à les éviter pour ne pas être broutées.

☒ Attirer les pollinisateurs : les couleurs, mais aussi les odeurs attirent les insectes. Exemple : certaines orchidées synthétisent des phéromones sexuelles qui sont des substances volatiles émises par les insectes femelles pour attirer les mâles.

☒ Décourager la compétition vis-à-vis d’autres espèces. On parle d’allélopathie : certaines plantes émettent des substances pour inhiber la croissance des autres plantes.

☒ Ces composés jouent aussi un rôle important dans la qualité alimentaire des fruits et déterminent aussi leurs saveurs (les tannins sont à l’origine de la sensation d’astringence des fruits non mûrs, les flavones sont responsables de l’amertume des *Ci trus* et peuvent donner naissance, par transformation chimique à des dihydrochalcones à saveur sucrée [42].

Tableau 4: Les principales classes de composées phénoliques [74, 99]

Squelette carboné	Classe	Exemple	origine
C6	Phénols simples	Catéchol	
C6 - C1	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C6 - C3	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acides caféique, férulique Scopolétine, esculéatine	Citrus Citrus
C6 – C4	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C6 –C2 – C6	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C6 –C3 – C6	Flavonoïdes □ □ Flavonols □ □ Anthocyanes □ □ Flavanols □ □ Flavanones Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélagonidine Catéchine, épicatechine Naringénine Déidzéine	Fruits, légumes, fleurs Fleure, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
(C6 – C3)2	Lingnanes	Pinorésinol	Pin
(C6 – C3) n	Lignines		Bois, noyau des fruits
(C15) n	Tannins		Raisin rouge, Kaki



III.2. Les composés phénoliques des margines

Les composés phénoliques des margines sont très divers et leur structure est très variable. Ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction. Leur solubilisation dans l'huile est cependant bien inférieure à celle dans les eaux de végétation, ce qui explique leur concentration élevée détectée dans les margines [143].

III.2.1. Monomères aromatiques

Plusieurs acides phénoliques ont été identifiés:

- Acide caféique (trans), acide caféique (cis), acide p-coumarique, acide protocatéchuique, acide vanillique [172].
- Acide 4-hydroxyphénylacétique, acide protocatéchuique, acide syringique et acide p-hydroxybenzoïque
- Acide p-hydroxyphénylacétique, acide vétratrique, acide vanillique, acide 3,4,5
- Triméthoxybenzoïque, acide syringique et acide caféique [11].

Les alcools phénoliques ont été aussi cités: Le 4-hydroxyphényl alcool, 3,4-dihydroxyphényl éthanol [172]. Ces alcools sont parfois associés à des glucosides comme le 4-diglucoside B (3,4 dihydroxyphényl) éthanol.

D'autres composés phénoliques ont été identifiés: oleuropéine, L-caféyl- glucose, tirosol, hydroxytirosol, apéginine, lutéoline. L'oleuropéine dont la concentration peut atteindre jusqu'à 2 % du poids d'olives, est très abondante dans les margines [176].

III.2.2. Les polymères phénoliques

Les polyphénols identifiés dans les margines sont essentiellement les anthocyanes et les tanins dont la concentration peut atteindre 12 g/l. Les tanins sont des polyphénols dont les structures sont complexes, conventionnellement classés en tanins hydrolysables et tanins condensés.

Les tanins hydrolysables renferment 3 groupes :

- Esters d'acides phénoliques
- Esters d'acides phénoliques et sucres
- Glucosides, c'est le groupe le plus abondant où l'acide gallique est le plus important.

L'action des tanases d'*A. niger* hydrolyse ce type de tanins en glucose et en acide gallique. Les gallotanins sont les plus représentatifs de ce groupe.



Les tanins condensés, appelés aussi flavotanins. Ils sont formés par la polymérisation de la catéchine à différents degrés. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 et ils sont souvent associés aux anthocyanes. Traités par HCl 5N en milieu alcoolique, ils sont dégradés avec formation de pigments anthocyaniques de coloration rouge (cyanidine).

En ce qui concerne la lignine, aucun auteur n'a cité la présence de ce polymère dans les margines, bien que les pulpes d'olives soient très riches en composés lignocellulosiques. Il est actuellement démontré que la lignine est un hétéropolymère formé par la polymérisation oxydative de trois monomères dérivés de l'alcool hydroxycinnamique : le 4-hydroxycinnamate, le 4-hydroxy - 3 méthoxycinnamate (coniférylate) et le 3,5 - diméthoxy - 4-hydroxycinnamate (sinapylate) [70].

III.3. Les composées phénoliques dans la nutrition animale

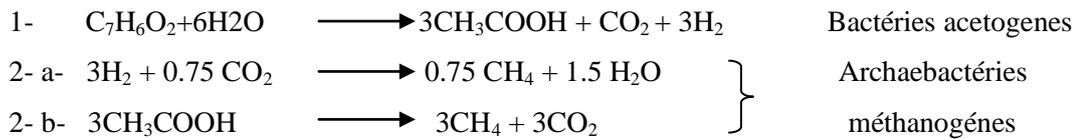
Les arbres, les arbustes et les plantes herbacées constituent la principale source d'aliments pour la plupart des herbivores du monde. Ces fourrages contiennent des taux variés de composés phénoliques qui jouent un rôle très important sur le plan organoleptique et nutritionnel. Leurs effets sur les animaux, qui les consomment, varient de bénéfiques à toxiques et ils peuvent même être létaux (101).

III.3.1. Métabolisme des composées phénoliques

Il est admis que la stabilité structurale des composés phénoliques est un facteur limitant leur dégradation en anaérobiose. Cette difficulté est due à la stabilité du noyau benzène (importante résonance du cycle > 100 KJ/mole), ce qui rend la réduction du noyau benzène en dérivés cyclohexanes non aromatique difficile à atteindre [106]. En effet, il a été montré au début du XVIII^{ème} siècle l'aptitude des bactéries anaérobies à dégrader les composés phénoliques comme le benzoate, les phénols et la lignine dont les produits de fermentation sont le CO₂ et le méthane [163]. Les études de la dégradation anaérobie des composés phénoliques ont permis d'illustrer les principales voies de dégradation de ces composés. Il s'avère que la voie du benzoyl-CoA est la voie majeure de dégradation de large variété de composés phénoliques : phénols, hydroxybenzoates, phenylacétate, toluène et certains crésols [163]. Les principaux microorganismes du rumen qui ont la capacité à dégrader les composés phénoliques appartiennent aux genres : *Streptococcus* (*S.bovis*, *S.caprinus*, *S.gallolyticus* et *S.macedonicus*). En réalité, ces microorganismes sont équipés d'un système enzymatique approprié dit tannase [77].



Certains composés phénoliques simples des margines sont dégradés complètement, c'est le cas du benzoate. La minéralisation complète du benzoate sous les conditions de la méthanésation est répartie en deux étapes [75].



Parfois, la dégradation des composés phénoliques n'est pas complète, elle aboutit à l'apparition d'intermédiaires. Par exemple dans le cas de l'oleuropene, composé phénolique abondant dans les margines, une hydrolyse enzymatique par la β -glucosidase libère de hydroxytyrosol et l'oleuropeine aglycone [24]. De même, il apparaît que l'acide 3-phenyl est aussi un produit intermédiaire de la transformation microbienne de l'acide cinnamique en anaérobiose [30].

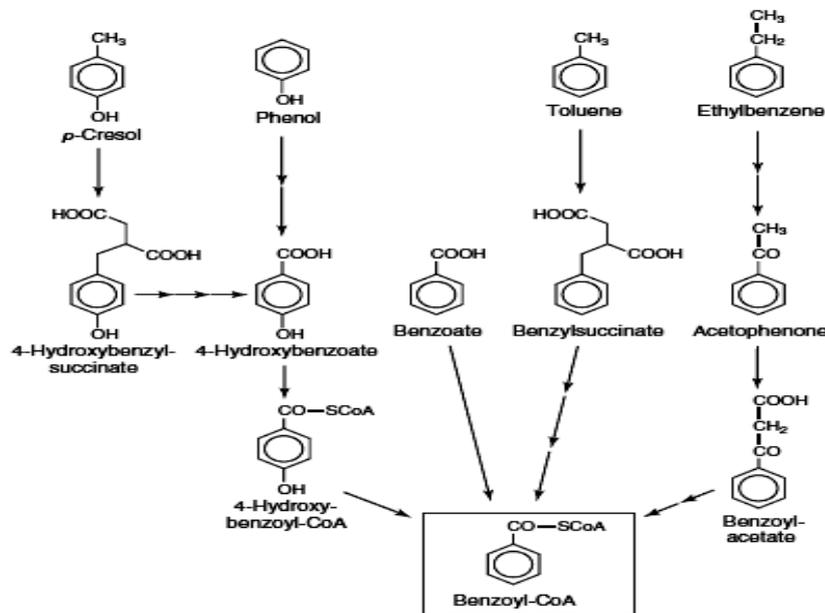


Figure n°5 . Dégradation anaérobie des composées phénoliques via la voie de benzoyl CoA [106]

D'autres composés phénoliques à hautes poids moléculaires, cas des tanins hydrolysables, peuvent être également métabolisés par ensemble d'archaebactéries méthanogènes. C'est le cas aussi de l'acide gallique qui est métaboliser par *Streptococcus gallolyticus* en pyrogallol et en suit en pholoroglucinol par la voie de décarboxylation [77,130]. Cependant, d'autres travaux ont mentionnés que le catéchol et le protocatéchuete, présentes dans les margines, ne sont pratiquement pas métabolisés dans les conditions d'anaérobiose régnants dans le rumen où ils constituent de puissants d'inhibition de la méthanogénèse ruminale.



III.3.2. les effets des composés phénoliques sur les animaux

III.3.2.1. Effet toxique et antinutritionnel

Les effets antinutritionnels et/ou toxiques des tanins sont surtout associés à leur grande affinité à se combiner aux protéines endogènes et exogènes (protéines du tractus digestifs et diététiques), aux polymères (cellulose, hémicelluloses et pectine) et aux éléments minéraux, ralentissant ainsi leur digestion. Les associations protéines-tanins influent divers facteurs, tels que le goût et la valeur nutritive des aliments. En inhibant certaines enzymes, les tanins peuvent avoir des conséquences de destruction nutritionnelle envers les herbivores qui les ingèrent. Lorsqu'ils sont consommés par les herbivores, les tanins induisent des réponses négatives. Ces réponses peuvent être instantanées comme l'astringence ou tardives liées donc à leurs effets toxiques et antinutritionnels.

La toxicité des tanins se manifeste à trois niveaux : l'ingestion, la digestibilité et le microbiote ruminal. Cette toxicité varie en fonction des tanins ingérés et de la tolérance de l'animal qui, à son tour, dépend de certaines caractéristiques telles que la nature du tractus digestif, le comportement alimentaire, la taille, l'âge et les mécanismes de détoxification [28].

A. Effets des composés phénoliques sur l'ingestion et l'appétit de l'animal

L'action des tanins sur l'ingestion des aliments se produit au niveau de la cavité buccale car les premières interactions entre les tanins et les protéines se déclenchent à ce niveau. En effet, la mastication entraîne la rupture des cellules des tissus de la plante et expose les protéines et le reste des constituants cellulaires à l'action des tanins. Il en résulte un phénomène d'astringence provenant de la formation de complexes entre les tanins et les glycoprotéines salivaires. Ces effets se manifestent du point de vue sensoriel par une sécheresse de la bouche due à la contraction des canaux salivaires [117]. Le goût amer, qui en découle, réduit d'une façon considérable la sapidité de l'animal qui se répercute directement sur l'ingestion.

B. Effets sur la digestibilité

Les tanins (proanthocyanidines) ne sont pas généralement absorbés à travers le tractus digestif des ruminants, ils restent sous forme libre ou liée dans le rumen et diminuent la digestibilité de la matière organique, en particulier celle des protéines et des parois végétales [28, 101].

Au niveau du tractus digestif, ces composés polyphénoliques peuvent réduire le processus d'activation des enzymes et inhiber l'activité des principales enzymes, surtout les protéases digestives en créant des complexes avec les mêmes enzymes [109].



C. Toxicité au microbiote ruminal

Les polyphénols, en particulier les tanins condensés, exercent une action inhibitrice sur la croissance des microorganismes du rumen. Contrairement aux tanins hydrolysables, les tanins condensés sont très difficiles à dégrader dans les conditions anaérobies qui règnent dans cet écosystème. La toxicité des tanins vis à vis des microorganismes du rumen est décrite pour plusieurs espèces bactériennes, telles que *Streptococcus bovis*, *Butyvirbio fibrosolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, et *Ruminobacter amylophilis*. Trois mécanismes de toxicité ont été identifiés :

- Inhibition des enzymes et privation des substrats : les tanins ont la capacité d'inhiber les enzymes endocellulaires et extracellulaires sécrétées par les bactéries. Ainsi, l'activité de l'endoglucanase de *Fibrobacter succinogenes* est inhibée *in vitro* par les tanins condensés de *Lotus corniculatus*. En se liant aux protéases extracellulaires, les tanins peuvent réduire la croissance des bactéries protéolytiques, en particulier *Ruminobacter amylophilis*, *Streptococcus bovis* et *Butyvirbio fibrosolvens* [109].
- Action sur les membranes : les tanins agissent sur les membranes cellulaires des bactéries. Leur effet antimicrobien peut être dû à leur liaison aux protéines des pores de la paroi cellulaire, altérant de ce fait les mécanismes de transport (glucose, acides aminés, ammoniac). Les tanins de faible poids moléculaire peuvent pénétrer à travers les pores de la paroi cellulaire externe et inactiver les perméases du périplasma impliquées dans le transport des acides aminés et des glucides [93].
- Action sur les ions : les tanins se lient aux ions et perturbent l'absorption de ces oligoéléments indispensables à la croissance des bactéries. En se combinant aux ions de calcium impliqués dans la structure des bactéries à Gram négatif, les tanins affectent la perméabilité de la paroi bactérienne [93].

En plus de ces effets majeurs, les tanins induisent des changements dans la physiologie de plusieurs espèces de bactéries ruminales. Ils prolongent la phase de latence de certaines bactéries comme *Streptococcus gallolyticus* dont la croissance sur un milieu liquide, en présence de tanins, se caractérise par une longue phase de latence et une faible vitesse de croissance [173].

D. Effets sur l'animal hôte

Les effets fondamentaux des tanins sur l'animal hôte incluent la diminution des fonctions ruminales et de l'ingestion. Par conséquent, le processus digestif est ralenti, l'animal perd son appétit et devient léthargique. Les fèces deviennent très foncés (noirs), secs et durs.



L'animal boit de grands volumes d'eau, son poids vif, sa production de laine et sa vitesse de reproduction chutent.

La consommation excessive de tanins (5-9%) engendre des symptômes de toxicité très graves. Les tanins hydrolysables sont les plus dangereux pour les ruminants parce que le métabolisme microbien et la digestion gastrique les convertissent en métabolites de faibles poids moléculaires, absorbables et fortement toxiques car ils passent facilement dans la circulation sanguine [109].

Les lésions majeures associées à l'empoisonnement par les tanins hydrolysables sont des gastroentérites hémorragiques, des nécroses hépatiques et une altération de la rate et des reins qui peut provoquer la mort de l'animal (taux de tanins hydrolysables supérieur à 20%). Ils peuvent être à l'origine de nombreux problèmes de reproduction car ils déclenchent des avortements et peuvent même provoquer la stérilité chez l'animal. Quant aux tanins condensés, leur toxicité est difficile à séparer de leurs effets dépressifs sur la digestion des protéines et des glucides.

Les tanins condensés ne sont pas absorbés à travers le tractus digestif. Ils peuvent endommager la muqueuse gastro-intestinale, en diminuant l'absorption des éléments nutritifs. Ils peuvent aussi réduire l'absorption des acides aminés essentiels [12].

III.3.2.2. Effets bénéfiques

Les tanins peuvent exercer des effets nutritionnels bénéfiques chez les ruminants qui en consomment des taux modérés. Plusieurs études suggèrent que la présence des tanins condensés à un seuil inférieur à 6% est avantageuse et induit une amélioration des performances animales : croissance et rendement en viande et en lait [28]. L'affinité qu'ont les tanins pour les protéines est, elle-même, à l'origine de leurs effets positifs. En se combinant à ces macromolécules, les tanins les protègent contre une dégradation trop intense dans le rumen, le pH de ce dernier (5-7) favorise la formation de complexes protéines-tanins inattaquables par la microbiote ruminal [12, 28, 101]. Ces complexes se dissocient plus loin dans la phase post ruminale au contact des sécrétions gastriques (pH 2-3) et pancréatiques (pH \approx 8) qui favorisent la dissociation de ces complexes et permettent ainsi la dégradation des protéines et la libération des acides aminés absorbés, par la suite, dans le duodénum. Ainsi, la précipitation des protéines par les tanins protège les microorganismes du rumen de leurs effets délétères. Elle permet également le recyclage de l'urée par la diminution de la concentration d'ammoniac dans le rumen [28].



La précipitation des protéines par les tanins participe également à l'activité anti-diarrhéique des tanins, en protégeant les organes digestifs des attaques nuisibles. Elle contribue aussi à l'action antihémorragique des plantes riches en tanins. La présence naturelle des tanins dans les différents pâturages protège les herbivores contre les ballonnements [101]. En concentrations relativement faibles, les tanins stimulent l'activité des enzymes digestives et inhibent la mutagénéité de plusieurs agents cancérigènes. Cette action est, en partie, attribuée à leur capacité à former des liaisons avec ces composés, ce mécanisme d'inhibition dépend du type de mutagènes. Une forte inhibition de la progression des tumeurs a été démontrée expérimentalement pour plusieurs types de tanins sur deux étapes de la cancérogenèse [138].

Plusieurs tanins hydrolysables oligomériques, et leurs composés apparentés, révèlent une forte activité antitumorale qui peut être due à l'amélioration des réponses immunitaires de l'animal hôte, à travers leur action sur les cellules de la tumeur et sur les immunocytes. Les proanthocyanidines, sous leurs deux formes libre et liée aux protéines, possèdent des groupements phénoliques qui diminuent la sensibilité des cellules saines aux agents toxiques [101].

Les tanins des légumineuses peuvent améliorer la qualité des fourrages ensilés en empêchant la dégradation excessive des protéines diététiques. Ils jouent aussi un rôle écologique car ils réduisent la production de méthane. Ils forment aussi des précipités avec les ions métalliques, réduisant ainsi leur toxicité [101].

Les tanins condensés ont un effet positif sur la capacité de l'animal à lutter contre les strongyloses gastro-intestinales mais aussi sur sa capacité à maintenir un niveau de production malgré la présence de parasite. Les différentes études réalisées chez les caprins et les ovins mettent en évidence une efficacité relative des tanins condensés (10 à 12% de légumineuses) pour lutter contre le parasitisme gastro-intestinal. Ils engendrent une réduction des oeufs du parasite dans les fèces, ce qui permet une moindre contamination des pâturages et donc évite une infestation massive des ruminants. Ceci conduit à une meilleure croissance, un meilleur gain de poids et une augmentation dans la production de laine [12, 101].

