



HAL
open science

Les tanins hydrolysables et condensés : une piste pour la réduction de la production du méthane entérique par les ruminants en milieu tropical

Moufida Rira

► To cite this version:

Moufida Rira. Les tanins hydrolysables et condensés : une piste pour la réduction de la production du méthane entérique par les ruminants en milieu tropical. Agronomie. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2019. Français. NNT : 2019CLFAC065 . tel-02861917

HAL Id: tel-02861917

<https://theses.hal.science/tel-02861917v1>

Submitted on 9 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE
LA SANTÉ – AGRONOMIE – ENVIRONNEMENT

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Génétique, Physiologie, Pathologie, Nutrition, Microbiologie, Santé, Innovation

Par **Moufida RIRA**

Soutenue publiquement le 13 Décembre 2019

Les tanins hydrolysables et condensés : une piste pour la réduction de la production du méthane entérique par les ruminants en milieu tropical

Rapporteurs	Pr Corine BAYOURTHE (Professeur, INP-ENSAT, Toulouse) Pr Maria José RANILLA (Professeur, Univ. Leon, Espagne)
Examineurs	Dr Denis BASTIANELLI (Chercheur, CIRAD, Montpellier) Pr Christelle PHILIPPEAU (Professeur, Agrosup, Dijon) Pr Gilles MAILHOT (Professeur, CNRS, UCA, Clermont-Ferrand)
Directeur de Thèse	Dr Diego MORGAVI (Directeur de Recherches, INRA, Clermont- Ferrand)
Membre invité	Dr Michel DOREAU (Directeur de Recherches, INRA, Clermont- Ferrand)

Préparée dans l'Unité Mixte de Recherches sur les Herbivores
INRA Centre Auvergne Rhône-Alpes

Remerciements

Je remercie Mme Corine BAYOURTHE (Professeur, INP-ENSA Toulouse) et Mme Maria José RANILLA (Professeur, Univ. Leon, Espagne) pour avoir accepté d'être rapportrices de ce manuscrit, malgré leur charge de travail. Je remercie aussi Mr Denis BASTIANELLI (CIRAD, Montpellier) qui était membre du comité de pilotage de la thèse, Mme Christelle PHILIPPEAU (Agrosup, Dijon) et Mr Gilles MAILHOT (CNRS, UCA, Clermont-Ferrand) pour leur rôle d'examineurs.

Mes sincères remerciements s'adressent à mon directeur de thèse Diego Morgavi et mon codirecteur de thèse Michel Doreau. Mon histoire avec ces deux aimables personnes a commencé en octobre 2011 quand j'ai débarqué de Constantine pour une bourse de 18 mois afin de finaliser une première thèse de doctorat. Au début je ne connaissais que Diego qui m'a dirigé vers Michel, (j'étais un peu craintive comme même) mais j'ai tout de suite découvert deux personnes aux innombrables qualités humaines auxquelles s'ajoutent bien sur les qualités scientifiques qui m'ont beaucoup aidée ; c'est pour cette raison que j'ai refait une nouvelle thèse avec ce duo.

Diego

Merci pour avoir dirigé ma thèse avec beaucoup de patience. Pour ta rigueur scientifique, tes conseils et tes encouragements qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Michel

Merci pour le temps que tu m'a consacré pendant ta retraite, pour ta grande contribution à la réalisation de cette thèse, pour ta gentillesse, tous tes encouragements et pour ton amitié.

Je vous serai éternellement reconnaissante

Mes remerciements s'adressent également à Isabelle Van Praagh-Doreau pour sa sympathie, l'impact de sa gentillesse sur la réussite de cette thèse est considérable !

J'aimerais aussi souligner l'importante contribution des coauteurs des articles intégrés à cette thèse, en particulier Harry Archimède qui était en outre membre du comité de pilotage de ma thèse.

Je remercie chaleureusement les membres de l'équipe DINAMIC à l'INRA pour leur collaboration, aide et sympathie: Pierre Nozière, responsable d'équipe, Cécile Martin, Milka Popova, Mathieu Silberberg pour les discussions scientifiques fructueuses, Angélique Torrent, Lucette Genestoux, Dominique Graviou, Yvonne Rochette pour leur aide précieuse au niveau du laboratoire, ainsi que Agnès Cornu, Gaëlle Maxin et Vincent Niderkorn pour leur participation à mon comité de thèse.

J'aimerais remercier le personnel des installations expérimentales des Cèdres et de l'Annexe, en particulier André Guittard, pour la bonne humeur et leur sympathie au cours des expérimentations, rien n'aurait été possible sans leur contribution.

Mes chaleureux remerciements s'adressent également :

À mes parents,

Vous m'avez toujours poussé à aller plus haut et plus loin dans mes études, dans mes passions...

Pour m'avoir soutenu dans les moments difficiles

Aux limites et au cadre que vous avez su m'imposer, sans lequel je n'aurais pas réussi. Aux espoirs que vous avez bien voulu fonder en moi.

À ma très chère tante Nadira,

Pour m'avoir toujours encouragé, quel que soit le parcours, quels que soient les difficultés

Pour ne pas avoir (trop!) douté de moi

Pour m'avoir «chouchoutée» quand j'en avais besoin

Pour m'avoir hurlé dessus quand j'en faisais trop

Pour tout ce que tu as fait et que tu fais encore pour moi

A ma chère Amie, Selima

Merci pour ta gentillesse, chaque mot apaisant, chaque geste amical a changé mon monde pour le rendre plus doux, plus paisible. Qu'est ce que j'ai fait de bien pour mériter une amie telle que toi ! Tu es incroyable ! Tous les mots me manquent sauf un : Merci

A Mes frères Pipo et Mounir,

Avoir des frères sur qui compter dans les moments difficiles est vraiment merveilleux ! Quelques mots sincères afin de vous remercier pour votre soutien, votre gentillesse, à la joie à laquelle votre présence a contribué.

Enfin,

À tous mes amis, que j'ai croisés au cours de mes années de thèses, avec qui j'ai partagé un peu de labeur, de souvenirs et de soutien. Une mention particulière pour Fabienne, Gaëlle et Maguy avec qui j'ai partagé d'agréables moments.

Résumé

En zone tropicale, la production de lait et de viande par les ruminants est limitée par une faible disponibilité et une qualité médiocre des fourrages. A ces contraintes alimentaires s'ajoute l'impact environnemental lié en particulier aux émissions de méthane entérique par les ruminants. L'objectif de cette thèse était de comparer la production de méthane en milieu tempéré et en milieu tropical, puis de valoriser des fourrages tropicaux connus pour leur richesse en tanins dont les propriétés anti-méthanogènes sont reconnues, et qui peuvent réduire l'impact environnemental sans compromettre la productivité animale.

Cette thèse comporte trois expérimentations distinctes. La première consistait en une étude *in vivo* visant à déterminer si les différences de digestibilité, de production de méthane, de fermentation et d'écosystème microbien du rumen observées entre les zones tempérées et tropicales proviennent de l'environnement (site d'expérimentation en milieu tempéré ou tropical), du fourrage (produit en zone tempérée ou tropicale), ou du génotype ovin (race de zone tempérée ou tropicale). Les résultats ont montré que les différences sont liées en priorité à la nature du fourrage, et sont influencées par les interactions entre génotype, caractéristiques du fourrage et environnement.

La seconde expérience consistait à étudier l'effet de plantes riches en tanins condensés (feuilles de *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta*) sur la production de méthane, l'ingestion et la digestibilité de la ration, les fermentations et l'écosystème microbien du rumen. Un essai *in vivo* a montré que l'incorporation de ces plantes à raison de 40% du régime d'ovins sous forme de granulés permettait de réduire le méthane entérique sans effets indésirables sur la digestibilité et la fermentation ruminale. Un essai *in vitro* a montré que le principal facteur de la réponse a été la dose de tanins condensés plutôt que la source.

La troisième expérience consistait en l'étude *in situ* et *in vitro* du pouvoir anti-méthanogène et de la dégradation dans le rumen de plantes riches en tanins hydrolysables (feuilles et gousses d'*Acacia nilotica*) ou en tanins condensés (feuilles de *Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta*, *Musa spp*). Les résultats obtenus suggèrent que les tanins hydrolysables conviennent mieux à la réduction des émissions de méthane que les tanins condensés car ils inhibent fortement la production de méthane sans effets négatifs marqués sur la fermentation ruminale. Les effets des tanins sur la production de méthane et la fermentation dans le rumen ont été en partie expliqués par le devenir des différentes fractions des tanins (libres, associés aux protéines ou aux fibres) dans le rumen. L'association de plantes riches en tanins hydrolysables et en tanins condensés ne parvient pas à dégager de possibles synergies entre ces de types de molécules.

Ce travail a permis de montrer qu'il était possible de réduire les émissions de méthane entérique par les ruminants en milieu tropical par la consommation de fourrages riches en tanins hydrolysables sans compromettre les processus digestifs dans le rumen ; la diminution de la méthanogenèse avec les tanins condensés présente plus de risque de réduire les fermentations.

Mot clés : méthane, fourrages tropicaux, tanins hydrolysables, tanins condensés, fermentation ruminale

Summary

Hydrolysable and condensed tannins: a way for reducing enteric methane production by ruminants in tropical environments

In tropical areas, dairy and meat production from ruminants is limited by low availability and poor quality of forages. In addition to this dietary constraint, the emission of enteric methane under these less productive conditions is proportionally larger than under temperate conditions. The aim of this work is i) to compare enteric methane production in tropical and temperate environments, and ii) to promote tropical forages rich in hydrolysable or condensed tannins having anti-methanogenic properties that could reduce the environmental impact without compromising animal productivity.

This work includes three separate studies. The first one was an *in vivo* study aiming to determine the origin of the differences of digestibility, methane production, ruminal fermentation and microbial ecosystem between tropical and temperate countries using as variables: the site of the experiment (tropics or temperate area), the type of forage (grown in the tropics or in temperate areas); and the animal genotype (tropical or temperate). Results showed that differences are mainly due to forages, but with interactions between nature of forages, environment and genotype.

The objective of the second study was to determine the effect of plants rich in condensed tannins (leaves of *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala*, and *Manihot esculenta*) on methane production, intake, digestibility, ruminal fermentation and microbial ecosystem. An *in vivo* trial demonstrated that the inclusion of 40% of these plants as pellets in sheep diet reduced enteric methane without compromising the nutritive value of the diet. An *in vitro* trial showed that the response to tannins was more due to tannin concentration than to the plant species.

In the third study, plants rich in hydrolysable tannins (leaves and pods of *Acacia nilotica*) or in condensed tannins (leaves of *Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta*, *Musa spp*) were studied for their anti-methanogenic properties and their ruminal degradation in an *in situ* and an *in vitro* trial. Results suggest that hydrolysable tannins are more suitable than condensed tannins for mitigating methane emission because of a strong reduction in methane production without negatively affecting ruminal fermentation. These results have been partly explained by the fate of the different fractions of condensed tannins (free, protein-bound and fibre-bound) in the rumen. The association of plants rich in hydrolysable tannins with plants rich in condensed tannins failed to produce synergistic effects on methane mitigation.

This work showed that enteric methane production by ruminants could be reduced in tropical areas by the inclusion of hydrolysable tannins without compromising digestive processes in the rumen; methane mitigation with condensed tannins may result in a reduction of the extent of fermentation.

Keywords: methane, tropical forages, hydrolysable tannins, condensed tannins, ruminal fermentation

LISTE DES TRAVAUX

réalisés dans le cadre de cette thèse

Articles publiés dans des journaux à comité de lecture, ou en préparation

- ✓ **Rira M**, Morgavi DP, 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.
- ✓ Archimède H, **Rira M**, Barde DJ, Labirin F, Marie-Magdeleine C, Calif B, Periacarpin F, Fleury J, Rochette Y, Morgavi DP, Doreau M. 2016. Potential of tannin-rich plants, *Leucaena leucocephala*, *Glyricidia sepium* and *Manihot esculenta*, to reduce enteric methane emissions in sheep. *Journal of Animal Physiology and animal nutrition*, 100, 1149-1158.
- ✓ **Rira M**, Morgavi DP, Popova M, Marie-Magdeleine C, Silou-Etienne T, Archimède H, Doreau M. 2016. Ruminal methanogens and bacteria populations in sheep are modified by a tropical environment. *Animal Feed Science and Technology*, 220, 226-236.
- ✓ Archimède H, **Rira M**, Eugène M, Fleury J, Lastel ML, Periacarpin F, Silou-Etienne T, Morgavi DP, Doreau M. 2018. *Journal of Cleaner Production.*, 185, 455-463
- ✓ **Rira M**, Morgavi DP, Genestoux L, Djibiri S, Sekhri I, Doreau M. 2019. Methanogenic potential of tropical feeds rich in hydrolysable tannins. *Journal of Animal Science*, 97, 2700-2710.
- ✓ **Rira M**, Morgavi DP, Popova M, Torrent A, Genestoux L, Maxin G, Doreau M. Composition and ruminal fate of tannins from tropical plants: Correlation with in situ degradability and in vitro methane production. En preparation.

Communications scientifiques lors de congrès internationaux

- ✓ **Rira M**, Morgavi DP, Popova M, Marie-Magdeleine C, Silou T, Archimède H, Doreau M. 2013. Ruminal methanogens population is enhanced by tropical environment. Proceedings of the Greenhouse Gases and Animal Agriculture (GGAA) Conference, Dublin, in *Advances in Animal Biosciences*, 4, 341. (Poster)
- ✓ Archimède H, **Rira M**, Eugène M, Morgavi DP, Anaïs C, Periacarpin F, Calif B, Martin C, Marie-Magdeleine C, Doreau M. 2013. Intake, total-tract digestibility and methane emission of Texel and Blackbelly sheep fed C4 and C3 grasses tested simultaneously in a temperate and a tropical area. Proceedings of the Greenhouse Gases and Animal Agriculture (GGAA) Conference, Dublin, in *Advances in Animal Biosciences*, 4, 285. (Poster)
- ✓ **Rira M**, Marie-Magdeleine C, Archimède H, Morgavi DP, Doreau M. 2013. Effect of condensed tannins on methane emission and ruminal microbial populations. Proc. 4th ISEP Meeting, Sacramento, Ca., in *Energy and protein metabolism and nutrition in*

sustainable animal production (ed. J.W. Oltjen, E. Kebreab, H. Lapierre), Wageningen Acad. Publ., the Netherlands, p. 501-502. (Poster)

- ✓ **Rira M**, Morgavi D., Archimède H., Marie-Magdeleine C., Genestoux L., Bousseboua H., Doreau M., 2014. Effect of tropical plants containing condensed tannins on fermentation, digestibility and methane production in sheep. Abstract Book, Livestock, climate change and food security conference, Madrid, Spain, 19-20 May, p63. (Poster)
- ✓ **Rira M**, Morgavi DP, Archimède H, Marie-Magdeleine C, Genestoux L, Bousseboua H, Doreau M, 2014. Tropical plants containing condensed tannins inhibit ruminal methanogenesis in vitro. Proceedings Joint ISNH/ISRP International Conference ISNH-ISRP Symposium, Canberra, Australia, 8-12 September, published in Animal Production in Australia. (Poster)
- ✓ **Rira M**, Morgavi D P, Genestoux L, Quereuil A, Archimède H, Tillard E, Doreau M. 2018. In situ rumen degradability and in vitro gas and methane production of tannin-rich plants from tropical origin. Proceedings Joint ISNH International Conference ISNH Symposium, Clermont Ferrand, France, 2-6 September. (Poster)
- ✓ **Rira M**, Morgavi DP, Genestoux L, Sakhri I, Djibiri S, Lecomte P. 2018. Methane production in vitro as influenced by tropical plants containing hydrolysable tannins. Proceedings Joint ISNH International Conference ISNH Symposium, Clermont Ferrand, France, 2-6 September. (Poster)

Table des matières

Introduction : le contexte	1
Chapitre 1 : Etat de l'art	6
I/ Point sur le réchauffement climatique et la place de l'élevage dans ce phénomène	7
I.1/ Problème des pays tropicaux, urgence climatique	7
I.2/ Options de mitigation en zone tropicale.....	10
II/ Tanins	15
II.1/ Description et propriétés	15
II.2/ Diversité chimique des tanins	16
II.2.1 / Tanins hydrolysables.....	16
a. Tanins galliques ou gallotanins.....	17
b. Tanins ellagiques ou ellagitanins	17
c. Tanins complexes	18
II.2.2 / Tanins condensés	19
II.3/ Propriétés physico-chimiques et biologiques	20
II.4/ Analyse des tanins, quelle méthode choisir?	21
II.4.1 / Tanins condensés	22
II.4.2 / Tanins hydrolysables.....	24
III/ Tanins comme anti-méthanogènes, molécule de controverse ?.....	25
III.1/ Rappel de la méthanogèse ruminale	25
III.2/ Interactions tanins méthanogénèse	27
III.3/ Mécanismes de l'effet antiméthanogène des tanins	28
IV/ Adaptation des bactéries aux tanins : mécanismes de tolérance.....	34
V/ Devenir métabolique des tanins	38
V.1/ Tanins hydrolysables	38
V.2/ Tanins condensés.....	39
VI/ Limites et intérêts pratiques des tanins	40
VI.1/ Tanins et utilisation de l'azote dans le rumen et l'intestin	40
VI.2/ Tanins, ingestion et digestibilité.....	41
VI.3/ Prévention de la météorisation	44
VI.4/ Alternative aux antiparasitaires chimiques.....	44
VI.5/ La toxicité des tanins hydrolysables empêche-t-elle leur utilisation pratique dans l'alimentation des ruminants ?.....	45

VII/ Recommandations et questions et de recherche sur les tanins.....	46
Chapitre 2 : Effet du type de fourrage, du type d'animal et de l'environnement climatique sur la production de méthane entérique par les ruminants	48
Présentation de l'expérimentation	49
Publication 1: Intake, total-tract digestibility and methane emissions of Texel and Blackbelly sheep fed C4 and C3 grasses tested simultaneously in a temperate and a tropical area.....	51
Publication 2: Ruminal methanogens and bacteria populations are modified by a tropical environment.....	61
Chapitre 3 : Effet de l'apport de ressources riches en tanins condensés sur la digestion et l'émission de méthane par des moutons consommant une graminée tropicale	75
Présentation des expérimentations	76
Publication 3: Potential of tannin-rich plants, <i>Leucaena Leucocephala</i> , <i>Glyricidia sepium</i> and <i>Manihot esculenta</i> , to reduce enteric methane emissions in sheep	78
Publication 4: Potential of tannin-rich plants for modulating rumen microbes and ruminal fermentation in sheep.	89
Chapitre 4 : Effet de la nature des tanins, condensés ou hydrolysables, sur la fermentation ruminal <i>in vitro</i> et la dégradabilité <i>in situ</i> : focus sur le devenir des tanins	104
Présentation des expérimentations	105
Publication 5: Methanogenic potential of tropical feeds rich in hydrolyzable tannins	107
Publication 6: Composition and ruminal fate of tannins from tropical plants: Correlation with <i>in situ</i> degradability and <i>in vitro</i> methane production.....	119
Chapitre 5 : Discussion générale	151
I. Fourrages tropicaux et méthane	152
I.1/ Particularités des fourrages tropicaux : composition chimique et type de photosynthèse	152
I.2/ Part de l'environnement dans la production de méthane et les processus ruminiaux ...	154
I.3/ Effet de la nature des fourrages sur la production de méthane	155
I.4/ Effet du génotype sur la production de méthane et les processus ruminiaux.....	156
II. Plantes tropicales et tanins : leur caractérisation et leur estimation	158
II.1/ Choix des tanins étudiés.....	158
II.2/ Teneurs des plantes étudiées en tanins hydrolysables	160
II.3/ Teneurs des plantes étudiées en tanins condensés	162
II.4/ Importance relative des trois fractions de tanins condensés	166
III. Tanins et dégradation microbienne	167
III.1/ Devenir des tanins dans le rumen	167

III.2/ Tanins et dégradation de l'azote et des parois.....	169
III.3/ Tanins condensés et microbiote ruminal.....	173
VI/ Tanins et méthane entérique	177
VI.1/ Tanins condensés et méthane	177
VI.2/ Tanins hydrolysables et méthane	180
VI.3/ Interaction entre tanins hydrolysables et condensés	183
Conclusion et perspectives.....	186
Bibliographie	191

Listes des figures

Figure 1. Contribution des pays développés, émergents et en développement aux émissions de méthane et de protoxyde d'azote.	8
Figure 2. Relation entre les GES et la productivité animale (Gerber et al., 2011).....	9
Figure 3. Options possibles pour réduire la production de méthane entérique (Cottle et al., 2011).....	11
Figure 4. Structure générale des tanins hydrolysables. Gallotanins et monomères de l'acide gallique, l'acide digallique et penta-O-galloyl- β -D-glucose (Grasel et al., 2016).....	17
Figure 5. Ellagitanins et monomères de l'acide hexahydroxydiphénique.....	18
Figure 6. Structures des flavan-3-ols présents dans les tanins condensés (Naumann et al., 2017).....	19
Figure 7. Exemple des différents types de couplages d'interflavanes se produisant dans les oligomères et les polymères de tanins condensés (Smeriglio et al., 2017).....	20
Figure 8. Schéma synthétisant la méthanogénèse ruminale.	26
Figure 9. Catéchine en tant que puits d'hydrogène pendant la fermentation ruminal <i>in vitro</i> (Naumann et al., 2017 adapté de Becker et al., 2013).....	33
Figure 10. Mécanismes de tolérance des bactéries vis-à-vis des tanins (Patra et al., 2012 adapté de Patra et Saxena, 2011).....	35
Figure 11. Micrographie de transmission électronique de <i>Streptococcus gallolyticus</i> après une nuit de croissance dans l'acide tannique à 4%. Les flèches indiquent la matrice extracellulaire. Barre correspond à 0,2 μ m (O'Donovan et Brooker, 2001).....	36
Figure 12. Micrographie de contraste de phase d'une bactérie ruminale dégradant l'acide tannique. (A) Cellules en l'absence de composés phénoliques. (B) Formation de chaînette à une concentration de 8 g/L d'acide tannique (Nelson et al, 1995).	37
Figure 13. Voies de dégradation des tanins hydrolysables dans le rumen (Patra et al., 2012).	38
Figure 14. Effets des tanins sur le taux d'inhibition de la production de méthane (%) dans le rumen (Min et Solaiman, 2018).....	46

Liste des tableaux

Tableau 1. Part des besoins énergétiques non productifs dans les besoins totaux : effet de la productivité de la vache laitière (Doreau, communication personnelle, d'après INRA, 2007).	10
Tableau 2. Principales caractéristiques des graminées en C4 comparativement aux graminées en C3 et aux pailles (d'après Assoumaya et al., 2007) ¹	154
Tableau 3. Proportion de tanins condensés extractibles, liés aux protéines et liés aux fibres des plantes étudiées : comparaison avec la bibliographie.	165
Tableau 4. Récapitulatif des valeurs de digestibilité ou de dégradabilité mesurées dans les différents essais, <i>in vivo</i> , <i>in situ</i> ou <i>in vitro</i>	171

Liste des abréviations

ADF : Acid Detergent Fibre

ADL Acid Detergent Lignin

AGV : Acides Gras Volatils

CH₄ : Méthane

CO₂ : Dioxyde de Carbone

dMO: digestibilité de la matière organique

dNDF : dégradabilité du Neutral Detergent Fibre

DT : Dégradabilité Théorique

GES : Gaz à Effet de Serre

H₂ : Hydrogène

HHDP : Acide Hexahydroxydiphénique

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

MAT: Matière Azotée Totale

MODI : Matière Organique Digestible Ingérée

MOF : Matière Organique Fermentée

MS: Matière Sèche

MSI: Matière Sèche Ingérée

N₂O : Protoxyde d'Azote

NDF : Neutral Detergent Fibre

PEG: Polyéthylène Glycol

PVPP : Polyvinylpolypyrrolidone

RUSITC : Rumen Simulation Technique

SDS: Sodium Dodecylsulfate

SF₆ : Hexafluorure de Soufre

SPIR : Spectroscopie dans le Proche InfraRouge

UV: Ultraviolet

Introduction : le contexte

I/ Introduction : le contexte

Les dernières décennies ont vu naître de par le monde une volonté croissante de développement écologique avec comme motivation la protection et la préservation de l'environnement, notamment la limitation du réchauffement climatique. Ce dernier est sans équivoque, et la lutte contre lui est un enjeu pour la grande majorité des pays. Elle implique la réduction des émissions de gaz à effet de serre (GES) produits par les activités humaines. Selon les travaux récents de la FAO, les activités liées à l'élevage, incluant celles qui se situent en amont des exploitations d'élevage, représentent 14,5% des émissions de GES d'origine anthropique (Gerber et al., 2013). Ces émissions sont dues à trois gaz : le gaz carbonique (CO₂), le protoxyde d'azote (N₂O) et le méthane (CH₄), et sont exprimées en équivalent-CO₂ afin de tenir compte du pouvoir de réchauffement comparé de ces trois gaz. Le CH₄ produit par les fermentations entériques des ruminants représente au niveau mondial environ 44% des émissions de GES liés à l'élevage.

Bien que l'essentiel de la production de lait et de viande soit réalisé dans des zones tempérées, les zones tropicales sont à l'origine d'une part non négligeable des émissions de CH₄ entérique par les ruminants : 6% pour le continent africain et 13 % pour l'Asie du Sud (sous-continent indien) selon Gerber et al. (2013). Cela conduit certains auteurs, essentiellement américains, à affirmer que les pays en développement sont les premiers responsables des émissions de CH₄ liées à l'élevage (Thorpe, 2009), oubliant qu'ils sont de faibles contributeurs aux émissions de CO₂ dues aux processus en amont de l'exploitation agricole (fabrication d'intrants et d'aliments concentrés) (Opio et al., 2013).

En fait, les pays tropicaux sont de forts producteurs de CH₄ en raison de la faible productivité animale par kg de lait ou de viande (Gerber et al., 2011). La raison principale est que l'émission de CH₄ entérique est proportionnelle à la quantité d'aliments fermentés dans le rumen ; elle est estimée par la quantité d'énergie métabolisable ingérée (IPCC, 2007) ou par la quantité de matière organique digestible ingérée (Sauvant et al, 2011). Or dans les zones tropicales en conditions d'agriculture paysanne les animaux sont faibles producteurs, car ils consomment une quantité modérée d'une ration à base de fourrages de faible digestibilité. La part des besoins énergétiques d'entretien dans les besoins totaux (entretien + production de lait ou de viande) est élevée, et par voie de conséquence la production de CH₄ est élevée lorsqu'elle est rapportée à une unité de production de lait ou de viande (Martin et al., 2010).

L'un des principaux facteurs limitants de la productivité des ruminants en zone tropicale est la faible digestibilité des fourrages tropicaux. Celle-ci est due à une teneur en parois (NDF, ADF) et en lignine plus élevée que celle de fourrages tempérés à stade de végétation comparable (Assoumaya et al., 2007). Cette différence est attribuée au mécanisme de photosynthèse. En effet, les plantes tropicales ont développé des alternatives aux limitations imposées par le climat. Dans le cas des graminées (mais pas des légumineuses), il s'agit du mécanisme de photosynthèse en C4 qui diffère du mécanisme tempéré en C3 par le mode de fixation du CO₂ au cours de la photosynthèse. Il permet à ces plantes d'assimiler la totalité du CO₂ et d'avoir un rendement photosynthétique supérieur à celui des plantes en C3. De plus, le mécanisme en C4 résulte en une teneur élevée en lignine qui affecte considérablement l'ingestion et la digestion chez les ruminants (Wilson, 1994).

Cet effet lié à la faible productivité animale pourrait être renforcé par une émission de CH₄ plus forte pour les fourrages en C4 que pour les fourrages en C3, comme cela a été suggéré par une méta-analyse portant uniquement sur les fourrages (Archimède et al., 2011) : les ruminants qui consomment des graminées en C4 produisent 17 % plus de CH₄ (par kg de matière organique) comparativement à ceux qui consomment les graminées en C3. Toutefois ce travail souffre d'un biais. La comparaison entre fourrages en C3 et en C4 est en réalité une comparaison entre des fourrages en C3 consommés en zone tempérée par des ruminants adaptés aux climats tempérés, et des fourrages en C4 consommés en zone tropicale par des ruminants adaptés aux climats tropicaux. Il importe donc de connaître l'origine réelle de ces différences de production de CH₄, afin d'éviter une interprétation erronée des différences observées.

Les résultats rapportés par la méta-analyse d'Archimède et al. (2011) indiquent que les légumineuses tropicales génèrent 20 % moins de CH₄ que les graminées en C4, probablement en raison de composés secondaires, car en zone tempérée il n'a pas été démontré que les légumineuses avaient un pouvoir anti-méthanogène (Doreau et al., 2011). Parmi ces composés, on pense logiquement aux tanins, qui sont des métabolites secondaires souvent présents en fortes quantités dans les légumineuses arbustives tropicales. Il a été clairement montré que les tanins sont susceptibles de réduire la production de CH₄ (revues de Doreau et al., 2011 et de Jayanegara et al., 2012). Il a récemment été proposé, sur la base d'une méta-analyse réalisée sur des mesures de méthane *in vivo* (Eugène et al., 2018), d'inclure la teneur en tanins des fourrages dans une équation de prédiction de la production de CH₄ par les ruminants recevant des fourrages seuls (Sauvant et al., 2018 in INRA 2018).

Les tanins sont des composés polyphénoliques des plantes qui leur confèrent une défense contre les agressions des phytopathogènes (bactéries, champignons, virus) et des prédateurs (insectes, mammifères herbivores). Du point de vue de la composition chimique, on distingue deux grandes familles de tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. Qu'ils soient hydrolysables ou condensés, les tanins possèdent un large éventail d'activités biologiques, antibactériennes et antioxydantes en particulier, liées à leur caractère réducteur et à leur affinité pour les protéines. Ces substances sont recommandées en nutrition des ruminants, pour leur effet antiparasitaire contre les nématodes (Hoste et al., 2012).

Mais l'utilisation de plantes riches en tanins dans l'alimentation des ruminants présente un inconvénient majeur : les tanins condensés, qui ont la propriété de se fixer aux parois végétales, entraînent souvent une limitation de la dégradation des fourrages dans le rumen, et donc de leur digestibilité, ce qui est un handicap tout particulier dans le cas des fourrages tropicaux riches en parois (Waghorn, 2008). Leur rôle sur l'utilisation de l'azote est moins négatif ou parfois positif : les tanins, qui se fixent aussi sur les protéines, les protègent de la dégradation dans le rumen, souvent sans limiter la digestibilité intestinale. En zone tropicale, les légumineuses arbustives fournissent un apport non négligeable d'azote dans la ration, mais sont souvent de faible valeur énergétique. Quant aux plantes riches en tanins hydrolysables, qui sont beaucoup moins bien connues, leur valeur nutritive ne serait pas réduite dans les mêmes proportions, mais beaucoup d'entre elles sont toxiques pour l'animal (Reed, 1995). Aujourd'hui encore, malgré le nombre considérable d'études, les tanins n'ont pas livré tous leurs secrets, comme en témoigne un article d'une grande spécialiste du sujet (Mueller-Harvey et al., 2018).

La question est donc de savoir s'il faut envisager l'utilisation de plantes riches en tanins en milieu tropical pour réduire la méthanogenèse. Une première réponse peut être tirée d'une synthèse des effets des différents agents de mitigation de la production de CH₄ (Doreau et al., 2017) : les aliments, additifs ou biotechnologies étudiés dans ce but sont soit moins efficaces (c'est le cas de toutes les biotechnologies et de nombreux additifs comme les huiles essentielles), soit efficaces de manière moins systématique (par exemple les plantes riches en saponines ou les acides organiques), soit dangereux ou interdits dans certains pays (antibiotiques ionophores), soit difficiles à recommander pour un usage par l'éleveur (nitrates), soit trop coûteux pour un usage à grande échelle dans les pays tropicaux (lipides, 3-nitrooxypropanol). En pratique, il ne reste que les plantes riches en tanins.

Mais l'usage des plantes riches en tanins dans l'alimentation ne pourra être recommandé qu'en connaissant mieux les effets nutritionnels ou antinutritionnels qui en découlent. Jusqu'à présent, les études sur la digestibilité des plantes riches en tanins ont été déconnectées de celles de leur rôle sur la méthanogenèse. Il est nécessaire d'analyser simultanément la digestibilité des sources de tanins et la production de CH₄ qu'elles engendrent, en comparant pour cela différentes sources. Un élément de compréhension des résultats observés pourrait être fourni en étudiant le devenir des tanins liés aux parois ou aux protéines dans le rumen.

A la suite de ces constats, deux objectifs ont été assignés à cette thèse. Le premier concerne la différence entre les fourrages tropicaux (en C4) et les fourrages tempérés (en C3). Il s'agit de :

- ✓ **Faire la part du type de fourrage, du type d'animal et de l'environnement climatique (zone tempérée ou tropicale) dans les différences de production de CH₄ entérique observées dans les essais menés en milieu tempéré et en milieu tropical ;**
- ✓ **Expliquer les différences de production de CH₄ par la digestibilité, le transit des digesta et les fermentations ruminales.**

Le deuxième objectif est focalisé sur le pouvoir anti-méthanogène, *in vitro* et *in vivo*, des tanins condensés et des tanins hydrolysables contenus dans des légumineuses fourragères et dans des sous-produits de culture utilisables dans l'alimentation des ruminants en zone tropicale. Il s'agit de :

- ✓ **Evaluer l'impact de l'apport de tanins hydrolysables et de tanins condensés (via plusieurs ressources) sur l'émission de CH₄ chez les ruminants *in vitro*, *in situ* et *in vivo*;**
- ✓ **Expliquer les différences de production de CH₄ par la digestibilité et les fermentations ruminales, l'écosystème microbien et le devenir des tanins dans le rumen.**

Afin de situer le contexte des travaux, ce mémoire comporte en premier lieu un état de l'art. Il présente d'abord la contribution des ruminants aux émissions de CH₄ en zone tropicale et les pistes envisageables de réduction du CH₄ entérique. Ensuite il se focalise sur l'utilisation des plantes riches en tanins pour diminuer ces émissions : caractérisation,

propriétés et méthodes d'analyse des tanins, effets antiméthanogènes, devenir métabolique et utilisation pratique (Chapitre 1).

