

Relation entre les métabolites secondaires de *Genista aspalathoides* et la production de méthane *in vitro* chez les caprins

Oumayma HAMMAMI¹, Houcine SELMI², Ali FERCHICHI¹

(Reçu le 10/04/2023; Accepté le 01/05/2023)

Résumé

La fermentation entérique est une source d'émission de gaz à effet de serre. Cette recherche a porté sur la valorisation d'une espèce arbustive *Genista aspalathoides* du Nord-Ouest de la Tunisie (Tabarka), par la détermination des métabolites secondaires (phénoliques totaux, flavonoïdes totaux et tanins condensés), ainsi que l'évaluation de la méthanogenèse *in vitro* chez les caprins. Le criblage phytochimique a été déterminé par des méthodes *in vitro*. La teneur en cellulose brute, qui limite leur digestibilité, était faible (5,79 %). La teneur en protéines brutes était de 1,88 g/kg MS. *Genista aspalathoides* était riche en composés phénoliques, en particulier en tanins condensés (11,3 mg EC/g MS) qui inhibaient la production de méthane. Les résultats élevés des paramètres de fermentation *in vitro* (digestibilité de la matière organique, énergie métabolisable et acides gras totaux) montrent l'efficacité des chèvres à ingérer des fibres alimentaires.

Mots-clés: Fermentation entérique, *Genista aspalathoides*, Nord-Ouest Tunisie, méthane, métabolites secondaires, caprins

Relationship between the secondary metabolites of *Genista aspalathoides* and *in vitro* production of methane in goats

Abstract

Enteric fermentation is a source of greenhouse gas emissions. This research focused on the valorization of a shrubby species *Genista aspalathoides* from the North-West of Tunisia (Tabarka), by the determination of secondary metabolites (total phenolics, total flavonoids and condensed tannins), as well as the evaluation of the *in vitro* methanogenesis in goats. Phytochemical screening was determined by *in vitro* methods. The crude fiber content, which limits their digestibility, was low (5.79%). The crude protein content was 1.88 g/kg DM. *Genista aspalathoides* was rich in phenolic compounds, particularly condensed tannins (11.3 mg EC/g DM) which inhibited methane production. The high results of *in vitro* fermentation parameters (digestibility of organic matter, metabolizable energy and total fatty acids) show the efficiency of goats in ingesting dietary fibre.

Keywords: Enteric fermentation, *Genista aspalathoides*, North-West Tunisia, methane production, secondary metabolites, goats

INTRODUCTION

La lutte contre le changement climatique est le grand défi à l'échelle mondiale. La réduction des émissions gazeuses d'origine entérique et leur impact environnemental est urgent en raison de la croissance du secteur d'élevage pour assurer la sécurité alimentaire et nourrir une population mondiale de plus en plus nombreuse, riche et urbanisée (Gerber *et al.*, 2014). La fermentation entérique est la principale source d'émissions de méthane (FAO, 2013; Gerber *et al.*, 2014), qui contribue à des émissions quantifiables dans les pays où l'élevage des ruminants au pâturage a un rôle économique considérable (Vermorel *et al.*, 2008) (35-40 % du PIB agricole en Tunisie). En Tunisie, l'élevage caprin est essentiellement présent dans les régions montagneuses du Nord du pays. Dans la région subéricole de Tabarka, le couvert végétal a une importance capitale dans l'alimentation des troupeaux (Kayouli et Buldgen, 2001). La végétation spontanée, notamment les arbustes fourragers, constitue une contribution majeure à la couverture des besoins des caprins au niveau des maquis en système extensif (Mebrouk-Boudechiche *et al.*, 2014). En revanche, les émissions des gaz à effet de serre sont directement liées à la consommation alimentaire. Jouany et Thivend (2008) nous ont affirmé qu'il est possible de moduler les émissions d'origine digestive via l'alimentation des animaux.

Plusieurs auteurs, avec des résultats divers mais globalement encourageants, ont rapporté l'effet anti-méthanogène des végétaux riches en métabolites secondaires (Rira, 2015). Busquet *et al.* (2005) et Rira (2015) ont signalé que certaines plantes ou extraits de plantes peuvent en effet modifier l'orientation des fermentations ruminales.

Afin de valoriser de façon optimale le potentiel nutritif de *Genista aspalathoides*, arbuste fourrager, il est nécessaire de bien connaître ses caractéristiques phytochimiques, notamment ses composés phénoliques. Établir la relation entre les composés phénoliques de *Genista aspalathoides* et la production de méthane chez les caprins *in vitro* est l'objet de ce travail.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériel végétal

Genista aspalathoides est un arbuste fourrager palatable par les caprins. L'échantillonnage de cette espèce (la partie aérienne) s'est déroulé en avril 2019 dans la région de Tabarka (Nord-Ouest Tunisien).