III.3.3. Adaptation des animaux aux tanins

Les animaux qui se nourrissent de plantes riches en tanins semblent développer des mécanismes défensifs vis à vis de ces substances. Chez quelques herbivores, les protéines salivaires riches en proline (PRPs) constituent la première ligne de défense contre les tanins diététiques [157]. Ces protéines, appelées également mucines, sont très riches en proline.



C'est pourquoi elles ont une très grande affinité pour les tanins, auxquels elles se combinent pour prévenir la précipitation des protéines diététiques. Les PRPs procurent une double protection, aussi bien sur le plan qualitatif que quantitatif. En désactivant les tanins, elles réduisent les pertes fécales d'azote et permettent donc de protéger quantitativement les protéines diététiques. En plus, leur richesse en azote non spécifique et en acides aminés non essentiels les rend plus commodes à être exploitées par l'animal à la place des acides aminés essentiels des protéines diététiques précieuses, ce qui permet de protéger qualitativement les protéines [101]. Les PRPs fournissent aux animaux la capacité de maintenir une plus grande digestion des fibres et des protéines, lors de l'ingestion de fourrages riches en tanins. La désintoxication au niveau de la bouche permet à ces animaux d'ingérer les plantes tannifères [157].

Le microbiote ruminal s'adapte également aux tanins, les bactéries les plus résistantes se trouvent chez les ruminants qui consomment de grandes proportions de fourrages riches en tanins. Contrairement aux tanins hydrolysables, les tanins condensés sont résistants à la dégradation microbienne car les microorganismes du rumen n'ont pas un équipement enzymatique adéquat pour leur dégradation. Pour se protéger contre ces molécules actives, les bactéries ruminales, en particulier *Prevotella ruminicola* possèdent quelques mécanismes qui leur permettent de survivre et de rester actives dans un environnement saturé en tanins [109]. Ces mécanismes adaptatifs incluent la méthylation des groupements hydroxyphénoliques des tanins, la sécrétion de polysaccharides extracellulaires ayant une forte affinité pour les tanins et dont la fonction est de séparer la paroi cellulaire des tanins réactifs (*Streptococcus gallicatus*) et/ou par la formation de glycoprotéines épaisses, possédant également une grande affinité pour les tanins afin de les empêcher de manifester leurs effets adverses sur les bactéries du rumen [173].

Un autre mécanisme de désintoxication possible se produit au niveau du foie. Il est induit par les substances phénoliques, de faibles poids moléculaires, libérées suite à la dégradation des tanins hydrolysables. Une fois que ces composés parviennent au sang, ils atteignent le foie où ils sont métabolisés et excrétés dans les urines [101].

Chapitre II

Matériel

et

méthodes



I. Matériels

I.1 Matériel végétal

Le substrat retenu dans cette étude sont des margines obtenues à partir d’olives de couleur mi-noires. Ces olives sont pressées dans des huileries traditionnelle et moderne (03 phase) dans 04 wilayas située à nord /est de l’Algérie

I.1.1. lieu et climat des régions de collecte des échantillons

Tableau n° 5: lieu et climat des régions de collecte des échantillons

Wilaya	Commune d’huilerie d’olive	Coordonnées [184]		distance à la wilaya Km	Climat	Procédés d’extraction	Date de collecte
		Latitude N	Longitude E				
ANNABA	BERRAHEL	36° 50' 7"	7° 27' 12"	39.5 à l’ouest	Humide	moderne	12 /01/2011
	ANNABA VILLE	36° 54' 0"	7° 46' 0"	/	Humide	traditionnelle	12 /01/2011
GUELMA	ROKNIA	36° 33' 1"	7° 13' 43"	32 à l’ouest	Sub-humide	traditionnelle	14/01/2011
	MEDJEZ SFA	36° 26' 57"	7° 46' 1"	44 à l’est	Sub-humide	moderne	29/12/2010
SIKIKDA	EL ARROUCH	36° 39' 11"	6° 50' 11"	32 au sud	Humide	moderne	05/01/2011
	SIKIKDA	36° 52' 45"	6° 54' 24"	/	Humide	traditionnelle	05/01/2011
TÉBESSA	FERKANE	34° 33' 0"	7° 25' 0"	170 au sud	Aride	traditionnelle	22/12/2010

I.1.2. échantillonnage

Les margines de cette étude sont obtenues à partir d’olives de couleur mi-noire. Le site de prélèvement est dans les huileries traditionnelles au moment de la presse et dans les huileries modernes au moment de la centrifugation.

La collecte a été réalisée pendant la période hivernal (Décembre 2010; janvier 2011). Les échantillons sont introduits dans des bidons (5 L) en polypropylène fumées et, une fois au laboratoire, ils sont stockés à l’obscurité, dans un environnement non oxygéné et à 4°C.

I.2. Matériel animal

Les animaux utilisés comme source d’inoculum sont des ovins, choisis de manière aléatoire, d’âge et de sexe différents et pâturant sur des parcours naturels, selon les déclarations des propriétaires (un régime alimentaire libre et non défini). Ils sont sacrifiés aux abattoirs municipaux de Boussouf (CONSTANTINE), Le jus de rumen est prélevé à partir de 3 moutons, il est obtenu par filtration du contenu de rumen à travers 4 couches de gaze chirurgicale, il est ensuite transféré au laboratoire dans un thermos préchauffé à 39°C et saturé par le CO₂



II. Méthodes

II.1. Extraction et quantification des composés phénoliques

II.1.1 Extraction des composés phénoliques

Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules polyphénoliques contenant dans les margines.

Les composés phénoliques contenus dans les margines sont déterminés en utilisant de l'acétate d'éthyle [174,40]. Les margines doivent, au préalable, subir un prétraitement par l'hexane pour éliminer les lipides.

■ Délipidation des margines

20 ml de margines sont centrifugées pendant 10 min à 3200g. Deux phases sont obtenues : une phase aqueuse et un culot précipité. 10 ml de la partie aqueuse sont ajoutées à 20 ml d'hexane. La solution est mélangée à l'aide d'un mixer électrique (Vortex mixer ZX3-RX3), pendant 15 min à une vitesse de 2500 tr/min. Après 15 min, les margines sont recueillies après séparation complète en deux phases : l'hexane (surnageant) et les margines délipidées (culot) prêtes à une extraction liquide-liquide.

■ Extraction à l'acétate d'éthyle

1,5 ml d'acétate d'éthyle sont additionnés à 2ml de margines délipidées, l'ensemble est homogénéisé à l'aide d'un mixer électrique (Vortex mixer ZX3-RX3) pendant 15 min à une vitesse de 2500 tr/min. Après 15 min, le mélange est complètement séparé en deux phases : l'acétate d'éthyle riche en polyphénols (surnageant) et les margines (culot).

le surnageant (l'acétate d'éthyle riche en polyphénols) est évaporées presque à sec sous pression réduite par l'évaporateur rotatif à 40⁰ C .les polyphénols sont récupérés dans des flacons fumés et conservées à 4⁰C jusqu'à le jour de dosage(fig 06).

II.1.2 Quantification des composés phénoliques

II.1.2.1 Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols sont dosés par la technique colorimétrique de Folin ciocalteu [102]. Un aliquote de 50 µl de l'extrait phénolique est mélangé à : 0.95 ml d'eau distillée, 0.50 ml de solution de Folin Ciocalteu (1N) et 2,5 ml de carbonate de sodium (Na₂CO₃ 20%). Le développement d'une couleur bleue est obtenu après incubation à l'obscurité et à température



ambiante pendant 40 min. L'absorbance est mesurée à 725 nm. Les résultats sont rapportés à une courbe étalon standard, ils sont exprimés en équivalent d'acide gallique (fig. 07).

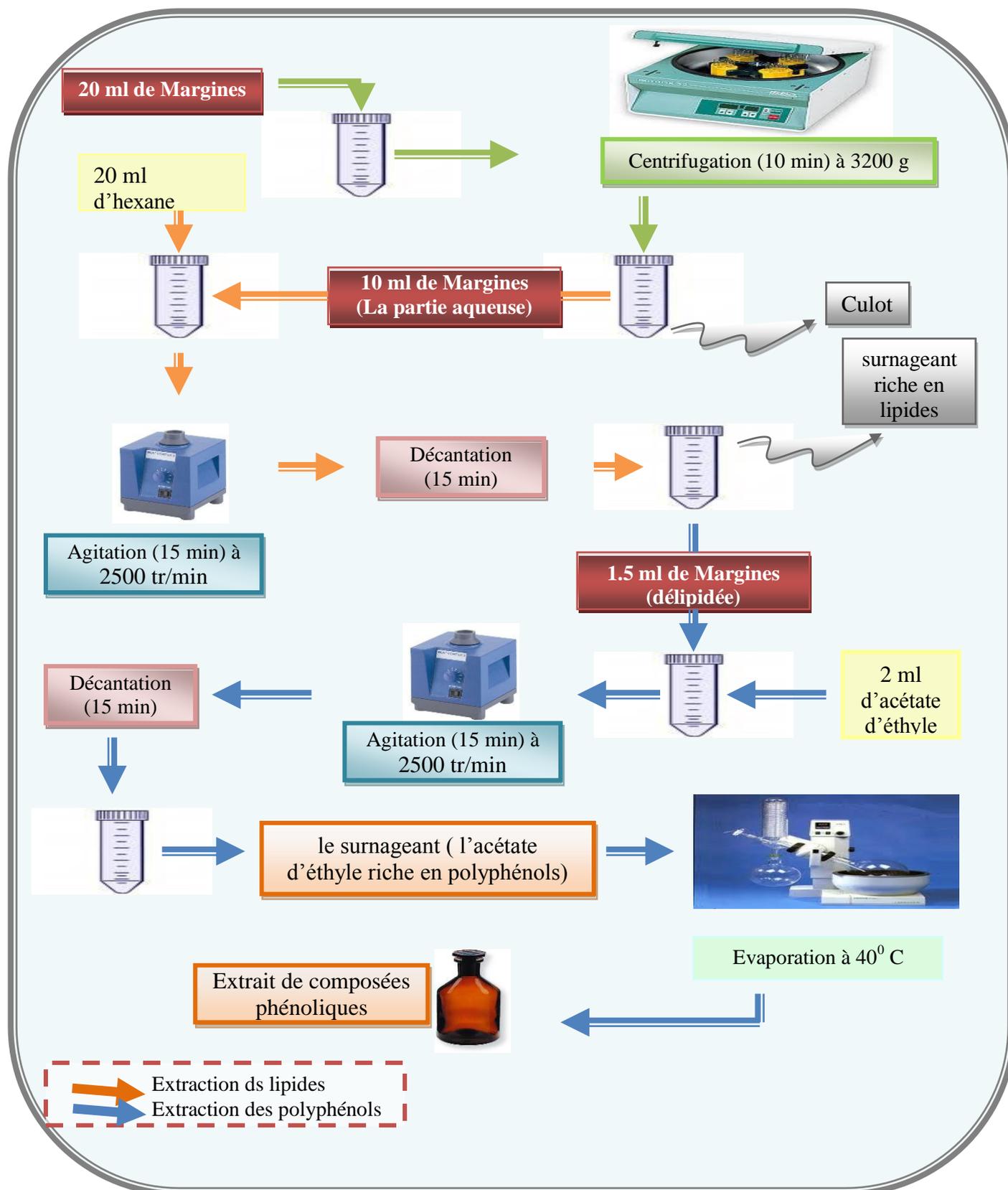


Figure n°6 : Méthode d'extraction des polyphénols des margines

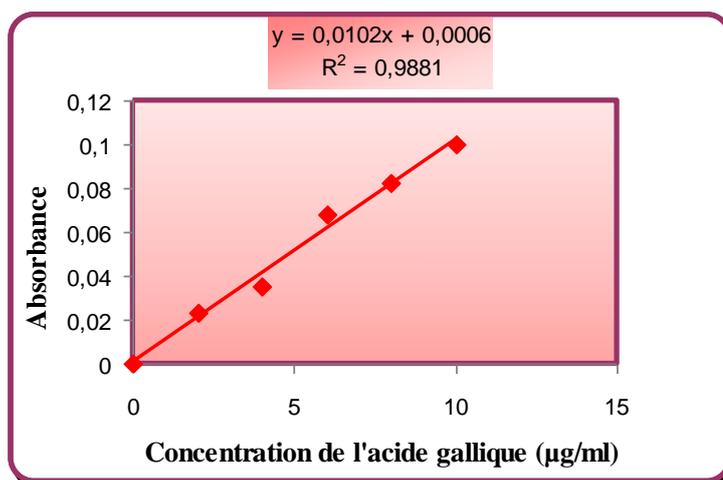


Figure n° 07: courbe étalon correspondant aux dosages des phénols totaux.

II.1.2.2 Dosage des tanins totaux

Les tanins totaux sont estimés en mélangeant 100 mg de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) avec 2ml d'eau distillé et 2 ml de l'extrait initial. L'ensemble est agité et maintenu à 40°C pendant 15 min, ensuite il est centrifugé à 3000g et à 4°C. Le surnageant est utilisé pour la détermination des tanins totaux qui correspondent à la différence entre les phénols totaux (mesuré par le procédé de Folin Ciocalteu), avant et après traitement avec le PVPP [102]. La concentration des tannins totaux est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage préparée sur la base de l'acide tannique (fig 08)

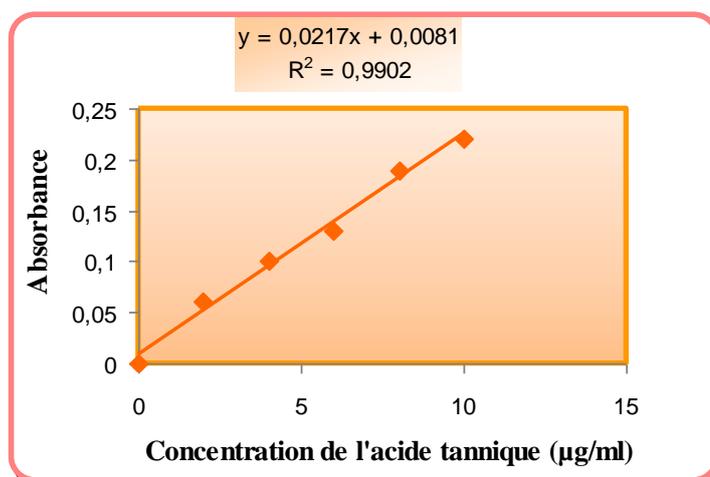


Figure n° 08: courbe étalon correspondant aux dosages tannins totaux.

II.1.2.3 Dosage des tanins condensés

Les tanins condensés sont dosés par la méthode au Butanol-HCl [100]. Le milieu réactionnel est composé de 0,5 ml de l'extrait, 3 ml de butanol-HCl (95/5) et 0,1 ml d'une



solution ferrique (sulfate d'ammonium ferrique 2%, dilué dans (HCl à 2N). Les échantillons sont incubés dans un bain marie bouillant pendant 60 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm et les résultats sont exprimés en se référant à une courbe étalon de quebracho tanin (fig.9).

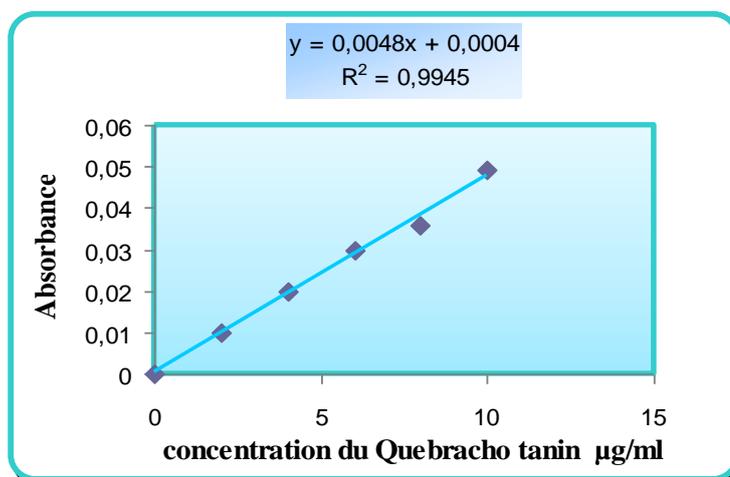


Figure n°09: courbe étalon correspondant aux dosages tannins condensés

II.1.2.4 Dosage des flavonoïdes :

La quantification du contenu flavonoïque est estimée par la méthode d'AlCl₃, selon le protocole modifié de [53].

Un volume de 0,75 ml de AlCl₃ (2%) a été mélangé à un volume de 0.25 ml d'extrait et un volume de 0.50 d'eau distillée. L'absorbance est mesurée à 420 nm, après incubation à température ambiante pendant 30 min, les résultats sont exprimés en se référant à une courbe étalon (fig. 10) préalablement tracée avec la quercétine comme substance de référence .

Toutes les manipulations sont répétées 03 fois.

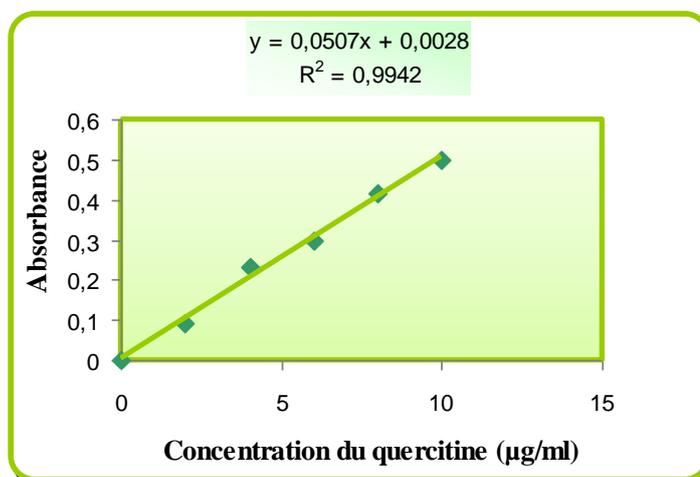


Figure n° 10: courbe étalon correspondant aux dosages flavonoïdes totaux.



II.2. Fermentations in vitro des substrats

La fermentation des substrats est étudiée par la technique de production de gaz *in vitro*. Toutes les étapes mentionnées sont décrites dans les articles de [112,113]

II.2.1. Technique de la production de gaz in vitro

La technique de production de gaz *in vitro*, développée par MENKE et al 1979 [112], est une simulation de la digestion dans le rumen. C'est une technique rapide, simple et peu coûteuse qui offre une très bonne méthode pour prédire la dégradation et la digestibilité des nutriments. Elle permet parallèlement l'étude des produits terminaux de la fermentation ruminale qui affectent l'environnement.

II.2.2. Description du système de fermentation

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

II.2.3. Préparation de la salive artificielle et de l'inoculum

II.2.3.1. Préparation de la salive artificielle (solution tampon)

il faut un mélange des cinq solutions suivantes:

1- La solution A : représentant la solution des microminéraux qui permettent la fixation de la microflore cellulolytique sur les fibres.

2- La solution B : c'est la solution tampon, composée de carbonate de sodium (NaHCO₃).

3- La solution C : c'est la solution des macrominéraux.

4- La solution D : composée de la résazurine qui est un indicateur du potentiel d'oxydoréduction.

5- La solution E : c'est la solution réductrice, constituée de Na₂S.