Les trois parties suivantes du mémoire correspondent à la partie expérimentale de l'étude et exposent successivement les expériences menées en conditions *in vitro*, *in situ* et *in vivo*. La première partie répond au premier objectif, les deux autres au second objectif.

1. Dans la première partie, un essai *in vivo* a été simultanément mené en zone tempérée (INRA, Auvergne) et tropicale (INRA, Guadeloupe) dans une optique de comparaison entre les deux environnements de mesure, entre les fourrages en C3 et C4, et entre deux génotypes de moutons (tempéré et tropical) par rapport aux émissions de CH₄ et à différents facteurs explicatifs (Chapitre 2).
2. La deuxième partie expérimentale a consisté à tester, *in vitro* et *in vivo*, l'effet antiméthanogène des tanins condensés via quatre sources tropicales (Chapitre 3). Les plantes riches en tanins condensés sont déjà largement consommées dans les pays tropicaux.
3. La troisième partie a été l'étude comparative, *in vitro* et *in situ*, entre les tanins hydrolysables et les tanins condensés, par rapport aux effets qu'ils peuvent engendrer sur la production de CH₄, la fermentation ruminale et l'écosystème microbien, en utilisant des fourrages collectés dans différentes zones géographiques tropicales (Chapitre 4). Cette partie est plus prospective car les tanins hydrolysables sont actuellement peu présents dans l'alimentation des ruminants.

Chapitre 1 : Etat de l'art

I/ Point sur le réchauffement climatique et la place de l'élevage dans ce phénomène

Les émissions de gaz à effet de serre (GES), leur contribution au changement climatique mondial et les prévisions d'évolution ont été le sujet de nombreuses études au cours des dernières années (Karakurt et al., 2012; Dean et al., 2018). Le réchauffement climatique représente un défi majeur pour les années futures ; il est désormais reconnu par la totalité de la communauté scientifique et la grande majorité des hommes politiques en raison des conséquences irréversibles et destructrices pour la vie sur Terre. Il s'explique par une augmentation des GES relatifs à l'activité humaine (transport, industrie, agriculture dont l'élevage...). Ces derniers captent une partie du rayonnement solaire traversant l'atmosphère, qui de ce fait se réchauffe. Ce phénomène est appelé « forçage radiatif ». L'essentiel du pouvoir réchauffant est dû au CO₂, au N₂O et au CH₄. Ce dernier fait donc partie du trio de tête des GES. Dans la plupart des pays, il provient de différentes sources anthropiques. Cependant, le principal secteur d'émission de CH₄ à l'échelle mondiale est l'agriculture, qui domine avec 51% des émissions globales dues à la riziculture et surtout à l'élevage (fermentations entériques et effluents d'élevage), notamment du fait de la poussée de la production animale dans les pays du Sud (Herrero et al., 2009). Les autres émissions liées à l'élevage (CO₂ et N₂O), généralement calculées par analyse de cycle de vie, concernent essentiellement la production d'aliments et d'intrants (engrais, pesticides), les transports, la récolte des fourrages, l'énergie consommée dans les bâtiments. Un exemple sur troupeaux de bovins à viande est montré par Nguyen et al. (2012). Le CH₄ est un puissant GES qui demeure dans l'atmosphère pendant environ 9 à 15 ans et qui est 28 fois plus « réchauffant » que le CO₂, sur une période de 100 ans (IPCC, 2014). Le CH₄ produit par les ruminants n'entraîne pas seulement des problèmes environnementaux, il représente également une perte d'énergie car de 2 à 12 % de l'énergie brute de l'aliment est converti en CH₄ lors de la digestion microbienne dans le rumen (Johnson et Johnson, 1995). Par conséquent, la diminution de la production de CH₄ provenant de ruminants est souhaitable pour réduire les émissions de GES et accroître l'énergie disponible pour la nutrition des ruminants.

I.1/ Problème des pays tropicaux, urgence climatique

Les émissions de GES liées à l'élevage représentent un pourcentage important des émissions totales de GES dans de nombreux pays en développement, et devraient augmenter au cours des prochaines décennies (IPCC, 2007). En effet, le secteur agricole est actuellement confronté au défi de nourrir une population croissante qui devrait passer d'environ 6,5 à 9,2 milliards de personnes d'ici 2050 (FAO, 2009). Plus d'un milliard de cette augmentation

de population est prévu pour l'Afrique. L'urbanisation rapide devrait également se poursuivre dans les pays en voie de développement et la demande mondiale en produits animaux continuera d'augmenter dans les décennies à venir. Ainsi, les marchés mondiaux doivent avoir la capacité d'approvisionnement à la fois en céréales et en produits animaux en quantités souhaitées. Le challenge serait d'accroître les systèmes de production animale tout en respectant les normes environnementales pour réduire l'impact potentiel des nouveaux systèmes de production (Thornton et al., 2009 ; Meale et al, 2012). Compte tenu de l'importance croissante de la consommation de produits animaux dans de nombreux pays émergents et en voie de développement, les émissions liées à l'élevage représentent un pourcentage plus élevé des émissions de GES totales. Dans ces pays, le nombre d'animaux d'élevage augmente parallèlement pour répondre à la demande croissante en nourriture. L'inefficacité des systèmes d'élevage et le faible investissement dans le secteur pour améliorer la productivité entraînent une augmentation rapide des GES émis dans l'atmosphère (Scholtz et al., 2013). En zone tropicale, les pratiques d'élevage sont généralement ancrées dans la tradition dans des exploitations de type familial, de petite taille et pratiquant un mode d'élevage peu intensifié. D'après la FAO (Opio et al., 2013), les émissions par unité de produit sont plus élevées dans les systèmes à basse productivité d'Asie du Sud, d'Afrique subsaharienne, d'Amérique latine, des Caraïbes et d'Asie du Sud-Est (Figure1).

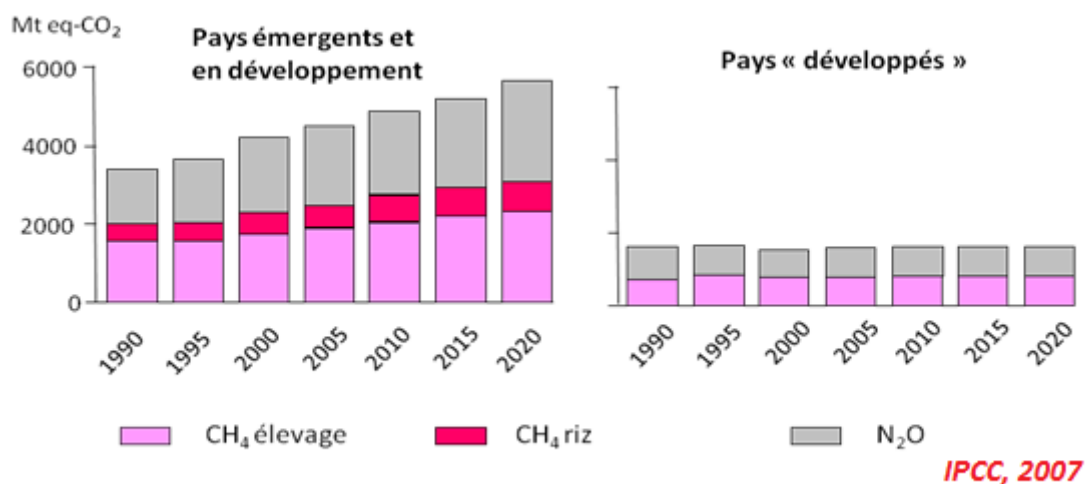


Figure 1. Contribution des pays développés, émergents et en développement aux émissions de méthane et de protoxyde d'azote .

Ceci est illustré par la relation entre les GES et la productivité animale, présentée par Gerber et al. (2011) (Figure 2).

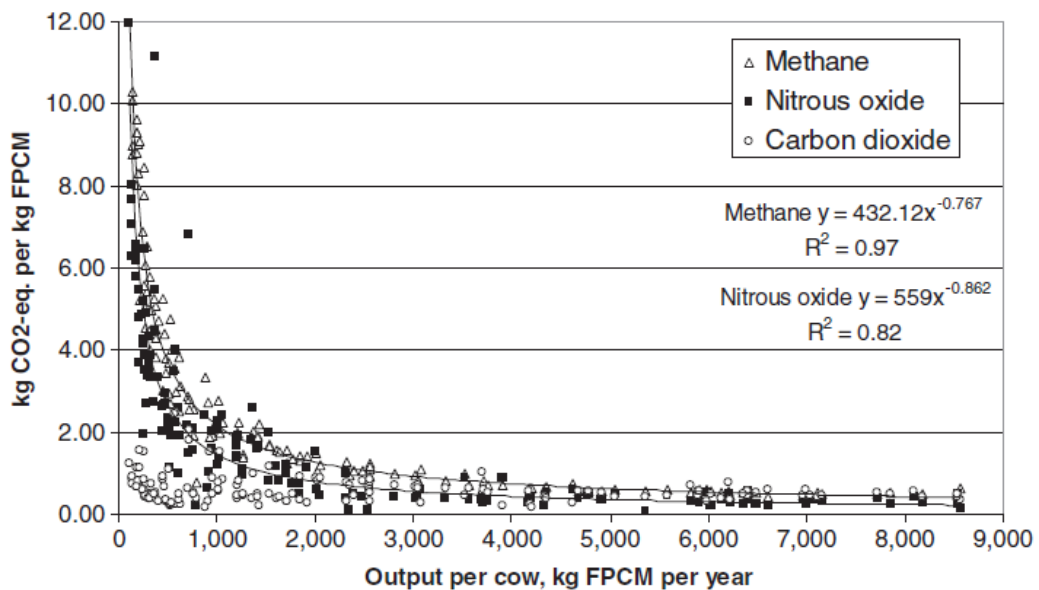


Figure 2. Relation entre les GES et la productivité animale (Gerber et al., 2011).

Il apparait clairement que l'accroissement de la productivité permettrait la diminution des émissions de GES d'autant plus que la productivité est faible. En cause, une mauvaise digestibilité des aliments, des pratiques d'élevage moins performantes en terme de reproduction (plus d'animaux inutiles qui émettent même s'ils ne produisent pas), une vitesse de croissance plus lente et un âge plus avancé au premier vêlage (soit plus de temps durant lequel l'animal émet). Un calcul réalisé à partir des tables des besoins énergétiques des ruminants (INRA, 2018) montre qu'à l'échelle de l'année, le pourcentage des besoins non productifs dans les besoins totaux est beaucoup plus élevé pour une vache typique d'une exploitation familiale africaine que pour une vache à haut potentiel dans un pays développé (Tableau 1). Cette situation présente un caractère d'urgence qui mérite une grande considération et une prompt intervention afin de limiter les éventuelles répercussions irréversibles. La deuxième caractéristique de ces pays est leur grande biodiversité fourragère longtemps considérée de mauvaise valeur nutritive.

L'effet de serre (ou l'urgence climatique) a modifié la perception des scientifiques vis-à-vis de la flore tropicale. La volonté de maîtriser une végétation anciennement considérée comme néfaste a fait place à une démarche beaucoup plus réfléchie en cherchant un équilibre

entre la satisfaction des besoins alimentaires des hommes et des animaux, et la nécessité de préserver l'environnement.

Tableau 1. Part des besoins énergétiques non productifs dans les besoins totaux : effet de la productivité de la vache laitière (Doreau, communication personnelle, d'après INRA, 2007).

	% de besoins non productifs	
	Echelle de l'année	Echelle de la vie
700 kg poids, 50 kg lait/j 1er vêlage 2 ans - 2,5 lactations intervalle entre vêlages 410 j	33	47
700 kg poids, 25 kg lait/j 1er vêlage 2,5 ans - 4 lactations intervalle entre vêlages 380 j	47	59
400 kg poids, 2 kg lait/j 1er vêlage 3,5 ans - 8 lactations intervalle entre vêlages 500 j	87	90

I.2/ Options de mitigation en zone tropicale

Depuis une quinzaine d'années, un grand nombre d'études ont été réalisées dans un objectif de réduction ou de maîtrise des émissions de CH₄ à court et moyen terme au niveau mondial. Il existe des possibilités importantes et de nombreuses solutions sont préconisées, mais la réponse de la production de CH₄ dans le rumen est variable. De nombreuses revues bibliographiques ont été consacrées à ce sujet, les plus exhaustives étant celles de

Beauchemin et al. (2009) et Grainger et Beauchemin (2011) au Canada, Martin et al. (2010) et Doreau et al. (2011) en France, et Hristov et al. (2013a,b) aux Etats-Unis. Depuis, le développement exponentiel des expérimentations au niveau mondial s'est traduit par des revues ou méta-analyses plus ciblées sur l'effet d'agents de mitigation apparus récemment, comme par exemple celle de Lee et Beauchemin (2014) sur l'utilisation des nitrates ou celle de Jayanegara et al. (2018c) sur le 3- nitrooxypropanol. Les articles de synthèse les plus récents montrent qu'il n'y a toujours pas de solution miracle (Doreau et al., 2017 ; Islam et Lee, 2019). Dans ce chapitre, nous ferons une analyse critique des méthodes envisagées pour réduire les émissions de CH₄, basée sur les revues citées ci-dessus en particulier.

Diverses voies ont été explorées dans le but de réduire la quantité de CH₄ produite dans le rumen (Cottle et al., 2011, Figure 3).

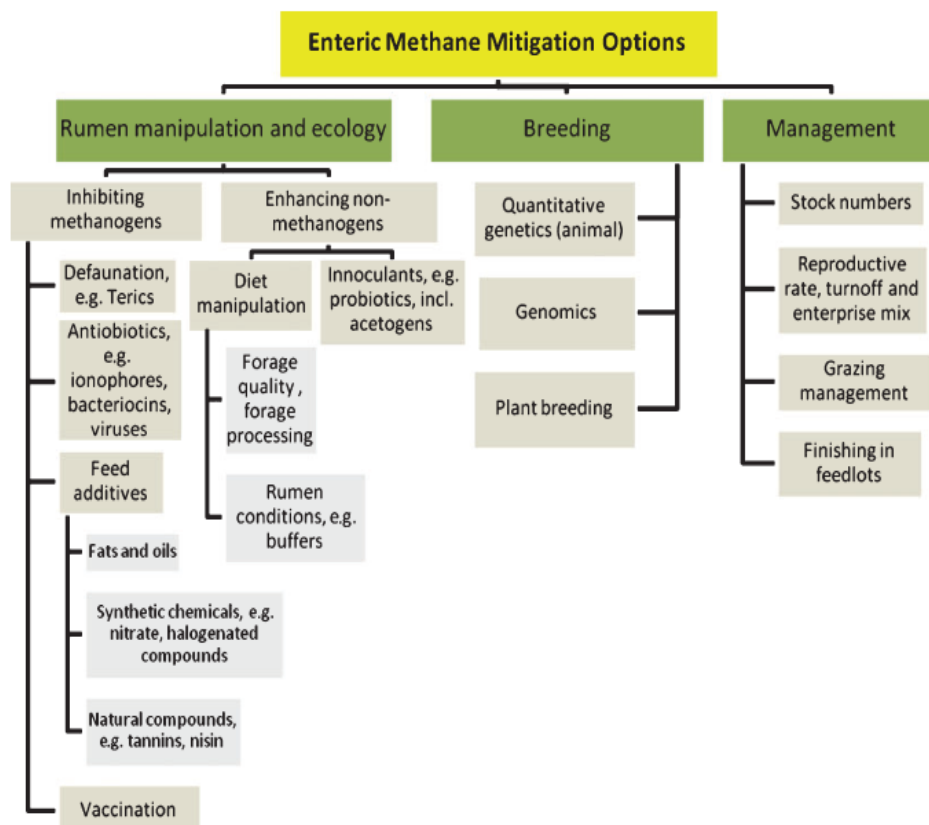


Figure 3. Options possibles pour réduire la production de méthane entérique (Cottle et al., 2011).

Dans la plupart des cas, le principe est de minimiser la consommation d'aliment par kg de produit, lait ou viande, puisque la production de CH₄ est globalement liée à la quantité de

glucides consommés par l'animal. Certaines font appel à la génétique ou à une modification du système de production ou du mode de conduite des animaux, d'autres à une modification du fonctionnement du rumen. Dans ce dernier cas, il est possible ou bien de réduire la production d'hydrogène (H_2) par les processus biochimiques dans le rumen, ou bien de réduire l'utilisation de H_2 pour former du CH_4 . Ce ne sont pas les mêmes mécanismes qui sont mis en jeu dans ces deux cas.

Un moyen qui a été mis en avant très rapidement est l'augmentation par la génétique de la productivité animale : potentiel laitier ou potentiel de croissance des animaux. Augmenter le niveau de production par la génétique, pour réduire la part des besoins productifs dans l'alimentation, est une solution coûteuse, et qui est connue pour réduire les performances de reproduction, la rusticité des animaux et leur adaptation à leur environnement dans le cas des animaux en conditions difficiles. Améliorer l'efficacité alimentaire en augmentant les performances animales pour une même quantité ingérée est une solution séduisante à moyen terme (Basarab et al., 2013) mais les effets secondaires sur la reproduction et la santé animale ne sont pas connus. Cette solution ne semble pas adaptée à court ou moyen terme pour les animaux à faible productivité des zones tropicales. Les modifications du système de production ou de la conduite des animaux (Hristov et al., 2013b) sont des options de long terme, et ne sont pas facilement applicables dans la pratique. Par exemple, dans une exploitation d'élevage, augmenter la part du pâturage dans l'alimentation ou abattre plus précocement les bovins à viande, comme le proposent Cottle et al. (2011), nécessite des changements profonds dans le fonctionnement de l'exploitation, que les éleveurs ne sont pas prêts à adopter dans l'unique but de réduire les émissions de CH_4 .

La manipulation du fonctionnement du rumen par la modulation de la ration ou par l'ajout d'additifs est un moyen qui peut être mis en œuvre plus rapidement et plus facilement. La réduction de la production de CH_4 est souvent liée à une diminution de deux catégories de microorganismes, les protozoaires et les archées méthanogènes. Il faut toutefois s'assurer que les techniques proposées soient efficaces de manière assez systématique, et qu'elles fonctionnent à long terme. En effet, à mesure que les microbes du rumen s'adaptent aux nouvelles conditions, les effets bénéfiques constatés peuvent s'amenuiser. Les méthodes utilisées ne doivent pas être nocives pour l'environnement ou la santé animale ou humaine, ne pas entraîner d'accroissement des deux autres GES, et ne pas affecter la production de lait ou de viande. Enfin, l'objectif de ces travaux de thèse étant la réduction de CH_4 en zone tropicale, il faut s'assurer de la faisabilité des techniques proposées en zone tropicale, ce que

seulement peu d'auteurs ont analysé, sans toutefois se prononcer clairement (Forabosco et al., 2017).

Un moyen efficace de réduire le CH₄ en jouant sur la composition de la ration est d'utiliser des régimes très riches en concentré de type céréales, car ils réduisent les protozoaires qui sont positivement liés à la production de CH₄ (Guyader et al., 2014) et favorisent la production de propionate qui consomme du H₂ (Doreau et al., 2011). Mais cette technique présente l'inconvénient d'émettre plus de CO₂ car il y a plus d'intrants, d'être parfois risquée pour la santé de l'animal en favorisant l'acidose et d'utiliser des céréales pour des ruminants, alors qu'elles pourraient servir à nourrir des humains ou des monogastriques. Le moyen reconnu comme le plus efficace pour réduire le CH₄ est d'enrichir la ration en lipides insaturés, le lin riche en acides gras oméga-3 étant le plus efficace, en raison entre autres d'une réduction des protozoaires. Toutes les synthèses concordent sur ce point. Mais une étude de coût réalisée en conditions françaises a montré qu'une telle technique, appliquée à grande échelle, serait très onéreuse (Doreau et al., 2014). Elle est donc inapplicable en milieu tropical. Dans certaines zones, un apport de concentré sous forme de graines oléagineuses est pratiqué, mais il est trop faible pour avoir un effet sur le CH₄, comme l'a montré une étude dose-réponse (Martin et al., 2016). Enfin, la nature du fourrage pourrait agir sur la production de CH₄. Les relations entre fourrage et émissions de CH₄ sont peu claires. L'amélioration de la qualité du fourrage entraîne une diminution de l'émission de CH₄ par kg de produit, puisque la quantité d'énergie digestible ingérée par jour par l'animal sera supérieure ce qui favorisera la production. Mais pour une même quantité ingérée, les résultats sont contradictoires. En effet, plus il y a de fibres ingérées par kg d'aliment d'une part, et plus ces fibres sont digestibles d'autre part, plus la production de CH₄ sera importante ; or quantité et digestibilité des fibres varient souvent en sens inverse, par exemple lorsque l'âge du fourrage varie. Dans les pays tropicaux, on manque de références sur ce point ; en outre il semble que les fourrages tropicaux en C4 produisent plus de CH₄ que les fourrages tempérés en C3 comme cela a déjà été dit (Archimède et al., 2011). Il est donc probable qu'on ne peut pas réduire la production de CH₄ en milieu tropical en modifiant le type de fourrage.

La piste des additifs alimentaires a été largement étudiée. Les différents auteurs de revues bibliographiques ou de synthèse sont d'accord sur les points suivants : 1) les antibiotiques ionophores sont efficaces à court terme mais pas toujours à long terme, et sont une pratique interdite dans beaucoup de pays comme dans l'Union Européenne ; 2) les probiotiques (bactéries, levures) ont un effet aléatoire et non reproductible ; 3) les acides

organiques (malate, fumarate) n'ont pas un effet systématique et coûtent très cher ; 4) les composés halogénés (bromochlorométhane, bromoethylsulfonate) sont toxiques pour l'animal ; 5) les enzymes exogènes sont rarement efficaces ; 6) les nitrates sont une solution systématiquement efficace et peu coûteuse, mais qui souffre d'une image négative (surtout dans les pays développés) et nécessite des précautions d'emploi et un contrôle de son utilisation afin d'éviter la toxicité pour l'animal par méthémoglobinémie et un accroissement des émissions de N₂O avec des rations riches en azote dégradable dans le rumen (Lee et Beauchemin, 2014, Doreau et al., 2018) ; 7) le 3-nitrooxypropanol est actuellement l'additif le plus systématiquement efficace et probablement à long terme (Jayanegara et al., 2018c), mais il n'est pas encore commercialisé car ses possibles effets collatéraux ne sont pas connus, et s'il l'est dans un proche avenir son coût sera probablement élevé et incompatible avec les réalités économiques des pays tropicaux.

Restent les métabolites secondaires des plantes, qui peuvent être utilisés sous forme d'extraits ou sous forme de la plante entière, ce qui est une solution très économique et adaptée aux pays tropicaux pour des systèmes peu productifs. Depuis une vingtaine d'années, les chercheurs s'intéressent de plus en plus à cette catégorie de biomolécules (Bodas et al., 2012). La reconnaissance des propriétés de ces composés, leur abondance dans les plantes, leur potentiel nutraceutique et leurs vertus dans la réduction des émissions de CH₄ sont les principales raisons de cet engouement (Ugbogu et al., 2019). Les plantes riches en saponines ont un effet méthanogène lié à une diminution des protozoaires non systématique et très variable selon les plantes et pour une même plante selon les auteurs : les saponines de thé ont montré leur efficacité dans des essais réalisés en Chine, mais pas dans des essais réalisés en France (Guyader et al., 2016). Les huiles essentielles ont souvent montré un effet *in vitro*, mais sont en moyenne peu efficaces pour réduire le CH₄ *in vivo*, même à court terme (Benchaar et Greathead, 2011). C'est le cas en particulier des composés de l'extrait d'ail, qui ont maintes fois réduit le CH₄ *in vitro*, mais jamais *in vivo*. En outre, la composition en huiles essentielles d'une même plante varie selon l'année et le site de récolte entre autres, ce qui rend difficile de garantir leur efficacité. La seule catégorie de composés secondaires qui de l'avis des auteurs de synthèses (Jayanegara et al., 2012, Hristov et al., 2013a, Doreau et al., 2017) réduit très fréquemment le CH₄ est celle des tanins. Ces auteurs mentionnent toutefois que leur intérêt anti-méthanogène peut être freiné par une faible valeur nutritive pouvant entraîner une réduction de digestibilité de la ration. Toutefois leur présence fréquente en zone

tropicale conduit à les considérer comme très intéressants pour réduire le CH₄ entérique en zone tropicale. C'est ce qui a motivé leur étude dans cette thèse.

II/ Tanins

Les tanins représentent un des quatre groupes de métabolites secondaires des plantes supérieures avec les saponines, les huiles essentielles et les alcaloïdes. A la différence des métabolites primaires intervenant directement dans la nutrition et la croissance, les métabolites secondaires participent à la vie de relation de la plante avec son environnement. La synthèse des tanins est ainsi un des mécanismes de défense contre les agressions des phytopathogènes (bactéries, champignons, virus) et des prédateurs (insectes, mammifères herbivores) (Mueller-Harvey et al., 2018). Dans ce chapitre, nous présentons les principaux aspects de la connaissance des tanins, de leurs propriétés et leurs effets biologiques, afin de permettre une réflexion conduisant aux expérimentations sur les plantes riches en tanins dans un objectif de réduction des émissions de CH₄.

II.1/ Description et propriétés

Les tanins sont des substances naturelles polyphénoliques, hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000, à saveur astringente, ayant en commun la propriété de précipiter les protéines, en s'y liant (Bate-Smith, 1954 ; Haslam, 1989 ; Scalbert, 1991). Ils forment une vaste famille de molécules caractérisées par la présence d'au moins un noyau aromatique associé à un ou plusieurs groupements phénoliques hydroxylés.

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, particulièrement dans certaines familles comme les légumineuses (*Fabaceae*). Parmi elles, on trouve certaines espèces fourragères tempérées telles que le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) et les lotiers pédonculé et corniculé (*Lotus pedunculatus* et *L. corniculatus*) (Tedeschi et al., 2014 ; Mueller-Harvey et al., 2018). Ces plantes largement utilisées dans les siècles passés et oubliées en raison d'une productivité modérée sont redécouvertes en raison de leurs propriétés environnementales, et leur valeur nutritive est réévaluée. On les retrouve en grand nombre dans légumineuses arbustives fourragères en régions tropicales, en particulier chez *Leucaena leucocephala*, *Calliandra calothyrsus* et certaines espèces du genre *Acacia spp.* (Mokoboki et al., 2005; Hess et al., 2008; Sallam et al., 2010). *Leucaena leucocephala* et *Calliandra calothyrsus* en particulier sont cultivées à grande échelle dans certains pays pour leur richesse en protéines.

Chez les végétaux, les tanins se localisent dans divers organes. Les plus fortes concentrations se rencontrent souvent dans les fruits, les fleurs et les feuilles. On observe surtout une accumulation dans les écorces âgées et les tissus d'origine pathologique comme les galles. Ainsi, des analyses effectuées avec le sainfoin ont montré que les feuilles, les fleurs et les tiges contiennent respectivement 0,31%, 0,30% et 0,07% de tanins (Borreani et al., 2003). La teneur et la nature des tanins d'une plante vont également varier en fonction de l'espèce, du tissu et du stade phénologique (Schweitzer et al., 2008), ainsi que des conditions environnementales : augmentation de la teneur avec le stress thermique et/ou hydrique (Tharayil et al., 2011 ; Bunglavan et Dutta, 2013).

II.2/ Diversité chimique des tanins

Du point de vue de la composition chimique, on distingue aujourd'hui plusieurs catégories de tanins, les tanins hydrolysables et les tanins condensés étant les principales catégories. Il y a aussi les caffetanins, les labiataetanins et les phlorotanins qui se réfèrent à la famille des tanins (Okuda et Ito, 2011). Les deux premières classes sont connues et intensivement étudiées alors que les travaux de recherche concernant les autres catégories sont relativement récents.

Dans ce qui suit, nous ne détaillerons que les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

II.2.1/ Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont constitués de molécules phénoliques simples. Ce sont des esters d'acide gallique et de ses dimères (acide digallique, acide ellagique) et de monosaccharides, le plus souvent le glucose (Figure 4).

Comme leur nom l'indique, ils sont facilement hydrolysables par les acides et les enzymes (tannase) en pyrogallol. Les tanins hydrolysables sont caractéristiques des Angiospermes dicotylédones (surtout *Rosidae*, *Dilenidae*, *Hamamelidae*). Au niveau cellulaire, les tanins hydrolysables sont majoritairement présents dans les parois et les espaces intracellulaires. Les tanins hydrolysables sont souvent répertoriés en 3 trois sous-classes:

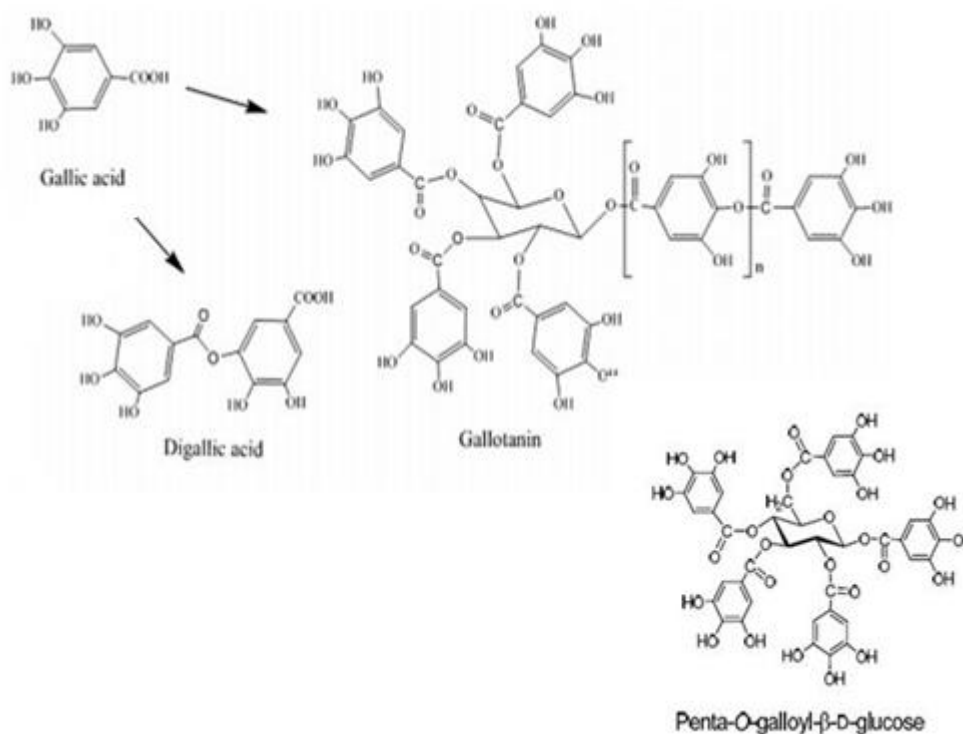


Figure 4. Structure générale des tanins hydrolysables. Gallotanins et monomères de l'acide gallique, l'acide digallique et penta-O-galloyl- β -D-glucose (Grasel et al., 2016).

a. Tanins galliques ou gallotanins

Ce sont les tanins hydrolysables les plus simples. Chimiquement, il s'agit d'esters polygalloyl de glucose, mais d'autres molécules peuvent inclure le glucitol, l'hammamélose, l'acide shikimique, l'acide quinique et le quercitol (Hagerman, 2011). Le gallotanin prototype est le pentagalloyl glucose (β -1,2,3,4,6-Pentagalloyl-O-D-Glucopyranose) ou PGG, qui possède cinq liaisons ester identiques impliquant des groupes hydroxyles aliphatiques du sucre de base (Figure 4). L'anomère alpha n'est pas commun dans la nature. L'hydrolyse acide de ces molécules libère l'ose et l'acide gallique. Les gallotanins simples sont relativement rares dans la nature, cependant ils se trouvent dans plusieurs espèces botaniques comme *Acer*, *Quercus*, *Rhus*, *Pelargonium*, *Acacia* (Haslam, 1986 ; Mueller-Harvey, 2001).

b. Tanins ellagiques ou ellagitanins

Avec plus de 500 molécules naturelles caractérisées à ce jour, les ellagitanins forment de loin le plus grand groupe de tanins hydrolysables connus. Ce sont des esters de l'acide hexahydroxy-diphénique (HHPD) et de monosaccharide, généralement β -D-glucose (Figure 5).

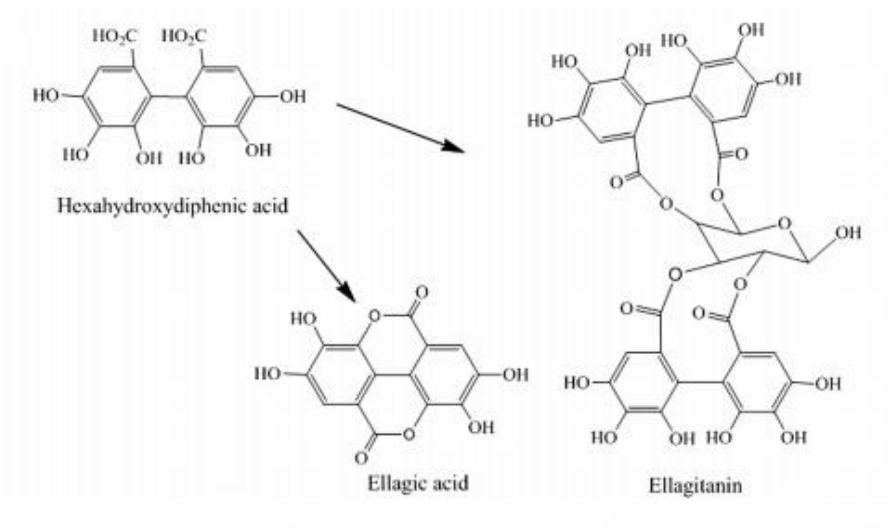


Figure 5. Ellagitanins et monomères de l'acide hexahydroxydiphénique et acide ellagique (Grasel et al., 2016).