Matériel animal

Le jus du rumen, qui contient les micro-organismes responsables de la dégradation des aliments ingérés par les caprins, a été prélevé à partir de l'abattoir Municipal de Tabarka après l'abattage des animaux.

Composition chimique et pariétale

On a utilisé les méthodes de l'AOAC (1990) pour déterminer les teneurs en matières sèche (MS), matière minérales, matières organiques (MO) et en matières azotées totales (MAT).

Le dosage des constituants des pariétaux (NDF, ADF et ADL) a été déterminé à l'aide d'un appareil Fiber test selon Van Soest et Wine (1991). La teneur en matière azotée totale (MAT) ou en protéines brutes (PB) d'un échantillon est obtenue en dosant l'azote (N) qu'il contient selon la méthode de Kjeldahl (AOAC, 1990).

¹ Institut National Agronomique de Tunisie, Université de Carthage, Tunis, Tunisie

² Institut Sylvio-Pastoral de Tabarka, Université de Jandouba, Tabarka, Tunisie

Prédiction de la valeur alimentaire

La prédiction des valeurs énergétiques et azotées d'aliments est exprimée respectivement en UFL/Kg MS et en g PDI /Kg MS. Ces valeurs ont été obtenues à l'aide des équations adoptées par Sauvart (1981).

Dosage des composés phénoliques

Le dosage des polyphénols totaux a été effectuée à l'aide de la méthode de Singleton *et al.* (1999) en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et une solution aqueuse de carbonate de sodium Na₂CO₃ (20%). Les résultats sont exprimés en mg équivalent en acide gallique/g d'échantillon (mg Eq A G/g d'extrait).

Les flavonoïdes totaux contenus dans l'extrait aqueux sont estimés en mg Eq Q/g d'extrait, par la méthode du trichlorure d'aluminium (Yi *et al.*, 2007).

Les tanins condensés ont été déterminés en utilisant la méthode de Sun *et al.* (1998). Les résultats sont exprimés en mg équivalent Catéchine /g d'échantillon.

La production *in vitro* de gaz total

La fermentation du substrat de *Genista aspalatoides* est étudiée par la technique de production de gaz *in vitro* adoptée par Menke *et al.* (1979). Cette technique est une simulation de la digestion des aliments dans le rumen. Elle permet d'étudier la stoechiométrie et la cinétique de fermentation ruminale dans un système «batch». L'incubation des substrats en présence de l'inoculum (salive artificielle et jus de rumen de caprins) se fait dans des seringues de 100 ml de capacité. La fermentation *in vitro* aboutit par suite à des produits terminaux de la digestion en l'occurrence l'ammoniac, les acides gras volatils et les gaz, notamment le CO₂ et le CH₄. Le déplacement du piston de la seringue au cours du processus de fermentation due à la production de gaz est mesuré par soustraction par rapport à la position initiale.

L'incubation est arrêtée lorsque la production de gaz devient quasiment stable. L'analyse qualitative des gaz produits se fait par l'injection de NaOH (10N) dans chaque seringue. La soude absorbe le CO₂, le déplacement de piston à ce niveau correspond au volume de gaz restant CH₄ chez les caprins.

Les paramètres de fermentation

Les paramètres caractéristiques de la production de gaz sont déduits du modèle exponentiel proposé par Orskov et Mc Donald (1979).

Prédiction de la digestibilité de la Matière Organique (d MO), de la production des Acides Gras Volatils (AGV) et de l'Énergie Métabolisable (EM)

La digestibilité de la matière organique (d MO) est calculée en utilisant la formule proposée par Menke et Steingass (1988).

Le contenu en énergie métabolisable (EM) ainsi que les acides gras volatils totaux (AGV) produits ont été calculés selon la méthode de Makkar (2002).

Analyse statistique

Les résultats des effets de *Genista aspalatoides* sur les paramètres mesurés ont été soumis à une analyse de la variance selon la procédure GLM du logiciel SAS (1989) et comparés par le test des rangs multiples de Duncan (1955).

Le modèle utilisé permet de comparer l'énergie métabolisable, la concentration des acides gras volatils, la digestibilité de la matière organique en fonction des arbustes, composant les régimes expérimentaux.