Cette solution de couleur bleue est un mélange composé de : 475ml d'eau distillée, 0,12ml de la solution des microminéraux, 240 ml de la solution tampon, 240ml de la solution des macrominéraux, 1,22 ml de la solution de résazurine et enfin 100ml de la solution réductrice (Annexe 02)



II.2.3.2. Préparation de l'inoculum

Le milieu de fermentation est obtenu en mélangeant un volume de jus de rumen filtré avec 2 volumes de salive artificielle (1:2 v/v). Cette dernière est chauffée jusqu'au virage de la coloration bleue vers le rose, puis un barbotage est assuré en profondeur par un flux continu de CO₂ jusqu'à ce que la solution devienne incolore (fig 11). A ce moment, le jus de rumen est ajouté, puis un barbotage en surface est maintenu pendant 15 min afin de créer une atmosphère totalement anaérobie

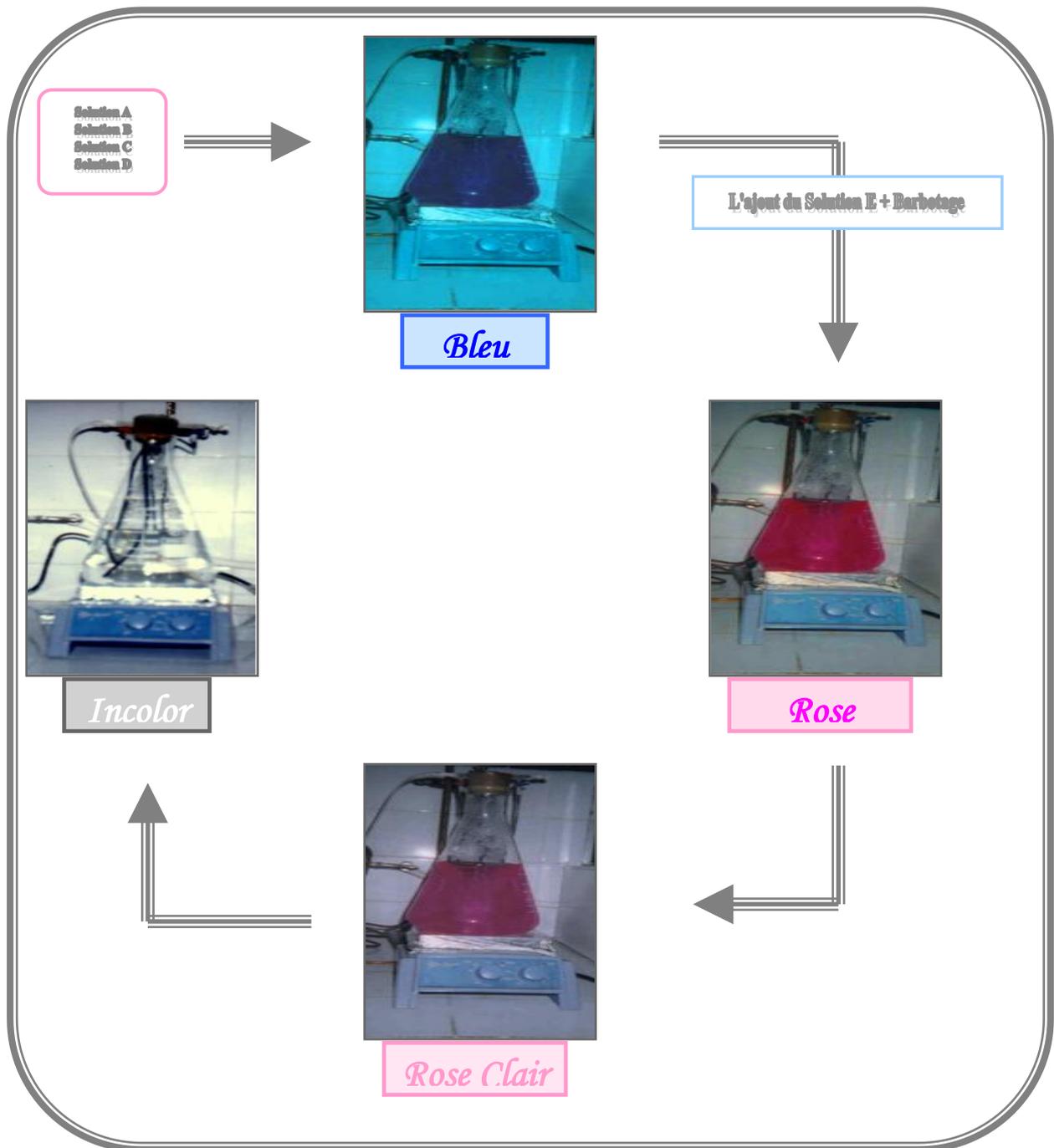


Figure n°11: Etapes de la préparation de la salive artificielle



II.2.4. Inoculation

Pour chaque échantillon, (03) seringues contenant 200mg de foin de la vesce-avoine et un volume de 100 μ l d'additif sont incubées avec 30ml du milieu de culture (jus de rumen + solution tampon). En parallèle, (03) seringues contenant 200 foin sont utilisées comme control. (03) seringues témoins, ne contenant pas de substrat (uniquement le milieu de culture), sont incubées dans les mêmes conditions.

II.2.5. Incubation

Les seringues inoculées sont horizontalement incubées dans une étuve à agitation rotatoire (type GFL 3033) à 9 tours/min et à 39°C pendant 96 heures (fig 12).

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, 24, 48, 72 et 96 heures. Le gaz produit est mesuré par une lecture visuelle des graduations présentes sur la face de chaque seringue.



Figure n°12 : l'incubation dans une étuve à agitation rotatoire (type GFL 3033)



II.3. Etude des gaz produits

II.3.1 Etude quantitative et qualitative des gaz produits

II.3.1.1. Analyse quantitative des gaz

La production réelle de gaz dans chaque seringue correspond à la production de gaz après 96 heures sous traite du volume de gaz enregistré à t_0 et celui du volume de gaz moyen produit par le blanc

$$(PGT) = (V_{96} - V_0 - V_B)$$

PGT : production de gaz total.

V_{96} : volume de gaz lu à 96 heures de fermentation.

V_0 : volume initial.

V_B : volume de gaz produit par le blanc.

II.3.1.2. Analyse qualitative des gaz

Le volume des gaz produits (CH_4 et CO_2), est déterminé par un traitement à la soude ($NaOH$ 10N) [83]. Les gaz produits à chaque intervalle de temps sont transférés dans une autre seringue. Cette dernière est injectée de manière étanche par la soude qui réagit avec le CO_2 par absorption, entraînant le déplacement du piston d'un volume correspondant au volume de CH_4 . Le volume de CO_2 est déterminé par soustraction du volume net de CH_4 enregistré, par rapport au volume de gaz total produit.

En injectant 04 ml de $NaOH$ (10 N) dans chaque seringue, le piston se déplace suite à la réduction du CO_2 par la soude, le volume restant est celui du méthane.

$$V_{CH4} = V_{NaOH} - V_{liq}$$

$$V_{CO2} = V_t - V_{CH4}$$

V_{NaOH} : volume enregistré après injection de la soude

V_{liq} : volume liquide

V_t : volume total de gaz produit.

II.3.2 Détermination des paramètres caractéristiques de la production de gaz

Les paramètres caractéristiques modélisés de la fermentation des substrats sont déduits du modèle exponentiel proposé par [132].



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

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

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

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

c : Vitesse de fermentation des substrats.

II.4. Mesure du pH et analyse des produits de fermentation

II.4.1. Mesure du pH

Après 24 heures de fermentation le pH du contenu de chaque seringue est mesuré au pH-mètre muni d'une électrode combinée.

II.4.2. Dosage de l'azote ammoniacal

Principe

L'azote ammoniacal (N-NH₃) est dosé par une technique colorimétrique [32], dont le principe est le suivant :

L'ion ammonium (NH₃) se fixe sur une molécule de phénol en présence du chlore. La réaction est catalysée par le nitroprusside de sodium. Il se forme un complexe de type indophénol qui donne une coloration bleue. La densité optique est mesurée à 660 nm (fig 13). Les résultats sont rapportés à une courbe étalon standard et exprimés en équivalent de chlorure d'ammonium (NH₄ - Cl) (fig 14).

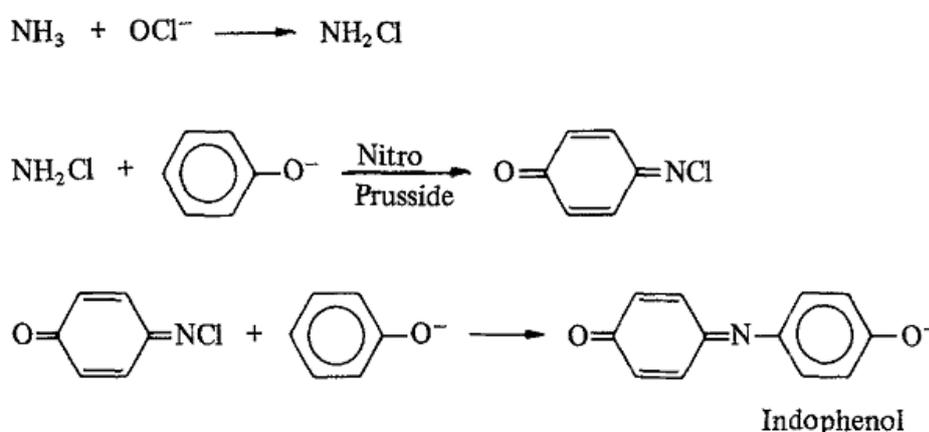


Figure n^o 13 : Principe de dosage de l'azote ammoniacal présent dans le milieu fermentaire.



Echantionnage

Après 24 h d'incubation, Les échantillons (le contenu de chaque seringue) sont bloqués par une solution d'acide orthophosphorique (H₃PO₄, 50 g/L) à raison de 2 ml pour 10 ml de contenu de chaque seringue. Les échantillons sont centrifugés à 11.000 tr/min pendant 30 min, ensuite sont conservés à -20 0C jusqu'à le dosage chimique.

Dosage

5 ml de solution A (annexe 03) est mélangée avec 2 µl de l'échantillon (contenue de chaque rumen + H₃PO₄). Après une bonne homogénéisation, 5 ml de solution B (annexe 07) sont ajoutés. Ce mélange homogénéisé est maintenue dans un bain marie à 37 0C pendant 20 min.

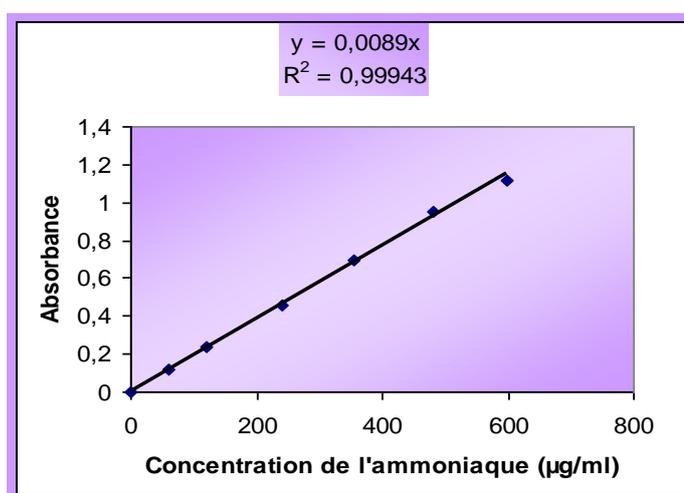


Figure n°14: courbe étalon correspondant au dosage de l'azote ammoniacal ruminale.

II.4.3. Dénombrement des protozoaires

Principe

Les protozoaires sont traités avec une solution de MFS (methylgreen-formalin-saline) (Annexe 4), qui permet la fixation des cellules par le formaldéhyde et la coloration des noyaux par le vert de méthyle. La solution et les échantillons fixés peuvent être conservés pendant 3 ans à l'obscurité [131].

Le dénombrement est réalisé sur une cellule de Malassez, qui est une lame épaisse en verre dans laquelle est creusée une chambre de comptage constituée de 100 rectangles, parmi lesquels 25 sont subdivisés en 20 petits carrés pour faciliter le comptage. Le volume total de la cellule est égal à 1µl, soit 0,01µl par rectangle ce qui permet une évaluation quantitative (Fig 15).

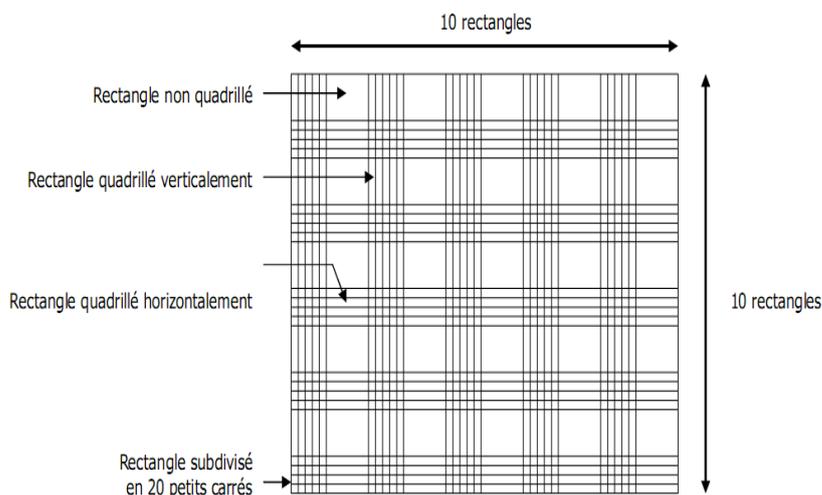


Figure n°15. *Quadrillage de dénombrement de la cellule de Malassez.*

Echantillonnage

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

Comptage et calcul

L’échantillon à compter est mis entre lame et lamelle à l’aide d’une pipette pasteur en évitant la formation de bulles d’air. Le comptage est fait sur les 25 rectangles subdivisés en petits carrés à l’aide d’un microscope à l’objectif ×40. Chaque échantillon est compté deux fois est si la différence entre les deux résultats est supérieure à 10% le dénombrement doit être refait. Le nombre des protozoaires est exprimé selon la relation suivante :

$$N = n_1 * v * n_2 * f * 1000$$

- N : nombre de cellules par ml.
- n1 : nombre de cellules comptées.
- v : volume d’un rectangle= 0,01 µl.
- n2: nombre de rectangles comptés= 25.
- f : facteur de dilution.

II.5. détermination la digestibilité apparente

Le coefficient de digestibilité apparente est calculé après une centrifugation (12000 tours /min pendant 20 min) du contenu de chaque seringue, le culot est séché à 105° C pendant 72 heures puis pesé.



$$\text{CUDa \%} = \text{msi} - (\text{msrs} - \text{msrb}) * 100 / \text{msi}$$

msi : matière sèche initiale

msrs : matière sèche résiduelle du substrat incubé

msrb : moyenne des matières sèches résiduelles des seringues témoins

II.6. Analyse statistique

Les données sont traitées par le logiciel statistique **STATISTICA** version 6. Elles sont soumises à une analyse de la variance ANOVA à deux facteurs (nature du traitement et région de collecte). Les différences sont considérées significatives au seuil 5%. Les moyennes sont classées selon la classification de Test de Duncan ($\alpha = 5\%$).

Les paramètres cinétiques sont déduits du modèle exponentiel de [132] :

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

Le calcul est effectué par le logiciel informatique DEG

Chapitre III

Résultats

et

discussion



III.1. Dosage des composées phénoliques :

Les résultats du dosage des composées phénoliques des différents extraits des margines sont résumés dans le tableau 6 et fig 16

III.1.1. Dosage des phénols totaux (PT)

Le tableau 6 montre que les extraits des margines issues des systèmes d'extraction traditionnels (Procédés discontinus) et modernes (Procédés continus à trois phases) renferment des taux significativement variables ($P < 1\%$) de phénols totaux. La teneur la plus élevée est enregistré pour l'E.M.U.T.(extrait de marge d'unité traditionnelle) du ANNABA (27,36g/l) et le plus faible est observé pour l'E.M.U.T. du TEBESSA (2,91g/l). L'ordre décroissant de la teneur des extraits en phénols totaux est le suivant :E.M.U.T. des [ANNABA (27,36 g/l) >GUELMA (14,80g/l) >SKIKDA(14,54g/l)] > E.M.U.M. (extrait de marge des unités modernes)des [SKIKDA(10,13g/l) > GUELMA(07,79g/l) > ANNABA(07,69g/l)] > E.M.U.T du TEBESSA(2,91g/l). Il ressort également que le contenu phénolique des extraits (ANNABA, GUELMA et SKIKDA) est influencé par le système d'extraction, excepté l'E.M.U.T du TEBESSA ($P < 1\%$) et une différents significative est notée entre les trois régions (ANNABA, GUELMA et SKIKDA) avec la région du TEBESSA ($P < 1\%$).La teneur en PT des extraits des margines, enregistrée dans notre étude, est comparable à celle notée dans d'autres travaux qui donnent des teneurs : 3 [4], 7.8[152] , 9.7[2],10.7[175] 13.45 [92] , et 18.5g/l [73].

III.1.2. Dosage des tanins totaux (TT)

Les teneurs en (TT) des extraits sont 21,06, 11,29, 09,50, 07,74 04,25, 02,95 et de 2,91 g/l pour les E.M.U.T.A., E.M.U.T.S., E.M.U.T.G., E.M.U.M.S., E.M.U. M. G., E.M.U.M. A. et E.M.U.T. T. respectivement tableau X. De même, la concentration en (TT) est statistiquement différente entre les systèmes d'extraction utilisés, excepté l'E.M.U.T.T. ($P < 1\%$) et une différents significative est notée entre la région du SKIKDA et région du TEBESSA ($P < 1\%$). HAMDI ET GARCIA [73] ont trouvé : 9.2 g/l de TT.

III.1.3. Dosage des tanins condensés (TC)

Les concentrations en tanins condensés sont significativement variable entre les extraits des margines étudiées $P < 0.05$ tableau 6 et reste faible par rapport à la teneur en TT. Le taux le plus élevé est enregistré pour l'E.M.U.T.S (1,06 g/l) et le plus faible est observé pour l'E.M.U.T.T (0,33g/l). Cette concentration faible en TC montre la richesse des extraits des margines en tanins hydrolysables (TH). HAMDI ET GARCIA [73] ont trouvé : 7 et 2.2 g/l pour les TH et TC, respectivement.



Tableau n° 6. Concentration des composées phénolique (PT, TT, TC et FL g/l) des extraits des margines obtenues par trituration traditionnelle et moderne.

	<i>PT</i>	<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>FL</i>
<i>E.M.U. T. G.</i>	14,80 ^b ± 0,58	09,50 ^b ± 1,23	0,67 ^c ± 0,01	0,0579 ± 0,0063
<i>E.M.U. M.G.</i>	07,79 ^d ± 0,08	04,25 ^c ± 0,55	0,42 ^d ± 0,12	0,0666 ± 0,0147
<i>E.M.U. T. S.</i>	14,54 ^b ± 0,76	11,29 ^b ± 1,33	1,06 ^a ± 0,019	0,0640 ± 0,0140
<i>E.M.U.M. S.</i>	10,13 ^c ± 0,66	07,74 ^b ± 0,48	0,77 ^{bc} ± 0,05	0,0474 ± 0,0193
<i>E.M.U. T. A.</i>	27,36 ^a ± 1,52	21,06 ^a ± 1,88	0,86 ^b ± 0,02	0,1079 ± 0,0580
<i>E.M.U.M. A.</i>	07,69 ^{cd} ± 0,07	02,95 ^c ± 1,10	0,46 ^d ± 0,05	0,0542 ± 0,0023
<i>E.M.U. T. T.</i>	2,91 ^e ± 1,02	02,05 ^c ± 0,91	0,33 ^d ± 0,06	0,0472 ± 0,0030
<i>S.E.M</i>	0,85	1,13	0,060	0,0230
<i>pr</i>	0000	0000	0,02515	0,5518

PT : phénols totaux, **TT** : tanins totaux, **TC** : tanins condensés. **S.E.M.** : erreur standard des moyennes. **Pr.** : probabilité, ^{a,b,c,d,e} Moyennes dans une même colonne affectées d'exposants différents sont statistiquement distincts (P < 0.05).