Ils peuvent être sous forme de monomère, oligomère ou C-glycosidique. Les ellagitanins ont surtout tendance à former des dimères et des oligomères de poids moléculaire élevé. Les monomères ont des liaisons de type C-O-C (Silva Pinto et al., 2008). Les ellagitanins C-glycosidiques se caractérisent par une liaison intermoléculaire très spécifique entre le carbone anomérique d'un monomère et le HHDP ou le groupe galloyl d'un autre monomère (Quideau, 2009). La structure chimique des ellagitanins a une influence sur leur sensibilité à l'hydrolyse. De plus, étant des composés de structure complexe, les ellagitanins subissent facilement des réactions chimiques (isomérisation et oligomérisation). Les ellagitanins sont plus communs que les gallotanins. Plusieurs ellagitanins ont été isolés des fruits de *Terminalia chebula* (myrobolan) (Schmidt et Mayer, 1956), ainsi que des espèces de *Castanea* (chêne) et de *Quercus* (châtaignier) de la famille des *Fagaceae*.

c. Tanins complexes

Appelés également tanins partiellement hydrolysables, ils résultent de la condensation entre une unité de tanin hydrolysable et une unité de tanin condensé. Cette condensation conduit à la formation d'une liaison carbone-carbone entre l'atome de carbone C1 du glucose de la molécule de tanin hydrolysable et un carbone C6 ou C8 de la molécule de flavanol monomère ou de tanin condensé (Khanbabae and van Ree, 2001). On les retrouve dans certaines plantes comme les écorces de *Quercus petraea* (Konig et al., 1994).

II.2.2/ Tanins condensés

Les tanins condensés sont des composés non hydrolysables ayant un poids moléculaire plus élevé, issus de la polymérisation d'unités flavan-3-ols en dimères, oligomères (2-10 monomères) et polymères (>10 monomères), qui sont hydroxylés en position 3. Cette condensation leur confère une structure voisine à celle des flavonoïdes (Figure 6). La variation structurelle des tanins condensés est due aux différentes unités, aux positions, orientations et types des liaisons inter-flavonoïdes. Les unités flavan-3-ols les plus courantes trouvées dans les tanins condensés comprennent la catéchine, l'epicatéchine, la gallocatéchine et l'épigallocatéchine (Figure 6) (Naumann et al., 2017).

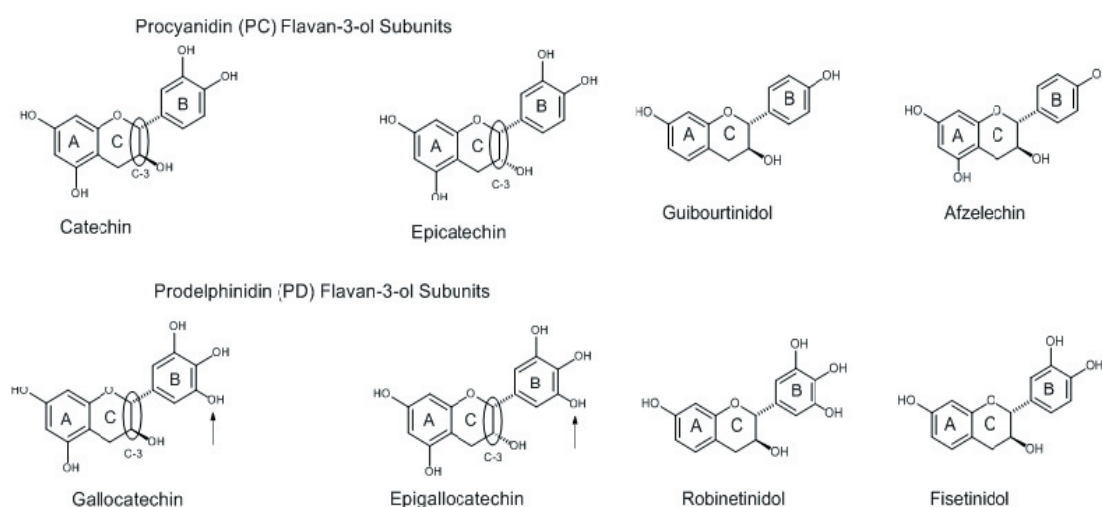


Figure 6. Structures des flavanes-3-ols présents dans les tanins condensés (Naumann et al., 2017).

Dans les structures oligomériques et polymériques des tanins condensés, les unités flavan-3-ols sont reliées entre elles par deux types de liaisons inter-flavonoïdes : des liaisons dites de type B et parfois des liaisons de type A. Les liaisons interflavonoïdes de type B se font entre le carbone C4 de l'unité supérieure et les carbones C8 ou C6 de l'unité inférieure (moins fréquente) (Smeriglio et al., 2017). Les tanins condensés de type A ont une liaison éther supplémentaire par rapport au type B qui peut se faire entre le carbone C2 du cycle C de l'unité supérieure et la fonction hydroxyle portée par le carbone C7 ou C5 du cycle A de l'unité inférieure (Figure 7). Lorsqu'ils sont traités à chaud en milieu acide, les tanins condensés peuvent être dépolymérisés et générer des anthocyanidines, c'est pourquoi ils sont également appelés proanthocyanidines (Porter et al., 1986). Ils sont habituellement dénommés d'après l'anthocyanidine qui est libérée : les procyanidines et les prodelphinidines. Ces

derniers se différencient par un groupement OH supplémentaire en position R3 et ont en conséquence une capacité plus élevée à se fixer aux protéines. Au niveau cellulaire les tanins condensés sont surtout stockés sous forme libre dans les vacuoles (70-80%) et, en proportion variable, sous forme liée aux fibres ou aux protéines cellulaires (Terrill et al., 1992).

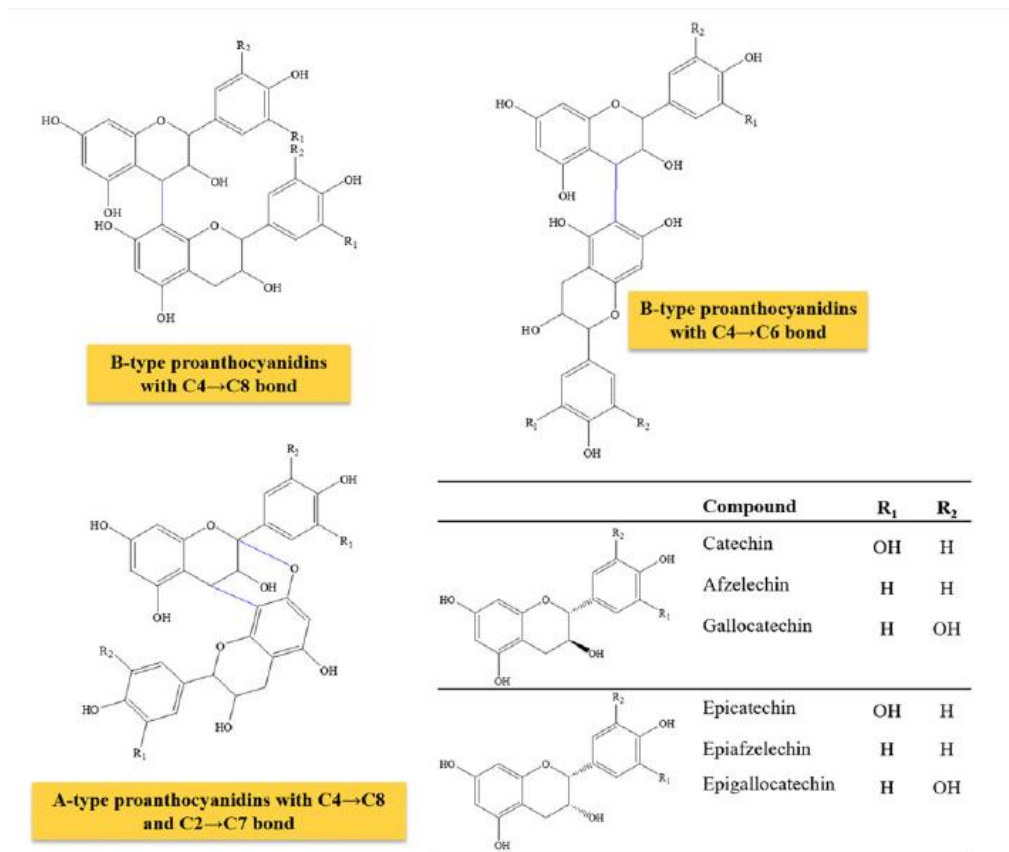


Figure 7. Exemple des différents types de couplages d'interflavanes se produisant dans les oligomères et les polymères de tanins condensés (Smeriglio et al., 2017).

II.3/ Propriétés physico-chimiques et biologiques

Les tanins hydrolysables et condensés ont la capacité de se fixer aux protéines. Mais cette propriété est plus attribuée aux tanins condensés. La nature des associations tanins-protéines est sujette à un débat scientifique. Des interactions de différentes natures ont été proposées dans la littérature : des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogène, des interactions de type ionique (exclusives des tanins hydrolysables) ou covalente (Kumar and Singh, 1984 ; Naumann et al., 2017). L'activité biologique des tanins est multifactorielle ; elle est liée en particulier, au poids moléculaire des tanins, au degré de polymérisation, à la stéréochimie, à l'hydroxylation, au nombre de sites capables de s'associer avec les protéines,

ainsi qu'au pH de l'environnement (Smith et al., 2005 ; Bayourthe et Ali-Haimoud-Lekhal, 2014).

Plusieurs auteurs ont montré que la capacité des tanins à précipiter les protéines augmente avec le poids moléculaire et le degré de polymérisation (Bate-Smith, 1973 ; Vidal et al., 2003). Cependant, d'autres auteurs comme Huang et al. (2010) et Tharayil et al. (2011) ont suggéré une capacité réduite de précipitation des protéines par les tanins condensés ayant un poids moléculaire et un degré de polymérisation élevés, et ceci serait dû à une liberté conformationnelle limitée. La conformation des protéines affecte leur affinité pour les tanins condensés. En effet, les protéines globulaires étroitement enroulées ont une affinité faible pour les tanins condensés par rapport aux protéines flexibles à structure ouverte (Hagerman et Butler, 1981). Ces derniers présentent une accessibilité accrue des groupes phénoliques des tanins condensés pour les groupes carboxyles des protéines, ce qui permettrait de favoriser les liaisons hydrogène entre les tanins condensés et les protéines (Edelmann et Landl, 2002; Smith et al., 2005). La complexation des tanins condensés aux protéines est pH-dépendante. Les liaisons sont plus fortes quand le pH est proche du point isoélectrique de la protéine (Hagerman and Butler, 1981).

Bien que les tanins exercent principalement leurs effets sur les protéines, ils peuvent interagir avec les glucides, notamment les hémicelluloses, la cellulose, l'amidon et les pectines (Chiquette et al., 1988; Schofield et al., 2001). Ils sont capables de se lier aux glucides et les précipiter (mécanisme de compétition avec les protéines) (Soares et al., 2012). Dans les tissus des plantes, les tanins condensés peuvent se lier aux fibres (Terrill et al., 1992).

Les tanins condensés ont la capacité de chélater les minéraux. Certains cations comme Mg, Ca, Zn, Mn, Co, Cu, Al, Fe³⁺ et Fe²⁺ sont précipités par les tanins condensés à des pH précis comme pour les protéines (Scalbert, 1991 ; Naumann, et al., 2013a ; Naumann et al., 2017). La capacité des tanins condensés à se lier aux lipides a également été démontrée (Tsuchiya, 1999), notamment pour le lipide A du lipopolysaccharide chez les bactéries à Gram négatif (Delehanty et al., 2007).

II.4/ Analyse des tanins, quelle méthode choisir?

La littérature concernant la méthodologie d'analyse des tanins est diversifiée et parfois contradictoire. Pour la même plante, les teneurs mesurées en tanins sont extrêmement variables selon les auteurs, et il est très vraisemblable que les différences ne soient pas liées

seulement aux variations des teneurs en tanins en fonction du stade phénologique, du lieu et de l'année de récolte, l'organe de la plante, des conditions du sol et du climat. Ainsi, pour *Acacia nilotica*, la teneur en tanins hydrolysables varie de moins de 0,1 (Zabré et al., 2018) à 18,6% de la matière sèche (Goel et al., 2015). Pour *Calliandra calothyrsus*, la teneur en tanins condensés varie de 1,8 (Dzowela et al., 1995) à 36,8% de la matière sèche (Tuwei et al., 2003). Une cause de cette amplitude de variation est très certainement la méthode d'analyse utilisée. Les méthodes actuellement disponibles pour l'analyse des tanins hydrolysables et condensés vont des simples méthodes colorimétriques, spectrophotométriques (UV) et enzymatiques à des techniques de chromatographie couplée à la spectrophotométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire, plus sophistiquées et plus onéreuses mais qui permettent de définir la structure chimique de la molécule (Zeller, 2019). Ainsi Mueller-Harvey et al. (1987) caractérisent l'ensemble des composés phénoliques présents dans des fourrages éthiopiens. Mais même si ces techniques de référence fournissent des résultats très précis, elles ne sont pas adaptées à des études dont l'objectif principal est le rôle de tanins dans le fonctionnement du rumen. C'est pourquoi, nous détaillons uniquement des méthodes plus simples d'emploi, en particulier celles qui nous ont semblé les plus à même d'être utilisées dans les études de nutrition animale.

II.4.1/ Tanins condensés

Deux méthodes simples de quantification des tanins condensés dans les fourrages sont couramment utilisées : les méthodes butanol-HCl et vanilline. La méthode butanol-HCl a été mise au point par Swain et Hillis (1959). La réaction implique la dépolymérisation des polymères dans l'acide et la conversion des monomères en anthocyanidines, qui peuvent être quantifiées par spectrophotométrie. Cette méthode a une longue histoire et a fait l'objet de plusieurs modifications à travers les années afin de l'améliorer. La modification la plus marquante est celle de Porter et al. (1986), qui ont augmenté la reproductibilité de cette méthode en optimisant la proportion du butanol et de l'acide, le temps de la réaction, l'addition d'ions ferreux et la sensibilité de la méthode à la présence d'eau. Depuis cette modification, cette méthode a été largement recommandée pour déterminer la teneur en tanins condensés (Hagerman et Butler, 1989; Waterman et Mole, 1994). Terrill et al. (1992) ont apporté des modifications complémentaires à la méthode qui consistaient en l'utilisation d'extraits aqueux, le développement de courbes étalons pour chaque fraction de tanins, la prolongation du temps d'ébullition et la suppression d'ions ferreux de la réaction. Ces modifications ont permis l'utilisation de la méthode butanol-HCl pour la mesure de la teneur

en tanins condensés en trois fractions différentes : libres ou extractibles, liés aux protéines et aux fibres. La méthode butanol-HCl de Terrill et al. (1992) est très recommandée pour l'évaluation de la teneur en tanins des plantes riches en tanins condensés ; des auteurs ont en effet constaté que leur méthode n'a pas réussi à analyser de très faibles concentrations de tanins condensés, c'est-à-dire, lorsque les plantes en contiennent moins de 1 % (Jackson et al., 1996). La méthode butanol-HCl est encore sujette à de nombreuses études visant à l'améliorer davantage en optimisant les procédés d'extraction en modifiant les solvants (Mané et al., 2007 ; Grabber et al., 2013 ; Shay et al., 2017). L'avantage de la méthode butanol-HCl est qu'elle peut être utilisée directement sur du matériel végétal ou sur des résidus extraits par solvant. Elle permet une quantification directe de toutes les fractions de tanins condensés, c'est-à-dire les extractibles et les non extractibles (Tarascou et al., 2010 ; Perez-Jimenez et Torres, 2011). Selon le solvant utilisé, les tanins condensés extractibles représentent généralement entre 10 % et 50% de la teneur totale en tanins condensés, et dans certains tissus végétaux, ils peuvent atteindre 90% du total des tanins condensés (Marles et al., 2003). Typiquement, l'analyse des tanins condensés avec cette méthode s'effectue en utilisant l'acétone qui semble être le solvant le mieux établi en terme d'extraction des tanins condensés (Lindroth et al., 1996 ; Lindroth et al., 2002 ; Liu et al., 2009). Elle est souvent diluée avec l'eau (7:3) (Karonen et al., 2004; Sivakumaran et al., 2006; Esatbeyoglu et al., 2010). Le deuxième solvant communément utilisé après l'acétone est le méthanol (Yu et Dahlgren, 2000 ; Xu et al., 2012). Pour les solvants aussi, les résultats sont contradictoires ; par exemple Sarnoski et al. (2012) n'ont pas trouvé de différence en comparant l'extraction des tanins par différents solvants. Les différences structurelles entre les tanins condensés provenant de diverses sources végétales peuvent conduire à des réactivités variables à ce test d'où la nécessité d'utiliser des standards de tanins condensés purifiés de la même espèce si une quantification absolue est indispensable (Terrill et al., 1992 ; Jackson et al., 1996). En effet, les standards internes diffèrent des standards commerciaux comme le quebracho et qui souvent surestime ou sous-estime la teneur en tanins condensés (Wisdom et al., 1987 ; Giner Chavez et al., 1997 ; Schofield et al., 2001 ; Wolf et al., 2008 ; Hattas et al., 2012). Cependant, l'utilisation d'un standard commercial comme le quebracho avec la méthode butanol-HCl est plus pratique et permet tout de même une quantification cohérente et une comparaison objectives entre les espèces végétales notamment pour les études qui concernent la nutrition animale où l'élucidation de la structure chimique est secondaire.

La méthode à la vanilline permet également de déterminer la teneur en tanins condensés dans les fourrages. La première version de cette méthode a été décrite par Swain et Hillis (1959) ; elle implique la réaction de la vanilline préparée dans une solution d'acide sulfurique à 70% avec le noyau A des flavan-3-ols ou des flavan-3,4-diols pour former un produit de condensation rouge qui peut être mesuré par spectrophotométrie à 500 nm (Swain et Hillis, 1959). Burns (1971) a modifié la méthode en remplaçant l'acide sulfurique à 70% par l'acide chlorhydrique pour mesurer la teneur en tanins des grains de sorgho. Ceci a simplifié la procédure, mais les composés colorés obtenus avec l'acide sulfurique étaient plus stables que ceux obtenus avec l'acide chlorhydrique qui ont une plus faible reproductibilité (Scalbert, 1992). Afin d'améliorer la sensibilité et la reproductibilité du dosage, cette méthode a également été sujette à de nombreuses modifications en testant plusieurs facteurs tels que la concentration de la vanilline, le solvant d'extraction, le temps de l'extraction et de la réaction, la température, ainsi que les standards utilisés pour l'expression des résultats (Maxon et Rooney, 1972; Makkar et Becker, 1993). Comparativement à la méthode butanol-HCl, la méthode vanilline-HCl a été moins explorée. La dernière tentative d'amélioration de cette méthode quantitative a été publiée par Sun et al. (1998). La méthode de vanilline a été utilisée pendant de nombreuses années comme méthode colorimétrique pour le dosage des tanins condensés en raison de sa sensibilité et de sa simplicité (Desphande et al., 1986) mais une plus faible reproductibilité et une spécificité moindre la rendent de moins en moins employée.

II.4.2/ Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont également dosés par des méthodes colorimétriques, mais ces dernières ont été moins étudiées que celles des tanins condensés. Deux méthodes sont couramment employées. La première est la méthode au réactif KIO_3 décrite par Bate-Smith (1977) qui permet de déterminer les gallotanins et les ellagitanins. Cette dernière avait quelques inconvénients par rapport au développement de la couleur qui dépend de façon critique de la température et de la durée de la réaction. Pour cette raison, cette méthode a été modifiée par Willis et Allen (1998) qui ont réexaminé ce test en détail et ont suggéré un protocole amélioré pour la détermination des gallotanins et ellagitanins, et juste après par Hartzfeld et al. (2002) afin de faciliter le screening des tanins hydrolysables dans les aliments et les fourrages avec un protocole qui peut être mis en œuvre dans des laboratoires dotés de capacités instrumentales limitées. La deuxième méthode est celle de la rhodanine développée par Inoue et Hagerman (1988) et qui dose spécifiquement les gallotanins. Ces derniers sont

mesurés en déterminant la quantité d'acide gallique avant et après hydrolyse des tanins en conditions anaérobies. Il est possible de déterminer les ellagitanins par différence entre les résultats obtenus par la première et par la deuxième méthode.

Les tanins hydrolysables peuvent aussi être estimés indirectement par la méthode de Folin Ciocalteu qui permet de quantifier globalement les composés phénoliques (Porter et al., 1986). Le réactif de Folin Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux. Afin de séparer les composés phénoliques totaux des composés phénoliques autres que les tanins, un dosage différentiel avant et après ajout d'un polymère insoluble qui se lie aux tanins, le polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), est réalisé pour avoir la quantité des tanins totaux. Enfin les tanins hydrolysables sont obtenus par soustraction entre les tanins totaux et les tanins condensés préalablement dosés par la méthode butanol-HCl. Cette méthode nous semble très imprécise, car la technique de Folin-Ciocalteu est réputée pour son manque de reproductibilité et sa non-spécificité des polyphénols (Makkar et al., 1993); et la différence entre deux analyses utilisant cette technique est d'autant plus imprécise.

Pour conclure, le choix d'une méthode de dosage demeure jusqu'à présent délicat. La non maîtrise de l'interaction structure chimique/activité biologique et les différences entre les résultats obtenus est un sérieux obstacle dans la recommandation d'une méthode d'analyse particulière à l'heure actuelle. Il est donc suggéré d'utiliser, dans la mesure du possible, une série de méthodes pour caractériser les plantes contenant des tanins. En plus des méthodes chimiques, d'autres tests biologiques, comme la diffusion radiale qui mesure le taux de précipitation des protéines par les tanins, devraient également être envisagés en conjonction avec des essais sur animaux afin de démêler les effets des tanins sur la nutrition animale.

III/ Tanins comme anti-méthanogènes, molécule de controverse ?

III.1/ Rappel de la méthanogèse ruminale

Les régimes des ruminants comprennent approximativement de 75 % de glucides sous forme de cellulose, d'hémicelluloses et d'amidon. Dans le rumen, ces sucres complexes sont dégradés par les enzymes du microbiote ruminal et libèrent trois principaux acides gras

volatils (AGV), l'acétate, le propionate et le butyrate. Ces AGV seront par la suite absorbés à travers la paroi du rumen et sont utilisés comme source d'énergie par l'animal. En plus des AGV, le microbiote ruminal génère des sous-produits du métabolisme comme le H₂ et le CO₂ qui sont les précurseurs du CH₄ entérique (Figure 8).

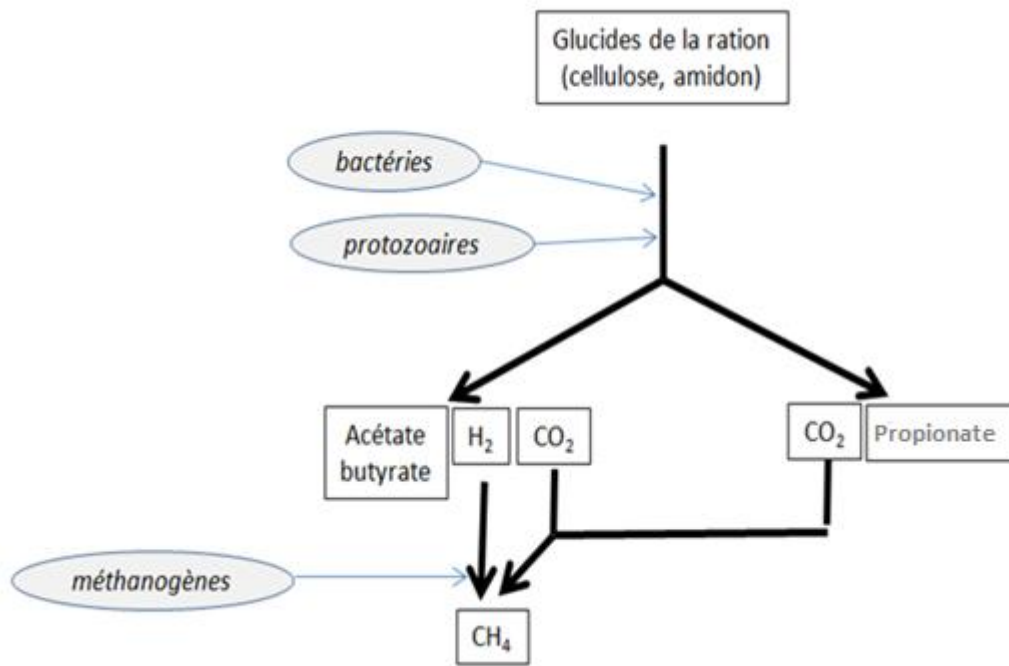


Figure 8. Schéma synthétisant la méthanogénèse ruminale.

Deux groupes de ce microbiote sont les principaux producteurs de H₂, il s'agit des bactéries et des protozoaires. Un autre groupe se charge d'utiliser le H₂ pour produire le CH₄, il s'agit des archées méthanogènes. En effet, de fortes concentrations en H₂ dans le rumen impliquent le ralentissement de l'activité des microbes qui fermentent les aliments, ce qui pourrait compromettre la production d'AGV (McAllister et Newbold, 2008). Pour une fermentation optimale, un équilibre entre la production et l'utilisation de le H₂ doit être maintenu dans l'environnement ruminal. L'hydrogène est la principale source d'énergie pour les archées méthanogènes (dans un degré moindre l'acétate, le formate et les alcools). Ces bactéries utilisent le H₂ pour réduire le CO₂ en CH₄, selon la réaction suivante : $4 \text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$. Le CH₄ et le CO₂ sont ensuite éructés pour l'essentiel, une petite partie étant absorbée par la paroi du rumen puis exhalée. D'autres voies d'utilisation du H₂ sont possibles, mais sont normalement très minoritaires. Les plus connues sont la voie de l'acétogénèse, qui produit de l'acétate à partir de CH₄ et CO₂ grâce à des bactéries acétogènes et la voie de la

réduction des nitrates qui produit des nitrites et de l'ammoniac à partir de H₂ et de NO₃ grâce à des bactéries nitroréductrices (Morgavi et al., 2010).

III.2/ Interactions tanins méthanogénèse

Les études montrent des effets très variables de ces substances sur la méthanogénèse. La plus grande partie des travaux aboutissent à une réduction de la méthanogénèse confirmée par la méta-analyse de Jayanegara et al. (2012) qui récapitule 15 essais *in vitro* et 15 essais *in vivo* comprenant 171 traitements portant sur les tanins hydrolysables et condensés. Le taux de réduction du CH₄ entérique varie considérablement entre les études, de 2% à 63% (Patra et Saxena, 2010 ; Bodas et al., 2012). La variabilité de la réponse aux tanins a été expliquée par plusieurs auteurs et les avis étaient parfois contradictoires. Elle peut être due à la nature des tanins (hydrolysables ou condensés), à leur structure chimique, en particulier leur poids moléculaire (Huang et al., 2011) ou tout simplement à la dose employée. Les tanins peuvent être consommés directement dans certains fourrages ou ajoutés sous forme d'extraits à la ration. Wischer et al. (2013) ont évalué *in vitro* les effets de 10 extraits de tanins (hydrolysables et condensés) sur la production de CH₄ et ont noté des réductions allant de 8 à 28 %. Des résultats similaires ont été rapportés par Carulla et al. (2005), Wang et al. (2008), et Puchala et al. (2012) pour les extraits de tanins condensés. Plusieurs auteurs établissent une relation négative entre les teneurs en tanins de différentes plantes et les productions de CH₄ *in vitro* (Hariadi et Santoso, 2010 ; Niderkorn et al., 2011 ; Soltan et al., 2013) et *in vivo* (Animut et al., 2008a, b ; Puchala et al., 2012), ce qui suggérerait que la structure et la nature des tanins n'est pas un élément majeur de la variabilité de l'effet des tanins sur la méthanogénèse, par rapport à la dose de tanins.

Les tanins hydrolysables sont moins étudiés que les tanins condensés en raison de leur risque potentiel de toxicité hépatique et rénale pour l'animal (Reed, 1995). Jayanegara et al. (2015) ont rapporté que les tanins hydrolysables perturbaient moins les processus fermentaires et étaient plus efficaces dans la réduction de CH₄ *in vitro* que les tanins condensés. Les mêmes conclusions ont été tirées par Hassanat et Benchaar (2013) et Min et al. (2015) pour des extraits de tanins hydrolysables. Bhatta et al. (2009) ont analysé six sources commerciales contenant des tanins hydrolysables et des tanins condensés et ont montré un plus grand potentiel de réduction de la méthanogénèse par l'utilisation d'un mélange de tanins hydrolysables et des tanins condensés. La même tendance a été rapportée par Aboagye et al. (2019).

Cependant, quelques études échouent à démontrer une quelconque réduction des émissions de CH₄. En effet, l'ajout de l'extrait de bois de châtaignier (riche en tanins hydrolysables) à raison de 0,2% de la ration ne montre aucun effet sur la méthanogénèse *in vitro* (Sliwinski et al., 2002). De même, Beauchemin et al. (2007) n'ont observé aucune inhibition de la production de CH₄ par l'ajout du quebracho (riche en tanins condensés) à 2% de la ration mais ces études restent minoritaires.

L'inhibition de la méthanogénèse par les tanins est généralement (mais non systématiquement) accompagnée d'une réduction de la production de gaz qui indique une diminution de la dégradation des glucides, ce qui constitue l'inconvénient majeur de l'utilisation des tanins pour la mitigation du CH₄. Ainsi des études *in vitro* ont montré que le remplacement de 45 % du régime alimentaire par *Lespedeza cuneata* ou *Desmodium paniculatum*, ayant une concentration de tanins condensés de 2,6 et 9,0 %, respectivement, provoque une diminution de la production de CH₄ sans compromission de la fermentation ruminale (Naumann et al., 2015). De même, Cieslak et al. (2012) ont montré que les tanins condensés de *Vaccinium vitis idaea* distribués à raison de 2 g/kg de matière sèche atténuent la production de CH₄ sans effet négatif sur la fermentation.

III.3/ Mécanismes de l'effet antiméthanogène des tanins

La première raison pouvant expliquer la diminution de production de CH₄ en présence de tanins est la diminution de la quantité de glucides dégradés qu'ils entraînent, puisqu'il y a un lien direct entre quantité de glucides digérés et CH₄ produit. Cette diminution peut être liée à l'action négative des tanins sur la digestibilité des parois, mais aussi parfois à la plus faible concentration en parois de l'aliment, en raison d'une concentration élevée en constituants secondaires ou en protéines. Mais les tanins ont aussi un effet antiméthanogène par une action inhibitrice sur le microbiote. Qu'ils soient hydrolysables ou condensés, les mécanismes mis en jeu ne sont pas encore complètement établis. Il existe de multiples mécanismes qui pourraient expliquer l'effet antiméthanogène observé, mais il est probable que ces mécanismes ne soient pas exclusifs.

Le premier mécanisme est que les tanins agissent directement sur les archées méthanogènes du rumen. Plusieurs études ont montré une action bactériostatique ou bactéricide des tanins vis-à-vis de ces microorganismes, variable en fonction du groupe de méthanogènes et du type de tanins. En effet Tavendale et al. (2005) ont évalué la sensibilité de deux souches de *Methanobrevibacter ruminantium* : YLM-1 et DSM1093 ; ils ont montré

que les fractions oligomériques des tanins condensés de *Lotus pedunculatus* étaient inactives contre les deux souches en culture pure. Cependant une fraction polymérique de tanins a complètement inhibé ces deux souches. L'effet inhibiteur pour la souche YLM1 était de type bactériostatique, tandis que pour la souche DSM1093 il était de type bactéricide. Une tendance similaire a été observée par Ridwan et al. (2019) qui ont rapporté une baisse de 50% de la population d'archées méthanogènes quand le niveau d'incorporation d'ensilage de légumineuses contenant des tanins atteint 65% de la ration. De même, Tan et al. (2011a) ont montré que le nombre d'archées appartenant à l'ordre des *Methanobacteriales* diminue faiblement de manière curvilinéaire et cubique, alors que les archées méthanogènes globales diminuent plus d'une manière linéaire avec des doses croissantes de tanins condensés de *Leucaena leucocephala*. Les mêmes auteurs ont rapporté une modification de la diversité de la population d'archées méthanogènes chez des bovins consommant des tanins condensés, comparativement à un témoin : le nombre d'archées méthanogènes appartenant aux ordres des *Methanomicrobiales* et des *Methanobacteriales* est divisé par 2 et 5, respectivement (Tan et al., 2011b). De telles relations structure-activité ont été également démontrées par Saminathan et al. (2016), qui ont trouvé que les tanins condensés de *Leucaena leucocephala* de différents poids moléculaires modifient la diversité de la population d'archées méthanogènes du rumen. En effet, l'augmentation du poids moléculaire des tanins condensés a entraîné *in vitro* une diminution de la population de *Methanobrevibacter* et une augmentation de la population de *Thermoplasmata*.

Selon le type et la dose, les tanins condensés peuvent inhiber directement la croissance des archées méthanogènes dans le rumen (Patra and Saxena, 2010; Williams et al., 2011), ou perturber la symbiose méthanogènes-protozoaires. Ainsi Ng et al. (2016) ont rapporté l'existence d'une adhésine protéique qui intervient dans l'établissement de la symbiose archées méthanogènes-protozoaires ; d'autres parties cellulaires comme les membranes, la paroi et le glycocalyx, contiennent également des protéines. Il est possible que les tanins condensés se lient à ces parties protéiques et par conséquent interfèrent avec l'établissement de la symbiose et réduisent le transfert interspécifique du H₂ des protozoaires vers les archées méthanogènes. Bien que les tanins hydrolysables affectent également les archées méthanogènes (Field et al., 1989), ces substances sont communément considérées comme plutôt toxiques pour l'animal (Reed, 1995) et n'ont donc pas fait l'objet d'études approfondies. Cependant, Goel et Makkar (2012) ont montré que les tanins hydrolysables ont entraîné une réduction plus importante de la population des archées méthanogènes ou des

microorganismes qui leur fournissant du H₂. Une tendance similaire a été observée par Jayanegara et al. (2015).