Les paramètres caractéristiques de la cinétique de production de gaz sont prédits suivant la régression non linéaire par l'utilisation de la procédure du SAS (1989) selon le modèle d'Orskov et Mc Donald (1979).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Composition chimique et composition pariétale des arbustes étudiés

Les tableaux 1 et 2 illustrent la variation des caractéristiques chimiques et la composition pariétale de *Genista aspalatoides*. Ses teneurs en matière sèche et en matière organique ont été respectivement de 34,1% et 94,1%. Ces résultats ont été inférieurs à ceux rapportés par Gasmi-Boubaker et Kayouli (2008). La teneur en cellulose brute a été de 5,79% de la matière sèche. En général, les feuilles des arbustes forestiers sont fortement pourvues en parois totales qui sont susceptibles de constituer un facteur limitant leur digestibilité (Mebirouk-Boudechiche *et al.*, 2015).

Valeurs alimentaires de *Genista aspalatoides*

Les valeurs alimentaires de l'espèce étudiée prédites à partir de la composition chimique sont enregistrées dans le tableau 3. Elles montrent que *Genista aspalatoides* présente des valeurs énergétique et protéique faibles, vu ses faibles teneurs en MG (2,37%) et en MAT (2,75%).

Tableau 1: Composition chimique (% MS) de l'espèce étudiée

Espèce	%MS	MM	MO	MAT	MG
<i>Genista aspalatoides</i>	34,1	5,92	94,1	2,75	2,37

MS: Matière sèche; MM: Matière minérale; MO: Matière Organique; MAT: Matière azotée Totale; MG: Matière grasse

Tableau 2: Composition pariétale (%MS) de l'espèce étudiée

Espèce	ADF	ADL	CB	NDF	HC
<i>Genista aspalatoides</i>	36,1	30,3	5,79	45,1	8,92

ADF: Détergent Acide Fibre; ADL: Détergent Acide Lignine; CB: Cellulose Brute; NDF: Détergent Neutre Fibre; HC: Hémicellulose

Tableau 3: Variation des valeurs alimentaires de *Genista aspalatoides* prédites à partir de la composition chimique

Espèces	UFL /kgMS	PDIE (g/kg MS)	PDIN (g/kg MS)
<i>Genista aspalatoides</i>	0,058	64,8	1,876

Sarson et Salmon (1978) ont donné des arguments clairs et satisfaisants au fait qu'une alimentation uniquement composée de fourrages ligneux ne peut satisfaire aux besoins nutritionnels des ovins tandis qu'elle suffit au caprins. Ces résultats peuvent être expliqués par le mode d'échantillonnage de cette espèce.

Variation des concentrations en métabolites secondaires

Le tableau 4 illustre les résultats des analyses des métabolites secondaires de l'espèce étudiée. *Genista aspalatoides* présente une teneur en polyphénols totaux de l'ordre de 59,2 mg EAG/g MS et une teneur en tanins condensés de 11,3 mg EC/g MS. Les concentrations en phénols totaux sont élevées, ce qui peut être expliqué par ses teneurs élevées en constituants pariétaux (ADF, NDF et Lignine). En effet, Cabiddu *et al.* (2000) ont montré que les arbustes méditerranéens sont généralement considérés riches en composés phénoliques.

Cinétique de production de gaz par l'incubation du substrat

Dans le rumen, toute réaction biologique s'accompagne d'une perte d'énergie sous forme de chaleur ou de production de gaz. Cette dernière dépend essentiellement de la vitesse de dégradation et de la nature des glucides pariétaux caractéristiques de l'arbuste.

La cinétique de production de gaz de *Genista aspalatoides* suit un modèle exponentiel de 1^{er} degré (Tableau 5). En effet, la courbe de production est divisée en trois parties. Une partie où la production est négligeable qui correspond à une phase de latence où les microorganismes du rumen s'adaptent aux substrats (la fermentation de fraction immédiatement fermentescible «a»). Une phase croissante où la production atteint sa valeur maximale (dégradation de la fraction potentiellement fermentescible «b») et une phase où la production est à sa valeur minimale qu'on appelle «palier».

Le volume de gaz produit en 24 h d'incubation par l'espèce *Genista aspalatoides* est de 36 ml/ 300 mg de MS. Ce résultat est similaire à celui trouvé par Mebirouk-Boudechiche *et al.* (2015).

La vitesse de production de gaz (c) enregistrée par *Genista aspalatoides* est de 0,12 h⁻¹ provoquant la diminution du pH ruminal (5,82) au cours de l'incubation. En effet,

Soltner (1994) a mentionné qu'une fermentation rapide peut baisser le pH, ce qui est favorable à la croissance des micro-organismes qui produisent essentiellement le propionate et le lactate.