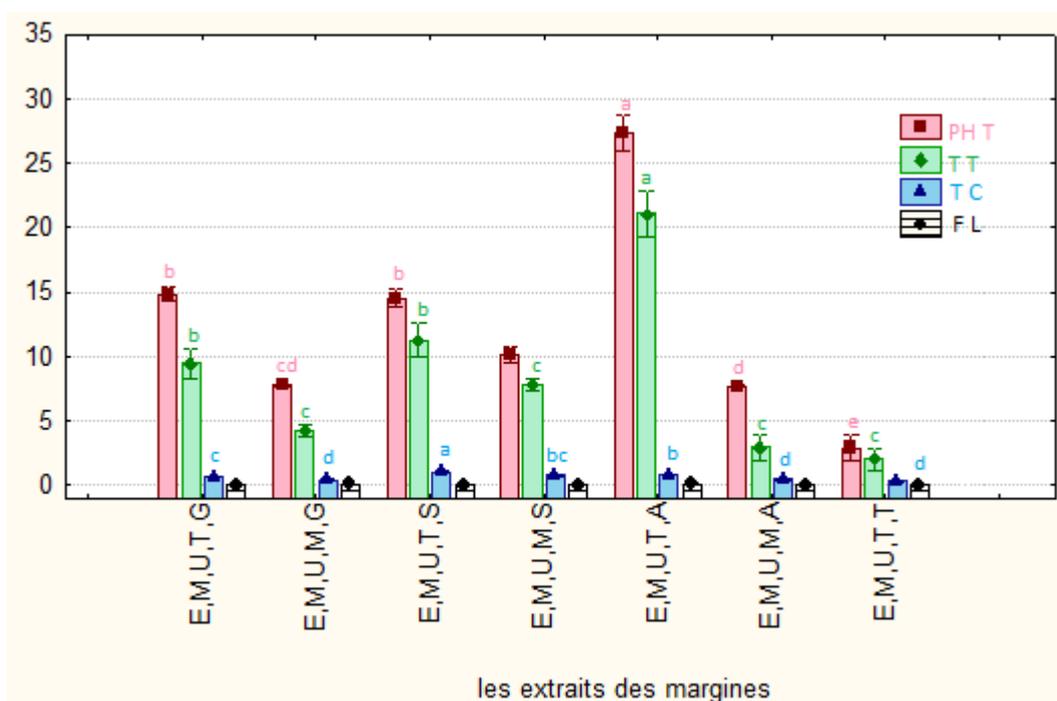


Figure n° 16. Concentration des composées phénolique (PT, TT, TC et FL g/l) des extraits des margines.



III.1.4. Dosage des flavonoïdes (FL)

Les teneurs en flavonoïdes sont très faible et très proches par rapport à l'autre composées phénoliques des extraits des margines et sont statiquement similaires ($P < 0.05$). Ces teneurs sont incluses dans une gamme variant de 0,1079 à 0,0472 g/l, la teneur la plus élevée est observée pour l'E.M.U.T. A. et la plus faible est enregistrée pour l'E.M.U.T. T.. nos résultats concernant les teneurs en FL sont inférieurs à ceux indiqués par d'autres auteurs [73].

En effet, l'analyse quantitative en composés phénoliques des margines, en particulier les tanins et les flavonoïdes, n'a pas fait l'objet de nombreux travaux. C'est pourquoi nous n'avons pas pu recueillir de données bibliographiques satisfaisantes.

En générale, on remarque deux points très importants :

La premier, les extrait des margines sont très riche en composés phénolique (surtaux en TH qui représentés presque $\frac{3}{4}$ du PT, dans les margines d'ANNABA, GUELMA et SKIKDA) par ce que les composées phénoliques proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction. Leur solubilisation dans l'huile est cependant bien inférieure à celle dans les eaux de végétation, ce qui explique leur concentration élevée détectée dans les margines [143].

La deuxième : il y a une similitude entre les résultats obtenus dans les trois régions ANNABA, GUELMA et SKIKDA. Où leur concentrations en composées phénoliques dans les l'E.M.U. Traditionnels plus importants que ceux enregistrés dans les unités Modernes. Ce qui peut s'expliquer par l'existence de ces trois zones dans le nord-est, qui a presque le même climat (méditerranéen) et la même variété d'olive traitée.

Cette variabilité dans les concentrations des différents composées phénoliques dans les margines dépend de plusieurs facteurs essentiellement du processus d'extraction [5 ,142]. En effet, le système à centrifugation exige l'ajout de grandes quantités de l'eau lors de deux centrifugations, par contre, l'extraction par le système à presse se fait sans addition significative d'eau, ce qui se répercute sur la charge des margines en matières organique (composées phénoliques) et en suspension. En plus, la variété, le degré de maturité des fruits, la période moisson (récolte) [146] et le temps de conservation (durée de stockage d'olive avant extraction et les margines après l'extraction) [88. 13] influencent les taux des composées phénoliques des margines.



III.2. Influence du contenu phénolique des margines sur l'activité ruminale

III.2.1. Influence du contenu phénolique des margines sur la production de gaz

III.2.1.1. Volume total de la production de gaz in vitro

Le tableau 7 y présente les volumes et les paramètres caractéristiques de la production de gaz enregistrés pour les différents mélanges du foin de vesce-avoine et des extraits phénoliques des margines (100 µl). Après 96 h de fermentation, l'inclusion des différents mélanges de foin de vesce-avoine et des extraits des margines n'a aucun effet sur la production de gaz *in vitro* ($P > 5\%$). En revanche, une stimulation non significative dans la production de gaz, le mélange de foin de vesce-avoine et de l' E.M.U.T.T. engendre la plus grande production de gaz (36,33 ml/ 200mg de MS), suivi les mélanges de foin de vesce-avoine et de l' E.M.U.T.G., E.M.U.T.A., E.M.U.T.S, E.M.U.M.G, E.M.U.M.A. et E.M.U.M.S. respectivement engendrent (33,33, 33,00, 32,67, 32,67, 31,00 et 31,00 ml /200mg de MS), le foin de vesce-avoine (témoin) produit le volume le plus faible (30.00 ml/200mg de MS).

Plusieurs auteurs ayant travaillé sur le foin de vesce-avoine observent des pourcentages proches des nôtres 38,33[25], 38,51[145], d'autres publient des chiffres plus importants allant jusqu'à 68,24 ml [94]. Ces écarts peuvent s'expliquer par la variabilité de l'activité microbienne de l'inoculum utilisé [65].

L'augmentation de la production du gaz chez les différents mélanges de foin de vesce-avoine et des extraits des margines, est probablement due à la dégradation des composés phénolique par les microbiotes ruminale. En effet, des observations similaires ont été fait par [94] ayant travaillé dans les mêmes conditions. Cette situation suggère que les microorganismes du rumen sont probablement dotés d'équipement enzymatique nécessaire à la dégradation des substances phénoliques. De plus, cette capacité fermentaire peut être due à une adaptation progressive des microorganismes du rumen aux substances inhibitrices. D'après Mc SWEENEY C.S et al 2001[109], les tanins hydrolysables sont facilement dégradés en anaérobiose par le microbiote ruminale. En effet, certains microorganismes du rumen, notamment, les *Sterptococcus* possèdent des tannases capable de dégrader les TH. Ces enzymes interviennent dans l'hydrolyse des liaisons esters des tanins hydrolysables en produisant de l'acide gallique et du glucose. Ce qui pourrait aussi expliqué l'augmentation dans la production du gaz.



Tableau n° 7. Production de gaz *in vitro* et les constantes cinétiques modélisées des mélanges du foin de vesce-avoine *e* et des extraits phénoliques des margines (100 µl) :

	<i>Production cumulative de gaz (ml)</i>								<i>paramètres cinétiques</i>		
	<i>T2</i>	<i>T4</i>	<i>T6</i>	<i>T8</i>	<i>T24</i>	<i>T48</i>	<i>T72</i>	<i>T96</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
<i>F.V-O</i>	3,67 ^b ± 0,33	5,33 ^c ± 0,58	5,67 ^c ± 0,88	8,33 ^b ± 1,00	14,33 ± 1,53	24,00 ± 0,67	27,67 ± 1,20	30,00 ± 1,53	2,59 ^b ± 0,47	31,50 ± 1,84	0,0222 ± 0,0018
<i>E.M.U.T. G.</i>	4,00 ^b ± 0,58	5,33 ^c ± 1,15	6,33 ^c ± 0,88	8,33 ^b ± 0,58	16,33 ± 1,73	27,67 ± 1,73	31,33 ± 2,31	33,33 ± 2,60	1,89 ^b ± 0,64	35,36 ± 2,26	0,0246 ± 0,0005
<i>E.M.U.M. G.</i>	4,50 ^b ± 0,29	9,67 ^{ab} ± 0,33	10,67 ^{ab} ± 0,33	12,33 ^{ab} ± 0,58	16,67 ± 2,03	27,56 ± 2,89	30,67 ± 3,18	32,67 ± 3,18	5,60 ^{ab} ± 0,60	30,53 ± 3,53	0,0239 ± 0,0022
<i>E.M.U.T. S.</i>	7,00 ^{ab} ± 1,00	7,33 ^{bc} ± 1,00	8,00 ^{abc} ± 1,00	9,67 ^{ab} ± 1,76	15,33 ± 2,31	27,67 ± 1,53	31,33 ± 1,53	32,67 ± 1,76	4,49 ^{ab} ± 1,00	32,83 ± 1,90	0,0200 ± 0,0021
<i>E.M.U.M. S.</i>	5,67 ^{ab} ± 2,03	7,67 ^{abc} ± 2,03	7,67 ^{abc} ± 2,33	10,00 ^{ab} ± 2,91	15,00 ± 2,60	25,33 ± 2,40	28,67 ± 2,33	31,00 ± 2,31	4,62 ^{ab} ± 2,20	31,59 ± 0,75	0,0201 ± 0,0018
<i>E.M.U.T. A.</i>	5,00 ^b ± 1,53	7,67 ^{abc} ± 0,88	8,00 ^{abc} ± 1,00	10,67 ^{ab} ± 0,88	16,67 ± 1,45	27,0 ± 1,33	30,67 ± 0,88	33,00 ± 0,58	4,25 ^{ab} ± 0,90	32,81 ± 0,99	0,0230 ± 0,0019
<i>E.M.U.M. A.</i>	7,00 ^{ab} ± 1,00	8,67 ^{abc} ± 0,88	9,00 ^{abc} ± 1,00	11,67 ^{ab} ± 1,33	17,33 ± 1,53	25,67 ± 3,00	29,00 ± 3,67	31,00 ± 4,00	5,90 ^{ab} ± 0,85	28,29 ± 4,44	0,0245 ± 0,0031
<i>E.M.U.T. T.</i>	9,00 ^a ± 1,53	11,33 ^a ± 1,53	11,67 ^a ± 1,86	14,67 ^a ± 1,76	20,67 ± 2,028	30,00 ± 1,86	34,33 ± 2,08	36,33 ± 2,33	8,07 ^a ± 1,68	32,13 ± 2,15	0,0229 ± 0,0014
<i>S.E.M</i>	1,17	1,16	1,26	1,51	1,91	1,95	2,21	2,39	1,19	2,42	0,0019
<i>pr</i>	0,6624	0,3213	0,3565	0,6529	0,9991	0,9612	0,9670	0,9888	0,4714	0,7427	0,9832



III.2.1.2. La cinétique de la production de gaz

La cinétique de la production de gaz *in vitro* des différents mélanges de foin de vesce-avoine et des extraits phénoliques des margines (100µl) sont présentées dans le tableau 7 la figure 17. Généralement, la cinétique de dégradation est caractérisée par 2 ou 3 phases distinctes : La première phase est dite phase exponentielle ou phase de croissance rapide, elle est caractérisée par une production élevée de gaz, environ 85% du gaz total est produit durant cette période qui dure de 0 à 48 heures pour les différents mélanges. La deuxième phase se situe entre 48 et 96 heures pour les différents mélanges. Peu de gaz est alors produit et la fermentation diminue jusqu'à se stabiliser totalement par l'épuisement du milieu de fermentation des conditions défavorables engendrées dans le milieu par l'acidité résultant de l'accumulation des acides gras volatils (AGV). Le profil cinétique des différents mélanges est distinct de celui observé dans d'autres travaux où la fermentation se stabilise au bout de 24h pour des sous-produits agroalimentaires tel que : les grignons d'olive, les déchets d'oranges et les déchets des dattes [01,06]. Alors que d'autres auteurs ayant travaillé sur des substrats plus fibreux (fractions de palmier dattier), trouvent que le plateau de production de gaz est atteint après 72h d'incubation [07]. Qui est similaire à notre étude.

Au début d'incubation (2 à 8 heures), la production de gaz *in vitro* est significativement différente entre les mélanges de foin de vesce-avoine et des extraits phénoliques des margines ($P > 5\%$) D'après les courbes de cinétique (Fig 17), il ressort que les extraits des margines améliorent la production de gaz de : 76,11%, 48,02%, 40,09%, 28,9%, 20,04% et 16,8% respectivement pour E.M.U.T.T., E.M.U.M.G., E.M.U.M.A., E.M.U.T.A, et E.M.U.M.S. Cette augmentation de la production du gaz peut être interprétée par la capacité du microbiote ruminal à dégrader les composés phénoliques. LEULMI N. 2011 [94] enregistre que la majeure partie de ces composés phénoliques des margines est dégradée pendant les premières 48h d'incubation où des taux de biodégradation égaux à 63,33% et 56,94%, respectivement pour les phénols totaux et les phénols simples .

En fin de la fermentation (à partir de 48h jusqu'à 96h d'incubation), l'addition des extraits phénoliques en général causent une diminution légère et non significative dans l'augmentation de la production de gaz par rapport au début d'incubation: 21,1%, 11,1%, 10,0%, 8,9%, 8,9%, 3,3% et 3,3% respectivement pour E.M.U.T.T., E.M.U.T.G., E.M.U.T.A., E.M.U.T.S, E.M.U.M.G, E.M.U.M.A. et E.M.U.M.S. Ceci pourrait être expliqué par un ralentissement dans la dégradation des composés phénoliques, et l'effet négatif qui peut être exercé par ces composés phénoliques sur le rôle du microbiote ruminal. En effet, il a été



noté qu'au-delà de 48 d'incubation, l'activité fermentaire du microbiote vis-à-vis des phénols totaux et des phénols simples baisse d'une manière significative [94]. Le même auteur observe les taux de biodégradation baissent de 8% et de 10,9%, respectivement pour les PT et les PS. Ceci pourrait être attribué à l'épuisement des composés phénoliques biodégradables dans le milieu de culture et/ou à la bioconversion des substrats en composés phénoliques stables et non biodégradables. En effet, des travaux ont montré que les produits de dégradation de certains composés phénoliques peuvent être plus toxiques que les composés initiaux. De nombreux auteurs ont démontré que la dégradation des polyphénols engendre la production de monomères simples qui peuvent être polymérisés et forment des tanins résistants à la biodégradation [72]. Ces derniers sont non biodégradables à cause de leur structure complexe et hétérogène et pourraient présenter un effet très toxique [29].

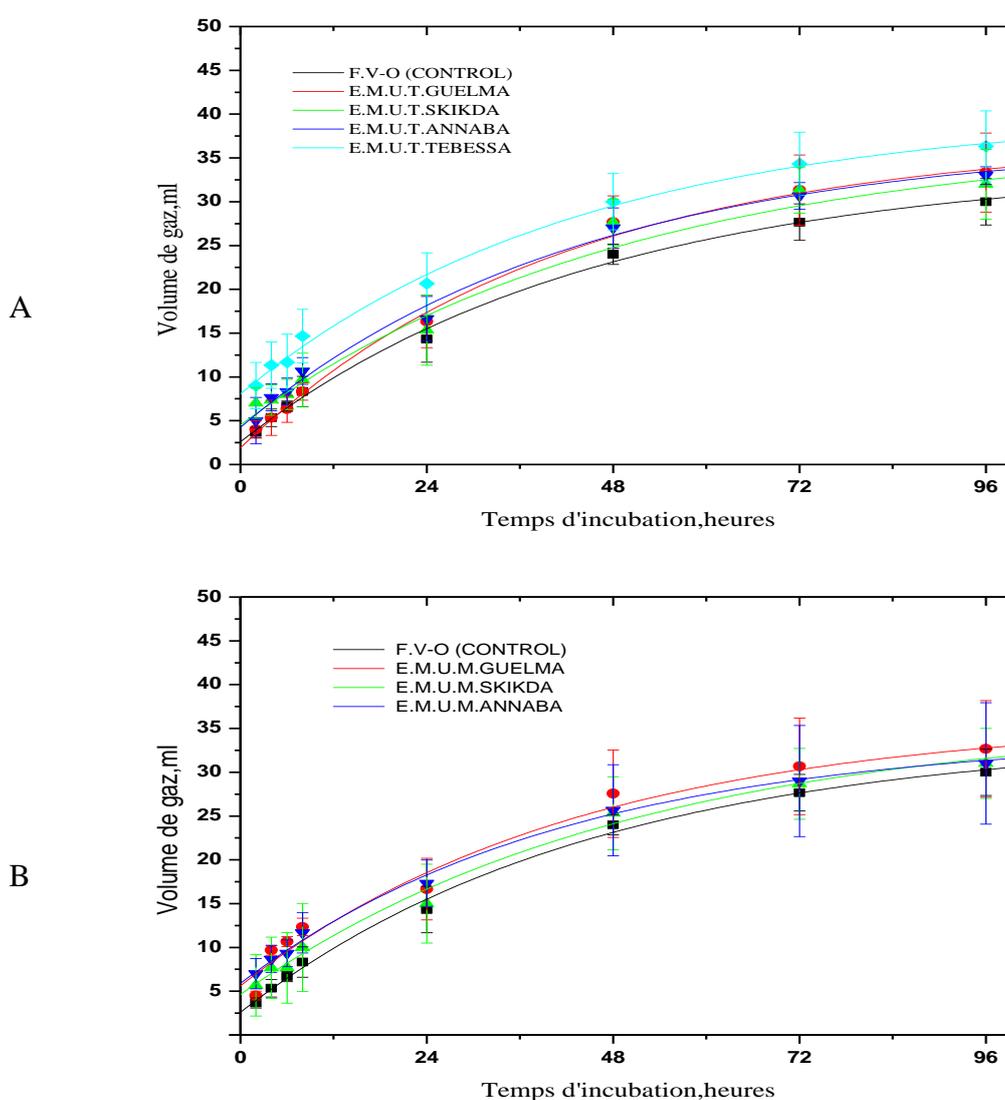


Figure n^o 17. Cinétique de production de gaz des mélanges du foin de vesce-avoine et des extraits des margines obtenues par trituration traditionnelle (A) et moderne (B).