Le deuxième mécanisme est que les tanins peuvent induire des changements majeurs dans les populations bactériennes impliquées dans la dégradation des fibres et des protéines. En effet, ils exercent une action sélective vis-à-vis des bactéries cellulolytiques du rumen comme *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* qui sont inhibées par les tanins condensés (Sharifi et al., 2019). Cependant, le degré d'inhibition varie selon les études, en fonction de la dose et du type de tanins employé. Par exemple, Singh et al. (2011) ont noté que l'inclusion des feuilles de *Ficus infectiria* (8 à 12 % de tanins condensés) à raison de 50 % du régime alimentaire des chèvres induisait une réduction de *Ruminococcus flavefaciens* mais n'avait aucun effet sur *Fibrobacter succinogenes*. Des phlorotanins d'une algue brune à 0,5 mg/mL ont inhibé la croissance de *Fibrobacter succinogenes*, mais ont eu un effet minime sur *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* (Wang et al., 2009). Les tanins condensés ont également un effet sur les bactéries non cellulolytiques ; ils ont une action inhibitrice sur la croissance *in vitro* de *Butyrivibrio fibrisolvens* et *Streptococcus bovis* mais ont peu d'effet sur *Prevotella ruminicola* et *Ruminococcus amylophilus* (McAllister et al., 1994). Ces résultats concordent également avec les données du pyroséquençage de rDNA-16S sur les extraits de tanins condensés et de tanins hydrolysables de quebracho et de châtaigner, respectivement (Min et al., 2014b). Cette étude a révélé que l'ajout de l'extrait de châtaigner augmentait l'abondance de *Prevotella spp*, aux dépens d'autres espèces, comparativement au témoin ; ils ont également rapporté une absence d'effets significatifs de ces extraits sur *Ruminococcus spp*. Une tendance similaire a été rapportée par Ridwan et al. (2019) avec une prédominance de *Prevotella brevis*, *P. ruminicola*, *Succiniclasticum ruminis* suite à l'addition d'ensilage de légumineuse contenant des tanins.

L'activité antimicrobienne des tanins est attribuée aux interactions des tanins avec les parois cellulaires des bactéries provoquant ainsi chez ces derniers des changements morphologiques. C'est le cas de *Fibrobacter succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens* et *Streptococcus bovis* dont la paroi a été modifiée par la formation de complexes protéines tanins (Bae et al., 1993 ; Jones et al., 1994). L'inhibition peut concerner l'activité enzymatique car les tanins condensés se lient aux enzymes microbiennes, ralentissant leur activité (Gonçalves et al., 2011). En effet, l'endoglucanase extracellulaire de *Fibrobacter succinogenes* a été inhibée *in vitro* par les tanins condensés de *Lotus corniculatus* (0,1 à 0,4

mg/mL) (Bae et al., 1993). L'effet antibactérien peut se traduire par une déstabilisation des membranes cytoplasmiques. Il a été démontré que les catéchines ont une action bactéricide car elles endommagent la membrane (Ikigai et al., 1993). L'action des tanins peut se manifester directement sur le métabolisme par inhibition de la phosphorylation oxydative, la privation de substrats pour la croissance microbienne et la chélation des cations réduisant leur disponibilité pour les microorganismes (Kumar et Vaithyanathan, 1990; Scalbert, 1991; Jones et al., 1994 ; Smith et al., 2005). En effet, les tanins condensés se lient aux minéraux (Lavin, 2012) et aux molécules organiques comme les protéines (Saminathan et al., 2014), les glucides (Soares et al., 2012) et les lipides (Delehanty et al., 2007). Il est possible que ces complexes deviennent indisponibles comme substrat pour l'utilisation par les microbes du rumen ; cette hypothèse est souvent la première explication mise en avant, bien que l'étude de Naumann et al. (2013b) ait démontré une faible relation entre les protéines précipitées par les tanins condensés et la diminution du CH₄. Les effets observés sur les populations bactériennes ci-dessus affectent indirectement la digestibilité des parois ; celle-ci est inhibée et par conséquent réduit la quantité de CH₄ produit par l'aliment.

Un troisième mécanisme pourrait être une action des tanins sur les protozoaires. Ceux-ci sont symbiotiques avec environ 37 % des archées méthanogènes du rumen (Finlay et al., 1994). L'effet des tanins sur les protozoaires est très variable et varie de l'absence d'effet à un effet positif ou très négatif (Patra et Saxena, 2009). La méta-analyse de Jayanegara et al. (2018b) menée sur des études *in vitro* en Rusitec a montré l'absence d'effet des tanins sur la population de protozoaires. De même, Benchaar et al. (2008) n'ont observé aucun effet sur le nombre de protozoaires chez des bovins laitiers nourris avec un régime contenant un extrait de quebracho (concentrations de tanins condensés de 70%, à raison de 150 g/jour) probablement en raison de la faible dose employée. Le même résultat est rapporté par Piñeiro-Vázquez et al. (2018) *in vivo* avec les tanins condensés de *Leucaena leucocephala*. Pour leur part, Salem et al. (1997) ont observé *in vivo* une augmentation linéaire du nombre de protozoaires chez des ovins nourris à base de foin de luzerne mélangé à des proportions croissantes de feuilles d'*Acacia cyanophylla* Lindl contenant 4,5 % de tanins condensés. La même tendance a été rapportée par Animut et al. (2008a) pour *Lespedeza striata*. De même, les tanins condensés de *Lotus corniculatus* et *Hedysarum coronarium* entraînent une augmentation du nombre de protozoaires chez des ovins (Chiquette et al. 1989). Inversement, plusieurs rapports indiquent l'effet inhibiteur des tanins sur les protozoaires du rumen. Cependant, peu d'études rapportent une diminution des protozoaires associés à

l'emploi des tanins *in vivo* (Lima et al., 2019), contrairement aux études *in vitro* de courte durée (système batch) pour lesquelles les diminutions sont plus fréquentes. En effet, Bhatta et al. (2015) ont noté une diminution de la population des protozoaires ciliés du rumen en testant *in vitro* des plantes tropicales ayant une concentration de tanins de 26 % et 13,8 %, respectivement. Makkar et al. (1995a) ont signalé que les tanins condensés du quebracho (0,1 à 0,4 mg/mL) réduisaient significativement le nombre total de protozoaires *in vitro*. L'effet est plus prononcé sur les holotriches. Monforte-Briceno et al. (2005) ont testé *in vitro* les propriétés de défaunation de 15 arbres fourragers, qui contiennent des teneurs variables de tanins condensés. Sur les 15 fourrages, l'effet inhibiteur sur les protozoaires s'observait chez les fourrages dont la teneur en tanins condensés était supérieur à 10% de la matière sèche, soit *Acacia farnesiana*, *Calliandra calothyrsus* et *Lysiloma latisiliquum* pour lesquels le nombre de protozoaires était réduit à zéro au bout de 24 h. Ceci peut être expliqué par le fait que la population des holotriches est plus sensible aux tanins que la population des entodiniomorphes (Carulla et al., 2005), mais comme elle est beaucoup plus réduite que celle des entodiniomorphes, la population totale de protozoaires semble peu sensible à la présence de tanins condensés dans le rumen.

Peu d'essais ont testé l'effet des tanins hydrolysables sur les protozoaires. Un extrait de *Terminalia chebula* a diminué *in vitro* le nombre d'entodiniomorphes grands et petits (Patra et al., 2006). Par contre, l'étude de Bhatta et al. (2009) n'a montré aucun effet *in vitro* des tanins hydrolysables du myrobolan et du châtaigner sur les protozoaires.

Les effets anti-protozoaires des tanins pourraient être bénéfiques pour l'inhibition de la méthanogenèse dans le rumen en réduisant la production de H₂. Cependant, les mécanismes d'inhibition des protozoaires du rumen par les tanins ne sont pas clairement connus. Pour conclure, l'effet des tanins sur les protozoaires n'est pas systématique et les effets négatifs les plus marquants ont été observés essentiellement dans les études *in vitro* qui sont moins fiables pour estimer la variation de la population des protozoaires.

Une nouvelle hypothèse est que les tanins condensés et leurs dérivés peuvent jouer le rôle d'accepteurs de H₂ et par conséquent réduisent la quantité de H₂ disponible dans le rumen pour former du CH₄ (Naumann et al., 2017). En effet, Becker et al. (2013) ont rapporté une réduction linéaire de la production de CH₄ *in vitro* suite à l'ajout de catéchine de flavan-3-ol ; à partir de données sur la dégradation de la catéchine ; ils en déduisent que la diminution de CH₄ peut être totalement expliquée par la capture de 6 atomes de H lors de la dégradation

réductive de la catéchine (Figure 9). Jusqu'à présent, aucune autre étude ne confirme cette hypothèse.

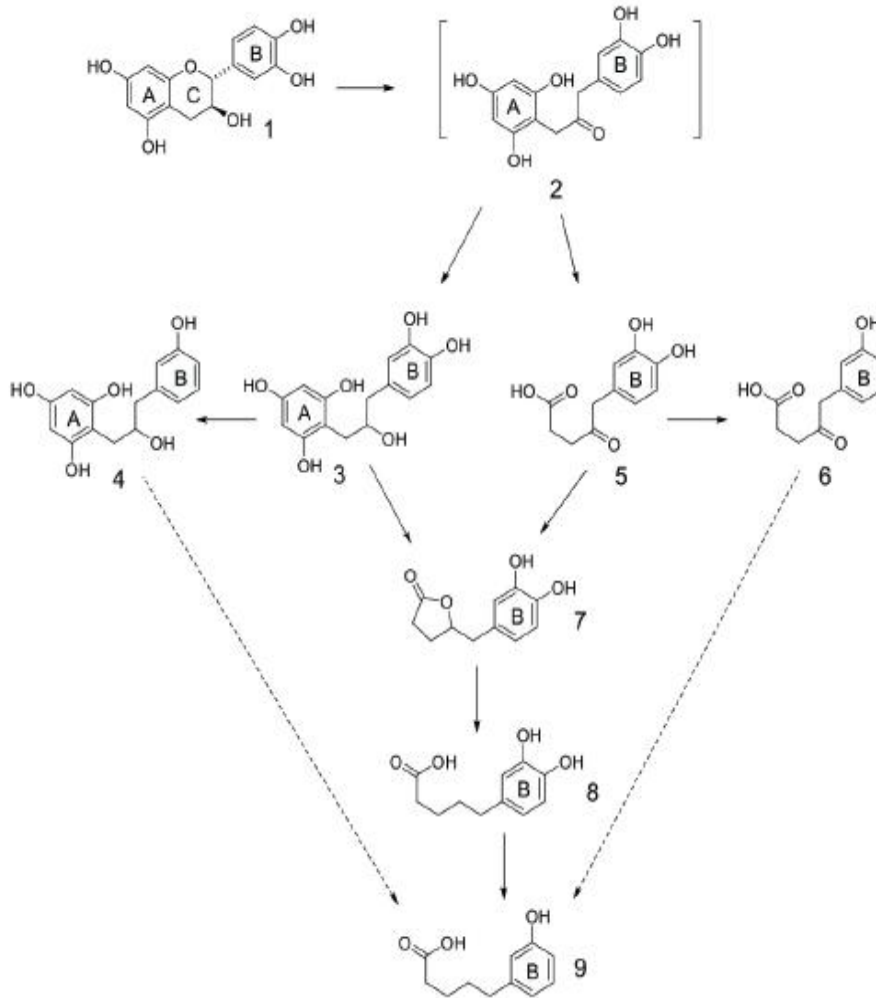


Figure 9. Catéchine en tant que puits d'hydrogène pendant la fermentation ruminal *in vitro*. (Naumann et al., 2017 adapté de Becker et al., 2013).

IV/ Adaptation des bactéries aux tanins : mécanismes de tolérance

Des bactéries capables de dégrader ou de tolérer les tanins ont été isolés du tube digestif de plusieurs espèces animales exposées aux fourrages riches en tanins (Osawa, 1990; Brooker et al., 1994; Nelson et al., 1995; Odenyo et al., 2001; Misrak, 2001, Ephraim et al., 2005, Kumar et al., 2014). Les bactéries tolérant et/ou dégradant les tanins condensés comme *Streptococcus bovis*, *Coprococcus sp.* et *Streptococcus caprinus*, *Selenomonas ruminantium* et *Streptococcus gallolyticus* ont été isolés du liquide ruminal des chameaux et des chèvres sauvages (Brooker et al., 1994), des chèvres (Skene et Brooker, 1995), des moutons, des chèvres et des antilopes (Odenyo et Osuji, 1998).

Les bactéries tolérantes aux tanins sont présentes dans le rumen indépendamment de la géographie, du climat et de l'organisme hôte (Nelson et al., 1998) . Ces bactéries se présentent sous différentes formes morphologiques, en cocci, ou en bacilles. Brooker et al. (1994) ont isolé une bactérie de l'espèce *Streptococcus caprinus* résistante aux tanins hydrolysables et condensés de chèvres sauvages consommant *Acacia aneura* (contenant de 11 à 14 % de tanins), mais absent chez les chèvres domestiques et les moutons. Une autre bactérie diplococcoïde anaérobie, isolée du rumen de chèvre nourries de *Desmodium ovalifolium* (contenant 17 % de tanins condensés), a pu se développer en présence de 30 g/L d'acide tannique et 4 g/L de tanins condensés de *Desmodium ovalifolium* et cette bactérie a pu dégrader l'acide tannique en pyrogallol (Nelson et al., 1995). De même, Odenyo et Osuji (1998) ont réussi à isoler trois souches de bactéries tolérantes aux tanins appartenant probablement à *Selenomonas spp.*, *Streptococcus caprinus* et *Butyrivibrio fibrisolvens* de moutons, de chèvres et d'antilopes, qui ont pu se développer dans des milieux contenant 50 g/L d'extrait de tanins et 50 à 70 g/L d'acide tannique. Dans le rumen, la présence de bactéries tolérantes aux tanins dépend de l'exposition préalable des animaux à des régimes riches en tanins, car ce type de bactéries est peu présent chez les ruminants qui n'ont aucun antécédent de consommation de tanins (Brooker et al., 1994; Nelson et al., 1998).

Les mécanismes par lesquels ces bactéries s'adaptent aux tanins sont mal connus. Plusieurs mécanismes de résistance ont été proposés (Figure 10). L'adaptation concerne souvent la paroi bactérienne. La microscopie électronique a indiqué que les tanins condensés du sainfoin étaient liés aux polymères de la paroi chez *Streptococcus bovis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola* et *Ruminobacter amylophilis*, mais une croissance et une division cellulaires anormales ont été observées uniquement chez *Streptococcus bovis* et *Butyrivibrio fibrisolvens* (Jones et al., 1994).

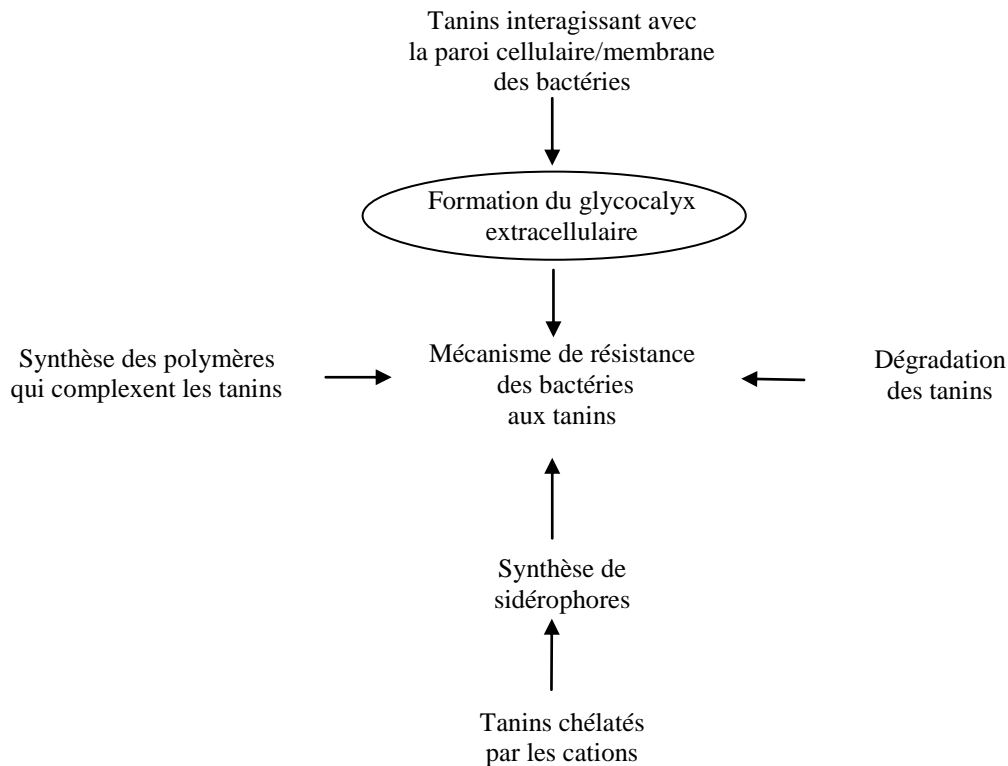


Figure 10. Mécanismes de tolérance des bactéries vis-à-vis des tanins (Patra et al., 2012 adapté de Patra et Saxena, 2011)

Certaines bactéries cultivées en présence de tanins sécrètent un exo-polysaccharide (glycoprotéine) formant une couche protectrice autour des cellules pour les protéger contre l'action des tanins (Figure 11) (O'Donovan et Brooker, 2001; Krause et al., 2005). Cette matrice permet à la bactérie de maintenir sa croissance en présence de concentrations de tanins jusqu'à 10 fois plus élevée (O'Donovan et Brooker, 2001). Bae et al. (1993) ont signalé que les cellules de *Fibrobacter succinogenes* S85 cultivées en présence de tanins condensés possédaient également une surface extracellulaire dense liée à la formation de complexes protéines-tanins. L'adaptation aux tanins peut être de type morphologique (Jones et al., 1994; McAllister et al., 1994). O'Donovan et Brooker (2001) ont montré grâce à la microscopie électronique que *Streptococcus gallolyticus* et *Streptococcus bovis* changent de taille et de forme en réponse à l'acide tannique ou aux tanins condensés d'*Acacia*.



Figure 11. Micrographie de transmission électronique de *Streptococcus gallolyticus* après une nuit de croissance dans l'acide tannique à 4%. Les flèches indiquent la matrice extracellulaire. Barre correspond à 0,2 μm (O'Donovan et Brooker, 2001).

De même, Nelson et al. (1995) ont observé un changement dans le mode de regroupement des bactéries qui passent de diplocoque à une chaînette lorsque la concentration d'acide tannique atteint 5g/L (Figure 12) ; lorsque la concentration d'acide tannique atteint 8 g/L, une réduction de la taille de cellule a été observée. Le mécanisme de tolérance des bactéries aux tanins peut également entraîner la dégradation des tanins hydrolysables par sécrétion de tannase. En outre, les bactéries cultivées en présence de tanins peuvent synthétiser des sidérophores qui compenseront probablement l'épuisement du fer précipité par les tanins (Scalbert, 1991). Outre le développement des mécanismes de tolérance par les bactéries du rumen, les animaux eux-mêmes peuvent développer une résistance aux tanins en sécrétant des quantités accrues de protéines riches en proline dans la salive (Mehansho et al., 1983 ; Naumann et al., 2017).

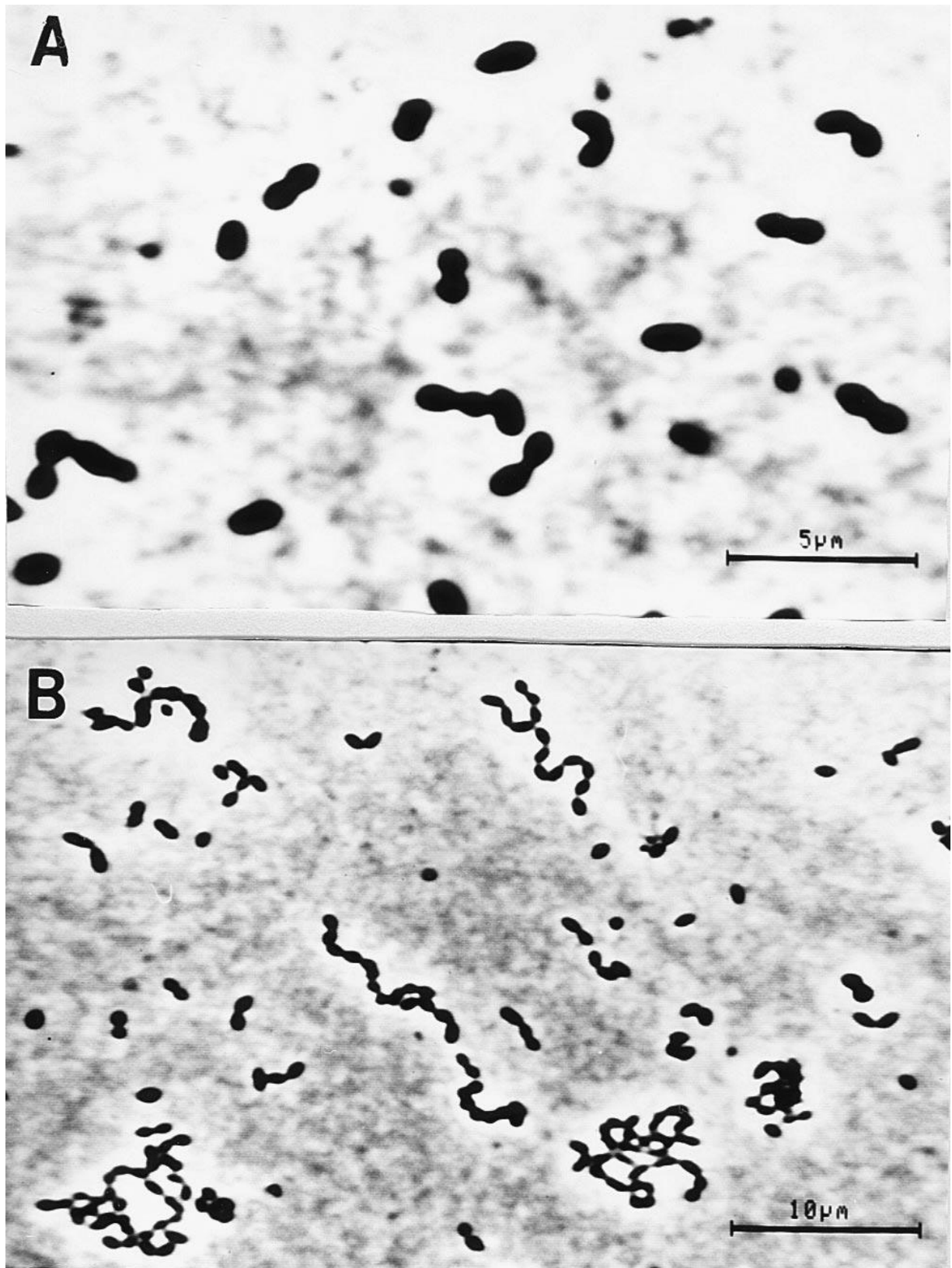


Figure 12. Micrographie de contraste de phase d'une bactérie ruminale dégradant l'acide tannique. (A) Cellules en l'absence de composés phénoliques. (B) Formation de chaînette à une concentration de 8 g/L d'acide tannique (Nelson et al, 1995).

V/ Devenir métabolique des tanins

Le devenir des tanins dans le rumen n'est pas bien établi. Toutefois, de nombreuses recherches ont été menées depuis quelques années sur le devenir métabolique des tanins dans le rumen mais les réponses sont très divergentes.

V.1/ Tanins hydrolysables

Le métabolisme des tanins hydrolysables est simple. Ces derniers ne sont pas excrétés dans les fèces chez les espèces animales, parce que ce type de tanin est hydrolysé peu après son ingestion, et l'acide gallique produit est absorbé et excrété dans l'urine (Figure 13).

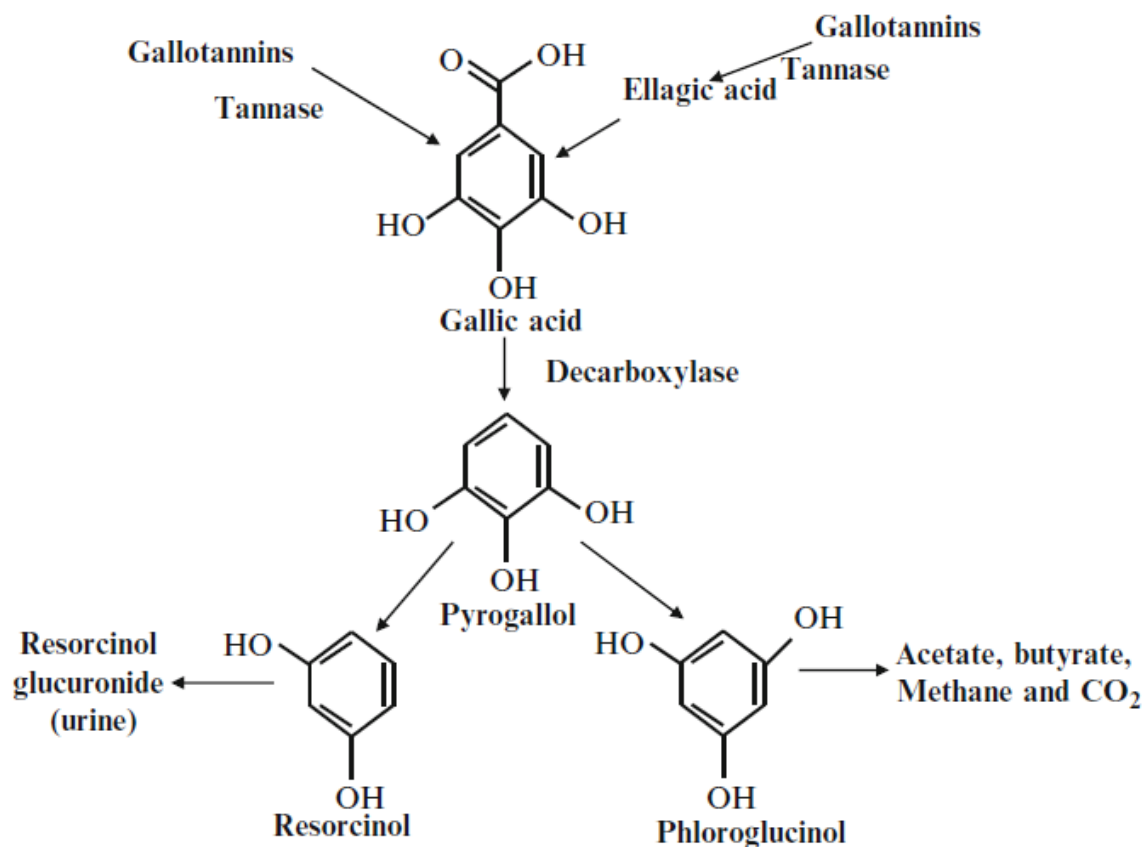


Figure 13. Voies de dégradation des tanins hydrolysables dans le rumen (Patra et al., 2012).

Les tanins hydrolysables sont principalement dégradés par la tannase (tanin acyl hydrolase, EC 3.1.1.20) qu'on trouve chez les bactéries et les champignons. Elle possède une activité estérase. Les microorganismes qui possèdent des tannases ont été identifiés chez les bovins, les moutons, les chèvres, les koalas, les cerfs et les humains qui consomment des

aliments contenant des tanins (Skene et Brooker, 1995 ; Osawa et al., 1995, 2000). Les liaisons esters des tanins hydrolysables sont clivées dans le rumen par *Streptococcus ruminantium* et *Streptococcus* spp. par la tannase, libérant du glucose, de l'acide gallique et de l'acide ellagique (Skene et Brooker, 1995 ; Bhat et al., 1998; Goel et al., 2005). Toutefois, l'hydrolyse de l'acide tannique peut parfois ne pas impliquer la production de tannase (Odenyo et al., 2001). L'acide gallique est directement décarboxylé en pyrogallol et est converti en résorcinol et en phloroglucinol, avant clivage de l'anneau phloroglucinol en acétate et butyrate par les microorganismes du rumen (Murdiati et al., 1992; Bhat et al., 1998). Les composés monomériques simples issus de la dégradation des tanins hydrolysables pourraient être absorbés et excrétés dans les urines sous forme de conjugués. Comparativement aux gallotanins, les ellagitanins sont plus difficiles à dégrader par les microorganismes du rumen, en raison de leur structure chimique complexe (Mingshu et al., 2006).

V.2/ Tanins condensés

Contrairement aux tanins hydrolysables, le métabolisme et le devenir des tanins condensés est complexe. Aucune étude ne mentionne la dégradation totale des tanins condensés qui se révèlent résistants à l'hydrolyse. Quelques études ont montré une disparition de 29,1 % et 51,7% de tanins condensés d'*Acacia barteri* et *Bauhania varigata*, respectivement, au bout de 24 h de fermentation *in vitro* ; celle-ci reste stationnaire au-delà de 24 h (Makkar et al., 1995b; Paul et al., 2006), probablement parce que les fermentations deviennent alors très faibles. *In vivo*, chez le cerf et le mouton, les tanins condensés du quebracho ont été excrétés respectivement à 100% et 60% dans les fèces, ce qui concorde dans le cas du cerf avec la formation de complexes indigestibles avec des protéines (Robbins et al., 1991).

Avec un marquage radioactif, Perez-Maldonado et Norton (1996a) ont détecté *in vivo* des disparitions importantes de tanins condensés de *Desmodium intortum* dans le tractus gastro-intestinal des moutons et des chèvres, et Terrill et al. (1994) ont montré *in vitro* et *in vivo* une disparition de tanins condensés qui serait plus élevée dans le rumen de moutons que dans l'intestin grêle. Ces deux auteurs postulent qu'une partie de cette disparition est due à des changements de structure ou à la conjugaison des tanins condensés qui les rendraient non quantifiables par la technique analytique du butanol-HCl. Une partie de cette disparition correspond toutefois à une dégradation et/ou à une absorption. Terrill et al. (1994) excluent la possibilité d'absorption alors que Perez-Maldonado et Norton (1996a) pensent qu'absorption et dégradation peuvent coexister.

Les mécanismes de dégradation sont mal connus. Le clivage des liaisons carbone-carbone du cycle flavan-3-ols (comme la catéchine et épicatechine) des tanins condensés par les microorganismes du rumen n'a pas été confirmé (McSweeney et al., 2001a). Une dégradation partielle serait possible pour les tanins libres de faible masse moléculaire. Wiryawan et al. (2000) ont montré que les bactéries isolées de chèvres exposées aux tanins condensés de *Calliandra calothyrsus* (contenant 6–10% de tanins condensés) ont été en mesure de réduire la concentration des tanins condensés du milieu de culture. Une expérience réalisée *in vitro* par Jones et al. (2001) utilisant *Leucaena spp.*, *Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia sepium* et *Acacia boliviana* sur le contenu ruminal de mouton et de plusieurs espèces de ruminants sauvages ont en revanche conclu qu'il serait peu probable que les bactéries du rumen dégradent les tanins condensés.

VI/ Limites et intérêts pratiques des tanins

Les plantes riches en tanins ne sont que peu utilisées dans l'alimentation des ruminants à l'heure actuelle. Bien que des effets positifs sur les performances animales soient parfois relevés, les effets négatifs sur la production de lait, le gain de poids et la production de laine sont plus fréquents, en particulier chez les animaux forts producteurs (revues de Min et al., 2003 ; Waghorn et al., 2008 ; Min et Solaiman, 2018). Ces effets négatifs sont dus essentiellement à une réduction d'ingestion volontaire et de la digestibilité de la ration, essentiellement des parois. L'effet sur l'apport de protéines à l'animal est parfois positif, parfois négatif, mais ne constitue pas un frein à l'utilisation des plantes riches en tanins. En revanche, celles-ci présentent des intérêts au niveau de la santé de l'animal, en réduisant les risques de météorisation et en constituant une alternative naturelle pour prévenir l'infestation parasitaire.

VI.1/ Tanins et utilisation de l'azote dans le rumen et l'intestin

Un des objectifs fondamentaux de la nutrition protéique chez les ruminants est d'optimiser l'utilisation des protéines alimentaires afin de maximiser la croissance animale et la production laitière par unité de protéines consommées (Schwab, 1995). Lorsque les ruminants consomment des fourrages de haute qualité contenant une concentration élevée en azote (25 à 35 g/kg MS), la plupart des protéines sont rapidement dégradées par les microorganismes du rumen, entraînant une désamination et une production d'ammoniac, qui sera utilisé pour la synthèse de protéines microbiennes ou absorbé par la paroi du rumen, l'excédent étant ensuite excrété dans l'urine (Bach et al., 2005). Les tanins ont la capacité de réduire la dégradation des protéines alimentaires par la formation de

complexes protéines-tanins. Plusieurs études ont montré l'effet bénéfiques des tanins à dose modérée dans la protection des protéines alimentaires de la dégradation ruminale, en les préservant de l'hydrolyse microbienne et de la désamination dans le rumen, augmentant de ce fait la proportion d'acides aminés d'origine alimentaire disponibles pour l'absorption dans l'intestin grêle (Wang et al., 1994). Cette action est largement observée pour les tanins hydrolysables comme pour les tanins condensés. Hervás et al. (2000) et Frutos et al. (2000) ont traités des tourteaux de soja par différentes doses d'acide tannique ou d'extrait de quebracho (0, 1, 4,7, 9, 13 et 20%) et ont noté une réduction significative de la dégradation des protéines dans le rumen. L'effet a été significatif même à la dose la plus faible, et de la même amplitude pour les deux types de tanins. Cette diminution de dégradation peut entraîner, avec des régimes pauvres en azote, une carence en ammoniac pour la synthèse de protéines microbiennes. Dans les faits, il semble que le flux d'azote total au duodénum (alimentaire + microbien) soit parfois peu modifié par l'apport de tanins (Waghorn et al., 1987) mais parfois nettement augmenté (Min et al., 2003). Ces auteurs en rassemblant différents essais ont trouvé que l'apport de tanins ne modifiait que peu le flux d'azote microbien, et augmentait significativement le flux d'azote total, en raison d'un accroissement du flux d'azote alimentaire. Néanmoins, il est probable que l'effet des plantes riches en tanins soit plus positif lorsqu'elles sont distribuées dans des régimes bien pourvus en azote dégradable.