Effet de tanins sur les paramètres de fermentation

La digestibilité de *Genista aspalatoides* est de l'ordre de 48,5%. En outre, l'énergie métabolisable enregistrée par cette espèce est de 7,25 kcal/kg MS (Tableau 6). Ces valeurs sont élevées, malgré sa richesse en cellulose brute. Ces résultats nous confirment l'efficacité de l'utilisation alimentaire des fibres par les caprins. Ceci est en accord avec l'étude de Domingue *et al.* (1991). La production des AGV totaux et de méthane (CH₄) enregistrée par l'espèce sont respectivement de 0,8 ml/ 300 mg de MS et 16,3 ml/ 300 mg de MS (Tableau 6). Ces résultats peuvent être expliqués par les teneurs élevées de *Genista aspalatoides* en tanins condensés. Plusieurs auteurs ont rapporté que les tanins réduisent la méthanogénèse ruminale. Rira (2015) nous a affirmé que ces composés phénoliques s'avèrent très efficaces dans la réduction de la production de CH₄ aussi bien dans les conditions *in vivo* qu'*in vitro*. Rira *et al.* (2015) ont également indiqué une relation linéaire entre la teneur en tanins condensés et la réduction du CH₄ *in vitro*, tandis qu'Oliveira *et al.* (2007) ont montré le contraire. En revanche, l'étude de Mebirouk-Bouchiche *et al.* (2015) a confirmé que l'augmentation de la production de méthane après ajout du PEG est la résultante de l'effet bloquant du PEG sur les tanins.

CONCLUSION

Le présent travail a permis d'établir la relation entre les composés phénoliques de *Genista aspalatoides*, arbuste du maquis du Nord-ouest tunisien et la méthanogénèse chez caprins *in vitro*. Le criblage phytochimique de cette espèce a montré leur contribution dans la couverture des besoins nutritifs des animaux en extensif. Cette étude a suggéré l'importance des métabolites secondaires, notamment les tanins condensés dans la réduction de la production de méthane, gaz à effet de serre. Il est important de prendre en compte l'effet d'utilisation des arbustes fourragers, riches en métabolites secondaires, dans la stratégie d'atténuation de l'émission de méthane (GES).

Tableau 4: Variation des concentrations des métabolites secondaires des espèces étudiées

Espèce	PP	FT	TC
<i>Genista aspalatoides</i>	59,2	4,20	11,3

PP: Phénols Totaux (en mg EAG /g MS); FT: Flavonoïdes totaux (en mg EAQ /g MS); TC: Tanins Condensés (en mg EC/gMS).

Tableau 5: Effet de l'espèce pastorale sur les paramètres de production de gaz chez les caprins

Espèces	A	B	C	V ₂₄	V _{total}
<i>Genista aspalatoides</i>	-4,15 ± 0	41,6 ± 0	0,12 ± 0	36 ± 0	37 ± 0

a: gaz produit à partir de la fraction soluble (ml / 300 mg de MS); b: gaz produit à partir de la fraction insoluble mais potentiellement fermentescible (ml / 300 mg de MS); c: vitesse de production de gaz (h⁻¹); V₂₄: gaz à 24 h d'incubation (ml/300 mg de MS); V_{total}: gaz à 48 h d'incubation (ml /300 mg de MS).

Tableau 6: Les paramètres estimés à partir de gaz produit au cours d'incubation de l'espèce étudiée

Espèces	pH	CH ₄	dMO	EM	AGV _t
<i>Genista aspalatoides</i>	5,82 ± 0,09	16,3 ± 0,57	48,5 ± 0,51	7,25 ± 0,05	0,8 ± 0

pH: potentiel hydrique; CH₄: Méthane; dMO: digestibilité de la MO; EM: Énergie métabolisable; AGV_t: Acides Gras Volatils Totaux