III.2.1.3. Les paramètres de la production de gaz in vitro

Les paramètres de la fermentation des différents mélanges de foin de vesce-avoine et des extraits phénoliques des margines, déduits à partir du modèle exponentiel de McDonald et Ørskov [132] sont également mentionnés dans le tableau 7. Généralement, on constate que les valeurs du facteur (a) sont positives. Elles sont : 8,07, 5,90, 5,60, 4,62, 4,49, 4,25, et 1,89 ml/200mg MS, respectivement pour les mélanges de foin de vesce-avoine avec E.M.U.T.T., E.M.U.M.A., E.M.U.M.G, E.M.U.M.S., E.M.U.T.S, E.M.U.T.A., et E.M.U.T.G.

La valeur positive de la production de gaz engendrée par la fraction soluble (a) pour le foin de vesce-avoine (2,59ml/200mg MS) sont également signalées par d'autres auteurs [69]. Ils sont synonymes d'une absence de phase de latence due à la colonisation et à la dégradation de la fraction pariétale. La moyenne enregistrée est, cependant, plus proche à celle rapportée par [94] qui note une valeur de 3,04 ml. RIRA M. 2006 [145] enregistrée 4,09 ml et ayant travaillée dans les mêmes conditions.

Le tableau 7 montre que la production de gaz à partir de la fraction soluble (a) augmente significativement avec toutes les additions à l'exception de l'E.M.U.T.G. (P >5%). Cette augmentation résulte probablement de la métabolisation ruminale des composées phénoliques et du glucose issu de la dégradation des tanins hydrolysable (TH).

Le volume de gaz produit par la fraction insoluble mais potentiellement fermentescible (b) est relativement élevé pour tous les mélanges et le témoin, et statiquement comparable (P >5%). Sont : 35,36, 32,83, 32,81, 32,13, 31,59, 31,50 et 28,29 ml/200mg MS. respectivement pour : E.M.U.T.G, E.M.U.T.S, E.M.U.T.A., E.M.U.T.T., E.M.U.M.S., témoin, E.M.U.M.G et E.M.U.M.A. Pour le foin de vesce-avoine, le résultat obtenu est similaire à celle trouvée par BOULTIFAT L. 2008 [25] 31,24 ml/200mg MS.

Les vitesses de production de gaz (c) des différents mélanges de foin de vesce-avoine et des extraits des margines à partir de la fraction (b) sont significativement non différentes (P >5%). sont : 2,46, 2,45, 2,39, 2,30, 2,29, 2,22, 2,01 et 2,00 %h⁻¹ respectivement pour : E.M.U.T.G, E.M.U.M.A., E.M.U.M.G, E.M.U.T.A., E.M.U.T.T., témoin, E.M.U.M.S et E.M.U.T.S.

L'addition des extraits phénoliques des margines n'a pas d'effet sur la production gaz par la fraction insoluble mais potentiellement fermentescible (b) et sur la vitesse de la production de gaz (c) à partir de la fraction (b).



Tableau n° 8. Influence des extraits phénoliques des margines sur le profil fermentaire (productions de CH₄ et du CO₂) du foin de vesce-avoine.

	productions de méthane (CH ₄)					dioxyde de carbone (CO ₂)				
	T2	T6	T24	T72	T96	T2	T6	T24	T72	T96
<i>F. V-A</i>	0,67 ± 0,33	1,33 ± 0,33	3,84 ^{ab} ± 0,33	7,83 ^a ± 1,76	8,42 ^a ± 1,50	3,00 ^{bc} ± 0,33	5,33 ^c	10,50 ^b ± 1,76	19,83 ^b ± 2,52	21,58 ^b ± 3,20
<i>E.M.U.T. G.</i>	1,33 ± 0,58	1,42 ± 0,58	2,42 ^b ± 0,73	4,09 ^{bc} ± 0,83	4,34 ^c ± 0,92	2,67 ^c ± 0,58	4,92 ^c ± 0,67	13,91 ^{ab} ± 1,42	27,24 ^a ± 1,64	29,00 ^{ab} ± 1,82
<i>E.M.U.M. G.</i>	1,67 ± 0,33	1,92 ± 0,38	2,84 ^{ab} ± 0,71	3,84 ^c ± 0,71	4,00 ^c ± 0,71	2,83 ^{bc} ± 0,17	8,83 ^{ab} ± 0,63	13,83 ^{ab} ± 1,46	26,81 ± 2,59	28,66 ^{ab} ± 2,66
<i>E.M.U.T. S.</i>	1,50 ± 0,60	1,58 ± 0,60	2,92 ^{ab} ± 1,09	4,59 ^{bc} ± 1,42	4,75 ^{bc} ± 1,42	5,50 ^{ab} ± 0,44	6,42 ^{bc} ± 0,44	12,41 ^{ab} ± 1,59	26,74 ^{ab} ± 0,44	28,24 ^{ab} ± 1,01
<i>E.M.U.M. S.</i>	1,67 ± 0,67	2,17 ± 0,50	4,34 ^{ab} ± 0,60	6,34 ^{abc} ± 0,60	7,25 ^{abc} ± 0,44	4,00 ^{bc} ± 1,45	5,50 ^c ± 1,96	10,66 ^b ± 2,77	22,33 ^{ab} ± 2,47	24,08 ^{ab} ± 2,36
<i>E.M.U.T. A.</i>	1,33 ± 0,58	1,50 ± 0,58	3,67 ^{ab} ± 0,30	6,34 ^{abc} ± 0,65	6,84 ^{abc} ± 0,55	3,67 ^{bc} ± 1,15	6,83 ^{abc} ± 0,38	13,00 ^{ab} ± 1,23	24,33 ^{ab} ± 1,28	26,16 ^{ab} ± 1,06
<i>E.M.U.M. A.</i>	2,17 ± 0,44	3,08 ± 0,87	4,59 ^a ± 0,58	7,25 ^{ab} ± 1,18	7,92 ^{ab} ± 1,53	5,50 ^{ab} ± 0,17	6,25 ^{bc} ± 0,08	13,41 ^{ab} ± 1,42	24,08 ^{ab} ± 2,75	25,41 ^{ab} ± 2,67
<i>E.M.U.T. T.</i>	2,00 ± 0,44	2,08 ± 0,44	3,92 ^{ab} ± 0,44	5,92 ^{abc} ± 0,44	6,08 ^{abc} ± 0,44	7,00 ^a ± 1,17	9,58 ^a ± 1,50	16,82 ^a ± 1,94	28,41 ^a ± 2,09	30,41 ^a ± 2,61
<i>S.E.M</i>	0,49	0,53	0,60	0,98	1,05	0,83	0,98	1,78	2,15	2,39
<i>pr</i>	0,9064	0,5712	0,7227	0,8245	0,6594	0,4302	0,1318	0,9768	0,8113	0,8914



III.2.1.3.L'Analyse qualitative des gaz produits

Les cinétiques de production de dioxyde de carbone (CO₂) et du méthane (CH₄) au cours de la fermentation des différents mélanges de foin de vesce-avoine et des extraits phénoliques des margines sont illustrées par le tableau 8 et la fig 18.

En général, la fermentation des substrats engendre un profil fermentaire orienté principalement vers une production accrue en CO₂. Le rapport CO₂/CH₄ de foin de vesce-avoine 2.52, est similaire au résultat qui publie par GUETITCHA H. 2001 [68] 2.57.

les extraits phénoliques des margines induisent une augmentation significative (P >0,05) dans la production du dioxyde de carbone (CO₂) pour le foin de vesce-avoine sont de 40,92%, 34,38%, 32,81%, 30,86%, 21,22%, 17,75% et 11,58% respectivement pour E.M.U.T.T., E.M.U.T.G., E.M.U.M.G., E.M.U.T.S, E.M.U.T.A., E.M.U.M.A. et E.M.U.M.S. Ce gaz est produit soit directement de la dégradation des carbohydrates de substrat ingéré et/ou indirectement à partir du système tampon (HCO₃) lors de la neutralisation des acides gras volatils (AGV) générés [22,36]. Ce CO₂ représente environ plus de la moitié du volume total du gaz produit dans le cas de l'utilisation du tampon de Menke [22,113].

Par contre, pour la production de méthane (CH₄), les différents extraits phénoliques des margines causent une réduction significative (P >0,05).cette diminution est plus prononcée pour les extraits phénoliques des margines collectées de la région de GUELMA.

Durant les premières heures d'incubation, on note que les différents extraits phénoliques des margines stimulent la production de méthane de 131,58%, 63,16%, 56,39%, 44,36%, 18,80%, 12,78% et 6.77% respectivement pour E.M.U.M.A., E.M.U.M.S., E.M.U.T.T., E.M.U.M.G., E.M.U.T.S, E.M.U.T.A. et E.M.U.T.G. Cette augmentation est probablement due à la dégradation des composées phénoliques simples. En effet, des études rapportent que la dégradation complète de ces composées comme le cas du benzoate. La minéralisation complète de ce dernier dans les conditions ruminales engendre la formation de 50% de gaz total sous forme de méthane [75]. En outre, ce résultat pourrait être expliquer par la dégradation des tanins hydrolysables et, particulièrement, de l'acide gallique. La fermentation ruminale de ce composé aboutit à la production de butyrate et d'acétate [109].Ce profil fermentaire est associé à la production importante d'hydrogène dont l'élimination engendre une production accrue de gaz sous forme de méthane [108].

Après 96h d'incubation les taux de réductions de ch₄ enregistrés sont respectivement 52,49%, 48,46%, 43,59%, 27,79%, 18,76%, 13,90% et 5,94% pour E.M.U.M.G., E.M.U.T.G.,

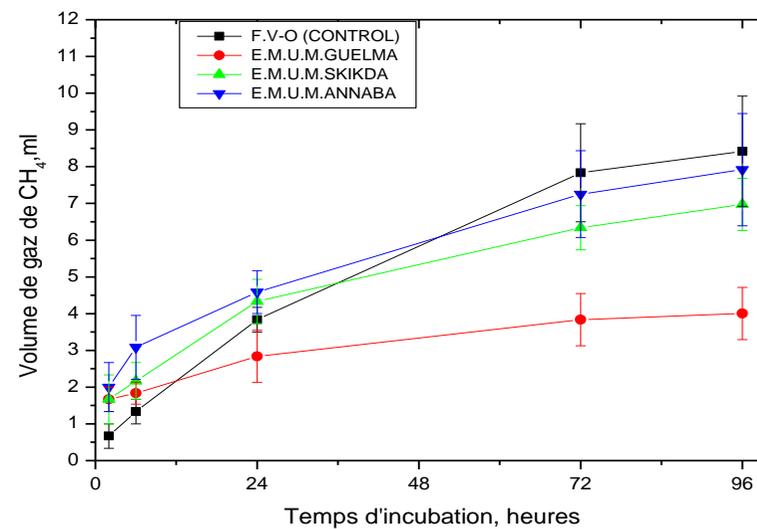
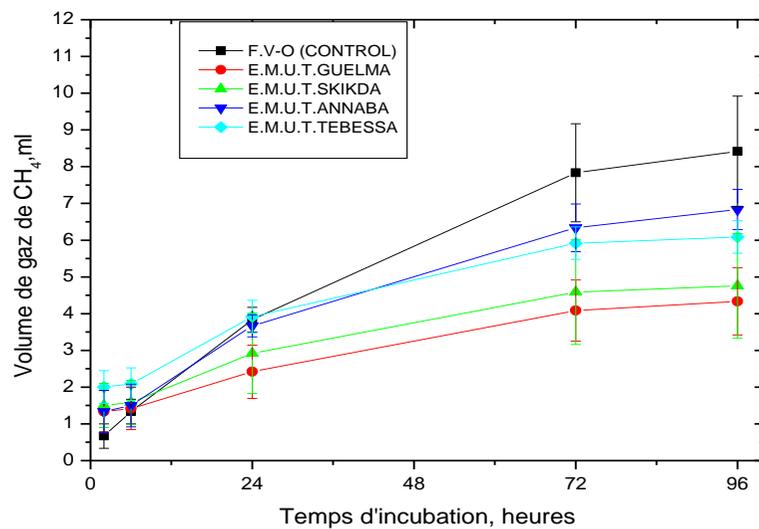
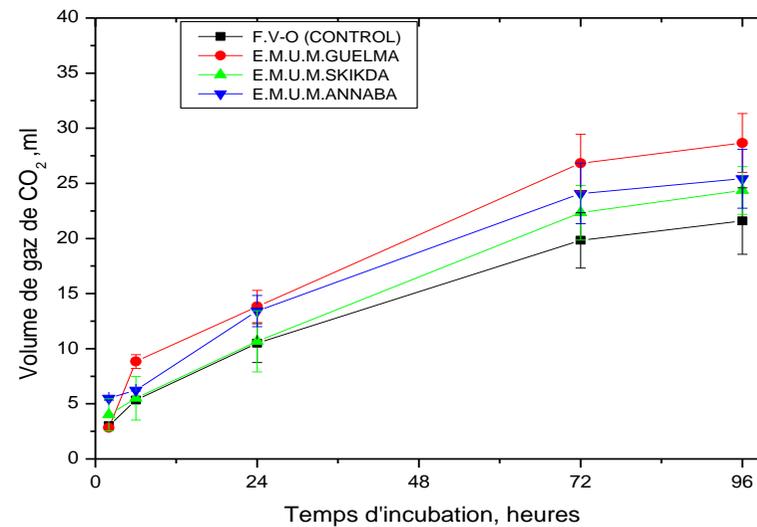
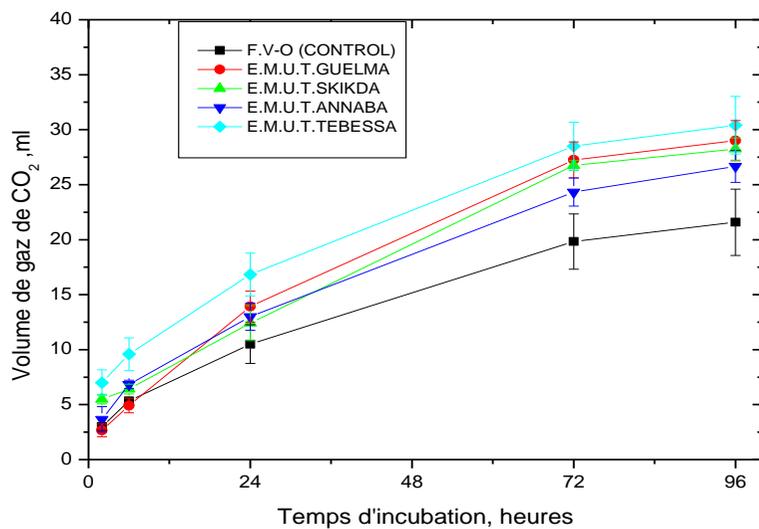


Figure n^o 18. Cinétique de production de (co₂ et ch₄) des mélanges du foin de vesce-avoine et des extraits des margines



E.M.U.T.S., E.M.U.T.T., E.M.U.T.A, E.M.U.M.S et E.M.U.M.A.. Ce résultat pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs rapportés dans la littérature. Ainsi, il est connu que les bactéries méthanogènes se retrouvent généralement liés intimement aux protozoaires ciliés [108, 91, 171], dont l'élimination par des complexes avec les tanins conduit forcément à une réduction de la méthanogènes de 35 à 45% [171, 82, 23]. Ceci laisse penser que les tanins ont un effet inhibiteur vis à vis des archaebactéries méthanogènes. Cette action peut être soit directe par l'inhibition de la croissance des archaebactéries méthanogènes ou indirecte soit par réduction de la production de l'hydrogène (H₂) [114] ou à l'accumulation des produits de dégradation de certains composés phénoliques qui peuvent être plus toxiques que les composés initiaux et inhibe la méthanogènes. Ces constatations sont faites pour le catéchol et le protocatéchuat, composés présents dans les margines, et qui sont pratiquement pas métabolisés dans les conditions d'anaérobiose régnants dans le rumen ou ils constituent de puissants facteurs d'inhibition de la méthanogènes ruminale [34]. Toutefois, plusieurs auteurs signalent que l'addition du PEG (polyéthylène glycol) augmente la production de méthane pour foin de vesce-avoine [94] et *Lotus Pedunculatus* [114]. Par contre, d'autres travaux montrent que le PEG n'a aucun effet sur la production de méthane pour *Medicago Sativa* et *Carduus pycnocephalus* [64]. 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 [165].



III.2.2. Influence du contenu phénolique des margines sur le profil fermentaire

III.2.2.1. pH

L'effet de l'addition des extraits phénoliques des margines sur le pH après 24h d'incubation est mentionné dans le tableau 9 et la fig19. Les extraits phénoliques des margines utilisés comme additif au foin de la vesce-avoine n'ont aucun effet sur le pH après 24h de fermentation ($P < 5\%$). Les valeurs de pH sont : 6,76, 6,76, 6,75, 6,72, 6,71, 6,70, 6,69 et 6,68 respectivement pour E.M.U.M.G., E.M.U.T.T., E.M.U.T.S., E.M.U.T.G., E.M.U.T.A, E.M.U.M.S et E.M.U.M.A. mais le pH reste dans la zone de neutralité. Ceci est dû à l'efficacité de la solution tampon utilisée [85]. Ces résultats sont similaires à ceux avancés par d'autres publications qui rapportent que l'incorporation du PEG n'a aucun effet significatif sur le pH [114,141]. Contrairement, certains auteurs indiquent que le PEG induit une augmentation significative de pH est remarquée ($P < 0,05$) [15], alors que d'autres travaux notent une diminution significative de pH après l'addition de PEG [180]. Ceci est expliqué par la stimulation de la dégradation des carbohydrates.

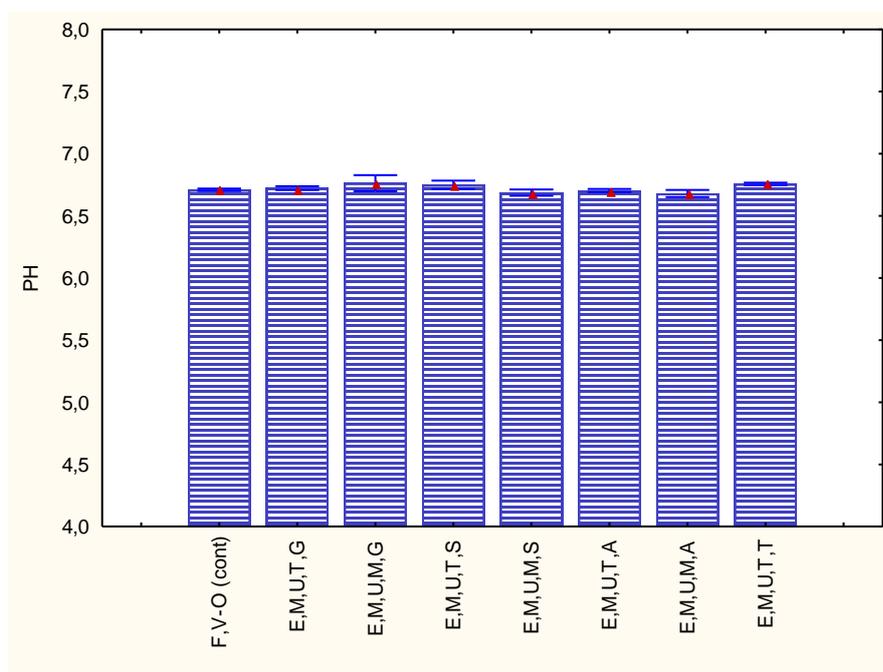


Figure n°19. Influence des extraits phénoliques des margines sur le pH après 24h d'incubation.