Les liaisons protéines-tanins sont stables entre les pH de 3,5 à 8, donc au pH du rumen, mais se dissocient à un pH inférieur à 3,5, ce qui est le cas de l'abomasum (pH 2,5 à 3) ou supérieur à 8 ce qui est le cas du duodénum (pH 8). Ceci explique que la digestibilité intestinale des protéines ne soit que peu affectée par la consommation de tanins (Mueller-Harvey et McAllan, 1992). Toutefois il arrive que la dissociation soit incomplète lorsque la teneur en tanins dans le régime est élevée, et dans ce cas la digestibilité intestinale des protéines est réduite. Selon Frutos et al. (2000) et Hervás et al. (2000), aucun effet négatif sur la digestibilité intestinale n'a été observé jusqu'à la dose de 13% pour l'acide tannique et 20% pour l'extrait de quebracho. Cela a une conséquence environnementale négative puisqu'il y a une augmentation d'azote fécal, mais il faut considérer que la diminution de production d'ammoniac dans le rumen tend à décroître l'excrétion d'azote urinaire, ce qui est positif.

VI.2/ Tanins, ingestion et digestibilité

Les études sur les effets des tanins sur l'ingestion et la digestibilité donnent des résultats très variables, positifs ou négatifs. Il y a une bibliographie abondante sur ce sujet. Un rapide

aperçu est présenté dans ce paragraphe à partir de publications significatives. La tendance générale est que la consommation de fourrages à forte teneur en tanins condensés (généralement > 5% de matière sèche) réduit significativement l'ingestion volontaire, tandis que des concentrations inférieures à 5% de matière sèche n'ont pas d'influence sur l'ingestion (Aerts et al., 1999). Outre le niveau d'apport de tanins, d'autres facteurs tels que la ration de base ou le type de tanins (et donc leur structure) peuvent moduler la réponse de l'ingestion, mais cela n'a pas été confirmé. En revanche, il a été établi que les chèvres ont la capacité d'ingérer plus de plantes riches en tanins que les moutons (Min et Solaiman, 2018). Peu d'auteurs ont observé un accroissement d'ingestion avec l'apport de tanins. Dans un essai de Carulla et al. (2005), l'ingestion a augmenté quand un extrait d'*Acacia mearnsii* a été inclus dans le régime. Hervás et al. (2003) ont administré intraruminalement à des moutons des doses croissantes d'extrait de quebracho (0, 0,5, 1,5 et 3,0 g/kg de poids vif par jour, soit l'équivalent de 0, 28, 83 et 166 g/kg de matière sèche consommée dans le régime) et ont trouvé que cela ne modifiait pas l'ingestion chez ces animaux à l'exception de ceux qui avaient reçu la dose la plus forte et dont l'ingestion était pratiquement nulle au bout de 6 jours. Beauchemin et al. (2007) n'ont également signalé aucun effet de l'extrait de quebracho à 0, 1 et 2 % de la matière sèche chez les bovins en croissance.

Comme les tanins condensés, les tanins hydrolysables peuvent affecter également l'ingestion. Certains auteurs n'ont pas observé de changement. Ainsi Frutos et al. (2004) n'ont constaté aucune réduction de l'ingestion volontaire chez des moutons nourris avec un régime contenant de la farine de soja traitée avec des tanins hydrolysables (20,8 g/kg de matière sèche). De même, Krueger et al. (2010) n'ont montré aucune différence dans l'ingestion quand 1,5 % de l'extrait de tanins hydrolysables a été ajouté à un régime à base céréales de maïs par rapport à un régime contrôle administré à des bouvillons de boucherie. Toutefois, un essai réalisé sur des moutons recevant 8 g/kg de poids vif d'acide tannique a montré au bout de 24 h une diminution sévère de l'ingestion qui est passée de 18 à 2,5 g de matière sèche par kg de poids vif (Zhu et al., 1992). Les données expérimentales avec des tanins hydrolysables sont trop peu nombreuses pour qu'on puisse tirer une loi générale. Deux essais sur jeunes bovins ont comparé des apports d'extraits de tanins hydrolysables ou condensés et du mélange des deux par rapport à un témoin. L'ingestion volontaire n'a pas été modifiée significativement (Rivera-Méndez et al., 2016, Aboagye et al., 2018). Toutefois les concentrations en tanins hydrolysables utilisées étaient probablement trop faibles dans les deux essais pour mettre en évidence des différences.

Pour expliquer l'effet des tanins sur l'ingestion volontaire, trois principaux mécanismes ont été suggérés : une réduction de la palatabilité des aliments, le ralentissement de la digestion qui entraîne un encombrement du rumen, et le développement d'aversion conditionnées. Une réduction de la palatabilité est généralement causée par la réaction entre les tanins et les mucoprotéines salivaires, ou par une réaction directe avec les récepteurs du goût, provoquant ainsi une sensation d'astringence (McLeod, 1974). Toutefois, chez les herbivores qui se nourrissent de plantes riches en tanins, des protéines riches en proline ont été trouvées dans leur salive (Robbins et al., 1987). Ces protéines ont une grande affinité pour les tanins. En s'y liant, les complexes formés réduiraient l'astringence et donc la palatabilité ce qui éviterait cette réduction de la palatabilité. Les complexes protéines tanins riches en proline formés sont stables dans toute la gamme de pH du tube digestif, contrairement aux autres complexes protéines-tanins. Ces protéines riches en proline peuvent être sécrétées en permanence ou inductibles (cas des moutons) (Robbins et al., 1987). Chez les bovins, ce sont d'autres protéines qui se lient aux tanins dans la salive (Makkar et Becker, 1998). Le deuxième mécanisme possible serait un ralentissement de la digestibilité. Narjisse et al. (1995) ont infusé directement des tanins dans le rumen pour déterminer si des facteurs indépendants de la palatabilité étaient responsables de la réduction de l'ingestion volontaire. En effet, la diminution de la digestibilité de la matière sèche dans le rumen ralentit la vidange du tractus digestif, produisant des signaux indiquant que l'animal est rassasié et fournissant une rétroaction aux centres nerveux impliqués dans le contrôle de l'ingestion. Ce mécanisme pourrait influencer l'ingestion volontaire plus qu'une réduction de la palatabilité (Waghorn et al., 1994). Le troisième mécanisme est basé sur l'identification des conséquences post-prandiales négatives suite à l'ingestion de tanins et le développement subséquent d'aversion conditionnées (Provenza, 1996).

De nombreux travaux ont montré l'effet des tanins sur la digestibilité. Une majorité d'auteurs ont rapporté une réduction de la digestibilité. Ainsi, Tiemann et al. (2008a) ont enregistré une diminution de 8,3 % et de 11,5 %, respectivement de la digestibilité de la matière organique suite à l'introduction de 300 g/kg de matière sèche de feuillage de *Calliandra calothyrsus* ou de *Flemingia macrophylla* dans la ration d'ovins en croissance. De même, Priolo et al. (2000) utilisant le PEG pour précipiter les tanins condensés, ont rapporté une réduction de 14% dans la digestibilité de la matière sèche et 23% des parois chez des moutons nourris en *Lotus pedunculatus* contenant une concentration de 2,5% de tanins condensés. Des effets similaires ont été signalés par Barahona et al. (1997) en distribuant aux

moutons des légumineuses tropicales à forte concentration en tanins condensés. La réduction de la digestibilité des parois est une conséquence évidente d'une part de la liaison des tanins condensés aux parois végétales, d'autre part de la réduction de la population des bactéries cellulolytiques suite à l'action des tanins (McAllister et al., 1994).

VI.3/ Prévention de la météorisation

Chez les ruminants, la météorisation spumeuse résulte d'une accumulation de gaz issus de fermentations ruminales exacerbées et séquestrés dans une mousse stable formée à partir des protéines solubles de la ration. La consommation modérée de plantes riches en tanins condensés (de l'ordre de 5 % MS) a été associée à une prévention des risques de météorisation spumeuse (Mangan, 1988; Aerts et al., 1999; Barry and McNabb, 1999; McMahan et al., 2000) tout en maintenant l'apport protéique à l'animal. En effet, la substitution d'environ 10 % de la luzerne ingérée par le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) procure des avantages incontestables dans la prévention de la météorisation (McMahan et al., 2000). Wang et al. (2006) ont constaté une réduction de 77 % de la survenue de météorisation chez les bovins où le sainfoin représentait 35 % de la ration. Ceci s'expliquerait par la formation des complexes tanins-protéines alimentaires, ce qui ralentit les fermentations ruminales et réduit la stabilité de la mousse qui emprisonne les gaz fermentaires (Wang et al., 2012; MacAdam et Villalba, 2015)

VI.4/ Alternative aux antiparasitaires chimiques

Les strongyloses gastro-intestinales sont une pathologie fréquente chez les ruminants, particulièrement importante chez les petits ruminants au pâturage. Elles sont dues à la présence, dans le tube digestif, de nématodes appartenant à plusieurs espèces. Ces derniers entraînent des déficits de production causés par des perturbations physiologiques et digestives, et donc des pertes économiques importantes en élevage. C'est la raison pour laquelle les tanins condensés peuvent être utilisés à des fins nutraceutiques, ce qui renvoie à une action combinée des bienfaits nutritionnels et antiparasitaires qu'ils comprennent (Hoste et al., 2012). En effet, plusieurs études fondées sur l'utilisation d'extraits de légumineuses fourragères tempérées telles que le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), les lotiers pédonculé et corniculé (*Lotus pedunculatus* et *L. corniculatus*) et le sulla (*Hedysarum coronarium*), ont confirmé leurs effets antiparasitaires significatifs, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Molan et al., 2002 ; Heckendorn et al., 2007 ; Barone et al., 2019). En régions tropicales, des études ont révélé des résultats similaires lors de la consommation de feuilles de deux espèces

d'acacia (*Acacia nilotica* et *Acacia karoo*) (Kahiya et al., 2003), ou de tzalam (*Lysiloma latisiliquum*) (Brunet et al., 2008 ; Martinez-Ortiz de Montellano et al., 2010) par des chèvres expérimentalement infestées. Le mécanisme par lequel les tanins condensés exercent leur action antiparasitaire n'est pas exactement connu. Cependant deux modes d'action ont été proposés. Le premier pourrait s'expliquer par un effet direct sur les parasites, en perturbant des fonctions ou structures vitales pour les nématodes, comme par exemple l'intégrité de la cuticule des vers adultes ou de la gaine des larves infestantes (deux structures riches en proline et en hydroxyproline), changement de l'ultrastructure des larves, l'altération de l'hypoderme, la présence de vacuoles dans le cytoplasme et la dégénérescence et/ou la mort des cellules musculaires et intestinales (Brunet et al., 2001). Le second est indirect. Grâce à leur capacité à se lier aux protéines, les tanins condensés pourraient agir en inhibant les principales enzymes des parasites, comme les glutathions-S-transférases parasitaires, qui jouent un rôle important dans la détoxification des composés xénobiotiques (Hoste et al., 2012 ; Hansen et al., 2016).

VI.5/ La toxicité des tanins hydrolysables empêche-t-elle leur utilisation pratique dans l'alimentation des ruminants ?

Pendant longtemps, les tanins hydrolysables ont été considérés comme des composés antinutritionnels et/ou toxiques lorsqu'ils étaient présents dans les rations des ruminants. Ils peuvent à être à l'origine de graves dommages irréversibles, ils provoquent des ulcères, de l'irritation et de la desquamation de la muqueuse intestinale, des lésions dans le foie et les reins, et, dans des conditions extrêmes, même la mort (Reed, 1995; Mueller-Harvey, 2006). Lorsqu'ils sont ingérés, les tanins hydrolysables sont dépolymérisés par voie enzymatique dans le rumen par clivage des liaisons ester entre le glucose et les sous-unités phénoliques, produisant de l'acide gallique, métabolisé en pyrogallol et en résorcinol, qui sont ensuite absorbés et sont responsables des lésions cellulaires (Murdiati et al., 1992). L'intensité des lésions semble dépendre de la dose et la structure du tanin consommé (Zhu et al., 1992). Chez le bovin et le mouton plusieurs cas d'intoxication aiguë liés à l'absorption de grandes quantités de tanins hydrolysables provenant des feuilles de chêne (*Quercus spp.*), de bois jaune (*Terminalia oblongata*), de *Clidemia hirta* et de châtaignier (*Castanea*) ont été diagnostiqués (Murdiati et al., 1990 ; Filippich et al., 1991 ; Garg et al., 1992, Frutos et al., 2004). Cependant, l'incorporation des certaines plantes riches en tanins hydrolysables comme *Acacia nilotica* (feuilles et gousses) a entraîné une augmentation de l'ingestion volontaire et du poids sans effets négatifs sur la digestibilité (Rubanza et al., 2007, Hidosa and Gemiyo,

2017). Par ailleurs, McSweeney et al. (1988) ont montré que l'incorporation de *Terminalia oblongata* (0,9 g de tanins par kg de poids vif) n'affectait pas la digestibilité chez des moutons, bien qu'ils aient montré des signes de toxicité. De plus, la détannification de cette plante, par différentes méthodes, n'a pas amélioré l'ingestion et la digestibilité (Tshabalala et al., 2013). Enfin, il est important de souligner que les intoxications causées par les tanins hydrolysables ne se produisent généralement que lorsque les animaux sont obligés de consommer des aliments riches en tanins hydrolysables faute de ressources végétales alternatives (Spier et al., 1987).

VII/ Recommandations et questions et de recherche sur les tanins

Les plantes et les extraits riches en tanins sont reconnus pour leur capacité à réduire la méthanogénèse ruminale. Cependant, il y a beaucoup de questions sans réponse et d'hypothèses non prouvées par rapport aux effets des tanins dans l'environnement ruminal. Une hypothèse commune est que la concentration des tanins détermine leur l'activité biologique. Une question précise qui mérite d'être explorée est : les activités biologiques des tanins, en particulier pour la réduction du CH₄ sont-elles en lien avec la structure chimique (tanins hydrolysables vs tanins condensés ; type de tanins condensés). Comme nous l'avons vu précédemment, il existe de multiples hypothèses sur la façon dont les tanins pourraient supprimer la production de CH₄ pendant la fermentation du rumen. Min et Solaiman (2018) ont montré que l'inhibition de la méthanogénèse est proportionnelle à la concentration des tanins condensés. (Figure 14).

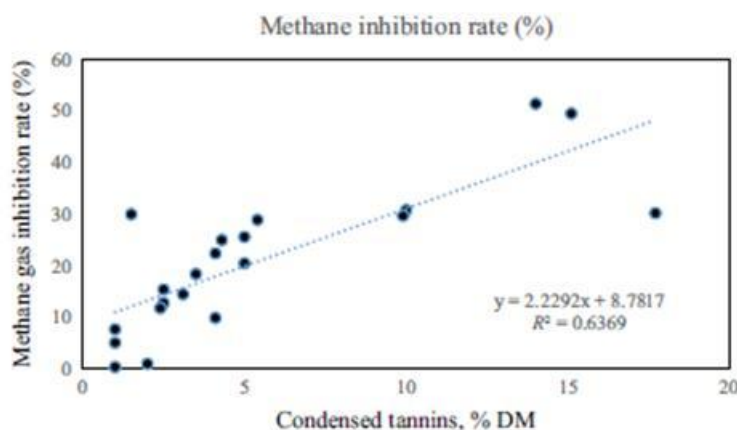


Figure 14. Effets des tanins sur le taux d'inhibition de la production de méthane (%) dans le rumen (Min et Solaiman, 2018).

Cependant, cet effet varie selon plusieurs paramètres comme la nature des tanins employés, leur structure, leur forme (extrait brut ou plante entière). Une étude de Naumann et al. (2018) a montré que la modulation de la production de CH₄ n'est corrélée ni à la structure, ni au poids moléculaire, ni à la capacité de précipitation des protéines par les tanins, alors qu'une opinion communément répandue est que les différences observées d'une étude à l'autre proviennent de différences de structure entre sources de tanins. Un autre problème majeur dans l'étude des tanins concerne les méthodes de dosage qui donnent des résultats variables en fonction fractions dosées et des standards utilisés. Les questions de recherche qui méritent d'être explorées actuellement sont :

- ✓ Comment optimiser les méthodes d'analyse chimique des tanins ?
- ✓ Les activités biologiques comme la réduction de la méthanogenèse sont-elles plus liées à la concentration en tanins ou à leur nature (tanins hydrolysables / tanins condensés) et à leur structure chimique (type de tanins condensés) ?
- ✓ Comment les différentes classes de tanins interagissent-elles dans le rumen ? Est-ce que leurs effets sont additifs, synergiques ou antagonistes pour les processus de fermentation et la méthanogénèse ?
- ✓ Quelles sont les relations exactes entre l'inhibition de la méthanogenèse et le profil des populations microbiennes, et donc à quel niveau interviennent les mécanismes mis en jeu ?
- ✓ Existe-t-il une mode d'utilisation des tanins qui peut produire des effets positifs à la fois nutritionnels et environnementaux ?

Chapitre 2 : Effet du type de fourrage, du type d'animal et de l'environnement climatique sur la production de méthane entérique par les ruminants

Présentation de l'expérimentation

Comme cela a été précisé dans l'introduction, le premier objectif affiché de cette thèse est de faire la part du type de fourrage (récolté en zone tropicale ou en zone tempérée), du type d'animal (génotype tempéré ou tropical), et de la région où a été conduite l'expérimentation (zone climatique tropicale ou tempérée) sur les différences de production de CH₄ par les ruminants. Afin de conduire l'expérimentation, une coordination étroite a été nécessaire entre deux centres INRA : Auvergne-Rhône-Alpes (Unité Mixte de Recherches sur les Herbivores (UMRH), Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle), responsable de l'expérimentation M. Doreau, et Antilles-Guyane (Unité de Recherches Zootechniques (URZ), 97170, Petit-Bourg, Guadeloupe), responsable de l'expérimentation H. Archimède.

Le travail a été réalisé sur moutons. Dans chacun des deux sites (Auvergne et Guadeloupe), on a utilisé 4 moutons de génotype européen Texel et 4 moutons de génotype antillais Blackbelly. Chaque animal a consommé 4 fourrages, deux fourrages en C3 (un de bonne qualité et un de mauvaise qualité) récoltés en Auvergne et deux fourrages en C4 (un de bonne qualité et un de mauvaise qualité) récoltés en Guadeloupe. Le schéma expérimental a pris la forme de 4 carrés latins : Texel en Guadeloupe, Blackbelly en Guadeloupe, Texel en Auvergne, Blackbelly en Auvergne. Dans chaque carré latin, les 4 animaux recevaient les 4 fourrages au cours de 4 périodes expérimentales successives. Les mesures réalisées ont été la consommation d'aliments et d'eau, la production de CH₄, la digestibilité de la matière sèche et des nutriments, le transit de la phase solide et de la phase liquide dans le rumen, les paramètres biochimiques du rumen (acides gras volatils et ammoniac) et la quantification des microbes du rumen (protozoaires, bactéries, archées méthanogènes).

Il a été nécessaire d'homogénéiser les conditions de mesure dans les deux sites. Les mesures d'ingestion, de transit de la phase solide des aliments et de digestibilité des aliments ont été réalisées dans les deux sites. Les analyses biochimiques et de l'écosystème microbien ont été réalisées exclusivement en France métropolitaine, soit parce que les techniques étaient disponibles seulement sur ce site (CH₄, quantification de l'écosystème microbien, chrome) soit afin d'éviter un biais lié au mode opératoire et à l'opérateur (acides gras volatils, ammoniac).

La complexité de ce protocole expérimental ambitieux a nécessité en particulier :

- ✓ De se procurer des moutons Texel dans un élevage guadeloupéen et des moutons Blackbelly dans un élevage français (centre INRA de Bourges). En effet, le transport d'animaux vivants entre France métropolitaine et Antilles posait des problèmes sanitaires.
- ✓ De faire voyager par bateau les quantités importantes de fourrages nécessaire à l'expérimentation entre la France métropolitaine et les Antilles, et vice versa.
- ✓ De faire voyager les échantillons biologiques des Antilles vers la France métropolitaine. Cela s'est révélé complexe pour le voyage de tubes de collecte de CH₄ utilisés dans la méthode de mesure dite du SF₆ (Martin et al., 2008) : transport d'environ 50 tubes en U de 60 x 40 x 5 cm lors de chacune des 4 périodes expérimentales.

Ce travail expérimental a été divisé en deux publications. La première (publication 1) a été consacrée aux aspects globaux sur l'ingestion, la digestibilité et l'émission de CH₄ (Archimède et al., 2018), la seconde (publication 2) au fonctionnement du rumen et à l'écosystème microbien (Rira et al., 2016).

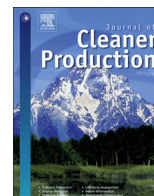
En marge de cette expérimentation, un essai méthodologique a été réalisé sur les moutons porteurs de canules utilisés en zone tempérée. L'objectif était d'analyser les conséquences d'un vidage total du rumen sur la fonction ruminale et le bien-être des moutons (Silberberg M., Boissy A., Rira M., Delval E., Chandèze H., Doreau M., 2015. Impact of rumen emptying on rumen fermentation and animal welfare in cannulated sheep. *Animal Production Science*, 55, 213-218). Ce travail répondant à un questionnement sociétal actuel n'est pas présenté dans la thèse.

Publication 1

Intake, total-tract digestibility and methane emissions of Texel and Blackbelly sheep fed C4 and C3 grasses tested simultaneously in a temperate and a tropical area

Archimède H., Rira M., Eugène M., Fleury J., Lastel M.L., Periacarpin F., Silou-Etinne T., Morgavi D.P., Doreau M.

Journal of Cleaner Production, 2018, 185, 455-463.



Intake, total-tract digestibility and methane emissions of Texel and Blackbelly sheep fed C4 and C3 grasses tested simultaneously in a temperate and a tropical area

H. Archimède^{a,*}, M. Rira^b, M. Eugène^b, J. Fleury^c, M.L. Lastel^a, F. Periacarpin^c,
T. Silou-Etienne^a, D.P. Morgavi^b, M. Doreau^b

^a INRA UR143 Unité de Recherches Zootechniques, 97170 Petit-Bourg Guadeloupe, French West Indies, France

^b INRA, UMR1213 Herbivores, 63122 Saint-Genès Champanelle France

^c INRA UE1284, Plateforme Tropicale d'Expérimentation sur l'Animal, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, French West Indies, France

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 7 March 2018

Keywords:

Methane
Digestibility
Sheep breed
Forages
Tropical and temperate environment

ABSTRACT

This experiment was designed to better understand the differences in enteric methane (CH₄) emissions of ruminants in tropical and temperate areas. Two double 4 × 4 Latin squares using adult sheep were evaluated simultaneously in a temperate and a tropical site. At each site, two breeds (four Texel, temperate origin, and four Blackbelly, tropical origin) and four hay types (two C3 grasses and two C4 grasses grown, respectively, in temperate and tropical sites) were tested. High-(H) and low-quality (L) grass hays were tested within each type of grass. No difference in dry matter (DM) intake (g/kg BW/d) was observed between sites. Intake of C4 grass was lower than that of C3 grass. A breed × site interaction was observed. In the tropical site, dry matter intake (g/kg BW/d) was higher in Blackbelly compared to Texel, whereas no difference was observed in the temperate site. The total-tract DM, OM (organic matter), NDF (neutral detergent fiber) and ADF (acid detergent fiber) digestibility values recorded in the temperate site were lower ($P < 0.01$) than those reported in the tropical site. Methane yield (g/kg DM intake) was not affected by site, whereas a breed × site interaction was observed. In the tropical site, methane emission was lower for Blackbelly compared to Texel, whereas the opposite was observed in the temperate site. Differences in methane emissions between the temperate and tropical sites could only be the result of diet and breed interactions with the environment.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The increase of atmospheric concentrations of greenhouse gases (GHG) is a major worldwide environmental concern. Emissions of GHG from livestock were estimated to account for 14.5% of the total emissions caused by anthropogenic activities, of which 39% are methane (CH₄) emissions (Gerber et al., 2013). Enteric CH₄ from ruminants represents the major part of CH₄ emissions and results from carbohydrate fermentation in the rumen. Methane production is higher in forage-based than in grain-based diets; however, large variations of CH₄ production have been reported among

forage types and are mainly explained by the rate of fermentation of plant cell contents and the presence of various plant secondary compounds (Beauchemin et al., 2009; Martin et al., 2010). Enteric CH₄ yield from forages, expressed per kg of dry matter intake (DMI), has been shown to be higher for forages used in tropical areas than for forages used in temperate areas. One possible reason is the difference in plant structure and composition deriving from C4 metabolism for forage grasses in tropical countries and C3 metabolism for forages in temperate countries (Archimède et al., 2011; Kennedy and Charmley, 2012). Animal genotype could also be another explanatory factor but most studies have been performed using only a single breed (Pinares-Patiño et al., 2003b). Studies on breed effect are scarce and comparisons between a temperate and a tropical genotype in the same environment have not been reported. Similarly, tropical forages were always studied in tropical areas, and temperate forages were always studied in temperate areas. To our knowledge, there is no study comparing CH₄ emissions for

Abbreviations: B, Blackbelly; CH₄, methane; DMI, DM intake; GHGs, Greenhouse gases; LW, Live weight; T, Texel.

* Corresponding author.

E-mail address: harry.archimede@inra.fr (H. Archimède).

temperate and tropical forages while taking into account these different effects (forage type, breed and site of measurement). To better understand these differences in CH₄ emission, two sheep breeds from tropical (West Indies) and temperate origin (France) were used in two parallel trials in a tropical and in a temperate site. Likewise, two forage types (temperate C3 versus tropical C4 grasses) were studied. Each forage type was represented by low and high quality. We measured methane emissions as well as intake, digestibility and retention time of feed particles in the rumen, factors which can explain differences in ruminal CH₄ yield. A companion paper (Rira et al., 2016) described rumen fermentation and microbial ecosystem characteristics.

2. Materials and methods

2.1. Experimental site and diets

This experiment was conducted simultaneously in two sites, a tropical and a temperate site. The first trial was carried out in the experimental animal facilities of the French National Agronomic Research Institute (INRA) of the West Indies (Guadeloupe, latitude 16.16 N, longitude 61.30 W). The second trial was conducted in continental France (INRA Auvergne-Rhône-Alpes Centre, Saint-Genès Champanelle, latitude 45.46 N, longitude 3.51 E). During the experiment, the temperatures in the animal housing facilities ranged from 21 to 25 °C and from 11 to 16 °C in the tropical and temperate site, respectively. Hygrometry in the buildings ranged from 83 to 88% in the tropical and from 32 to 46% in the temperate site. Temperature-hygrometry index (THI), calculated according to the formula $THI = (1.8 \times T + 32) - (0.55 - 0.0055 \times RH) \times (1.8 \times T - 26)$, where T is the temperature in °C and RH the relative hygrometry in % (NRC, 1971), ranged between 53 and 60 in France and between 69 and 86 in the West Indies.

Four experimental forage types were tested: a high quality tropical C4 grass (C4-H), a low quality tropical C4 grass (C4-L), a high quality temperate C3 grass (C3-H) and a low quality temperate C3 grass (C3-L). Forages were presented as hays and were obtained from permanent grasslands grown in a temperate and in a tropical area. Grasslands were fertilised weekly (100 kg of mineral nitrogen/ha/year). The temperate forage was obtained from a semi-mountain permanent grassland rich in different grasses (*Dactylis glomerata*, *Festuca* spp.) harvested in late June at the flowering stage (C3-L) and harvested a second time in late August (C3-H), both from the same parcel. The tropical forage was obtained from a permanent grassland rich in *Dichanthium* spp. regrowth of 36 days (C4-H) and 91 days (C4-L), both harvested in October. The hays were coarsely chopped with a biomass chopper, resulting in a range of particle size of approximately 5–20 mm.

2.2. Animals and experimental design

Sheep from two breeds, Texel (T) of temperate origin and Blackbelly (B) of tropical origin, were fed the same four forage types in four 4 × 4 Latin Square designs (one per breed for each site). Both trials started on the same day in early January. Sheep of both breeds (rams in the tropical site and wethers in the temperate site) were born and grown in the environment where they were used for the trial. A total of 16 sheep, i.e., four sheep per breed and per site, were used. The experimental design is illustrated in Fig. 1. The two-year-old sheep were fitted with a rumen cannula (70 mm internal diameter) made of polyvinyl chloride; surgery took place more than 2 months before the beginning of the trials. In the temperate site, average body weight was 60.2 ± 1.5 kg for Texel sheep and 51.3 ± 4.3 kg for Blackbelly sheep. In the tropical site, average body

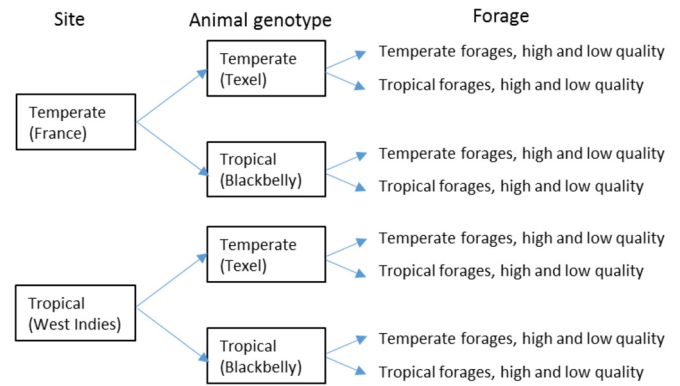


Fig. 1. Outline of the experimental design and measurements.

weight was 44.7 ± 0.7 kg for Texel sheep and 44.4 ± 2.1 kg for Blackbelly sheep. Sheep were fed *ad libitum* two times per day at 12-h intervals (60% of the diet at 0700 h and 40% of the diet at 1900 h) and had free access to water and salt blocks. The quantities of hay distributed each day were 10% higher than the quantities ingested two days before. The change-over from one forage to another was made during a three-day transition. Sheep were individually housed in 4 m² boxes for the first two weeks of each period and in narrower boxes adapted for faeces and urine collection for the last two weeks. Each period lasted 28 days, with 14 days of adaptation to diets and to equipment for gas collection, followed by seven days of measurements of feed intake and CH₄ emission and seven days of measurements for feed intake, and feces and urine collection for determining total tract digestibility of DM, OM and fiber and N balance, and rumen liquid turnover rate and total emptying.

The animals were managed following European Union recommendations for animal welfare in accordance with the regulations of the Animal Care Committee of INRA.

2.3. Measurements

Measurements included feed intake, apparent total-tract digestibility of dry matter (DM), organic matter and fiber, N balance, emission of enteric methane and outflow rate of particles and of liquid from the rumen. Dry matter intake and digestibility were determined from daily weighing the amounts of diet offered and refused and the faeces during five consecutive days as well as from daily determination of DM content based on 200-g samples. Daily representative samples of the forage offered and refused and of faeces were subject to chemical analysis. Organic matter and fiber digestibility were determined from DM digestibility and OM, NDF and ADF content in forages and feces. Water intake was measured daily in the West Indies site using individual counters. Nitrogen balance, i.e., N in feeds, feces and urine, and N retained, was determined from digestibility data and urine collection. Urine was collected daily in cans containing sulfuric acid (approximately 2.5 vol. H₂SO₄ (10%) per 100 vol urine) and subsamples were pooled for N determination. Enteric CH₄ production was determined over five consecutive days using the sulphur hexafluoride (SF₆) tracer technique according to the method of Johnson et al. (1994), and was implemented as described by Martin et al. (2008). Briefly, brass permeation tubes (12.5 × 40 mm i.d.), weighing about 32 g, were loaded with about 600 mg of SF₆ gas (Air Liquide, Mitry-Mory, France) while in liquid N₂. They were then kept in a conical flask in a 39 °C water bath and calibrated by regular weighing (twice weekly) over a 10-week period. Average permeation rate of SF₆

from the tubes was 1.015 ± 0.038 mg/d. A calibrated permeation tube was introduced orally into the rumen of each ram one week before the first gas sampling period and remained in the rumen throughout the experiment. Representative breath samples from each ram were collected in pre-evacuated (-0.8 atm) polyvinyl chloride cylindrical collection devices (~ 0.7 L) by means of capillary and Teflon tubing fitted to a halter. The pre-evacuated collection devices were placed at the top of the animal stall and changed every 24 h before the morning feeding (0700 h). The devices containing the samples were over-pressured with N_2 gas to about $+0.8$ atm prior to SF_6 and CH_4 analyses. Background concentrations of gases were measured daily in ambient air samples collected in a device placed in the barn with a good natural ventilation.

The outflow rate of the liquid phase of the rumen was estimated using CrEDTA according to Udén et al. (1980). A single dose of a 50-mL solution made of 2.77 mg Cr per mL was introduced into the rumen on day 2 of week 4 before morning feeding. Rumen fluid samples were taken at 1, 4, 9, 25, 33 and 50 h after dosing.

The outflow rate of the particle phase of the rumen was determined from indigestible NDF (iNDF) as described by Michalet-Doreau and Doreau (2001) and from acid detergent lignin (ADL) as described by Archimède et al. (2000). For this purpose, complete emptying of the rumen was performed on the last day of each period, 9 h after the morning feed distribution, according to the procedure described by Silberberg et al. (2014). The rumen content was weighed and sampled, a 200-g sample was taken for DM determination by drying as mentioned above, a 400-g sample was lyophilised for ADL analysis and for iNDF determination using the nylon bag technique as follows. In the tropical site, six Blackbelly rams were fed permanent grassland hay based on *Dichanthium* spp. given *ad libitum* and 400 g alfalfa pellets. The 64 rumen contents and the four forages were ground and nine dacron bags per sample were filled with 3 g of content. Bags were then introduced in the rumen and removed after 120 h (three rams per sample, three bags per sample and per ram, 24 bags per 120 h-cycle). Residues were then pooled per sample and determined for NDF in order to obtain iNDF particle outflow rate (PAR, h^{-1}), calculated by two methods:

- 1) $PAR (h^{-1}) = (ADL \text{ faecal excretion}/24)/ADL \text{ amount in rumen content}$
- 2) $PAR (h^{-1}) = iNDF \text{ intake}/24/iNDF \text{ amount in rumen content}$.