RÉFÉRENCES

- AOAC (1990). Official methods of analysis. Association of official analytical chemists, Washington, DC.
- Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A., Cardozo P. W., Kamel C. (2005). Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 88: 2508-2516.
- Cabiddu A., Decandia M., Sitzia M., Molle G. (2000). A note on the chemical composition and tannin content of some Mediterranean shrubs browsed by Sarda goats. In: Ledin I. (ed), Morand-Fehr P. (ed.). Sheep and goat nutrition: Intake, digestion, quality of products and rangelands. Zaragoza: CIHEAM. *Cahiers options Méditerranéennes*, 52:175-178.
- Domingue F.B.M., Dellow D.W., Wilson P.R., Barry T.N. (1991). Comparative digestion in deer, goats and sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 34: 45-53.
- Duncan D.B. (1955). Multiple range and multiple F test. *Biometrics*, 11:1-42.
- FAO (2013). Tackling climate change through livestock.
- Gasmi-Boubaker A., Kayouli C. (2008). Composition chimique de quelques espèces du maquis du Nord-Ouest de la Tunisie. Programme Azahar: Systèmes agroforestiers comme technique pour la gestion durable du territoire.
- Gerber P.J., Steinfeld H., Henderson B., Mottet A., Opio C., Dijkman J., Falcucci A., Tempio G. (2014). Lutter contre le changement climatique grâce à l'élevage—Une évaluation des émissions et des opportunités d'atténuation au niveau mondial. FAO, Rome.
- Jouany J.P., Thivend P. (2008). La production de méthane d'origine digestive chez les ruminants et son impact sur le réchauffement climatique. *Management et Avenir*, 20: 259-274.
- Kayouli C., Buldgen A. (2001). Élevage durable dans les petites exploitations du nord ouest de la Tunisie. Faculté universitaire des sciences agronomiques (FUSAGx), unité de zootechnie, p. 52-78.
- Makkar H.P.S. (2002). Development and field evaluation of animal feed supplementation packages. Proceedings of the final review meeting of an IAEA Technical Cooperation Regional AFRA Project, November 25-29, 2000, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Cairo, Egypt, p. 1-66.
- Mebirouk-Boudechiche L., Cherif M., Boudechiche L., Sammar F. (2014). Teneurs en composés primaires et secondaires des feuilles d'arbustes fourragers de la région humide d'Algérie. *Revue Méd. Vét.*, 165: 344-352.
- Mebirouk-Boudechiche L., Chemmam M., Boudechiche L., Matalah S. (2014). Caractéristiques nutritionnelles de quelques arbustes fourragers du nord est algérien. *Renc. Rech. Ruminants*, 21.
- Mebirouk-Boudechiche L., Abidi S., Cherif M., Bouzouraa I. (2015). Digestibilité *in vitro* et cinétique de fermentation des feuilles de cinq arbustes fourragers du Nord-Est Algérien. *Revue Méd. Vét.*, 166: 350-359.
- Menke K.H., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritz D., Schneider W. (1979). The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from gas production when they are incubated with rumen liquor. *Journal of Agricultural Science*, 93: 217- 222.
- Menke K.H., Steingass H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28: 7- 55.
- Oliveira S.G., Berchielli T.T., Pedreira M.S., Primavesi O., Frighetto R., Lima M.A. (2007). Effect of tannin levels in sorghum silage and concentrate supplementation on apparent digestibility and methane emission in beef cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 135: 236-248.
- Orskov E.R., Macdonald I. (1979). The estimations of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate passage. *Journal Agriculture Science*, 92: 499-502.
- Rira M. (2015). Impact de plantes riches en métabolites secondaires sur la méthanogénèse ruminale et les activités fermentaires du microbiome ruminal chez des ovins. Thèse, Université Des Frères Mentouri Constantine.
- Rira M., Morgavi D.P., Archimède H., Marie-Magdeleine C., Popova M., Bousseboua H., Doreau M. (2015). Potential of tannin-rich plants for modulating ruminal microbes and ruminal fermentation in sheep. *Journal of Animal Science*, 93: 334-347.
- Sarson M., Salmon P. (1978). Rôle des arbres et des arbustes fourragers dans l'aménagement des pâturages naturels en Afrique du Nord. Mimeo. Supporting paper no. 10, 8th world Forestry Congress, Jakarta.
- SAS User's Guide (1989). Version 6.10 for Windows, SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Sauvant D. (1981). Prévission de la valeur énergétique des aliments concentrés et composés pour les ruminants. In Prévission de la valeur nutritive des aliments des ruminants (Eds. C. dimarquilly.), ZIS7-258, (France), p 580.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method. Enzymol*, 299: 152-178.
- Sun B., Richardo-da-Silvia J.M., Spanger I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 4267-4274.
- Van Swinderen H.V. (1991). Les arbres et arbustes fourragers: rêve ou réalité ? *Tropicultura*, 8: 36-39.
- Vermorel M., Jouany J.P., Eugène M., Sauvant D., Noblet J. (2008). Évaluation quantitative des émissions de méthane entérique par les animaux d'élevage en 2007 en France. *Productions Animales*, 21: 403-418.
- Yi Z.B., Yu Y., Liang Y.Z., Zeng B. (2007). *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT-Food Science and Technology*, 4: 597-603.