III.2.2.2. Production d'ammoniaque

Les résultats de la production d'ammoniaque ($N-NH_3$) enregistrés après 24 h d'incubation des mélanges du foin de vesce-avoine et des extraits phénoliques des margines sont illustrés également dans le tableau 9 et la fig 20. Il montre que les différents extraits phénoliques des margines causent une diminution significative dans la production d'ammoniaque après 24h d'incubation ($P > 0,05$) de 39,41%, 38,42%, 32,08%, 28,51%, 23,96%, 20,40% et 11,68% respectivement pour E.M.U.T.S., E.M.U.M.G., E.M.U.T.G., E.M.U.M.S., E.M.U.T.A., E.M.U.T.T et E.M.U.M.A.

La diminution de la production d'ammoniaque peut être due à l'inhibition de l'activité protéolytique ou peptidolytique des différents microorganismes surtout les protozoaires. ces derniers jouent un rôle primordial dans protéolyse où leur activité spécifique de désamination des acides aminés est trois fois supérieure à celle des bactéries [47]. Comme elle peut être la conséquence de l'inhibition spécifique de la désamination assurée principalement par les bactéries, plus exactement les bactéries hyper-productrice d'ammoniaque [83,111]. Cette diminution peut être expliquée aussi par une assimilation intense de ce macronutriment par les bactéries [07] et/ou sa transformation en protéines microbienne [84]. Comparativement à d'autres études, l'addition du PEG n'a pas d'effet significativement après 24 h de fermentation sur la production d'ammoniaque dans le cas du foin de vesce-avoine ($P > 0,05$) [94].

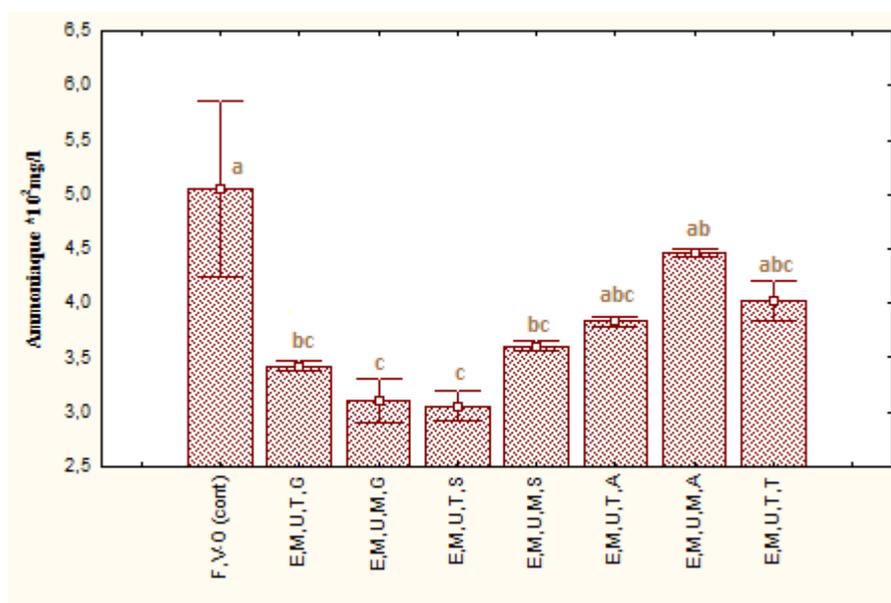


Figure n° 20. Influence des extraits phénoliques des margines sur la production d'ammoniaque après 24h d'incubation



III.2.2.3. Composition quantitative de la faune ruminale (protozoaires)

La variation quantitative de la faune ruminale entre les différents mélanges de foin de vesce-avoine et des extraits phénoliques des margines est également mentionnée dans le tableau 9 et la fig 21.

L'addition des différents extraits phénoliques des margines diminue le nombre de protozoaires de 64,33%, 62,95%, 56,65%, 47,55%, 42,30%, 39,53 et 37,39% respectivement pour E.M.U.M.A., E.M.U.T.T, E.M.U.M.S., E.M.U.T.A., E.M.U.T.G., E.M.U.M.G. et E.M.U.T.S. Cette diminution pourrait être expliquée par les effets des composés phénoliques vis-à-vis les protozoaires. Selon la littérature, la diminution de nombre des protozoaires est principalement liée à l'effet des tanins sur les protozoaires [63,87]. Ces molécules peuvent agir soit directement sur la faune ruminale (les protozoaires) en altérant leur métabolisme ou indirectement par leurs propriétés antiméthanogéniques. En effet, entre 9 et 25% des archaebactéries méthanogènes sont associées aux protozoaires ciliés qui leurs fournissent de l'hydrogène moléculaires (H_2) comme substrat énergétique.

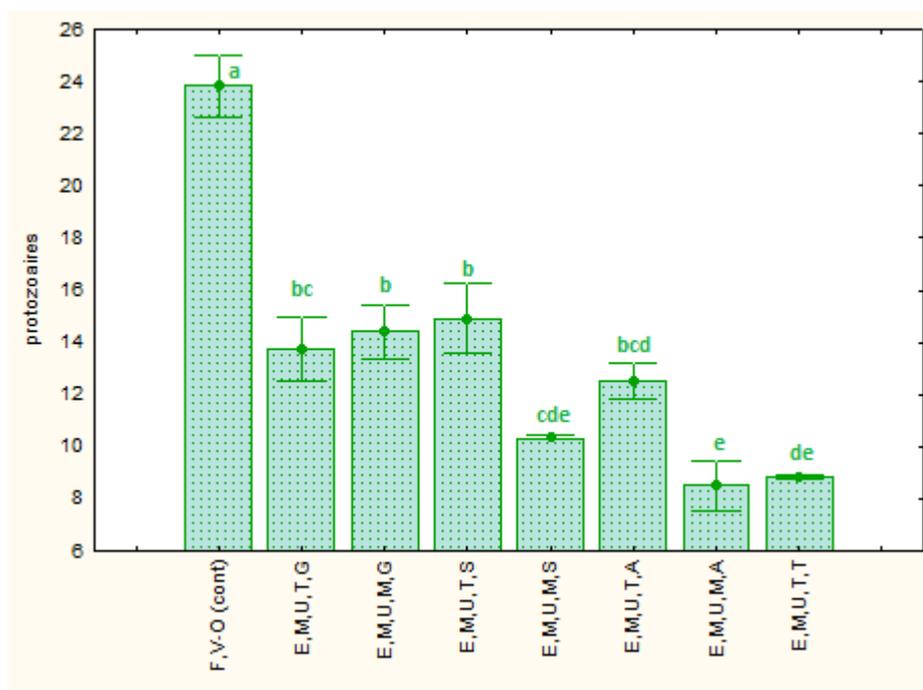


Figure n° 21. Influence des extraits phénoliques des margines sur le nombre de protozoaires (*10³cellules/ml) après 24h d'incubation.



Tableau n° 9. Influence des extraits phénoliques des margines sur le facies fermentaire (pH, N-NH3 (*10² mg/ml) et nombre de protozoaires (*10³ cellules/ml)) de la dégradation in vitro du foin de vesce -avoine.

	<i>F. V-A</i>	<i>E.M.U.T. G.</i>	<i>E.M.U.M.G.</i>	<i>E.M.U.T. S.</i>	<i>E.M.U.M. S.</i>	<i>E.M.U.T. A.</i>	<i>E.M.U.M.A.</i>	<i>E.M.U.T. T.</i>	<i>S.E.M</i>	<i>pr</i>
pH	6,71 ± 0,02	6,72 ± 0,02	6,76 ± 0,07	6,75 ± 0,04	6,69 ± 0,03	6,70 ± 0,01	6,68 ± 0,03	6,76 ± 0,02	0,03	0,5479
[Ammoniaque] *10²mg/l	5,05 ^a ± 0,85	3,43 ^{bc} ± 0,05	3,11 ^c ± 0,21	3,06 ^c ± 0,15	3,61 ^{bc} ± 0,05	3,84 ^{abc} ± 0,05	4,46 ^{ab} ± 0,04	4,02 ^{abc} ± 0,20	0,077	0,7310
Protozoaires *10³cellules/ml	23,83 ^a ± 1,97	13,75 ^{bc} ± 1,28	14,41 ^b ± 1,10	14,92 ^b ± 1,42	10,33 ^{cde} ± 0,08	12,5 ^{bcd} ± 0,75	8,50 ^e ± 1,01	8,83 ^{de} ± 0,08	1,19	0,1073

Tableau 10. Influence des extraits phénoliques des margines sur la digestibilité apparente (%) du foin de vesce -avoine.

	<i>F. V-A</i>	<i>E.M.U.T. G.</i>	<i>E.M.U.M.G.</i>	<i>E.M.U.T. S.</i>	<i>E.M.U.M. S.</i>	<i>E.M.U.T. A.</i>	<i>E.M.U.M.A.</i>	<i>E.M.U.T. T.</i>	<i>S.E.M</i>	<i>pr</i>
Digestibilité %	41,25 ^c ± 3,17	78,40 ^{ab} ± 6,95	89,93 ^a ± 1,88	50,58 ^c ± 6,07	69,12 ^b ± 8,99	72,35 ^{ab} ± 4,82	75,57 ^{ab} ± 0,80	49,62 ^c ± 5,45	5,62	0,4067



III.2.2. Influence du contenu phénolique des margines sur la digestibilité apparente

La dégradation de la matière sèche des différents mélanges de foin de vesce-avoine avec les extraits phénoliques des margines représentée par les coefficients de digestibilité (CD) est également mentionnée dans le tableau 10 et la fig 22. Pour le foin de vesce-avoine, nos résultats sont inférieurs à ceux enregistrés par certains auteurs qui signalent des valeurs qui restent du même ordre. RIRA M. 2006 [145] enregistre une valeur de 50,90% de même que ARHAB R. 2007 [20] qui note un coefficient de 58,38%. Une autre étude menée par ARHAB R. 1999 [06] sur le microbrite ruminal de dromadaire enregistre une valeur de 65,06%. L'addition de les extraits phénoliques des margines augmente significativement le CD de foin de vesce-avoine ($P > 0,05$). L'augmentation la plus importante est enregistrée pour les mélanges de foin de vesce-avoine avec les extraits phénoliques des margines colletées de la région de Guelma (118,01% pour E.M.U.M. et 90,06% pour E.M.U.T), suivi les extraits phénoliques des margines colletées de la région de la région de Annaba (83,20% pour E.M.U.M. et 75,39% pour E.M.U.T), la région de Skikda (67,56% pour E.M.U.M. et 22,62% pour E.M.U.T) et enfin, l'E.M.U.T.T. a enregistré une augmentation plus faible (20,29 %). Cette augmentation peut être due à la diminution de nombre des protozoaires. L'élimination des protozoaires provoque une augmentation du nombre total de bactéries qui s'explique par l'absence de prédation. Cette prédation pouvant être sélective, la défaunation agit non seulement sur le nombre de bactéries, mais aussi sur la composition du mélange bactérien, ainsi, par exemple, la concentration de bactéries amylolytiques augmente. Alors que l'amidon favorise la production de propionate et diminue la méthanogènes et réduit la perte d'azote sous forme d'ammoniaque [83].

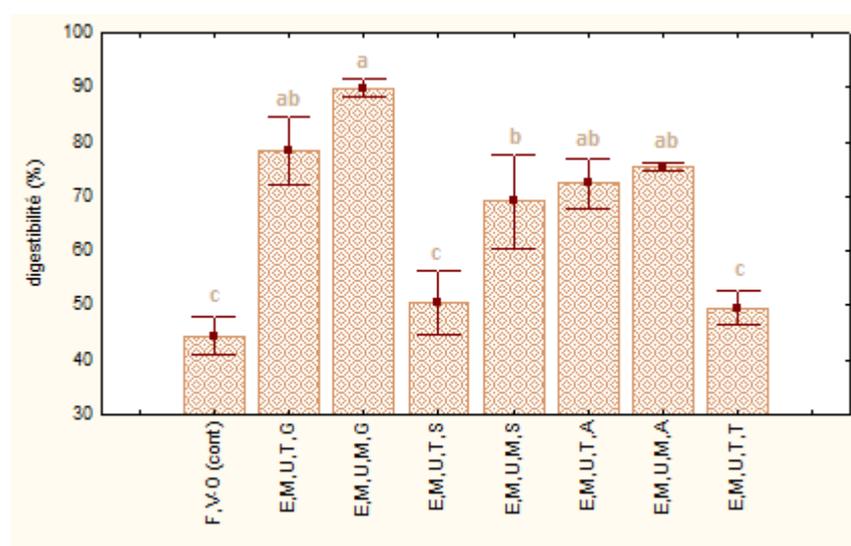


Figure n°22. Influence des extraits phénoliques des margines sur la digestibilité apparente (%) du foin de vesce -avoine.

discussion et conclusion générale



L'industrie d'extraction d'huile d'olive pose de sérieux problèmes environnementaux. Les margines ne subissent aucun traitement et sont souvent déversés dans les égouts d'assainissement, stockés dans des bassins d'évaporation ou épandus directement sur le sol. Il en résulte un impact négatif sur l'environnement qui se traduit par le colmatage des sols, la pollution des eaux superficielles et souterraines et le dégagement d'odeurs nauséabondes. Ces problèmes environnementaux sont attribués à la richesse des effluents en matière organique et en particulier en polyphénols qui sont responsables d'effets phytotoxiques et antimicrobiens. L'objectif assigné à ce travail est l'étude de l'effet du contenu phénolique extrait des margines issues de deux modes de trituration sur la méthanogénèse ruminale *in vitro*. Dans cette optique, sept échantillons de margines sont collectées dans quatre régions productrices d'huile d'olive à savoir GUELMA, SKIKDA, ANNABA et TEBESSA. Le contenu phénolique de chaque échantillon est extrait à l'acétate d'éthyle après une étape de délipidation. les extraits phénoliques sont soumise à une analyse phytochimique. Par la suite, ces extraits sont utilisés comme additif au foin de vesce-avoine dans le but d'étudier l'impact des composées phénolique sur l'activité fermentaire du microbiote ruminal.

Les résultats du dosage des composées phénoliques des différents extraits des margines, révèlent leurs richesse en phénols totaux et en tanins totaux. En revanche, ils caractérisent par leur teneur faible en tanins condensés et en flavonoïdes. La variabilité dans les concentrations des différents composées phénoliques dans les margines dépend de plusieurs facteurs, essentiellement du processus d'extraction. Les teneurs les plus élevées sont enregistrées pour les E.M.U.T et les plus faible sont enregistrées pour les E.M.U.M. la faible concentration en composées phénoliques des extraits de margines des unités modernes, est principalement due à l'ajout de grandes quantités de l'eau lors de deux centrifugations, par contre, l'extraction par le système à presse se fait sans addition significative d'eau, ce qui se répercute sur la charge des margines en composées phénoliques.

En ce qui concerne les résultats de la production de gaz *in vitro*, l'inclusion des différents mélanges de foin de vesce-avoine et des extraits des margines n'a aucun effet sur la production de gaz *in vitro*. En revanche, une stimulation non significative dans la production de gaz. Cette augmentation, est probablement due à la dégradation des composées phénolique par les microbiots ruminales.

Pour les paramètres de la fermentation des différents mélanges de foin de vesce-avoine et des extraits phénoliques des margines, déduits à partir du modèle exponentiel de Mc



Donald et Ørskov L'addition des extraits phénoliques des margines n'a pas d'effet sur la production gaz par la fraction insoluble mais potentiellement fermentescible (b) et sur la vitesse de la production de gaz (c) à partir de la fraction (b). En revanche, une stimulation la production de gaz à partir de la fraction soluble (a). Cette augmentation résulte probablement de la métabolisation ruminale des composées phénoliques et du glucose issu de la dégradation des tanins hydrolysable (TH).

L'analyse qualitative de gaz de fermentation montre que les extraits phénoliques des margines causent une réduction significative ($P > 0,05$). cette diminution est plus prononcée pour les extraits phénoliques des margines collectées de la région de GUELMA. Durant les premières heures d'incubation les extraits phénoliques des margines induisent une augmentation dans la production CH_4 . Mai après 96h d'incubation les contenus phénoliques induisent une réduction dans la production de méthane. les taux de réductions de CH_4 enregistrés sont respectivement 52,49%, 48,46%, 43,59%, 27,79%, 18,76%, 13,90% et 5,94% pour E.M.U.M.G., E.M.U.T.G., E.M.U.T.S., E.M.U.T.T., E.M.U.T.A, E.M.U.M.S et E.M.U.M.A.. L'augmentation dans la production de méthane est probablement due à la dégradation des composées phénoliques simples. En revanche, la réduction de CH_4 pourrait être due soit directe par l'inhibition de la croissance des archaebactéries méthanogènes ou indirecte par réduction de la production de l'hydrogène (H_2) ou à l'accumulation des produit de dégradation de certains composées phénoliques qui peuvent être plus toxique que les composée initiaux et inhibe la méthanogènes.

L'étude de l'influence du contenu phénolique des margines sur le profil fermentaire montre que L'addition des différents extraits phénoliques des margines diminue le nombre de protozoaires de 64,33%, 62,95%, 56,65%, 47,55%, 42,30%, 39,53 et 37,39% respectivement pour E.M.U.M.A., E.M.U.T.T, E.M.U.M.S., E.M.U.T.A., E.M.U.T.G., E.M.U.M.G. et E.M.U.T.S. Cette diminution pourrait être expliquée par les effets des composées phénoliques vis-à-vis les protozoaires. En outre, cette diminution est corroborée à une réduction dans de la production d'ammoniaque et une augmentation dans les coefficients de digestibilité. L'élimination des protozoaires provoque une augmentation du nombre total de bactéries qui s'explique par l'absence de prédation. Cette prédation pouvant être sélective, la défaunation agit non seulement sur le nombre de bactéries, mais aussi sur la composition du mélange bactérien, ainsi, par exemple, la concentration de bactéries amylolytiques augmente. Alors que l'amidon favorise la production de propionate et diminue la méthanogènes et réduit la perte d'azote sous forme d'ammoniaque.



Ces résultats indiquent la possibilité d'usage des composés phénoliques des margines comme additifs alimentaires dans la réduction de la méthanogène ruminale. Il reste cependant, nécessaire de définir la nature chimique des composés phénoliques présentes dans chaque extrait, de conduire un complément d'étude pour déterminer leur devenir métabolique dans le rumen, et de définir leurs activités sur les principales enzymes cellulolytiques et la composition quantitative de principales composantes microbiennes du rumen.