2.4. Analytical procedures

Dry matter content of fresh forage, refusals and faeces was determined by drying until constant weight at $60^\circ C$ in a forced draught oven. Samples for chemical analyses were dried under the same conditions. Diet and faeces samples were milled through a 1-mm screen (Reich hammer mill, Haan, Germany) prior to analysis. Organic matter (OM) and N analyses were performed according to AOAC (1990, Methods 923.3 and 992.15, respectively) by ashing at $550^\circ C$ for 6 h for OM and by the Dumas method for N. Nitrogen analyses of fresh urine samples were performed according to the same method as for the diets. Crude protein (CP) was calculated as $N \times 6.25$. Cell wall components [neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF) and ADL] in diet and faeces were determined using a sequential procedure (AOAC, 2006, Methods 200.04 and 973.18, respectively for NDF and ADF + ADL). Concentrations of SF_6 and CH_4 in breath and ambient air samples were determined by gas chromatography as described in Archimède et al., 2016. Daily CH_4 emission from each animal was calculated using the known permeation rate of SF_6 and the concentrations (above the

background) of SF_6 and CH_4 in the breath sample, according to the following formula:

$$CH_4 (g/d) = SF_6 \text{ permeation rate } (g/d) \times [CH_4]/[SF_6]$$

The daily enteric CH_4 production (g/d) was also used to define CH_4 yield phenotypes (Negussie et al., 2017) based on intake (DMI, OMI, NDFI, DDMI) and digestibility (DOMI, DNDF) of forages.

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the mixed procedure of SAS (SAS, 2008). Regarding the indicators of the ingestion and total tract digestion, the model included site ($n = 2$), breed ($n = 2$), forage ($n = 4$), period ($n = 4$), interactions between forage and site, breed and forage and breed and site as fixed effects and animal nested within the breed \times site interaction as random effect. Differences between C3 and C4 forages were analysed using orthogonal contrasts, while differences between high- and low-quality forages were analysed by orthogonal contrasts within C3 or C4 forages. For CH_4 emission and yield, additional statistical analyses were performed using the same model, but with the level of intake (DM intake per kg BW) taken as covariate. For water intake, measured only in the tropical site, the model included breed ($n = 2$), forage ($n = 4$), period ($n = 4$) and the interaction between breed and forage as fixed effects and animal nested within breed as random effect. Statistical differences were declared significant at $p \leq 0.05$. A difference between $p = 0.05$ and $p = 0.10$ was considered a tendency.

3. Results

3.1. Chemical composition, feed intake, total-tract digestibility and nitrogen balance

The chemical composition of the four forages is presented in Table 1. No statistical test was carried out to compare the chemical composition of grasses because we had only one harvest for each forage. High- and low-quality forages mainly differed by their protein content. Overall, whatever the maturity of the forage, fibre content was higher in tropical grasses than in temperate grasses.

Daily intake is presented in Table 2. No difference in DM intake (g/kg BW/d) was registered between the two sites. Intake of C4 grass was lower than that of C3 grass ($P < 0.001$). Within the same type of grass metabolism (C3 vs. C4), the intake of high-quality grass was higher than that of low quality grass only with C4 grass ($P = 0.04$). No forage \times site interaction was registered and no breed effect on DM intake (g/kg BW/d) was observed. However, there was a breed \times site interaction ($P = 0.04$): DM intake was higher for Blackbelly than for Texel in the West Indies ($P = 0.05$), whereas no difference was registered in France A breed \times forage interaction was observed ($P = 0.004$): Blackbelly had a higher intake of C4 grasses than Texel ($P = 0.03$ and 0.06 for H and L, respectively) and

Table 1
Chemical composition of experimental forages^a, in g/kg dry matter.

	C4-H	C4-L	C3-H	C3-L
Organic matter	912	929	878	926
NDF	742	742	586	623
ADF	470	540	410	370
Lignin	74	74	59	62
Crude protein	120	69	134	83

C3-H = C3 grass high-quality, C3-L = C3 grass low-quality.

^a C4-H = C4 grass high-quality, C4-L = C4 grass low-quality.

Table 2
Voluntary intake (dry matter, organic matter, neutral detergent fibre, acid detergent fibre, crude protein) of two sheep^a breeds (Br) fed four different forages^b (For) in two simultaneous trials in France and the West Indies.

	C3-H		C3-L		C4-H		C4-L		SE	P-value						
	B	T	B	T	B	T	B	T		Site	For	C3 vs C4	Br	Br*site	Br*For	For*site
Dry matter intake, g/kg BW/d																
France	21.8	28.9	25.2	26.3	17.0	16.8	15.1	12.9	1.87	0.95	0.00	0.00	0.47	0.04	0.00	0.17
West Indies	22.8	25.8	23.7	21.9	22.8	14.8	18.7	13.8								
Dry matter intake, g/d																
France	1008	1643	1160	1570	830	994	675	778	94.4	0.01	0.00	0.00	0.75	0.00	0.01	0.04
West Indies	1147	994	1159	892	1057	608	876	559								
Organic matter intake, g/d																
France	896	1459	1089	1468	760	910	629	724	85.5	0.01	0.00	0.00	0.78	0.00	0.01	0.03
West Indies	1022	909	1068	817	965	555	811	517								
Neutral detergent fibre, g/d																
France	563	915	691	933	605	727	496	570	61.4	0.13	0.00	0.00	0.90	0.00	0.02	0.24
West Indies	693	612	758	584	801	462	668	435								
Acid detergent fibre, g/d																
France	307	496	368	498	323	391	269	307	33.6	0.04	0.00	0.00	0.90	0.00	0.02	0.18
West Indies	339	293	402	309	424	242	348	222								
Water intake, g/kg BW/d																
West Indies	90.4	91.2	60.2	63.8	95.1	70.8	56.5	60.8	6.77		0.00	0.26	0.42		0.14	

^a B = Blackbelly sheep, T = Texel sheep.

^b C4-H = C4 grass high-quality, C4-L = C4 grass low-quality, C3-H = C3 grass high-quality, C3-L = C3 grass low-quality.

Texel had a higher intake of C3 grasses, although this was observed only for H ($P = 0.008$). When DM intake was expressed in g/d, site effect and forage effect were significant ($P = 0.0122$ and $P < 0.0001$), but breed effect was not significant. The significance of site, forage and breed effects was similar for OM, NDF, ADF and CP intake (g/d) as for DM intake (g/d), except that site effect was not significant for NDF intake. Water intake in the West Indies was higher ($P = 0.0002$) for H forages than for L forages.

Overall, total-tract DM, OM, NDF and ADF digestibility values recorded in France were lower ($p < 0.01$) than those reported in the West Indies (Table 3). A tendency for a lower CP digestibility in France was observed ($P = 0.08$), but site \times forage interaction was not significant. However, a forage \times site interaction ($P < 0.01$) was observed for all diet components, characterised by a higher digestibility of C4 grasses in the West Indies than in France, but there were no differences between site in the digestibility of C3 grasses. No difference was registered for DM and OM total tract digestibility of C4 grass compared with C3 grass. Within the same type of grass metabolism (C3 vs. C4), DM and OM total tract digestibility of low-quality grass was lower ($P < 0.001$) than that of high-quality grass. Total tract digestibility of NDF and ADF of C4 grass was higher ($P < 0.001$) than that of C3 grass. Within the same type of grass (C3

vs. C4), NDF and ADF total tract digestibility of low-quality grass was lower ($P < 0.001$) than that of high-quality grass. Crude Protein total tract digestibility of C4 grass was lower ($P = 0.012$) than that of C3 grass. Within the same physiological type of grass (C3 vs. C4), CP total tract digestibility of low-quality grass was lower ($P < 0.001$) than that of high-quality grass. Irrespective of the diet component, neither a breed effect nor a breed \times site or breed \times forage interaction was observed for digestibility.

The nitrogen balance is presented in Table 4. Nitrogen intake, fecal N, urinary N and retained N differed widely among forages and between C3 and C4 grasses ($P < 0.0001$). Nitrogen intake, fecal N and urinary N were higher in France than in the West Indies ($P = 0.03$, $P = 0.02$ and $P < 0.0001$, respectively), whereas retained N was higher in the West Indies than in France ($P < 0.0001$). For N intake and urinary N, the difference between sites was wider for C3 grasses (significant interaction, $P = 0.03$ and $P < 0.0001$, respectively). There was no breed effect on N use by animals, but N intake and fecal N were higher for the Texel than for the Blackbelly breed only for C3 grasses (significant breed \times forage interaction). In addition, N intake, fecal N and retained N were higher for Texel in France and higher for Blackbelly in the West Indies (significant breed \times site interaction). When considering the 16 means between

Table 3
Total-tract digestibility (dry matter intake, organic matter digestibility, neutral detergent fibre, acid detergent fibre, crude protein) of two sheep breeds^a (Br) fed four different forages^b (For) in two simultaneous trials in France and the West Indies.

	C3-H		C3-L		C4-H		C4-L		SE	P-value						
	B	T	B	T	B	T	B	T		Site	For	C3vsC4	Br	Br*site	Br*for	Site*for
DM digestibility, %																
France	66.8	62.2	56.4	55.4	62.5	61.8	51.4	47.6	2.09	0.00	0.00	0.27	0.25	0.22	0.59	0.02
West Indies	65.2	63.7	57.6	54.2	66.2	66.6	55.5	60.4								
OM digestibility, %																
France	68.8	64.6	57.4	56.6	62.9	62.3	52.8	49.6	1.97	0.00	0.00	0.13	0.35	0.20	0.49	0.00
West Indies	66.6	65.2	58.5	55.3	67.0	67.4	56.6	62.1								
NDF digestibility, %																
France	65.4	60.7	48.4	47.7	69.7	69.7	54.3	5.11	1.91	0.00	0.00	0.00	0.42	0.25	0.36	0.00
West Indies	65.7	64.2	57.5	54.3	73.8	74.5	61.7	67.2								
ADF digestibility, %																
France	63.5	58.6	47.5	47.1	68.5	68.3	50.4	45.8	2.27	0.00	0.00	0.00	0.24	0.41	0.64	0.00
West Indies	57.8	56.2	55.0	50.2	72.1	72.5	58.5	62.7								

^a B = Blackbelly sheep, T = Texel sheep.

^b C4-H = C4 grass high-quality, C4-L = C4 grass low-quality, C3-H = C3 grass high-quality, C3-L = C3 grass low-quality.

Table 4Nitrogen balance of two sheep breeds^a (Br) fed four different forages^b (For) in two simultaneous trials in France and the West Indies.

	C3-H		C3-L		C4-H		C4-L		SE	P-value						
	B	T	B	T	B	T	B	T		Site	For	C3vsC4	Br	Br*site	Br*for	For*site
N intake, g/d																
France	21.4	35.2	15.6	21.3	16.6	20.0	7.3	8.4	1.77	0.03	0.00	0.00	0.50	0.00	0.01	0.03
West Indies	24.3	21.4	15.5	12.0	20.9	12.4	10.6	7.3								
Faecal N, g/d																
France	7.9	13.9	8.9	11.8	7.5	8.6	5.0	5.8	1.02	0.02	0.00	0.00	0.64	0.00	0.04	0.17
West Indies	8.7	7.8	8.7	7.1	8.4	5.2	6.7	4.1								
Urinary N, g/d																
France	8.6	9.5	3.7	3.5	5.2	4.5	3.0	2.8	0.54	0.00	0.00	0.00	0.77	0.88	0.93	0.00
West Indies	2.0	1.5	0.6	0.7	1.4	1.5	0.8	0.7								
Retained N, g/d																
France	4.9	11.8	2.9	6.0	4.0	6.9	-0.6	-0.2	1.35	0.00	0.00	0.00	0.45	0.00	0.22	0.26
West Indies	13.6	12.2	6.1	4.2	11.2	5.8	3.1	2.6								
Faecal N/N intake																
France	0.362	0.399	0.572	0.554	0.449	0.439	0.677	0.696	0.047	0.08	0.00	0.01	0.86	0.64	0.83	0.40
West Indies	0.339	0.355	0.567	0.589	0.399	0.388	0.632	0.543								
Urinary N/N intake																
France	0.412	0.270	0.242	0.167	0.334	0.246	0.435	0.352	0.4125	0.00	0.00	0.03	0.06	0.01	0.63	0.06
West Indies	0.099	0.071	0.042	0.060	0.067	0.127	0.078	0.101								

^a B = Blackbelly sheep, T = Texel sheep.^b C4-H = C4 grass high-quality, C4-L = C4 grass low-quality, C3-H = C3 grass high-quality, C3-L = C3 grass low-quality.**Table 5**Liquid and particle rumen turnover of two sheep breeds^a (Br) fed four different forages^b (For) in two simultaneous trials in France and the West Indies.

	C3-H		C3-L		C4-H		C4-L		SE	P-value						
	B	T	B	T	B	T	B	T		Site	For	C3vsC4	Br	Br*site	Br*For	Site*For
Liquid turnover rate (%/h)																
France	11.9	8.5	11.4	9.9	9.6	7.1	7.6	6.5	1.25	0.03	0.00	0.00	0.21	0.18	0.24	0.49
West Indies	8.5	8.3	6.0	9.0	9.0	6.7	5.0	4.9								
Particle turnover rate (%/h)																
ADL turnover rate method																
France	1.8	2.8	2.9	4.3	1.5	2.0	1.3	1.6	0.64	0.01	0.00	0.00	0.06	0.49	0.23	0.01
West Indies	1.3	2.1	1.6	2.0	1.0	1.2	1.1	1.3								
Indigestible NDF turnover rate method																
France	1.1	2.1	2.1	4.0	1.7	2.3	1.6	2.0	0.41	0.01	0.01	0.29	0.04	0.29	0.46	0.05
West Indies	0.8	1.5	1.3	1.5	1.1	1.3	1.4	1.6								

^a B = Blackbelly sheep, T = Texel sheep.^b C4-H = C4 grass high-quality, C4-L = C4 grass low-quality, C3-H = C3 grass high-quality, C3-L = C3 grass low-quality.

animals, among forages, breeds and sites, fecal N and urinary N were significantly related to N intake ($r = 0.88$ and 0.62 , respectively; $P < 0.01$). The ratio between fecal N and N intake, which is the opposite of N digestibility, significantly depended on forages and was lower for C3 than for C4 and for high-quality forages than for low-quality forages ($P < 0.01$). It did not vary with site or breed and interactions were not significant. The ratio between urinary N and N intake significantly depended on forages and was higher for C4 than for C3 forages ($P = 0.003$). This ratio was higher in France than in the West Indies ($P < 0.0001$), especially for Blackbelly (significant breed \times site interaction, $P < 0.008$), but the breed effect was not significant.

3.2. Rumen outflow rates of liquids and solids

Rumen outflow rates are presented in Table 5. Overall, the liquid outflow rate was higher in France than in the West Indies ($P = 0.027$). Liquid outflow rates were higher in sheep consuming C3 grass compared to those who consumed C4 grass ($P = 0.0007$). Liquid outflow rates were higher ($P = 0.0150$) in sheep consuming C4-H grass compared to those who consumed C4-L grass, whereas no difference was registered between C3-H and C3-L grasses. No forage \times site interaction effect on liquid outflow rate was

registered. No breed effect, breed \times site interaction, breed \times forage interaction effects were registered on liquid outflow rate.

The solid outflow rate calculated by the indigestible NDF method was higher ($P = 0.0117$) in France. There was no difference between C3 and C4 grasses. No difference was registered between C4-L and C4-H, whereas higher ($P = 0.0017$) particle outflow rate differences were reported with C3-H compared with C3-L. There was a site \times forage interaction ($P = 0.054$), illustrating the lack of difference between sites with C3 grasses.

Results from the ADL method indicated that the particle outflow rate was higher ($P = 0.0149$) with C3 grasses compared with C4 grasses. Particle outflow rates were lower ($P = 0.0001$) with C4 grasses compared to C3 grasses and higher ($P = 0.0021$) in C3-H grass compared with C3-L grass. No difference was registered between high-quality C4 grass and low-quality C4 grass. A forage \times site interaction ($P = 0.0062$) on particle outflow rate was registered: the difference between sites was greater for C3 grasses than for C4 grasses.

Depending on the method, the particle outflow rate was lower ($P = 0.037$) or tended to be lower ($P = 0.06$) for Blackbelly compared with Texel ($P < 0.05$). No breed \times site or breed \times forage interaction was registered according to the method.

Table 6
Methane emissions of two sheep breeds^a (Br) fed four different forages^b (For) in two simultaneous trials in France and the West Indies.

	C3-H		C3-L		C4-H		C4-L		SE	P-value						
	B	T	B	T	B	T	B	T		Site	For	C3vsC4	Br	Br*site	Br*for	For*site
Enteric methane, g/d																
France	23.4	27.2	21.7	24.6	19.9	19.6	10.8	10.5	2.67	0.11	0.00	0.00	0.69	0.70	0.16	0.00
West Indies	12.4	18.9	18.6	15.8	19.4	16.4	15.6	15.1								
Enteric methane, g/kg DMI																
France	23.9	16.6	19.0	15.6	24.0	20.1	16.9	13.8	2.63	0.70	0.01	0.01	0.54	0.01	0.59	0.01
West Indies	12.2	18.9	15.8	18.0	18.4	27.1	18.1	27.0								
Enteric methane, g/kg OMI																
France	26.8	18.7	20.3	16.7	26.3	21.9	18.2	14.9	2.88	0.70	0.01	0.01	0.54	0.01	0.62	0.01
West Indies	13.6	21.1	17.1	19.7	20.2	29.6	19.6	29.2								
Enteric methane, g/kg NDFI																
France	42.9	29.7	32.2	26.3	32.9	27.5	23.5	18.8	4.04	0.59	0.08	0.34	0.74	0.01	0.68	0.00
West Indies	20.2	31.3	24.1	27.5	24.2	35.7	23.8	34.6								
Enteric methane, g/kg DDMI																
France	35.8	27.0	34.1	28.2	38.7	32.6	32.1	29.8	4.49	0.87	0.04	0.01	0.41	0.01	0.77	0.09
West Indies	18.7	29.7	27.4	32.9	27.5	40.9	32.2	45.0								
Enteric methane, g/kg DOMI																
France	39.1	29.2	35.8	29.6	42.8	35.3	33.8	30.5	4.79	0.93	0.06	0.01	0.45	0.01	0.82	0.08
West Indies	20.5	32.5	29.3	35.3	29.8	44.2	34.1	47.3								
Enteric methane, g/kg DNDF																
France	65.9	49.62	68.0	55.5	47.3	39.4	42.5	37.3	5.00	0.12	0.03	0.00	0.74	0.00	0.86	0.05
West Indies	31.2	48.9	42.3	50.1	32.5	47.9	38.1	51.8								

^a B = Blackbelly sheep, T = Texel sheep.

^b C4-H = C4 grass high-quality, C4-L = C4 grass low-quality, C3-H = C3 grass high-quality, C3-L = C3 grass low-quality.

3.3. Methane emissions and yields

Methane emissions are presented in Table 6. Methane emission and yield were not affected by site, irrespective of the mode of expression: per d, per kg DM, OM or NDF intake, per kg digested DM, OM or NDF.

Methane emission (g/d) was higher for C3 than for C4 grasses ($P=0.0003$) and higher for H than for L forages with C4 ($P=0.0006$), but similar between H and L for C3. A significant forage \times site interaction was observed ($P=0.0004$); the differences between sites were greater for C3 than for C4.

Methane yield (g/kg DM intake) was lower ($P\leq 0.01$) for C3 grasses than for C4 grasses and lower ($P<0.0389$ for CH₄/kg DMI) with C4-H compared to C4-L. No difference was registered between high- and low-quality C3 grass. A forage \times site interaction ($P=0.006$) was observed: CH₄/kg DM intake was higher for C3 in France and higher for C4 in the West Indies.

No breed effect and no breed \times forage interaction were registered. No breed \times site interaction was reported for methane emission expressed in g/d, but the interaction was significant ($P<0.01$) for CH₄ yield (g/kg DMI). Methane emission was higher for Texel in the West Indies and higher for Blackbelly in France for all modes of expression.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first experiment designed to compare intake, digestion and methane emission of temperate and tropical forages by a temperate and a tropical sheep breed both in temperate and tropical environments. In previous studies, comparisons between breeds were performed in a single site, under a unique climatic condition and, consequently, do not take into account possible interactions between genotype and environment.

4.1. Effect of type of forage

We observed a greater intake for C3 and early regrowth grasses compared to C4 and late regrowth grasses, respectively. We also observed that digestibility of C4 grasses was lesser than for C3

grasses. All these findings were expected and are in agreement with the literature (Leng, 1990; Kennedy, 1995; Assoumaya et al., 2007). We found lower CH₄ yield (g/kg DMI, OMI, DDMI or DOMI) for C3 versus C4 grasses. These results are in line with Archimède et al. (2011) and Kennedy and Charmley (2012). The higher liquid rumen outflow registered with C3 versus C4 grass could explain these differences in CH₄ emission (Hammond et al., 2014; Okine et al., 1989; Janssen, 2010). For C4 grasses, CH₄ emissions increased in late regrowth. In contrast, we did not observe an increase in methane production in mature C3 grasses. The main difference in the grasses studied is the higher fibre content and degree of lignification in C4 grasses compared with C3 grasses. These results are consistent with those published in a companion paper by Rira et al. (2016). These authors reported that mature tropical forages induced a greater concentration of acetate in detriment of propionate. The increase in the acetate/propionate ratio, which is correlated with fibre content, is accompanied by an increase in methane production (Beauchemin et al., 2009). The lack of effect of C3 forage maturity on methane emission was reported by others (Pinares-Patiño et al., 2003a; Molano and Clark, 2008; Hart et al., 2009; Warner et al., 2015). In contrast, other authors (Jonker et al., 2015; Warner et al., 2015) indicated that CH₄ emission and yield increases with forage maturity.

Our results show that DMI is one of the main explanatory variables of the amount of CH₄ produced and are in agreement with several authors (Jonker et al., 2015; Hristov et al., 2013). When comparing this study with a database of published studies containing methane emissions of animals fed forage diets (Methafour database, Eugène et al., 2014) (Fig. 2), the data from this study fall within normal ranges, which reinforces the notion that differences in CH₄ yield were related to variations in DMI. Changes in DMI between low-quality and high-quality forages also resulted in changes in CH₄ per kg DOMI. Intake level and rumen outflow, which are often positively correlated, partly explain this variability.

4.2. Breed effect

There was no effect of breed on DMI, digestibility and CH₄ emission and yield, but breed \times site and breed \times forage interactions

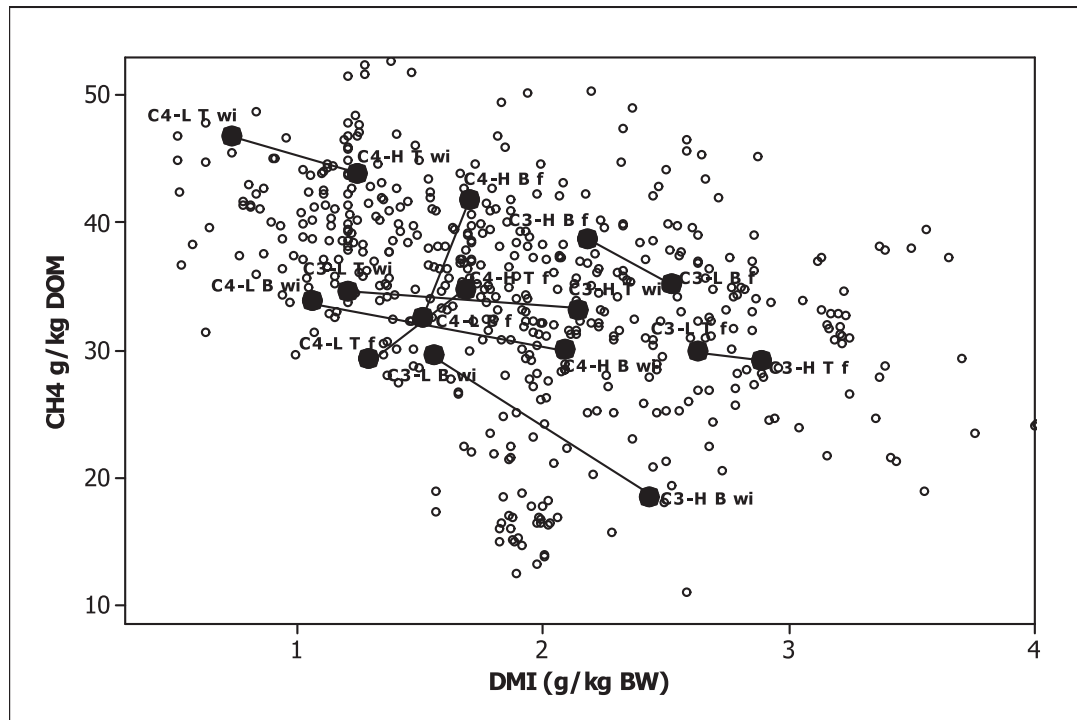


Fig. 2. Relationship between forage intake and methane emission: experimental data (black circles) compared to literature data (open circles). Literature data come from the Methafour database (Eugène et al., 2014).²C4-H = C4 grass high quality, C4-L = C4 grass low quality, C3-H = C3 grass high quality, C3-L = C3 grass low quality; T = Texel, B = Blackbelly; wi = West Indies, f = France; DMI = dry matter intake; BW = body weight; DOM = digestible organic matter.

were observed for DMI and CH₄. Dry matter intake was higher in Blackbelly than in Texel in the tropical site where a climatic stress could have occurred, whereas no difference was registered in the temperate site. This result indicates a diminished adaptation of Texel to warm and humid environments. Texel is a breed selected for meat production in temperate environments, whereas Blackbelly is a less productive breed originating from the Caribbean area and adapted to humid tropics. These differences in intake between the two breeds cannot be explained by the rumen outflow rate of particles, which was higher in Texel than in Blackbelly in both sites. It can be hypothesised that Texel sheep which, during the hottest hours of the day, breathed quickly and were noticeably affected by the heat (visual observation), reduced their intake to decrease their internal temperature.

For the interaction between breed and forage on DMI per kg BW, intake was higher for Texel than for Blackbelly for the C3-H, whereas it was higher for Blackbelly than for Texel for C4-L forage. Wilkes et al. (2012) also reported an interaction between genotypes comparing Damara and Merino breeds in Australia. Damara sheep use different mechanisms to exploit low-quality and high-quality feeds. On a low-quality diet, the Damara consumed a similar amount of feed as the Merinos but they displayed higher digestibility. On a high-quality diet, the Damaras had similar digestibility as Merinos but they had greater voluntary intake. For cattle, Hunter and Siebert (1985) suggested an interaction between genotype and diet quality to explain the phenotypical differences observed between *Bos taurus* Hereford vs *Bos indicus* Brahman. The *Bos taurus* ingested less low-quality forage than *Bos indicus*, while no difference was reported for high-quality forages. These differences were explained by the improved microbial digestion due to the greater urea recycling in *Bos indicus*.

No effect of breed and no interaction between breed and site or breed and forage were observed on digestibility. The absence of differences in end-products of digestion and in bacterial and

protozoal numbers and profile in our study (Rira et al., 2016) are in line with this result. Between-breed comparisons are abundant in the literature, and most comparisons did not show significant differences in the extent of digestion (Doreau and Diawara, 2003; Grimaud and Doreau, 2003). However, an interaction between breed and forage was observed on ruminal digestibility, but not on total-tract digestibility by Kennedy (1982). These authors reported that ruminal digestion was higher for Brahman crossbred than for Hereford fed a tropical hay due to a higher retention time in the rumen, whereas no difference was observed when they were fed alfalfa hay.

The absence of an overall breed effect on methane emission confirms literature data in dairy cows (Münger and Kreuzer, 2008; with Holstein, Simmental and Jersey) and in steers on different pastures (Fraser et al., 2014; with Limousin and Welsh black). Our results show higher methane production for Blackbelly versus Texel in France, while the opposite was observed in the West Indies. This genotype-environment interaction cannot be explained by differences in the turnover of solid and liquid phases of the rumen of these breeds, as suggested by Hegarty (2004). In the companion paper, Rira et al. (2016) did not report differences in the rumen microbiota between Texel and Blackbelly, corroborating previous studies which showed that rumen microbial populations were not significantly different between two cattle breeds (Rooke et al., 2014).

4.3. Effect of environmental conditions

The increase in temperature and hygrometry is a major factor minimising feed intake by ruminants (reviews by Morand-Fehr and Doreau, 2001; Renaudeau et al., 2012). The higher temperature and hygrometry in the tropical site compared to the temperate site could explain the observed decrease in intake. Although temperatures were not extreme, the difference in THI may have resulted in

thermal discomfort for sheep in the West Indies and, thus, in decreased feed intake. A THI greater than 75 may be uncomfortable, especially for animals native to temperate regions (Silanikove, 2000). However, in our experiment, when intake is expressed as percentage of BW, there was no difference between the two sites. This is probably because animals and their microbiota are adapted to their environments, as Texel and Blackbelly used in France were born in France and Texel and Blackbelly used in the West Indies were born in the West Indies.

In our experiment, OM digestibility was slightly, but significantly higher in the West Indies than in France. This is in line with the analysis of the literature by Morand-Fehr and Doreau (2001) and can be explained by the decrease in outflow of rumen content when temperature increases (Warren et al., 1974). Such a decrease has been observed in our study.

5. Conclusions

Differences in enteric methane emissions from sheep in temperate and tropical sites seem to be multifactorial and were influenced by diet, breed and interactions with the environment. The unique experimental design used in this study highlighted an interaction between sheep breeds and geographical location that was not reported before. Each breed performed better in its original environment. The native breed from the tropics, Blackbelly fed good quality C4 forages in the tropical site emitted comparable amounts of methane that Texel fed C3 forages in the temperate site. This work challenges the general held assumption that methane emissions from ruminants in tropical regions are greater than in temperate regions.

Acknowledgements

This experiment was completed with the financial support of the French National Research Agency (ANR), project ANR-09-STRA-01 EPAD, of the Region Guadeloupe and with European funding: FEOGA, FEDER, FSE. The authors thank Yvonne Rochette for supervising methane analyses, Brigitte Calif, Frédéric Pommier, Pierre Justin Dumoulin (West Indies), André Guittard, Denis Roux and the late Michel Fabre (France, Metropolitan) for technical assistance.

References

AOAC, 1990. Official Methods for Analysis. Association of Official Analysis Chemists, Gaithersburg, MD, USA.

AOAC, 2006. Official Methods for Analysis. Association of Official Analysis Chemists, Gaithersburg, MD, USA.

Archimède, H., Boval, M., Alexandre, G., Xandé, A., Aumont, G., Poncet, C., 2000. Effect of regrowth age on intake and digestion of *Digitaria decumbens* consumed by Blackbelly sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87, 153–162.

Archimède, H., Eugène, M., Marie-Magdeleine, C., Boval, M., Martin, C., Morgavi, D.P., Lecomte, P., Doreau, M., 2011. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167, 59–64.

Archimède, H., Rira, M., Barde, D.J., Labirin, F., Marie-Magdeleine, C., Calif, B., Pericarpin, F., Fleury, J., Rochette, Y., Morgavi, D.P., Doreau, M., 2016. Potential of tannin-rich plants, *Leucaena leucocephala*, *Glyricidia sepium* and *Manihot esculenta*, to reduce enteric methane emissions in sheep. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 100, 1149–1158.

Assoumaya, C., Sauviant, D., Archimède, H., 2007. Etude comparative de l'ingestion et de la digestion des fourrages tropicaux et tempérés. *INRA Prod. Anim.* 20, 383–392.

Beauchemin, K.A., McAllister, T.A., McGinn, S.M., 2009. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Rev. Perspect. Agric. Veterinary Sci. Nutr. Nat. Resour.* 2009 4, No. 035.

Doreau, M., Diawara, A., 2003. Effect of level of intake on digestion in cows: influence of animal genotype and nature of hay. *Livest. Prod. Sci.* 81, 35–45.

Eugène, M., Archimède, H., Doreau, M., Giger-Reverdin, S., Sauviant, D., 2014. Effect of feeding forages (C3 or C4 metabolism) on enteric methane emissions from ruminants: a meta-analysis. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 30, 223.

Fraser, M.D., Fleming, H.R., Moorby, J.M., 2014. Traditional vs modern: role of breed

type in determining enteric methane emissions from cattle grazing as part of contrasting grassland-based systems. *PLoS one* 9 (9), e107861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107861>.

Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falucci, A., Tempio, G., 2013. Tackling Climate Change through Livestock – a Global Assessment of Emissions and Mitigation Opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.

Grimaud, P., Doreau, M., 2003. Effects of level of intake and nitrogen supplementation on digestion by cows in a tropical environment. *Anim. Res.* 52, 103–118.

Hammond, K.J., Pacheco, D., Burke, J.L., Koolgaard, J.P., Muetzel, S., Waghorn, G.C., 2014. The effects of fresh forages and feed intake level on digesta kinetics and enteric methane emissions from sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 193, 32–43.

Hart, K.J., Martin, P.G., Foley, P.A., Kenny, D.A., Boland, T.M., 2009. Effect of sward dry matter digestibility on methane production, ruminal fermentation, and microbial populations of zero-grazed beef cattle. *J. Anim. Sci.* 87, 3342–3350.

Hegarty, R.S., 2004. Genotype differences and their impact on digestive tract function of ruminants: a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 44, 459–467.

Hristov, A.N., Oh, J., Firkins, J.L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H.P., Adesogan, A.T., Yang, W., Lee, C., Gerber, P.J., Henderson, B., Tricarico, J.M., 2013. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: a review of enteric methane mitigation options. *J. Anim. Sci.* 91, 5045–5069.

Hunter, R.A., Siebert, B.D., 1985. Utilization of low-quality roughage by *Bos Taurus* and *Bosindicus* cattle. 2. The effect of rumen-degradable nitrogen and sulphur on voluntary food intake and rumen characteristics. *Br. J. Nutr.* 53, 649–656.

Janssen, P.H., 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Anim. Feed Sci. Technol.* 160, 1–22.