Références

bibliographiques



1. **Adoui M. (2001).** Etude de la digestibilité de résidus agroalimentaires par la microflore ruminale d'ovins. Thèse de magistère. ISN. Université de Constantine, 68p.
2. **Aissam H (2003).** Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. Thèse de doctorat national. Université sidi mohamed ben abdellah. Fes. 156p.
3. **Aissam H., Errachidi F., Merzouki M., Benlemlih M. (2002).** Identification des levures isolées des margines et étude de leur activité catalase. Cahiers de l'Association Scientifique Européenne pour l'Eau et la Santé. 7: 23-30.
4. **Aktas, E.S., Imre, S., Ersoym, L., (2001).** Characterization and lime treatment of olive mill wastewater. Water Research. 35 (9) :2336–2340.
5. **Annaki A., Chaouch M., Rafiq M. (1999)** Influence de la durée du stockage des olives sur l'évolution de la composition des margines. L'eau. L'industrie. Les nuisances . 218 :24-28.
6. **Arhab R.(1999).** Etude de la digestibilité *in vitro* de sous-produits agroalimentaires et de la cellulose purifiées par la microflore ruminal de camélidies. Utilisation des gaz fermentaires comme marqueurs de fermentation. Thèse de magistère. ISN. Université de Constantine. 93p.
7. **Arhab R., (2007).** Etude de la fermentescibilité *in vitro* et de la digestibilité *in vivo* de végétaux des zones arides et de sous produits de l'agronomie saharienne par l'estimation de l'activité métabolique du microbiote ruminal d'ovins. Thèse de Doctorat. Université Mentouri Constantine. Algérie. 204 p.
8. **Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A. & Legret, P. (1994).** Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. Journal de Pharmacie de Belgique 49 (6) :462-46.
9. **Balice V., Carrieri C., Carrieri G. (1997).** Trattamento chimico-fisico seguito dal biologico delle acque di vegetazione delle olive, Ricerca. 2 :50-53.
10. **Balice V., Carrieri C., Cera O. (1990).** Caratteristiche delle acque di vegetazione. Rivista Italiana Sostanze Grasse. 67:9-16.
11. **Balice V., Cera O. (1984)** Acidic phenolic fraction of the juice of olives determined by gas chromatography method. Grasas y Aceites. 25:178 – 180.
12. **Barry T.N. and McNabb W.C. (1999).** The implication of condensed tannins on nutritive value of temperate forages fed to ruminants. Brit. J. Nutr. 81 : 263-272.
13. **Bazoti F.N., Gikas E., Skaltsounis A.L, Tsaibopoulos A., (2006).** Development of a liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC–ESI



MS/MS) method for the quantification of bioactive substances present in olive oil mill wastewaters. *Analytica Chimica Acta* 573–574, 258–266.

14. Bensemmane A. (2009). Le trait d'union des opérateurs économiques pour le Renouveau du Monde Agricole et Rural. 1er forum méditerranéen de l'oléiculture. 1111-4762.

15. Benyahia N., Zein K. (2003). Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. Contribution spéciale de Sustainable Business Associates (Suisse) à SESEC II, pp 2-7.

16. Bergey D.H. (1994). The methanogens. In *Bergey's Manual of Determination Bacteriology*. Edited by Holt G.J, 9eme Ed. p. 719-725.

17. Bernalier A., Fonty G., Bonnemoy F. and Gouet P. (1993). Inhibition of cellulotic activity of *Neocalimastix fromalis* by *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Gen. Microbiol.*1389 : 873-880.

18. Bernalier A., Fonty G. and Gouet P. (1991). Cellulose degradation by two rumen anaerobic fungi monoculture with rumen bacteria. *Animal Feed Science and Technology*. 32 :131-136.

19. Besle J.M., Jouany J.P. (1990). La biomasse pariétale des fourrages et sa valorisation par les herbivores. *INRA Prod. Anim.* 3 (1): 39-50.

20. Blake, D. R., and F. S. Rowland (1988), Continuing world-wide increase in tropospheric methane, 1978 – 1987, *Science*. 239:1129 – 1131.

21. Blaxter K.L., Clappetron J.L. (1965). Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *Br. J. Nutr.*

22. Blummel M., Makkar H.P.S. and Beker K. (1997). In vitro gas production: a technique revisited. In: *J. Anim. Physiol. And Anim. Nutr.* 77: 24-34.

23. Blummel M. , Orskov E.R. (1993). Comparison of gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 40, 109-119.

24. Bouaziz M., Hammami H., Bouallagui Z., Jemai H., Sayadi S. (2008). Production of antioxidants from olive processing by-products. *Electronic journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry.*7(8):3231-3236.

25. Boultifat L.(2008). Evaluation de la contribution spécifique des fractions soluble et insoluble de sous- produits de l'agronomie saharienne à la méthanogénèse ruminale d'ovins. Thèse Magister. Université de Constantine.87p



26. **Buldini P.L., Mevoli A., Quirini A. (2000).** On-line microdialysis-ion chromatographic determination of inorganic anions in olive-oil mill wastewater. *J Chromatogr A*. **882** (1-2), 321-8.
27. **Burk A.D. and Turabasso P.A. (2000).** Antibiosis between ruminal bacteria and ruminal fungi. *Applied Environmental Microbiology*. 66 (7) : 2921-2927.
28. **Cannas A.** www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin/pos_effects.html - 6k -
29. **Capasso R. (1997).** The chemistry, biotechnology and ecotoxicology of the polyphenols naturally occurring in vegetable wastes. *Current Tropical Phytochemistry., Resertrsh Trends*,1 :145-156.
30. **Chamkha M., Labat M., Bharat K. C. P., Jean-Louis G. (2001).** Isolation of a cinnamic acid-metabolizing *Clostridium glycolicum* strain from oil mill wastewaters and emendation of the species description. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51 : 2049–2054.
31. **Chamrani C. (1994).** Etude et possibilités du traitement physico-chimique des margines des huileries d'olive du Maroc, Mémoire d'ingénieur d'état. IAV, Rabat. Maroc
32. **Chaney A. L., Marbach E.P. (1962).** Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*. 8:130–132.
33. **Chenost, Kayouli . (1997).** Utilisation des fourrages grossiers en régions chaudes. In : Etude FAO Production et Santé Animales. Ed FAO (Rome): 135.
34. **Clark, F. M., and L. R. Fina. (1952).** The anaerobic decomposition of benzoic acid during methane fermentation. *Arch. Biochem*. 36:26-32.
35. **C.O.I. (1990).** Amélioration de la qualité de l'huile d'olive. Conseil Oléicole International-Madrid.
36. **Cone J.W. and Van Gelder A.H.(1999).** Influence of protein fermentation on gas production profiles. *Anim. Feed Sci. and Tec*. 76: 251-264.
37. **Cossu R., Blakey N., Cannas P. (1993).** Influence of codisposal of municipal solid waste and olive vegetation water on anaerobic digestion of sanitary landfill. *Water Sciences Technology*. 27: 261-271.
38. **Crutzen P.J., Asehman I., Seiller W.(1986).** Methane production by domestic animals, wild ruminants and other herbivores and human. 38:271-281.
39. **DellaGreca M., Monaco P., Pinto G., Pollio A., Previtiera L., Temussi F. (2001).** Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill waste waters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 67: 352-359.
40. **De Marco E., Savarese M., Paduano A., Sacchi R. (2007).** Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil. *Food chemistry*.104 : 858-867.



41. **Di-Giovacchino L., Mascolo A., Seghitti L. (1988).** Sulle caratteristiche delle acque di vegetazione delle olive. *La Rivista delle Sotanze Grasse*. 65.
42. **Druyne T. (1999).** Condensed vegetable tannins :biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and ecology*. 27.(4): 445-459.
43. **El Alami B. (2000).** Contribution à l'étude de l'activité anti-oxydante de la fraction phénolique des margines. Mémoire de 3ème cycle, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc. 93 p.
44. **El hajjouji H. (2007).** Evolution des caractéristiques physico-chimiques, spectroscopiques et écotoxicologiques des effluents d'huileries d'olive au cours de traitements biologique et chimique. Thèse doctorat. Université de Marakech.147p
45. **Ercoli E., Ertola R. (1983).** SCP production from olive black water. *Biotechnol. Lett.*7: 457 462.
46. **Ergüder T.H., Guven E., Demirer G.N. (2000).** Anaerobic treatment of olive mill wastes in batch reactors. *Process Biochem.*36 (3): 243-248.
47. **Eugene M. (2002).** Effets de la défaunation de ruminants sur les performances de production, en fonction de la ration ingérée. Etude des variations de la protéosynthèse et de la cellulolyse microbienne ruminale. Thèse de doctorat de l'institut national agronomique. paris-grignon. 122p.
48. **Fedeli E. (1977).** Lipids of olives. *Pros. Chem. Fats other lipids.*15, 57-74.
49. **Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1986).** Possibilidades de utilizacion del alpechin como fertilizante. Simposio Internacional. Sobre Valorizacion de los subproductos del olivar : alpechin y orujo. 5-6-7 Marzo, Sevilla- Aspana. 321-330.
50. **Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1977).** Problemas del aprovechamiento y depuracion de las aguas residuales de las almazaras. XIII. Reunion plenaria asamblea miembros del instituto de la Grasa y Sus Derivados.
51. **Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1981).** Différentes utilisations des margines : Actes séminaire international sur la valorisation des sous-produits de l'olivier. FAO-UNDP. Tunisie, pp 93-110.
52. **Fiestas Ros de Ursinos, J.A., Borja R. (1992)** Use and treatment of olive mill wastewater : Current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites*. 2:101-106.
53. **Fievez V., Babayemi O.J., Demeyer D. (2005).** Estimation of direct and indirect gas production that requires minimal laboratory facilities. *Anim. Feed. Sci. Tech.*
54. **Finlay B.J., Esteban G., Clarck K.J., Williams A.G., Embley T.M. (1994).** Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS. Microbi. Lett.* 117: 157-162.



55. Fki I., Allouche N., Sayadi S. (2005). The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenol acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*. 93 : 197-204.
56. Fonty G. et Chaucheyras-Durand F. (2007). Les écosystèmes digestifs. (Eds), Technique & Documentation, Paris, pp. 79-265.
57. Fonty G. et Forano E. (1999). Ecologie de la dégradation et de la fermentation des polyosides constitutifs des parois végétales dans le rumen. *Cahier Agriculture*. 8 (1): 21-35.
58. Fonty G., Joblin K.N. (1991). Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with other microorganisms in relation to fiber digestion. In: *Physiological aspect of digestion and metabolism in ruminants. Proceeding of the Seventh International Symposium on Ruminants Physiology*. Academic Press, San Diego, California. p 655-680.
59. Fonty G., Jouany J.P., Forano E. et Gouet Ph. (1986). Interaction entre espèces microbiennes dans le rumen. *Reprod. Nutr. Dev.* 26 : 147-159.
60. Fonty G., Jouany J.P., Forano E. et Gouet Ph. (1994). L'écosystème microbien du reticulo- rumen. In : *Nutrition des Ruminants Domestiques, Ingestion et digestion*. Jarrige R., Ruckesusch Y., Demarquilly C., Farce M-H. et Journet M. (Eds), Paris, France, pp.299-348.
61. Francesco G.L. (1993). Evaluations économiques sur l'innovation technologique. Les problèmes de l'environnement dans le secteur oléicole en Italie. *Olivae*. 47:15-20.
62. Georgé, S., Brat, P., Alter, P., and Amiot, M.J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant derived product, *J.Agric.Food Chem.*53: 1370-1373.
63. Getachew G., Makkar H.P.S. and Becker K. (2000). Tannins in tropical browses: Effects on *in vitro* microbial fermentation and microbial protein synthesis in media containing different amounts of nitrogen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 : 3581-3588.
64. Goel G., Makkar H. P.S., Becker K . (2008). Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. *Animal Feed Science and Technology* .147 : 72-89.
65. Goncalves L.M.B.O. and Borsa E.S. (1996). Study of gas production capacity by three sources of inocula. *J. Agric. Sci. Camb.* 127:511-515.
66. Grenet E. (1997). Aspects microscopiques de la dégradation microbienne des tissus végétaux dans le rumen. *INRA Prod. Anim.* 10 (3): 241-249.
67. Grenet E., Barry P. (1988). Colonization of thick- walled plant tissues by anaerobic fungi. *Anim. Feed Sci. Technol.* 19 :25-31.



68. **Guetitcha H. (2001).** Étude de la fermentescibilité in vitro de sous-produits agro-industriels par la microflore rumianle de caprins. Thèse de magistère. ISN. Université de Constantine, 88p.
69. **Haj-Ayed M., Gonzalez J., Caballero R. and Alvir M.R. (2000).** Nutritive value of on-farm common vetch-oat hays. II. Ruminant degradability of dry matter and crude protein. *Animal Zootechnics*. 49 : 391-398.
70. **Hamdi M. (1991)** Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines, effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive, Thèse de l'université de Provence. Marseille, France.
71. **Hamdi M. (1993).** Future prospects and constraints of olive mill waste waters use and treatment : A. Review. *Bioprocess Engineering*. 8: 209-214.
72. **Hamdi M., Ellouz P. (1993).** Treatment of detoxified olive mill wastewater's by anaerobic filter and aerobic fluidized bed processes. *Environmental Technology*. 14:183-188.
73. **Hamdi M., Garcia J.L. (1993)** Anaerobic digestion of olive mill wastewaters after detoxification by prior culture of *Aspergillus niger*. *Process Biochem*. 28:155-159.
74. **Harborne, J.B. (1980).** Secondary Plant Products. *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol 8, Bell EA, Charlwood BV, eds, Springer-Verlag, Berlin, 1980, pp.329-402. In: Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Macheix, J.J., Fleriet, A., Christian, A. 2005. PPTUR Lausanne
75. **Heider J., Fuchs G. (1997).** Microbial Anaerobic Aromatic Metabolism. *Anaerobie. Mikrobiologie*, 3 : 1-22. Institut für Biologie II, University at Freiburg, Freiburg, Germany. 3: 1-22.
76. **Heller W, Forkmann G. (1993).** The flavonoids advances in research since 1986.
77. **Hiura T., Hashidoko Y., Kobayashi Y., Tahara S. (2010).** Effective degradation of tannic acid by immobilized rumen microbes of a sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in winter. *Animal Feed Science and Technology*. 155 : 1-8.
78. **Hopkins, W.G. (2003).** Physiologie végétale. Edition Debock et lancier. Pp 276.
79. **IOM. (2004).** Industrie oléicole au Maroc et son impact sur l'environnement : Propositions d'actions de lutte contre la pollution générée par les huileries d'olives, cas de la province de Taounate. 14 p.
80. **Jarrige R. (1988).** Ingestion et digestion des aliments. In : Alimentation des bovins, ovins et caprins. (Eds), INRA, Paris, pp. 29-56.
81. **Jean-Marc Jancovici.** Les puits de carbone ne vont-ils pas absorber le surplus de CO₂ , <http://www.manicore.com/documentation/serre/puits.html>



- 82. Jouany J.P., (1991).** Defaunation of the rumen. In : Rumen Microbial metabolism and ruminant digestion. (ed J.P. Jouany).pp:239-261.
- 83. Jouany J.P. (1994).** Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. INRA Prod. Anim. 7 (3) : 207-225.
- 84. Jouany J.P., Reoerant J.M. (2007).** Propositions pour une démarche d'évaluation de substances ou de produits « nouveaux » destinés à l'alimentation animale Cas particulier des substances et produits à base de plantes. Agence française de sécurité sanitaire des aliments.
- 85. Juul N. (1981).** *In vitro* feed test for evaluation of energetic and productive energy resources for cattle feeding. *Tropical Animals Production*. 6: 287-299.
- 86. Kamara D.N. (2005).** Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, 89 (1): 124-131.
- 87. Kamara D.N., Agarwal N., Chaudhary L.C., (2006).** Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series*. 1293 : 156–163.
- 88. Khoufi S., Aloui F., Sayadi S., (2006).** Treatment of olive oil mill wastewater by combined process electro-Fenton reaction and anaerobic digestion. *Water Research*. 40:2007-2016.
- 89. Knupp G., Rücker G., Ramos-Cormenzana A., Garrido Hoyos S., Neugebauer M., Ossenkop T. (1996).** Problems of identifying phenolic compounds during the microbial degradation of olive mill waste water. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 38:277-282.
- 90. Komisarczuk- bony S., Durand M. (1991).** Effects of minerals on microbial metabolism. In: Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. Ed. INRA. 179-198.
- 91. Krumholz L.R., Forsberg C.W., Veira D.M. (1983).** Association of methanogenic bacteria with rumen protozoa. *Can. J. Microb.* 29: 676-680.
- 92. Laila Mandi¹, Mounia Achak¹, Abdellatif Hafidi², Naaila Ouazzani¹, (2009):**Low cost bio-sorbent for the removal of phenolic compounds from olive mill wastewater, *Options Méditerranéennes, Technological Perspectives for Rational Use of Water Resources in the Mediterranean Region* A n° 88..
- 93. Leinmüller E., Steingass H. and Menke K.H. (1991).** Tannins in Ruminant feed stuff. Institute of Animal Nutrition, University of Hohenheim (Germany).
- 94. Leulmi N. (2011).** La valorisation nutritionnelle des margines et de leur impact sur la réduction de la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Thèse de magistère. ISN. Université de Constantine, 101p.



95. Levi-Minzi R., Saviozzi R., Riffaldi A.R., Falzo L. (1992). L'épandage au champ des margines : effets sur les propriétés du sol. *Olivae*. 40: 20-25.
96. Lioyd D., Ralphs J., Durant L., Williams A.G., Ralph J.R., Amann R. (1994). Studies of the bacterial endosymbionts of anaerobic protozoa using fluorescently labelled rRNA targeted oligonucleotide probes. *Biochem. Soc. Trans.* 22: 5323.
97. Loulan P.Y., Thelier Y. (1987). Procédé et dispositif de traitement par fermentation méthanique des eaux résiduaires lipidiques, Brevet français, 2620439.
98. Maarouf A. (2000). Dictionnaire botanique PP 129.
99. Macheix, J.J., Fleuriet, A et Billot, J. (1990). Fruit phenolics, CRC press, Boca Roton. In : les polyphenols en agroalimentaire Sarni-Manchado P, Cheyner V. 2006., Tec et Doc Lavoisier-Paris.
100. Makkar H.P.S. (2000). Recent advances in the *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. Animal Production and Health Section Joint FAO/IAEA Division International Atomic Energy Agency Vienna (Austria).
101. Makkar H.P.S. (2003). Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*. 49 : 241-256.
102. Makkar H.P.S., Blümmel M., Borowy N.K. and Becker K. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal Science Food Agricultur*. 61 : 161-165.
103. Marisot A., Tournier J.P. (1986). Répercussions agronomique de l'épandage d'effluents et déchets de moulins à huile d'olive. *Agronomie*. 6: 235-241.
104. Martilotti F. (1993). Use of olive by-products in animal feeding in Italy. Division de la production et de la santé animale. FAO. Rome. 56-62.
105. Martin C., Morgavi D., Doreau M., Jouany J.P. (2006). Comment réduire la production de méthane chez les ruminants ? *Fourrages*. 187: 283-300.
106. Matthias B., Georg F., Johann H. (2002). Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Current Opinion in Chemical Biology*. 6 : 604-611.
107. Mc Allister T.A. (1997). Dietary and environmental aspect of methane production in ruminants. *Agri. Food. And Rur. Deve. Canada*.
108. Mc Allister T.A., Okine E. K., Mathison G. W., Cheng K.-J., (1996). Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*. 76 (2):231-243.



109. **Mc Sweeney C.S., Palmer B., McNeill D.M. and Krause D.O. (2001).** Microbial interaction with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 91: 83-93.
110. **Mebirouk M. (2002).** Rejets des huileries. Développement d'un procédé intégré dans la biodégradation des polyphénols dans la margine. *CMPP News*, n°11.
111. **Medini H., Elaissi A., Khoujad F. F. M. L., Chemli R., Harzallah-Skhiri F., (2009).** Seasonal and Geographical Influences on the Chemical Composition of *Juniperus phoenicea* L. Essential Oil Leaves from the Northern Tunisia. *Chemistry & Biodiversity*. 6 : 1378–1387.
112. **Menke K.H., Raab L., Salewski A., Steingass H., Friz D., Schneider W. 1979.** The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J. Agri. Sci. Casab.*92: 217-222.
113. **Menke K.H., Steingass H. (1988).** Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid, *Anim. Res. Dev.*28: 7-55.
114. **Michael H. T., Lucy P. M., David P., Nicola W., Graeme T.A., Subathira S. (2005).** Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*. 123–124, 403–419.
115. **Millan B., Lucas R., Robles A., García T., Alvarez de Cienfuegos G., Gálvez A. (2000).** A study on the microbiota from olive-mill wastewater (OMW) disposal lagoons, with emphasis on filamentous fungi and their biodegradative potential *Microbiol Res.* 155 (3):143-7.
116. **Miller T.L., Wolin M.J., Hongxue Z., Bryant M.P. (1986).** Characteristics of Methanogens isolated from bovine rumen. *Appl. Envir. Microb.* 51: 201-202.
117. **Mitjavila S., Lacombe G., Carrera G. and Derache R. (1997).** Tannic acid and oxidised tannic acid on the functional state of rat intestinal epithelium. *J. Nutr.*. 2113- 2121.
118. **Montedero G., Anichini F., Fantazzo P. (1980).** Composés phénoliques de l'huile d'olive, leur influence sur la technologie d'extraction, sur la résistance à l'oxydation et sur les caractéristiques organoleptiques de l'huile. *Bulletin liaison Groupe Polyphénols*. 9: 39-55.
119. **Morillo J. A., Antizar-Ladislao B., Monteoliva-Sánchez M., Ramos-Cormenzana A., Russell N. J. (2009).** Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Applied Microbiology Biotechnology*. 82 : 25–39.
120. **Morisot A. (1979).** Utilisation des margines par épandage. *Olivae*.19: 8-13.



121. Moss A.R. (1994). Methane production by ruminants-Literature review of IDietary manipulation to reduce methane production and II Laboratory procedures for estimating methane potential of diet. Nutr. Abstr. Rev. Ser. B64. 786-806.
122. Moss A.R. (1995). Contribution du méthane à l'effet de serre. Pew Center on Global Climate Change, Virginia, USA.
123. Moss A.R., Jouany J.P., et Newbold J. (2000)._Methane production by ruminants: its contribution to global warming. Ann. Zootech.. 49: 231-253.
124. Mouncif M., Achkari-Begdouri A., Faid M. (1993). Traitement des margines par digestion anaérobique. Actes Inst. Agron. Vet. Maroc.13 (2):13-19.
125. Mouncif M., Tamoh S., Faid M., Achkari-Begdouri A. (1993). A study of chemical and microbiological characteristics of olive mill waste water in Morocco. Grasas y Aceites. 44 : 335-338.
126. Muscolo A., Panuccio M.R., Sidari M. (2001). The effect of phenols on respiratory enzymes in seed germination respiratory enzyme activities during germination of Pinus laricio seeds treated with phenols extracted from different forest soils. Plant Growth Regulation. 35: 31-35.
127. Nagaraja T.G., Tone G., Reharka A.A. (1992). Moderation of ruminal fermentation by ciliateprotozoa in cattle fed a high grain diet. App. Envir. Mic, 58: 2410-2414.
128. Nassif D. (2004). Valorisation des polyphénols extraits des margines en tant qu'antioxydants naturels dans les huiles végétales. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies, Université Libanaise, Liban. 41 p
129. Nefzaoui A. (1987). Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits, séminaire sur l'économie de l'olivier. Tunis, 20-22 Janvier. Science et Technique, Olivae n° 19.
130. O'Donovan L., Brooker J.D. (2001). Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of Streptococcus galolyticus (*S.caprinus*) and Streptococcus bovis. *Microbiology*.147 : 1025-1033.
131. Ogimoto K., Imai S., (1981). Atlas of Rumen Microbiology. *Japan Scientific Society Press*. Tokyo. Japan.
132. Orskov E.R. and Mc Donald P. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. J. of Agri. Sci, Cambridge. 92: 499-503.
133. Orskov E.R., Ryle M. (1990). Energy nutrition of rumen microorganisms. In: Energy nutrition in ruminants. Ed. Elsevier Applied Science. 10-27.



134. Orskov E.R., Ryle M. (1990). Host animal control of microbial fermentation and host animal digestion. In: Energy nutrition in ruminants. Ed. Elsevier Applied Science. 43-51.
135. Orskov E.R., Ryle M. (1990). Manipulation of rumen fermentation and associative effects. In: Energy nutrition in ruminants. Ed. Elsevier Applied Science. 28-42.
136. Palmisano A.C., Barlaz M.A. (1996). Microbiology of solid waste CRC Press. p 224.
137. Papadimitriou E.K., Chatjipa I., Balis C. (1997). Application of composting to olive mill wastewater treatment. Environmental technology.18: 101-107.
138. Perchellet E.M., Moutaseb H.U., Makkar H.P.S. and Perchellet P. (1996). Ability of tannins extracted from various tree leaves to inhibit the biomarkers of tumor promotion in mouse skin *in vivo*. Int. J. Oncol..9 : 801–809.
139. Pérez J., Rubia T., Moreno G., Martínez J. (1992) Phenolic content and antibacterial activity of olive oil waste waters. Environ. Toxicol. Chem.11: 489-495.
140. Petruccioli M., Servili M., Montedero G.F., Federici F.(1988).Development of a recycle procedure for the utilization of vegetation waters in the olive oil extraction process. Biotechnology Letters.1: 55-60.
141. Priolo A., Waghorn G. C., Lanza M., Biondi L., Pennisi P. (2000). Polyethylene glycol as a means for reducing the impact of condensed tannins in carob pulp: effects on lamb growth. performance and meat quality. Journal Animal Science, 78:810-816. site web : <http://jas.fass.org>.
142. Ramos-Cormenzana A. (1986). Physical, chemical, microbiological and biochemical characteristics of vegetation water. In: Inter. Symp.: On olive by-products valorization. Sevilla-Spain. 41-60.
143. Ranalli A. (1991) The effluent from olive mills : Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. Olivae. 37: 30-39.
144. Raskin L., Stromley J.M., Rittman B.E., Stahl D.A. (1994). Group specific 16sr RNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. Appl. Envir. Microb. 60: 1232-1240.
145. Rira M. (2006). Effet des polyphénols et des tanins sur l'activité métabolique du microbiote ruminal d'ovins. Thèse de magistère. ISN. Université de Constantine, 95p.
146. Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero, M.A. 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. Waste Management. 26: 960-969.
147. Rumpler W.V., Johnson D.E., Bates D.B., (1986). The effect of high dietary cation concentration on methanogenesis by steers fed diets with and without ionophores, J. Anim. Sci. 62: 1737–1741.



148. **Salvemini F. (1985).** Composizione chimica e valutazione biologica di un mangime ottenuto essicando tercamente le acque di vegetazione delle olive. Riv. Delle Sostanze Grasse.112 : 559-564.
149. **Salvimini V., Cera O. (1984).**Acidic phenolic fraction of the juice of olives determined by gas chromatographic method. Grassas y Aceites. 25 : 178-180.
150. **Samperdro I., Aranda E., Martin J., Garcia Garrido J.M., Garcia Romero I., Ocampo J.A. (2004).** Saprobic fungi decrease plant toxicity caused by olive mill residues. Applied Soil Ecology. 26 : 149-156.
151. **Sauvant D. (2002).** Physiologie comparée de la digestion et de la nutrition. Inst. Nation. Agronomique. Paris- Grignon. p :10-28.
152. **Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., Riffaldi, R., Lupetti, A., (1991).** Effetti dello spandimento di acque di vegetazione sul terreno agrario. Agrochimica. 35: 135–148.
153. **Sharp R., Ziemer C.J., Marshall D.S., Stahl D.A. (1998).** Taxon-specific association between protozoal and methanogen population in the rumen and model system. FEMS. Microb.Ecol. 26: 71-78.
154. **Selosse M.A., Barnola J.M. (2000).** La production biologique du méthane. Benoit. URGELLIENS. Lyon.
155. **SFA. Société Française des Antioxydants (2005).**Conte rendu de la conférence polyphenols (23/24 NOV2005). Institut des corps gras. ITERG
156. **Sierra J., Martí E., Montserrat G., Crauañas R., Garau M.A. (2001).** Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal. The Science of the total environment. 279 : 207-214.
157. **Simon C. (2003).** Structure et dynamique de protéines de la salive humaine en interaction avec les tanins du vin de Bordeaux. Thèse de doctorat. Ecole doctorale des sciences chimiques Université de Bordeaux 1 (France).
158. **Singh G.P., Nagpal A.K., Sainj N., (2005).**Methane production in relation to productivity of livestock and environment: a review. Indian J. Anim. Sci.75: 143–148.
159. **Stem D.L., Kaufman R.K. (1998).** Annual estimates of global anthropogenic methane emissions: 1860-1994 Trends on line: A compendium of data on global change. Carbon Dioxide information Analysis Center, Caok Ridge National Laboratory, Departmen of Energy, US.
160. **Stewart C.S., Bryant M.P. (1988).** The rumen bacteria. In: The rumen microbial ecosystem. Elsevier. Applied. Science. p 21-75.
161. **Stewart C.S., Flint H.J., Bryant M.P. (1997).** The rumen bacteria. In: The rumen Microbial Ecosystem, edited by Hobson PN. P 10-72.



162. **Stumm C.K., Gitzen H.J., Vogels G.D. (1982).** Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *Brit. J.Nut.* 48: 417-431.

163. **Tarvin D., Buswell A. M. (1934).** The methane fermentation of organic acids and carbohydrates. *Journal Animal Chemistry.* 56 : 1751–1755.

164. **Teacher R.M., Mahadevan S., Erfle J.D., Sauer F.D. (1984).** Negative correlation between protozoal and bacterial levels in rumen samples and its relation to the determination of dietary effects on the rumen microbial population. *App. Evir. Micr.* 47: 566-570.

165. **Tendonkeng P.E., Kana J.R., Tendonkeng F. and Betfiang M.E. (2004).** Digestibilité in vitro de *Calliandra calothyrsus* en présence du Polyéthylène glycol et de *Brachiaria ruziziensis*, *Trypsacum laxum* ou *Pennisetum purpureum* au Cameroun. *Livestock Research for Rural Development*, 16 (7).

166. **Tomati U., Galli E. (1992).** In *Humus, its structure and role in agriculture and environment*, Kubat J. Ed. Elsevier, London. 117-126.

167. **Tokura M., Chagan K., Ushida K., Kojima Y. (1999).** Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. *Curr. Microbio.* 39: 123-128.

168. **Tokura M., Tajima K., Ushida K. (1999).** Isolation of *methanobrevibacter* sp as a ciliate associated ruminal methanogen. *J.Gen. Appl. Microbi*, 45: 43-47.

169. **Tsagariki E., Harris N., Lazarides., Konstantinos B. P. (2007).** Olive mill waste water treatment. *Springerlink*, 133-157.

170. **UNUP: The United Nations University Press (1986).** Food and Press nutrition bulletin

171. **Van nevel C. (1991).** Modification of rumen fermentation by the use of additives, in: Jouany J.P.(Ed.), *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*, INRA Editions, Paris, pp. 263–280.

172. **Vazquez R.A., Maestro D.R., Graciani C.E. (1974)** Compuestos fenólicos de la aceituna. II. polifenoles del alpechín. *Grasas y Aceites.* 25: 341-345.

173. **Villalba J.J., Provenza F.D. and Banner R.E. (2002).** Influence of macronutrients and polyethylene glycol on intake of a quebracho tannin diet by sheep and goats. *J.Anim. Sci.* 80: 3154-3164.

174. **Visioli F., Romani A., Mulinacci N., Zarini S., Conte D., Vincieri F. (1999).** Antioxidants and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 47: 3397-3401.

175. **Vlyssides, A.G., Loizides, M., Karlis, P.K., (2004).** Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *Journal of Cleaner Production* 12 (6), 603–611.



176. **Wagner H., Bladf S., Zgainski E.M. (1984)** Plant drug analysis. Translated by Scott Th.A. Springer-Verlag.
177. **Weimer P.J., Lopez-Guisa J.M., Frensh A.D. (1990)**. Effect of cellulose fine structure on kinetics of its digestion by mixed ruminal microorganisms in vitro. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2421- 2429.
178. **Wolin M.J. et Miller T.L. (1988)**. Microbe-Microbe interactions. In : Hobson PN. The rumen microbial ecosystem. Elsevier Science Publishers Ltd, pp.343-459.
179. **Yaakoubi A. , Chahlaoui A., Rahmani M., Elyachioui M., Oulhote Y., (2009)**.Effet de l'épandage des margines sur la microflore du sol.Agro solutions.20 :1
180. **Yanez Ruiz D.R., Moumen A., Martin Garcia I., Molina Alcaide E. (2004)**. Ruminal fermentation and degradation patterns,protozoa population, and urinary purine derivatives olive cake : Effect of PEG supply. Journal animal science. 82:2023-2032.
181. **Zenjari B., Nejmeddine A. (2001)**. Impact of spreading olive mill wastewater on soil characteristics : laboratory experiments. Agronomie.21: 749-755.
- 182 . http://www.cairn.info/loadimg.php?FILE=MAV/MAV_020/MAV_020_0259/fullMAV_idPAS_D_ISBN_pu2008-06s_sa17_art17_img011.jpg
183. http://titan.akka.eu/presentation-omeric/fiches/POLLUANTS/P2_Methane_corRD.pdf
184. <http://www.maplandia.com/algeria>

Annexes



Annexe n°01 : Caractéristiques physico-chimiques du rumen [80].

Paramètres mesurés	Caractéristiques
pH	5.7 - 7.3
Potentiel d'oxydoréduction	-0.35V
Température	38-41°C
Osmolarité	< 400 mOsmol.Kg-1
Phase gazeuse, %	CO2 :65 CH4 : 27 N2 : 7 O2 : 0.6 H2 : 0.2 H2S : 0.01.
Matière sèche	10-18%.
Acides gras volatils (AGV), mM	Ac, formique : < 0.02 Ac. Acétique : 66 Ac propionique, 23 Ac. Butyrique : 20 Ac mineurs (C4- C6), 2
Acide lactique, mM	< 7
Acide succinique, mM	0.002 à 0.004
Ethanol, mM	Non détectable
Ammoniaque, mM	< 92
Acides amines.	< 48meqM
Minéraux (mg.m-1)	Na :1.5-3.0 K : 0.6-2.3 Ca : 0.1-0.2 Mg : 0.1 P : 0.3 PO4 -3 : 1.9 HCO3-3 :1.3 S ; CL ;etc. toujours présents
Oligoéléments	Fe, Mn, Co, Mo, Zn, Se, etc. toujours présents



Annexe n°02. Composition de la salive artificielle [113].

Solutions	Eléments	Quantité
Solution A (Solution des microminéraux) (g/100 ml)	CaCl ₂ . 2H ₂ O MnCl ₂ . 4 H ₂ O CoCl ₂ . 6 H ₂ O FeCl ₃ . 6 H ₂ O Eau distillée	13,2 g 10 g 1 g 0,8 g 100 ml
Solution B (Solution tampon) (g/l)	NaHCO ₂ NH ₄ HCO ₃ Eau distillée	35,0 g 4 g 1000 ml
Solution C (Solution des macrominéraux) (g/l)	Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ . 7 H ₂ O Eau distillée	5,7 g 6,2 g 0,6 g 1000 ml
Solution D (Solution indicatrice du potentiel Redox) (g/100 ml)	Résazurine (C ₁₂ H ₆ NO ₄) Eau distillée	0,1 g 100 ml
Solution E (Solution réductrice) (g/99 ml)	Na ₂ S. 9 H ₂ O NaOH (1N) Eau distillée	0,336 g 2ml 47,5ml

Composants	Quantité pour 1000 ml SA
Solution A	0,12 ml
Solution B	240 ml
Solution C	240 ml
Solution D	1,22 ml
Solution E	49,5 ml
Eau distillée	475 ml



Annexe n° 03. Composition des solutions de dosage de l'ammoniaque [28].

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

Annexe n°04. Composition de la solution MFS (methylgreen-formalin-saline) [76].

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

Résumé

L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile, laisse deux résidus l'un liquide (les margines) et l'autre solide (les grignons). Les margines, sous-produit obtenu par centrifugation ou sédimentation de l'huile après le pressage de l'olive, sont caractérisées par une concentration élevée en sucres, lipides, protéines et surtout en composés phénoliques. Une fois rejetées sans avoir subi des traitements préalables, ces margines auront un impact négatif sur l'environnement dû à leur pouvoir d'inhiber le développement des plantes et de certains microorganismes. Leur phytoxicité est principalement attribuée à la présence des lipides et des polyphénols. L'objectif assigné à ce travail est l'étude de l'effet du contenu phénolique extrait des margines issues de deux modes de trituration sur la méthanogènes ruminale in vitro. Les margines retenues pour la présente étude sont issus de deux type d'huileries : industrielle (système à trois phase) et traditionnelle, implantées dans quatre wilaya : GUELMA, SKIKDA, ANNABA et TEBESSA. Le contenu phénolique est extrait à l'acétate d'éthyle après délipidation. Le contenu phénolique brut a été caractérisé par la détermination des phénols totaux (PT), tanins totaux (TT), tanins condensés (TC) et flavonoïdes totaux (FT). Le suivi de la fermentation du foin de vesce-avoine complémenté de 100 µl de chaque extrait phénolique est réalisé en système batch.

L'analyse phytochimique des extraits bruts des margines montre leurs richesse en phénols totaux (PT) et en tanins totaux (TT). En revanche, ils caractérisent par leur teneur faible en tanins condensés (TC) et en flavonoïdes (FL). Tandis que, l'analyse de l'impact des extraits phénoliques sur la production de méthane indique que l'addition des extraits phénoliques des margines induisent une réduction significative dans la méthanogènes ruminale ($p > 0.05$). Après 96h d'incubation les taux de réductions de CH_4 enregistrés sont respectivement 52,49%, 48,46%, 43,59%, 27,79%, 18,76%, 13,90% et 5,94% pour E.M.U.M.G., E.M.U.T.G., E.M.U.T.S., E.M.U.T.T., E.M.U.T.A, E.M.U.M.S et E.M.U.M.A. En outre, cette réduction est corroborée à une diminution dans le nombre de protozoaires, une réduction dans de la production d'ammoniac et une augmentation dans les coefficients de digestibilité. Ces résultat indiquent la possibilité d'usage des composées phénoliques des margines comme additifs alimentaires dans la réduction de la méthanogènes ruminale.

Mots clés : margines, composés phénoliques, méthane, protozoaires, ammoniac.
coefficient de digestibilité.