Johnson, K.A., Huyler, M., Westberg, H., Lamb, B., Zimmerman, P., 1994. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF6 tracer technique. *Environ. Sci. Technol.* 28, 359–362.

Jonker, A., Muetzel, S., Molano, G., Pacheco, D., 2015. Effect of fresh pasture forage quality, feeding level and supplementation on methane emissions from growing beef cattle. *Anim. Prod. Sci.* 56, 1714–1721.

Kennedy, P.M., 1995. Comparative adaptability of herbivores to tropical environments. In: Journet, M., Grenet, E., MFarce, M.-H., MTheriz, M., MDemarquilly, C. (Eds.), Recent Developments in the Nutrition of Herbivores, 309–228.

Kennedy, P.M., 1982. Ruminal and intestinal digestion in Brahman crossbred and Hereford cattle fed alfalfa or tropical pasture hay. *J. Anim. Sci.* 55, 1190–1199.

Kennedy, P.M., Charmley, E., 2012. Methane yields from Brahman cattle fed tropical grasses and legumes. *Anim. Prod. Sci.* 52, 225–239.

Leng, R.A., 1990. Factors affecting the utilization of poor-quality forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutr. Res. Rev.* 3, 277–303.

Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M., 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4, 351–365.

Martin, C., Rouel, J., Jouany, J.P., Doreau, M., Chilliard, Y., 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows with crude linseed, extruded linseed or linseed oil. *J. Anim. Sci.* 86, 2642–2650.

Michalet-Doreau, B., Doreau, M., 2001. Influence of drastic underfeeding on ruminal digestion in sheep. *Anim. Res.* 50, 451–462.

Molano, G., Clark, H., 2008. The effect of level of intake and forage quality on methane production by sheep. *Aust. J. Exp. Agric.* 48, 219–222.

Morand-Fehr, P., Doreau, M., 2001. Ingestion et digestion chez les ruminants soumis à un stress de chaleur. *INRA Prod. Anim.* 14, 15–27.

Münzer, A., Kreuzer, M., 2008. Absence of persistent methane emission differences in three breeds of dairy cows. *Aust. J. Exp. Agric.* 48, 77–82.

Negussie, E., de Haas, Y., Dehareng, F., Dewhurst, R.J., Dijkstra, J., Gengler, N., Morgavi, D.P., Soyeurt, H., van Gastelen, S., Yan, T., Biscarini, F., 2017. Invited review: large-scale indirect measurements for enteric methane emissions in dairy cattle: a review of proxies and their potential for use in management and breeding decisions. *J. Dairy Sci.* 100, 2433–2453.

NRC, 1971. A Guide to Environmental Research on Animals. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.

Okine, E., Mathison, G., Hardin, R., 1989. Effects of changes in frequency of reticular contractions on fluid and particulate passage rates in cattle. *J. Anim. Sci.* 67, 3388–3396.

Pinares-Patiño, C.S., Baumont, R., Martin, C., 2003a. Methane emissions by Charolais cows grazing a monospecific pasture of timothy at four stages of maturity. *Can. J. Anim. Sci.* 83, 769–777.

Pinares-Patiño, C.S., Ulyatt, M.J., Lassey, K.R., Barry, T.N., Holmes, C.W., 2003b. Rumen function and digestion parameters associated with differences between sheep in methane emissions when fed chaffed lucerne hay. *J. Agric. Sci.* 140, 205–214.

Rooke, J.A., Wallace, R.J., Duthie, C.A., McKain, N., Motta de Souza, S., Hyslop, J.J., Ross, D.W., Waterhouse, T., Roehe, R., 2014. Hydrogen and methane emissions from beef cattle and their rumen microbial community vary with diet, time after feeding and genotype. *Br. J. Nutr.* 112, 398–407.

Renaudeau, D., Collin, A., Yahav, S., de Balisio, V., Gourdière, J.L., Collier, R.J., 2012. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal* 6, 707–728.

Rira, M., Morgavi, D.P., Popova, M., Marie-Magdeleine, C., Silou-Etienne, T., Archimède, H., Doreau, M., 2016. Ruminal methanogens and bacteria populations in sheep are modified by a tropical environment. *Anim. Feed Sci. Technol.* 220, 226–236.

SAS, 2008. Statistical Analysis System Release 8.01. SAS Institute INC, Cary, NC.

Silanikove, M., 2000. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed

- domestic ruminants. *Livest. Prod. Sci.* 67, 1–18.
- Silberberg, M., Boissy, A., Rira, M., Delval, E., Chandeze, H., Doreau, M., 2014. Impact of rumen emptying on rumen fermentation and animal welfare in cannulated sheep. *Anim. Prod. Sci.* 55, 213–218.
- Udén, P., Colucci, P.E., Van Soest, P.J., 1980. Investigation of chromium, cerium, and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. *J. Sci. Food Agric.* 31, 625–632.
- Warner, D., Podesta, S.C., Hatew, B., Klop, G., van Laar, H., Bannink, A., Dijkstra, J., 2015. Effect of nitrogen fertilization rate and regrowth interval of grass herbage on methane emission of zero-grazing lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98, 3383–3393.
- Warren, W.P., Martz, F.A., Asay, K.H., Hilberbrand, E.S., Payne, C.G., Vogt, J.R., 1974. Digestibility and rate of passage by steers fed tall fescue, alfalfa or orchard grass hay in 18 and 32 C ambient temperatures. *J. Anim. Sci.* 39, 93–96.
- Wilkes, M.J., Hynd, P.I., Pitchford, W.S., 2012. Damara sheep have higher digestible energy intake than Merino sheep when fed low-quality or high-quality feed. *Anim. Prod. Sci.* 52, 30–34.

Publication 2

Ruminal methanogens and bacteria populations are modified by a tropical environment

Rira M., Morgavi D.P., Popova M., Marie-Magdeleine C., Silou-Etienne T., Archimède H., Doreau M.

Animal Feed Science and Technology, 2016, 220, 226-236.



Ruminal methanogens and bacteria populations in sheep are modified by a tropical environment

Moufida Rira^{a,1}, Diego P. Morgavi^a, Milka Popova^a, Carine Marie-Magdeleine^b, Tatiana Silou-Etienne^b, Harry Archimède^b, Michel Doreau^{a,*}

^a INRA, VetAgro Sup, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

^b INRA, UR143 URZ, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 May 2016

Received in revised form 13 July 2016

Accepted 9 August 2016

Keywords:

Rumen microbiota

Volatile fatty acids

Temperate vs tropical site

Sheep breed

Forage

Methane

ABSTRACT

Microbial fermentation of carbohydrates in the rumen is largely responsible for the emission of methane by ruminants. Ruminants fed tropical forages usually produce more enteric methane than ruminants fed temperate forages. The relative influence of forage type, breed and temperate vs tropical environment on rumen microbial populations is not known. This experiment aimed to separate these effects. We designed two parallel experiments in sheep in two sites: temperate (France) and tropical (French West Indies), using in each site two breeds, Texel (temperate origin), and Blackbelly (tropical origin) fed the same temperate forages (C3 carbon fixation, permanent grasslands of high and low quality) and tropical forages (C4 carbon fixation, permanent grasslands of high and low quality). We determined diet digestibility, ruminal end-products of fermentation and microbial groups: total protozoa, methanogens and bacteria, and selected fibrolytic bacteria. Dry matter digestibility coefficient was higher in tropical site (612 vs 580 g/kg on average, $P=0.004$) but no difference was observed between C3 and C4 forages. There was no effect of site on total VFA concentration, but the acetate:propionate ratio was higher for the tropical site (4.30 vs 3.93 on average, $P=0.007$). The acetate:propionate ratio was also affected by forage type with higher values for C3 than C4 forage (4.24 vs 3.99 on average, $P=0.03$). Concentration of total rumen bacteria and methanogens was determined by qPCR targeting, respectively, the *rrs* (16S ribosomal RNA subunit) and *mcrA* (methyl coenzyme-M reductase) genes. For both groups, the number of gene copies per gram of DM rumen content was higher in the tropical site ($P<0.001$). For cellulolytic bacteria, higher number of *rrs* copies per gram of DM of rumen content were detected for *Fibrobacter succinogenes* in the temperate site ($P<0.001$), whereas no differences were observed for *Ruminococcus flavefaciens* or *Ruminococcus albus* numbers between sites, breeds and forage type. Protozoa numbers determined by counting did not vary between sites, forages or breeds, but a site \times forage interaction was observed ($P=0.01$): there were more protozoa and *R. albus* in tropical sites for tropical forages. Our results suggest that rumen microbiota was mainly influenced by environment (temperate vs tropical) and that forage type (C3 vs C4) and breed had minor effects. However, an interaction between environment and forage type was observed for some variables.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: CH₄, methane; VFA, volatile fatty acid; DM, dry matter; H₂, hydrogen; CO₂, carbon dioxide; H, high; L, low; NDF, neutral detergent fibre assayed without a heat-stable amylase and expressed inclusive of residual ash; ADF, acid detergent fibre expressed inclusive of residual ash; OM, organic matter; NH₃, ammonia; PBS, phosphate buffer saline; DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis; TAE, Tris-Acetate-EDTA; MFS, methylgreen formalin saline.

* Corresponding author at: INRA, VetAgro Sup, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle France.

E-mail addresses: moufida.r@yahoo.fr (M. Rira), michel.doreau@clermont.inra.fr (M. Doreau).

¹ Present address: Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie, Ali Mendjli, BP E66, 25100 Constantine, Algeria.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.08.010>

0377-8401/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Enteric methane (CH₄) from ruminants accounts for 39% of livestock sector greenhouse gases emissions (Gerber et al., 2013). Several studies have tested different strategies for CH₄ abatement in ruminants (Hristov et al., 2013; Martin et al., 2010). However, although ruminant diets are based on forage, there is scant information on the effect of forage type on methanogenesis. A meta-analysis (Archimède et al., 2011) showed that enteric CH₄ production per kg of dry matter (DM) intake may be higher for ruminants fed tropical forages than for those fed temperate forages. These differences in CH₄ production may be due to the constitutional variation in the chemical structure of tropical and temperate forages, which display C4 and C3 carbon fixation pathways, respectively. However, differences could also be due to the ambient environment or to animal breed. Experiments carried out with tropical forages have always been conducted in the tropics with breeds originating from and adapted to a tropical environment; likewise, experiments with temperate forages have been run in temperate areas with breeds originating from these areas.

In the rumen, CH₄ production results from microbial fermentation of carbohydrates. The main end products of this fermentation are volatile fatty acids (VFA), hydrogen (H₂) and carbon dioxide (CO₂). A large diverse population of microorganisms drives this process, especially bacteria and protozoa. The H₂ produced is mainly used by methanogenic archaea to reduce CO₂ to CH₄. The activity, diversity and concentration of microbes harboured in the rumen are influenced by diet, breed, and the environment (King et al., 2011). However, to our knowledge, the relationships linking these three factors and their relative importance have not been studied.

The aim of this experiment was to compare rumen fermentation variables and microbial community structures of two breeds of sheep (Texel vs Blackbelly) fed C3 and C4 forages (permanent grasslands of high and low quality) in a temperate and a tropical site. Special attention was paid to methanogens and hydrogen-producing protozoa, which are associated with methanogenesis increase. Total bacteria were also studied, with a focus on cellulolytic bacteria, which play an important role in cell wall degradation and so can favour CH₄ production.

2. Materials and methods

2.1. Animals, diet, management and experimental design

The study was conducted in parallel in two research sites located in temperate and tropical areas. The temperate site was in Auvergne, France, at 45.70° North latitude and 3.03° West longitude. Where the animals were housed, the average daily temperature ranged between 11.2 °C and 15.9 °C, and the average relative humidity ranged between 32% and 46% during the experiment. The tropical area was in the French West Indies at 16.16° North latitude and 61.30° West longitude. The average daily temperature ranged between 21.0 °C and 25.0 °C and the average relative humidity ranged between 83% and 88% during the experiment.

In each site, 4 Texel wethers (temperate origin) and 4 Blackbelly rams (tropical origin) were used in two 4 × 4 Latin square designs. Sheep were born in the site where the experiment took place. Sheep were 2 years old and were fitted with a rumen cannula. Their body weight was 60.2 ± 1.5 kg for the Texel sheep and 51.3 ± 4.3 kg for the Blackbelly sheep in the temperate site; and 44.7 ± 0.7 kg for the Texel sheep and 44.4 ± 2.1 kg for the Blackbelly sheep in the tropical site. Management of experimental animals followed the guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture and other applicable guidelines and regulations for animal experimentation in the European Union (European Commission, 2010).

In both sites, sheep were fed the same forage from permanent grasslands, one grown in the temperate area and one grown in the tropical area. For each forage, there were two maturity stages that determined forage quality, high (H) and low (L), so that a total of 4 forages were studied in each site. Temperate forage was a semi-mountain permanent grassland, first cycle, flowering stage harvested in late June (L), and second cycle harvested in late August (H), both from the same parcel. The tropical forage was permanent grassland rich in *Dichanthium spp*; regrowths of 36 days (H) and 91 days (L), harvested in October. Transport of forage from one site to the other was by ship. Chemical composition of forages is presented in Table 1.

Each experimental period lasted 4 weeks: 2 weeks for adaptation to the forage, 1 week for CH₄ measurements, and 1 week for digestibility and rumen sampling. Detailed results on digestibility and CH₄ enteric productions arising from this study have been reported in a preliminary communication (Archimède et al., 2013) and will be fully published in a second paper (Archimède et al., unpublished).

Table 1

Average dry matter content and chemical composition of experimental forages^a.

	Temp H	Temp L	Trop H	Trop L
Dry matter, g/kg fresh matter ^b	875	879	866	878
Organic matter, g/kg dry matter	878	926	912	929
NDF, g/kg dry matter	586	623	742	742
ADF, g/kg dry matter	410	370	470	540
Crude protein, g/kg dry matter	134	83	120	69

^aTemp H = temperate forage high quality, Temp L = temperate forage low quality, Trop H = tropical forage high quality, Trop L = tropical forage low quality.

^bDry matter content of forages was on average 1.3 percentage unit higher in temperate site than in tropical site.

Sheep were fed *ad libitum* twice daily at 07:00 and 19:00 and were housed in a closed barn in the temperate site and in a semi-open barn in the tropical site. Animals were tied in boxes equipped for separation between urine and faeces in male sheep. They had free access to water and salt block at all times.

2.2. Measurement of feed intake and digestibility, and rumen sampling

Feed intake was measured by weighing daily offered and refused forages for 5 consecutive days. A 200-g sample of offered and refused forages was taken, and DM content was determined by oven-drying at 60 °C until constant weight. Digestibility coefficient was measured by total collection of faeces for 5 consecutive days. After weighing and mixing, 10% of daily collection of faeces were taken every day, and DM content was determined by oven-drying at 60 °C until constant weight.

Approximately 250 g of whole rumen contents were collected through the cannula just before and 3 h after the morning feeding. A subsample of exactly 30 g was used for microbial analysis. The remaining subsample was strained through a polyester monofilament fabric (250 µm mesh size). The pH was promptly measured using a portable pH-meter (CG840, electrode Ag/AgCl, Schott Geräte, Hofheim, Germany).

2.3. Fermentation characteristics analysis

For VFA, 0.8 mL of rumen fluid filtrate was mixed with 0.5 mL of a solution containing 4 mg/mL (w/v) crotonic acid and 20 mg/mL (w/v) metaphosphoric acid in 0.5 mol/L HCl, kept at 4 °C for 2 h and centrifuged (16,500 × g, 10 min, 4 °C). The supernatant was stored at –20 °C until analysis. Ruminant VFA were determined in the rumen liquid phase by gas chromatography (Ottenstein and Bartley, 1971). The gas chromatograph was a Hewlett Packard 5889 equipped with a Stabilwax DA (30 m × 0.53 mm i.d.) column maintained at 125 °C. The carrier gas was H₂ (34.6 mL/min). For ruminal ammonia (NH₃), 1 mL of liquid phase was added to 0.1 mL of H₃PO₄ 0.8 M and frozen at –20 °C until analysis. Ruminant ammonia was assayed by colorimetry using the phenol-hypochlorite method (Weatherburn, 1967).

2.4. Microbial analysis

Thirty grams of whole rumen contents was diluted with 15 mL of ice-cold phosphate buffer saline (PBS) pH 6.8 and homogenized in three 1 min cycles with 1 min intervals on ice, using a Polytron grinding mill (Kinematica GmbH, Steinhofhalde Switzerland). Approximately 0.5 g was transferred to a 2-mL Eppendorf tube and stored at –80 °C until DNA extraction.

Total DNA was extracted from approximately 200 mg of frozen rumen sample using the QIAamp DNA purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) (Yu and Morrison, 2004). DNA concentration and quality were checked by the A260 and A280 absorbance ratio in a NanoQuant Plate on a spectrophotometer (Infinity, Tecan, Männedorf, Switzerland). The extracted DNA was diluted to 10 ng/µL and used as a template for PCR to amplify the *rrs* gene of total bacteria and the *mcrA* gene for methanogens. Primers used in this study are listed in Table 2 (Edwards et al., 2007; Muyzer et al., 1993). When PCR products were used for denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), forward primers included a GC clamp (~40 nt). All PCR reactions were performed in a T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) (Popova et al., 2011; Sadet et al., 2007). PCR products were analyzed by electrophoresis on 20 g/L agarose gel (w/v) to check their size and estimate their concentration using a Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA).

For DGGE analysis, the amount of PCR product loaded on gels was adjusted to 100 ng for both bacterial *rrs* and methanogen *mcrA* genes. Gels had a 6–8 (w/v) polyacrylamide gradient and a denaturant gradient of 30–55% for *rrs* and 10% to 30% for *mcrA*. Electrophoresis was performed in 0.5× Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer (TAE Buffer 1×, 40 mmol/L Tris base, 40 mmol/L glacial acetic acid, 1 mmol/L EDTA) at 200 V and 60 °C for 5 h. Gels were silver stained using a commercial kit (Bio-Rad Laboratories) and analyzed using GelCompar II (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). The peak area of all bands (N) and of each band (*n_i*) and the number of bands S were used to calculate the community biodiversity using three indices: the Shannon index (H) calculated as $H = -\sum(n_i/N) \ln(n_i/N)$, Simpson's dominance index (λ) calculated as $\lambda = \sum(n_i/N)^2$, and the evenness index (e) calculated as $e = H/\ln S$ (Heip et al., 1998).

The quantitative (q) PCR for total bacteria (*rrs* gene) and methanogens (*mcrA* gene) was carried out (Morgavi et al., 2013). The slope and efficiency for *rrs* and *mcrA* primers were: –3.45 and 95.6%, and –3.43 and 95.1%, respectively, with R² being greater than 0.99 in both cases. The cellulolytic bacteria *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, and *Ruminococcus albus* were quantified with primers targeting the *rrs* gene (Denman and McSweeney, 2006; Koike and Kobayashi, 2001). The slope and efficiency for each primer pair were, respectively, –3.19 and 105.8%, –3.52 and 92.3%, and –3.54 and 91.5%. For each rumen content sample, results were expressed as the mean of three replicates in *rrs* or *mcrA* log₁₀ copies per gram of DM of rumen contents.

For protozoa counting, 3 mL of rumen fluid was added to 3 mL of methylgreen formalin saline (MFS) solution (35 mL/L formaldehyde, 0.14 mmol/L NaCl, 0.92 mmol/L methylgreen) and stored in the dark at room temperature. Rumen fluid/MFS solutions were diluted in an equal volume of PBS before protozoa counts under a microscope (× 400) in a Neubauer chamber (Ranilla et al., 2007). Data were expressed as log₁₀ cells/mL.

Table 2
Oligonucleotides used as primers for PCR-DGGE and qPCR analysis.

Oligonucleotides	Oligonucleotide sequences	Target	Amplicon length (bp)	Use in	Primer references
534R – 341f-GC	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG 5'-(GC)-CC TAC GGG AGG CAG CAG	<i>rrs</i> Bacteria	193	PCR-DGGE	Muyzer et al. (1993)
<i>mcrA</i> r <i>mcrA</i> f-GC	5'-TTC ATT GCR TAG TTW GGR TAG TT 5'-(GC) ₄₀ -GGT GGT GTM GGA TTC ACA CAR TAY GCW ACA GC	<i>mcrA</i> Methanogens	460–490	PCR-DGGE	Luton et al. (2002)
<i>qmcrA</i> -R <i>qmcrA</i> -F	5'-GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC 5'-TTCGGTGGATCDCARAGRGC	<i>mcrA</i> Methanogens	140	qPCR	Denman et al. (2007)
799R2 520F	5'-AACAGGATTAGATACCCTG 5'-AGCAGCCCGGTAAT	<i>rrs</i> Bacteria	280	qPCR	Edwards et al. (2007)
FS586-f FS706-r	5'-GTTCCGGAATTACTGGCGTAAA 5'-CGCCTGCCCTGAACTATC	<i>rrs</i> <i>Fibrobacter succinogenes</i>	121	qPCR	Denman and McSweeney (2006)
RF96-f RF220-r	5'-CGAACGGAGATAAATTGAGTTTACTTAGG 5'-CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC	<i>rss</i> <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	132	qPCR	Denman and McSweeney (2006)
RA1281f RA1439r	5'-CCC TAA AAG CAG TCT TAG TTC G 5'-CCT CCT TGC GGT TAG AAC A	<i>rrs</i> <i>Ruminococcus albus</i>	175	qPCR	Koike and Kobayashi (2001)

Table 3

Dry matter (DM) intake and digestibility, and rumen fermentation criteria before feeding in Texel (T) and Blackbelly (B) sheep fed four forages in temperate and tropical site.^a

	Temp H		Temp L		Trop H		Trop L		SEM	P value ^c			
	T	B	T	B	T	B	T	B		Site	Forage	Site x Forage	C3 vsC4
DM intake, g/kg BW ^b													
Temperate site	28.9	21.8	26.3	25.2	16.8	17.0	12.9	15.1	1.87	0.95	<0.001	0.17	<0.001
Tropical site	25.8	22.8	21.9	23.7	14.8	22.8	13.8	18.7					
DM digestibility coefficient													
Temperate site	0.622	0.668	0.554	0.564	0.618	0.625	0.476	0.514	0.0209	0.004	<0.001	0.02	0.27
Tropical site	0.637	0.652	0.542	0.576	0.666	0.662	0.604	0.555					
pH													
Temperate site	6.45	6.38	6.33	6.40	6.53	6.46	6.52	6.37	0.107	0.22	0.73	0.26	0.56
Tropical site	6.62	6.64	6.56	6.48	6.40	6.44	6.39	6.50					
VFA ^b , mmol/L													
Temperate site	92.7	90.5	87.5	91.0	73.1	73.8	93.0	94.4	6.72	0.79	0.02	0.30	0.05
Tropical site	81.3	83.1	78.6	95.5	75.3	89.9	85.9	98.9					
Acetate, mmol/mol													
Temperate site	711	717	751	754	722	718	711	696	12.5	0.02	<0.001	0.02	0.002
Tropical site	743	748	734	734	747	741	723	716					
Propionate, mmol/mol													
Temperate site	192	177	174	173	185	187	200	187	8.8	0.02	0.07	0.16	0.11
Tropical site	163	173	179	178	158	170	185	187					
Butyrate, mmol/mol													
Temperate site	76	80	60	60	79	83	101	97	8.0	0.13	0.002	0.08	0.01
Tropical site	75	69	68	69	74	75	75	79					
Minor VFA ^b , mmol/mol													
Temperate site	20	25	13	11	14	12	16	20	3.10	0.65	0.30	0.01	0.06
Tropical site	19	10	19	19	20	14	17	18					
Acetate:Propionate													
Temperate site	3.72	4.06	4.35	4.37	3.94	3.86	3.43	3.73	0.260	0.007	0.02	0.10	0.03
Tropical site	4.58	4.42	4.24	4.18	4.78	4.40	3.96	3.85					
Ammonia, mmol/L													
Temperate site	4.56	8.12	6.17	8.42	3.89	4.17	4.43	6.41	1.590	0.30	0.28	0.36	0.69
Tropical site	6.69	5.28	8.49	6.59	7.95	5.99	8.11	5.83					

^a Temp H=temperate forage, high quality, Temp L=temperate forage, low quality, Trop H=tropical forage, high quality, Trop L=tropical forage, low quality.

^b BW: body weight. VFA: volatile fatty acids. Minor VFA are the sum of isobutyrate, valerate, isovalerate and caproate.

^c Breed effect, breed x site and breed x forage interactions were not significant for all measured parameters.

2.5. Statistical analysis

To determine effects of site, breed and forage on feed intake, digestibility, pH, VFA concentration and composition, NH₃ concentration, protozoa numbers, gene copy numbers and diversity indices, data underwent analysis of variance using PROC MIXED (SAS, 2008). The model included site ($n=2$), forage ($n=4$), breed ($n=2$), interactions between forage and site, forage and breed and breed and site as fixed effects and animal nested within breed as random effect. Differences between C3 and C4 forages were also analyzed using orthogonal contrasts. Effects were declared significant at $P<0.05$. Linear regressions were established between CH₄ emission per kg DM and the different populations of microbes.

3. Results

3.1. Feed intake, digestibility and ruminal fermentation characteristics

Dry matter intake expressed in g/kg BW did not vary between sites and was higher for C3 forages than for C4 forages. Dry matter digestibility differed between sites, and a site x forage interaction was observed, digestibility being higher in tropical site than in temperate site only for C4 forages. Dry matter digestibility differed between forages, but this difference was due to forage quality within C3 and within C4 forages, but did not vary between C3 and C4 forages. No effect of breed was observed on feed intake and digestibility. Ruminal pH and NH₃ concentration did not vary between sites, breeds or forages, and interactions were not significant before (Table 3) or after feeding (Table S1). Total VFA molar concentration before feeding did not vary with site, but was higher with temperate forages than with tropical forages ($P<0.05$). After feeding, VFA concentration was higher in the temperate site than in the tropical site ($P<0.05$), and the difference between temperate and tropical forages remained. Before and after feeding, the proportion of acetate was higher for tropical forage in the temperate site and lower for temperate forage in the tropical site, and the proportion of propionate and butyrate was higher for sheep fed tropical forage in the temperate site and lower for tropical forage in the temperate site (Table 3 and Table S1). The acetate:propionate ratio was higher for C4 forages in the tropical site, particularly for H forage with an

Table 4
Protozoal population in Texel (T) and Blackbelly (B) sheep fed four forages in temperate and tropical site.^a

	Temp H		Temp L		Trop H		Trop L		SEM	P value ^c			
	T	B	T	B	T	B	T	B		Site	Forage	Site x Forage	C3 vs C4
Total, log ₁₀ cells/mL													
Temperate site	6.21	6.26	6.13	6.23	6.16	5.97	6.37	6.36	0.109	0.41	0.62	0.01	0.50
Tropical site	6.46	5.95	6.34	6.16	6.46	6.35	6.31	6.13					
Isotricha, log ₁₀ cells/mL													
Temperate site	5.16	4.69	2.68	2.74	4.35	3.46	5.27	3.92	0.970	0.77	0.16	0.41	0.11
Tropical site	4.11	3.03	4.25	2.48	4.70	4.00	5.23	3.16					
Dasytricha, log ₁₀ cells/mL													
Temperate site	5.59	5.25	5.08	3.53	5.56	5.44	5.94	5.49	0.475	0.35	0.05	0.14	0.52
Tropical site	4.82	4.37	5.33	4.54	5.43	5.46	4.70	5.43					
Large Entodiniomorphs ^b , log ₁₀ cells/mL													
Temperate site	5.85	6.02	6.00	6.16	5.85	5.65	5.87	6.19	0.138	0.14	0.67	0.41	0.30
Tropical site	6.31	5.76	6.12	6.02	6.34	6.21	6.15	5.68					
Small Entodiniomorphs ^b , log ₁₀ cells/mL													
Temperate site	5.47	5.34	5.04	5.05	5.04	4.87	5.54	5.35	0.085	0.01	<0.001	<0.001	<0.001
Tropical site	5.01	4.97	5.27	5.08	5.04	5.01	5.17	5.17					

^a Temp H = temperate forage, high quality; Temp L = temperate forage, low quality; Trop H = tropical forage, high quality, Trop L = tropical forage, low quality.

^b Large Entodiniomorphs: >100 μm, Small Entodiniomorphs: <100 μm.

^c Breed effect, breed x site and breed x forage interactions were not significant for all measured parameters.

Table 5
Quantification of rumen bacteria and methanogens in Texel (T) and Blackbelly (B) sheep fed four forages in temperate and tropical site.^a

	Temp H		Temp L		Trop H		Trop L		SEM	P value ^b			
	T	B	T	B	T	B	T	B		Site	Forage	Site x Forage	C3 vs C4
Total bacteria, log ₁₀ rrs copy number/g DM													
Temperate site	11.14	11.64	11.41	11.46	11.47	11.49	11.17	11.26	0.089	<0.001	0.03	0.001	0.14
Tropical site	11.59	11.51	11.80	11.61	11.74	11.71	11.65	11.62					
<i>Fibrobacter succinogenes</i> , log ₁₀ rrs copy number/g DM													
Temperate site	9.78	9.67	9.59	9.57	9.54	9.60	9.30	9.42	0.143	<0.001	0.12	0.13	0.11
Tropical site	9.00	9.06	9.41	9.23	9.27	9.13	9.03	9.10					
<i>Ruminococcus albus</i> , log ₁₀ rrs copy number/g DM													
Temperate site	8.76	8.76	7.43	8.19	7.81	8.33	7.67	7.86	0.302	0.99	0.40	<0.001	0.92
Tropical site	7.62	7.57	8.48	8.07	8.47	8.45	8.17	8.00					
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> , log ₁₀ rrs copy number/g DM													
Temperate site	8.78	8.57	8.57	8.47	8.50	8.64	8.23	8.19	0.185	0.30	0.10	0.39	0.22
Tropical site	8.63	8.48	8.77	8.58	8.68	8.72	8.49	8.54					
Total methanogens, log ₁₀ mcrA copy number/g DM													
Temperate site	8.93	8.92	8.80	8.91	8.89	8.83	8.65	8.71	0.072	<0.001	0.03	0.01	0.30
Tropical site	9.22	8.93	9.31	9.20	9.26	9.24	9.09	9.23					

^a Temp H = temperate forage, high quality; Temp L = temperate forage, low quality; Trop H = tropical forage, high quality, Trop L = tropical forage, low quality.

^b Breed effect, breed x site and breed x forage interactions were not significant for all measured parameters.

interaction site × forage after feeding (Table S1). No effect of breed was shown for VFA concentration or pattern, except for total VFA molar concentration after feeding, where a breed × site interaction ($P < 0.05$) was found.

3.2. Ruminal microbiota

Protozoa numbers did not vary among sites, forages or breeds, but a site × forage interaction was observed: protozoa population was higher for C3 forage in the temperate site, and for C4 forage in the tropical site (Table 4). Small entodiniomorphs (<100 μm) were more abundant in the temperate site and in sheep fed C3 than in those fed C4 ($P < 0.05$). Large entodiniomorphs (>100 μm), *Dasytricha* and *Isotricha* were not different between sites, forages or breeds.

Results of qPCR quantification of the bacterial *rrs* and methanogen *mcrA* gene copies are summarized in Table 5. The concentration of bacterial *rrs* copies was higher in the tropical site ($P < 0.05$) and for H forages. The concentration of *F. succinogenes* *rrs* gene copies was higher in the temperate site ($P < 0.05$). The concentration of *R. albus* was influenced by neither site nor forage, but a forage × site interaction was observed: higher *rrs* copies were detected in the temperate site for C3 forages, whereas in the tropical site higher *rrs* copies were observed for C4 forages. There was no difference in *R. flavefaciens* numbers between sites, breeds or forages.

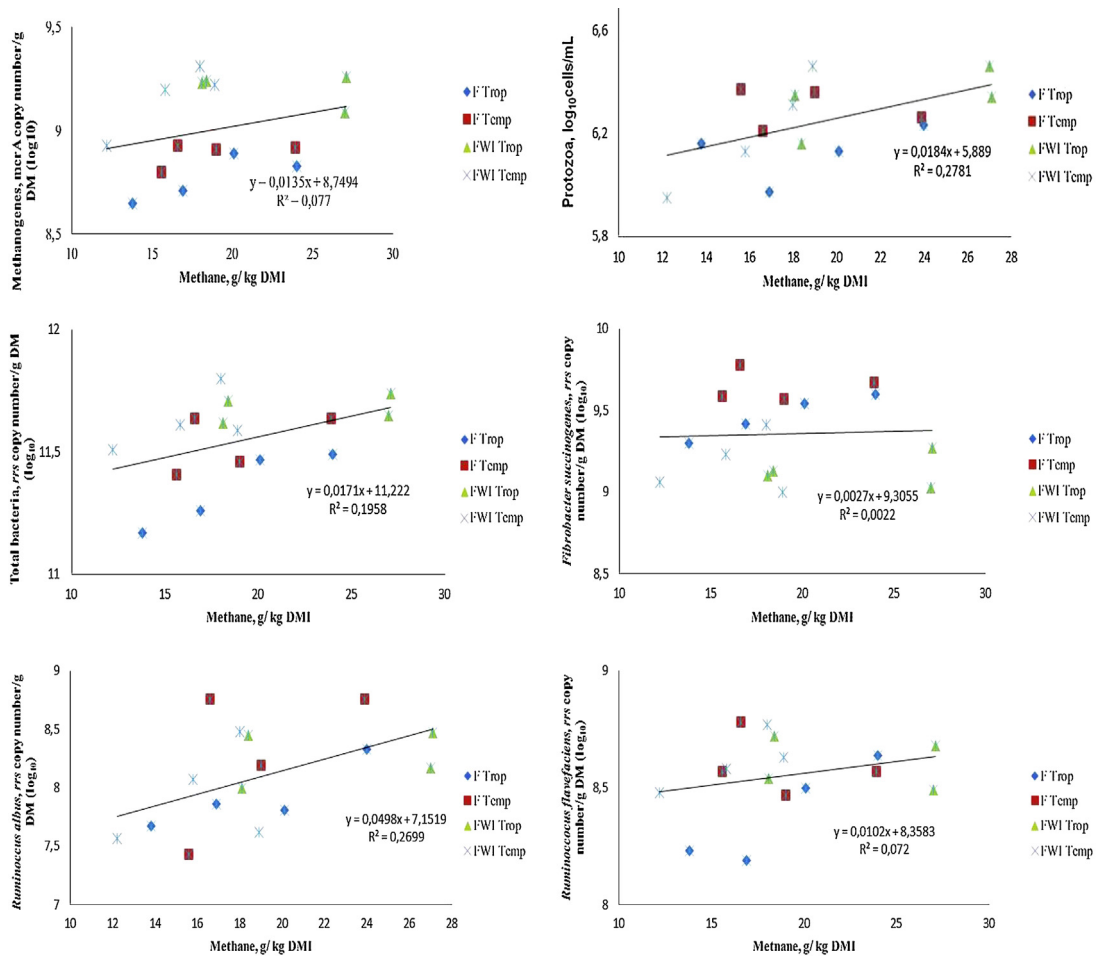


Fig. 1. Relationship between rumen microbes and methane enteric emission according to site (temperate (France, F) vs tropical (French West Indies, FWI)) and origin of forages (Temperate C3 (Temp) vs Tropical C4 (Trop)): high quality and low quality forage fed to Texel and Blackbelly. Each point is the mean of 4 individual values.

Methanogen concentration expressed as *mcrA* gene copy number in rumen contents was higher in the tropical site. Effects of forage and interaction between site and forage were observed: methanogen concentrations were higher in sheep fed C4 forages in the tropical site and in sheep fed C3 forages in the temperate site (Table 5).

DGGE analysis showed no difference within bacterial community structure and methanogenic community structure, and clustering patterns did not differ substantially among individual sheep (data not shown). Diversity indices were calculated from the *rrs* DNA PCR-DGGE profiles. Shannon, dominance and evenness indices did not vary between sites or breeds (Table S2). However, a tendential site \times breed interaction was observed for the Shannon index in *rrs* DNA PCR-DGGE profiles ($P = 0.055$). There was no difference between breed forages in either the number of bands or the values of diversity indices for the *rrs* DNA PCR-DGGE profiles (data not shown).

3.3. Relationships between microbial populations and methane production

Fig. 1 presents relationships between microbial abundances and CH₄ production according to site, breed and forages (mean of 4 animals for each combination). Significant and positive relationships were found between protozoa population and CH₄ production ($r = 0.53$, $P < 0.05$), and between *R. albus* and CH₄ production ($r = 0.52$, $P < 0.05$) (Fig. 1). No relationship was found between total bacteria, *R. flavefaciens*, *F. succinogenes* and CH₄ production ($r = 0.44$, 0.27 and 0.05 , respectively, $P > 0.05$). Higher CH₄ production was associated with higher methanogens numbers but the relationship was non-significant ($r = 0.28$, $P > 0.05$). Although some relationships were significant, coefficients of determination (R^2) were low.

4. Discussion

Factors other than animal and feed characteristics are known to affect rumen digestion including, among other factors, climatic conditions (Decruyenaere et al., 2009). Digestion and CH₄ production by ruminants differ between temperate and tropical conditions. However, as trials are usually carried out using feedstuffs harvested on site and a single, locally adapted breed (Archimède et al., 2011) it has not been possible to assess the relative importance of these factors. To our knowledge, our study is the first to simultaneously compare in a temperate and in a tropical environment, a temperate and a tropical sheep breed fed the same diet, allowing a finer interpretation of alleged differences between temperate and tropical sites in CH₄ production, rumen fermentation, and microbial ecosystem. Results on intake and digestibility will be thoroughly discussed in a second paper (Archimède et al., unpublished) and are briefly discussed in this manuscript.

4.1. Effect of environment on digestive processes

Intake per kg BW was not affected by site. The temperature in the tropical site was certainly not high enough to affect intake as suggested by the review of Morand-Fehr and Doreau (2001). The higher digestibility observed in the tropical site is in accordance with the review of Morand-Fehr and Doreau (2001) for a wide range of temperatures, for a same intake. Independently of diet and animal type, there is limited experimental evidence to explain differences in rumen fermentation and methanogenesis between temperate and tropical sites. Such differences can result from differences in temperature or hygrometry. In this study, no difference in VFA concentration between sites was observed before feeding, but after feeding, the concentration was lower for the tropical site than for the temperate site. This may be explained by the difference in temperature, as it was reported by Kelley et al. (1967) in cows fed a constant diet at different controlled temperatures, and by Martz et al. (1990) in cows fed forage diets with moderate differences in intake. Another explanation could be the dilution of VFA in the rumen due to higher water consumption (Silanikove, 1992). However, in this experiment, rumen water content was 87.7% on average and was similar between sites, which does not support this hypothesis.

In contrast to our results, increase in total rumen VFA content and a decrease in pH were reported (Kadzere et al., 2002) when ambient temperature increased because VFA were absorbed less efficiently. In the present study, the tropical site had higher acetate proportion than the temperate site before and after feeding; the same tendency was observed for the acetate:propionate ratio. This result is in line with a previous study showing that high ambient temperature was associated with higher proportion of acetate (Kelley et al., 1967). However, this trend is not general, as another trial showed that an increase in temperature did not change VFA pattern in cattle, and increased propionate in sheep (Lippke, 1975).

The observed differences in VFA pattern can be due to differences in microbial communities between temperate and tropical sites, especially as there was no effect of site on daily feed intake, on average 20.5 g DM/kg body weight for both sites (Archimède et al., 2013). The qPCR analysis revealed that total bacteria and methanogen numbers were higher for the tropical site. Change in bacterial numbers may be partially explained by the lower concentration of small endonimorphs in the tropical site, and hence a decreased predatory activity on bacteria. In contrast to our results, a significant change in the composition but not in the concentration of microbial populations at elevated ambient temperature and humidity was reported (Tajima et al., 2007), this shift being accompanied by a decrease in concentration of VFA in the rumen. The targeted cellulolytic bacteria were not affected by site, except for *F. succinogenes*, which was more abundant in the temperate site (Table 5). This bacterium is a major fibre-degrading species in the rumen that does not produce H₂ and is not associated with higher CH₄ production (Chaucheyras-Durand et al., 2010). A higher acetate production is generally linked to higher CH₄ production, but there was no site effect on CH₄ production (Archimède et al., 2013) for this experiment (18.7 and 19.4 g/kg DM intake on average for temperate and tropical sites, respectively). Methane was generally produced in higher quantities when H₂-producing cellulolytic species such as *Ruminococci* were dominant, because of their association with methanogens, which consume H₂ and produce CH₄ (Chaucheyras-Durand et al., 2010; Morgavi et al., 2010) resulting simultaneously in higher production of acetate (Morgavi et al., 2010; Pavlostathis et al., 1990). This is in line with our results where the number of *Ruminococci* was also not affected by any of the factors tested and not correlated with CH₄ production (Fig. 1).

In the present work we found little effect of environmental conditions on rumen fermentation and microbial populations. There are very few data in the literature: a change in rumen diversity and structure of microbiota was observed (Romero-Pérez et al., 2011), suggesting that shifts in microbial populations may have been due to differences in temperature sensitivity among microbial species, but the range of temperature tested by these authors was between -5 °C and -30 °C. The rumen and its contents are thermally stable but a modest change and disturbance within the rumen may occur with changes in ambient temperature. A difference in drinking water temperature can induce a difference in the temporary decrease in rumen temperature after drinking (Bewley et al., 2008). Another hypothesis is that a difference in ambient temperature (9 vs. 26 °C) results in a difference in mean retention time through hormonal changes, which may influence rumen fermentation (Barnett et al., 2015) and thus perhaps microbiota.

4.2. Effect of forage type on digestive processes

To date, studies on tropical forages have largely focused on comparisons of various plant species or physiological stages (Assoumaya, 2007). The higher intake of temperate forages compared to tropical ones was independent of site confirming the conclusion of the review of Assoumaya et al. (2007) comparing data on temperate forages carried out in temperate areas

with data on tropical forages carried out in tropical areas. In the present experiment, it was observed a logical reduction in digestibility with poor quality forages but also a noticeable improvement in digestibility of lower quality C4 forages in the tropical site. In C4 forages, digestibility between high and low quality hay is severely reduced compared to C3 and animals on the tropical site seem better adapted to extract nutrients from this poor quality feed resource. The current study shows that grass physiological type (temperate C3 vs tropical C4) had more influence on rumen fermentation than site. Differences between forages in VFA concentration and pattern could be explained by their quality: nature and content of fibre and amount of lignin. In the present study, poor quality forages (H vs L) result in a lower VFA concentration and in a higher acetate:propionate ratio, independently of the site. This confirms literature data on tropical forages: a decrease in propionate relative to total VFA, while acetate increased with advancing maturity of the C4 grass *Panicum maximum* was observed (Assoumaya, 2007; Relling et al., 2001). There is no direct comparison between C3 and C4 grasses in the literature, so that it is difficult to know whether differences between C3 and C4 forages observed in this study derived from the chemical composition, such as the higher content of secondary metabolites of *Dichanthium annulatum* (Awad et al., 2015) present in the mixture of *Dichanthium* in this study. In a meta-analysis (Assoumaya et al., 2007), ruminal OM digestion, which is related to VFA production, was similar between tropical and temperate forages for the same fibre content, suggesting that chemical composition plays a major role in the differences found between tropical and temperate forages. In our experiment, butyrate proportion was higher for L than for H forages, and higher after feeding for temperate than for tropical forages. This suggests that butyrate production is not directly related to chemical composition. Butyrate is generally associated with protozoa (Eugène et al., 2004), but in our study there was no effect of forage type on numbers of protozoa, bacteria or methanogens. However, a significant site × forage interaction between temperate and tropical was found for total bacteria, *R. albus*, methanogens and protozoa. This shows that these populations were highest with tropical forages in the tropical site, suggesting that degradation of poor quality C4 forages characteristic of the tropics requires a denser microbial community. Forage type (C3 vs C4) had no effect on the population numbers of total or cellulolytic bacteria and methanogens, whereas a global effect of forage is shown for both total bacteria and methanogens. This suggests an effect of quality, i.e. nutritive value of forages, on these populations. By contrast, a strong variation in ruminal bacteria of young steers fed either a C3 or a C4 grass was reported (Pitta et al., 2010).

No difference in methanogen *mcrA* copy number was detected among forages, although we expected to find more methanogens with tropical forages, because in this trial they generated more CH₄ than temperate forages: 17.5 and 20.7 g/kg DM intake on average for C3 temperate forages and C4 tropical forages, respectively (Archimède et al., 2013). These results are in line with previous results (Danielsson et al., 2012; Zhou et al., 2011) who reported that CH₄ production was not related to total methanogen population. Methane production could be related to methanogen activity rather than their abundance (Popova et al., 2011).

4.3. Effect of breed on digestive processes

There is little information available on the extent to which rumen fermentation and microbes vary between sheep breeds. In our experiment two contrasting sheep breeds were chosen: one of temperate origin and the other of tropical origin. Overall, rumen fermentation and microbes were not affected by breed for any of the variables measured. The absence of change in ruminal VFA concentration between genotypes agrees with a previous comparison of two sheep breeds: a local one and an improved one (Ile-de-France and Churra-da-Terra-Quente) fed the same diet (Lourenço et al., 2013). Very few studies have compared more widely-contrasting breeds. A comparison between local *Bos taurus* breed and a *Bos indicus* breed in a tropical environment showed no differences in digestive processes (Grimaud and Doreau, 2003). Differences in digestion between breeds may differ more for poor quality feeds, for which local breeds should be better adapted than improved breeds (Lopez et al., 2001). However, breed × forage interaction was not significant in our study, and the absence of breed effect might be due to the adaptation of ruminal microbiota for both Texel and Blackbelly to the environment where the experiment took place, since they were born and raised close to each experimental site. The establishment of the rumen microbiota is influenced by nutritional and/or environmental exposure in young animals after birth. Consequently, induced variations in microbial populations colonizing the rumen can lead to modifications in fermentation and CH₄ production (Abecia et al., 2013). The adaptation of Texel and Blackbelly microbiota to the temperate vs tropical environment may have reduced differences between breeds. In addition, climate conditions during this trial were not extreme enough to favor distinct adaptive and behavioral responses between breeds. Unfortunately, the origin and history of experimental animals is not specified in most studies. At the microbial level, qPCR analysis did not reveal any difference between Texel and Blackbelly. These results corroborate previous studies showing that methanogens, bacteria and protozoa population were not significantly different between two cattle breeds (Rooke et al., 2014). In contrast to this study, some authors have shown the impact of breed on potential CH₄ production and rumen microbiota and suggest that the host animal exerts a controlling effect on its own gut microbiota (Danielsson et al., 2012; King et al., 2011).

Differences in microbial populations were predominantly attributable to diet, with the host being less influential. In addition to feed composition effects, the environment appears to influence the establishment and development of the rumen microbiota, leading the host to adapt so as to regulate the influence of diet and environment.

5. Conclusion

This study shows that the differences observed in the rumen microbiota of sheep between tropical and temperate sites were intrinsic to the location and could not be attributed to local forages (temperate C3 vs tropical C4) or breeds. Total bacteria and methanogens were more abundant in the tropical site. This study also shows the adaptation capacity of each breed to its environment, suggested by the site × breed interaction. Future work should characterize the microbiota using high-throughput sequencing for phylogenetic and metagenomic analysis to gain a better understanding of the influence of the environment in shaping rumen populations.

Conflict of interest

The authors declare that there are not conflicts of interest.

Acknowledgments

This work has been granted by the French National Agency for Research (ANR) (EPAD project ANR-09-STRA-01), by Region Guadeloupe and other European funding: FEOGA, FEDER, FSE. We thank the staff of UE 1414 Herbipôle, INRA (France), especially Sébastien Alcouffe, André Guittard and Denis Roux, the staff of UE1284 PTEA, INRA (Guadeloupe) especially Fred Periacarpin for animal sampling, and Dominique Graviou for help in microbial analyses.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeeds.2016.08.010>.

References

- Abecia, L., Martín-García, A.I., Martínez, G., Newbold, C.J., Yáñez-Ruiz, D.R., 2013. Nutritional intervention in early life to manipulate rumen microbial colonization and methane output by kid goats postweaning. *J. Anim. Sci.* 91, 4832–4840.
- Archimède, H., Eugène, M., Marie-Magdeleine, C., Boval, M., Martin, C., Morgavi, D.P., Lecomte, P., Doreau, M., 2011. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166, 59–64.
- Archimède, H., Rira, M., Eugène, M., Morgavi, D.P., Anaïs, C., Periacarpin, F., Calif, B., Martin, C., Marie-Magdeleine, C., Doreau, M., 2013. Intake, total-tract digestibility and methane emission of Texel and Blackbelly sheep fed C4 and C3 grasses tested simultaneously in a temperate and a tropical area. *Adv. Anim. Biosci.* 4, 285.
- Assoumaya, C., Sauvart, D., Archimède, H., 2007. Etude comparative de l'ingestion et de la digestion des fourrages tropicaux et tempérés. *INRA Prod. Anim.* 20, 383–392.
- Assoumaya, C., 2007. Etude Des Facteurs Limitant l'ingestion Chez Les Petits Ruminants Valorisant Des Fourrages Tropicaux. PhD Thesis, Agro. Paris Tech., Paris, France, 298 pp.
- Awad, M.M., Ragab, E.A., Atef, A., 2015. Phytochemical investigation and biological evaluation of *Dichanthium annulatum* (Forssk.). *J. Sci. Innov. Res.* 4, 131–137.
- Barnett, M.C., McFarlane, J.R., Hegarty, R.S., 2015. Low ambient temperature elevates plasma triiodothyronine concentrations while reducing digesta mean retention time and methane yield in sheep. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 99, 483–491.
- Bewley, J.M., Grott, M.W., Einstein, M.E., Schutz, M.M., 2008. Impact of intake water temperatures on reticular temperatures of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91, 3880–38837.
- Chaucheyras-Durand, F., Masséglia, S., Fonty, G., Forano, E., 2010. Influence of the composition of the cellulolytic flora on the development of hydrogenotrophic microorganisms, hydrogen utilization, and methane production in the rumens of gnotobiotically reared lambs. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7931–7937.
- Danielsson, R., Schnürer, R., Arthurson, V., Bertilsson, J., 2012. Methanogenic population and CH₄ production in Swedish dairy cows fed different levels of forage. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6172–6179.
- Decruyenaere, V., Buldgen, A., Stilmant, D., 2009. Factors affecting intake by grazing ruminants and related quantification methods: a review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13, 559–573.
- Denman, S.E., McSweeney, C.S., 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58, 572–582.
- Denman, S.E., Tomkins, N.W., McSweeney, C.S., 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 313–322.
- Edwards, J.E., Huws, S.A., Kim, E.J., Kingston-Smith, A.H., 2007. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 323–335.
- Eugène, M., Archimède, H., Michalet-Doreau, B., Fonty, G., 2004. Effects of defaunation on microbial activities in the rumen of rams consuming a mixed diet (fresh *Digitaria decumbens* grass and concentrate). *Anim. Res.* 53, 187–200.
- European Commission, 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Off. J. Europ. Union*, L 276/33–L 276–79. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=EN> (accessed 12.06.16).
- Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Faluccci, A., Tempio, G., 2013. Tackling Climate Change Through Livestock – A Global Assessment of Emissions and Mitigation Opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy.
- Grimaud, P., Doreau, M., 2003. Effects of level of intake and nitrogen supplementation on digestion by cows in a tropical environment. *Anim. Res.* 52, 103–118.
- Heip, C.H.R., Herman, P.M.J., Soetaert, K., 1998. Indices of diversity and evenness. *Océanis* 24, 61–87.
- Hristov, A.N., Oh, J., Firkins, J.L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H.P.S., Adesogan, A.T., Yang, W., Lee, C., 2013. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *J. Anim. Sci.* 91, 5045–5069.
- Kadzere, C.T., Murphy, M.R., Silanikove, N., Maltz, E., 2002. Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livest. Prod. Sci.* 77, 59–91.

- Kelley, R.O., Martz, F.A., Johnson, H.D., 1967. Effect of environmental temperature on ruminal volatile fatty acid levels with controlled feed intake. *J. Dairy Sci.* 50, 531–533.
- King, E.E., Smith, R.P., St-Pierre, B., Wright, A.D.G., 2011. Differences in the rumen methanogen populations of lactating Jersey and Holstein dairy cows under the same diet regimen. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5682–5687.
- Koike, S., Kobayashi, Y., 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 361–366.
- Lippke, H., 1975. Digestibility and volatile fatty acids in steers and wethers at 21 and 32 °C ambient temperature. *J. Dairy Sci.* 58, 1860–1864.
- Lopez, S., Frutos, P., Mantecon, A.R., Giraldez, F.J., 2001. Comparative digestion of herbage by two breeds of sheep: effects of grass maturity stage and level of intake. *Anim. Sci.* 73, 513–522.
- Lourenço, A.L., Cone, J.W., Fontes, P., Dias-da-Silva, A.A., 2013. Effects of sheep breed and soybean meal supplementation on rumen environment and degradation kinetics. *NJAS Wagen. J. Life Sci.* 64–65, 77–85.
- Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J., Riley, P.W., 2002. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148, 3521–3530.
- Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M., 2010. Methane mitigation in ruminants. From microbes to the farm scale. *Animal* 4, 351–365.
- Martz, F.A., Payne, C.P., Matches, A.G., Belyea, R.L., Warren, W.P., 1990. Forage intake, ruminal dry matter disappearance, and ruminal blood volatile fatty acids for steers in 18 and 32 °C temperatures. *J. Dairy Sci.* 73, 1280–1287.
- Morand-Fehr, P., Doreau, M., 2001. Alimentation des ruminants soumis à un stress de chaleur. *INRA Prod. Anim.* 14, 15–27.
- Morgavi, D., Forano, E., Martin, C., Newbold, C.J., 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* 4, 1024–1036.
- Morgavi, D.P., Martin, C., Boudra, H., 2013. Fungal secondary metabolites from *Monascus* spp. reduce rumen methane production in vitro and in vivo. *J. Anim. Sci.* 91, 848–860.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Ottenstein, D.M., Bartley, D.A., 1971. Improved gas chromatography separation of free acids C2–C5 in dilute solution. *Anal. Chem.* 43, 952–955.
- Pavlostathis, S.G., Miller, T.L., Wolin, M.J., 1990. Cellulose fermentation by continuous cultures of *Ruminococcus albus* and *Methanobrevibacter smithii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 109–116.
- Pitta, D.W., Pinchak, W.E., Dowd, S.E., Osterstock, J., Gontcharova, V., Youn, E., Dorton, K., Yoon, I., Min, B.R., Fulford, J.D., Wickersham, T.A., 2010. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. *Microb. Ecol.* 59, 511–522.
- Popova, M., Martin, C., Eugène, M., Mialon, M.M., Doreau, M., Morgavi, D.P., 2011. Effect of fibre- and starch-rich finishing diets on methanogenic Archaea diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167, 113–121.
- Ranilla, M.J., Jouany, J.P., Morgavi, D.P., 2007. Methane production and substrate degradation by rumen microbial communities containing single protozoal species in vitro. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 675–680.
- Relling, E.A., Van Niekerk, W.A., Coertze, R.J., Rethman, N.F.G., 2001. An evaluation of *Panicum maximum* cv. Gatton. The influence of stage of maturity on diet selection, intake and rumen fermentation in sheep. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 31, 85–92.
- Romero-Pérez, G.A., Ominski, K.H., McAllister, T.A., Krause, D.O., 2011. Effect of environmental factors and influence of rumen and hindgut biogeography on bacterial communities in steers. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 258–268.
- Rooke, J.A., Wallace, R.J., Duthie, C.A., McKain, N., de Souza, S.M., Hyslop, J.J., Ross, D.W., Waterhouse, T., Roehe, R., 2014. Hydrogen and methane emissions from beef cattle and their rumen microbial community vary with diet, time after feeding and genotype. *Br. J. Nutr.* 112, 398–407.
- Statistical Analysis System, 2008. *SAS/STAT 9.2 User's Guide*. SAS Institute, Cary, NC.
- Sadet, S., Martin, C., Meunier, B., Morgavi, D.P., 2007. PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal* 1, 939–944.
- Silanikove, N., 1992. Effects of water scarcity and hot environment on appetite and digestion in ruminants: a review. *Livest. Prod. Sci.* 30, 175–1794.
- Tajima, K., Nonaka, I., Higuchi, K., Takusari, N., Kurihara, M., Takenaka, A., Mitsumori, M., Kajikawa, H., Aminov, R.I., 2007. Influence of high temperature and humidity on rumen bacterial diversity in Holstein heifers. *Anaerobe* 13, 57–64.
- Weatherburn, M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39, 971–974.
- Yu, Z., Morrison, M., 2004. Improved extraction of PCR quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* 36, 808–813.
- Zhou, M., Chung, Y.H., Beauchemin, K.A., Holtshausen, L., Oba, M., McAllister, T.A., Guan, L.L., 2011. Relationship between rumen methanogens and methane production in dairy cows fed diets supplemented with a feed enzyme additive. *J. Appl. Microbiol.* 111, 1148–1158.

Table S1Rumen fermentation criteria 3 hours after feeding in Texel (T) and Blackbelly (B) sheep fed four forages in temperate and tropical site¹

	Temp H		Temp L		Trop H		Trop L		SEM	P value ³			
	T	B	T	B	T	B	T	B		Site	Forage	Site x Forage	C3 vs C4
pH													
Temperate site	6.19	6.39	6.35	6.33	6.24	6.53	6.43	6.48	0.106	0.33	0.89	0.47	0.64
Tropical site	6.43	6.62	6.28	6.48	6.45	6.38	6.42	6.40					
VFA ² , mmol/L													
Temperate site	111.9	95.9	102.8	109.0	95.4	84.7	77.1	70.5	6.18	0.002	<0.001	0.02	<0.001
Tropical site	82.3	81.0	82.4	97.4	78.7	88.0	71.8	84.6					
Acetate, mmol/mol													
Temperate site	677	702	634	667	747	755	708	712	16.3	0.03	<0.001	<0.001	<0.001
Tropical site	742	740	694	691	705	713	737	726					
Propionate, mmol/mol													
Temperate site	223	196	240	214	175	170	189	192	11.4	0.01	<0.001	0.01	0.01
Tropical site	163	171	211	203	205	190	166	173					
Butyrate, mmol/mol													
Temperate site	78	80	110	100	64	63	91	86	10.2	0.59	0.01	0.17	0.09
Tropical site	79	79	79	93	74	79	82	86					
Minor VFA ² , mmol/mol													
Temperate site	23	22	13	19	13	12	13	10	2.8	0.46	0.18	0.002	0.08
Tropical site	15	10	15	14	16	18	15	14					
Acetate:Propionate													
Temperate site	3.04	3.63	2.69	3.19	4.30	4.47	3.77	3.76	0.301	0.01	<0.001	0.01	0.01
Tropical site	4.58	4.40	3.33	3.43	3.60	3.85	4.51	4.26					
Ammonia, mmol/L													
Temperate site	7.17	6.83	4.05	5.16	5.93	9.87	4.79	5.89	1.879	0.65	0.18	0.93	0.66
Tropical site	6.76	7.68	5.57	6.49	7.96	7.42	4.81	6.40					

¹ Temp H = temperate forage, high quality, Temp L = temperate forage, low quality, Trop H = tropical forage, high quality, Trop L = tropical forage, low quality.² VFA: volatile fatty acids. Minor VFA are the sum of isobutyrate, valerate, isovalerate and caproate.³ Breed x site was only significant for VFA; Breed effect and breed x forage interactions were not significant for all measured parameters.

Table S2Rumen microbial diversity observed in Texel (T) and Blackbelly (B) sheep fed four forages in temperate and tropical site¹

	Temp H		Temp L		Trop H		Trop L		SEM	<i>P</i> value ²			
	T	B	T	B	T	B	T	B		Site	Forage	Site x Forage	C3 vs C4
Dominance													
Temperate site	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.01	0.84	0.73	0.88	0.46
Tropical site	0.04	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04					
Shannon													
Temperate site	1.53	1.50	1.50	1.54	1.52	1.43	1.49	1.52	0.10	0.17	0.95	0.71	0.72
Tropical site	1.50	1.26	1.54	1.31	1.59	1.40	1.53	1.35					
Evenness													
Temperate site	0.95	0.93	0.96	0.94	0.96	0.90	0.96	0.93	0.06	0.30	0.91	0.75	0.68
Tropical site	0.95	0.83	0.94	0.86	0.96	0.94	0.94	0.90					

¹Temp H = temperate forage, high quality, Temp L = temperate forage, low quality, Trop H = tropical forage, high quality, Trop L = tropical forage, low quality.²Breed effect, breed x site and breed x forage interactions were not significant for all measured parameters.

**Chapitre 3 : Effet de l'apport de ressources riches en
tanins condensés sur la digestion et l'émission de
méthane par des moutons consommant une
graminée tropicale**

Présentation des expérimentations

Comme indiqué dans le chapitre Etat de l'art, la présence de tanins condensés dans les plantes entraîne une réduction de la production de CH₄ par les ruminants mais présente l'inconvénient de réduire fréquemment la digestibilité du fourrage. Toutefois, l'amplitude de leur action est mal connue. Nous avons voulu étudier simultanément les effets du niveau d'apport et de la source de tanins sur la production de CH₄, et expliquer les variations de CH₄ par les variations de la digestibilité de la ration et des différentes composantes de l'écosystème microbien. Pour cela, nous avons mené un essai *in vitro* dans le centre INRA Auvergne-Rhône-Alpes (UMRH Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle), responsable de l'expérimentation M. Doreau, et un essai *in vivo* dans le centre Antilles-Guyane (URZ 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe), responsable de l'expérimentation H. Archimède. Les deux essais étaient complémentaires, et ont été réalisés en concertation étroite.

Quatre fourrages riches en tanins ont été récoltées en Guadeloupe : feuilles de deux légumineuses arbustives (*Leucaena leucocephala*, *Glyricidia sepium*, et d'un sous-produit de culture, le manioc *Manihot esculenta*. L'essai *in vivo* a été réalisé en Guadeloupe selon deux carrés latins 4x4 un avec des moutons d'un génotype tropical, le Blackbelly, et un avec des moutons d'un génotype tempéré, le Texel. Les quatre traitements étaient un régime témoin composé d'un foin de prairie naturelle tropicale (*Dichanthium. spp*) et trois régimes comprenant ce même foin et 44% de plantes riches en tanins. Les mesures ont été l'ingestion, la digestibilité des constituants de la ration, le bilan azoté, la production de CH₄ (méthode du SF₆), la population de protozoaires (comptage), la diversité des bactéries et des méthanogènes par la méthode DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), et l'abondance des bactéries totales et cellulolytiques, et des méthanogènes par PCR quantitative. L'essai *in vitro*, réalisé à Theix, a utilisé les quatre mêmes fourrages. Les substrats ont été incubés pendant 24 h (en système batch) avec du liquide de rumen de 4 moutons Texel alimentés avec un fourrage tropical, dans différentes proportions entre le fourrage témoin et les 3 fourrages riches en tanins afin d'établir des courbes doses-réponse. Les mesures ont été la production de gaz totaux et de CH₄, ainsi que la production d'AGV et la concentration en ammoniac en 24 h d'incubation.

Dans l'essai *in vivo*, les mesures d'ingestion, de digestibilité et de bilan azoté ont été faites en Guadeloupe. La production de CH₄, les concentrations du liquide du rumen en acides gras volatils et en ammoniac et toutes les mesures de l'écosystème microbien ont été réalisées à Theix. Les mesures de l'essai *in vitro* ont été entièrement réalisées à Theix.

L'analyse chimique des tanins a été réalisée par la méthode vanilline-H₂SO₄ en Guadeloupe, mais des standards ont été purifiés pour chacune des 3 plantes riches en tanins à Theix.

Une des originalités de cette expérimentation a été la distribution des plantes riches en tanins sous forme de granulés dans l'essai *in vivo*. Ce choix a été motivé par la nécessité de bien contrôler les proportions entre le fourrage témoin et les fourrages riches en tanins. Il se double d'un intérêt pratique, car la distribution de suppléments riches en tanins sous une forme peu encombrante est une option pour leur utilisation sur le terrain. Cette forme d'administration permet de contourner le problème d'astringence posé par les tanins. Dans un essai préalable, il a été étudié la possibilité de transformer les feuillages riches en tanins en granulé et vérifier que les tannins ne sont pas détruits ou modifiés. Comme dans la première expérimentation, l'analyse de la production de CH₄ a nécessité le voyage des tubes de collectes vides d'Auvergne en Guadeloupe, et pleins de Guadeloupe en Auvergne.

Les résultats de ce travail ont été valorisés sous forme de deux publications, une par expérimentation. La première (publication 3) a concerné les données globales (ingestion, digestibilité, bilan azoté, CH₄) de l'essai *in vivo* (Archimède et al., 2016), la seconde (publication 4) a regroupé les résultats de l'essai *in vitro* (CH₄, paramètres fermentaires) et les données concernant le rumen (paramètres fermentaires, écosystème microbien) de l'essai *in vivo* (Rira et al., 2015).

Publication 3

Potential of tannin-rich plants, *Leucaena Leucocephala*, *Glyricidia sepium* and *Manihot esculenta*, to reduce enteric methane emissions in sheep.

**Archimède H., Rira M., Barde D.J., Labirin F., Marie-Magdeleine C., Calif B.,
Periacarpin F., Fleury J., Rochette Y., Morgavi D.P., Doreau M.**

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2016, 100, 1149-1158

ORIGINAL ARTICLE

Potential of tannin-rich plants, *Leucaena leucocephala*, *Glyricidia sepium* and *Manihot esculenta*, to reduce enteric methane emissions in sheep

H. Archimède¹, M. Rira², D. J. Barde¹, F. Labirin³, C. Marie-Magdeleine¹, B. Calif¹, F. Periacarpin³, J. Fleury³, Y. Rochette², D. P. Morgavi² and M. Doreau²

¹ INRA, UR143, Unité de Recherches Zootechnique, Guadeloupe, French West Indies

² INRA, UMR 1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, Saint-Genès Champanelle, France, and

³ INRA UE1284, Plateforme Tropicale d'Expérimentation sur l'Animal, Guadeloupe, French West Indies

Summary

An *in vivo* trial was conducted in sheep to investigate the effect of three tropical tannin-rich plants (TRP) on methane emission, intake and digestibility. The TRP used were leaves of *Glyricidia sepium*, *Leucaena leucocephala* and *Manihot esculenta* that contained, respectively, 39, 75 and 92 g condensed tannins/kg DM. Methane was determined with the sulphur hexafluoride tracer technique. Eight rumen-cannulated sheep of two breeds (four Texel, four Blackbelly) were used in two 4 × 4 Latin square designs. Four experimental diets were tested. They consisted in a tropical natural grassland hay based on *Dichanthium spp.* fed alone (C) or in association with *G. sepium* (G), *L. leucocephala* (L) or *M. esculenta* (M) given as pellets at 44% of the daily ration. Daily organic matter intake was higher in TRP diets (686, 984, 1054 and 1186 g/day for C, G, L and M respectively; $p < 0.05$) while apparent organic matter total tract digestibility was not affected (69.9%, 62.8%, 65.3% and 64.7% for C, G, L and M respectively; $p > 0.05$). Methane emission was 47.1, 44.9, 33.3 and 33.5 g/kg digestible organic matter intake for C, G, L and M, respectively, and was significantly lower ($p < 0.05$) for L and M than for G and C. Our results confirm the potential of some TRP to reduce methane production. The strong decrease in methane and the increase in intake with TRPs may be due to their presentation as pellets.

Keywords ruminant, rumen, tropical plant, tannin, methane

Correspondence H. Archimède, INRA, UR143, Unité de Recherches Zootechniques, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, French West Indies.
Tel: +590 25 59 41; Fax: +590 25 59 36; E-mail: Harry.Archimede@antilles.inra.fr

Received: 14 June 2015; accepted: 15 September 2015

Introduction

Livestock farming activities account for 14.5% of global greenhouse gas emissions of anthropogenic origin of which 39% are due to enteric methane emission from ruminants (Gerber et al., 2013). In addition to this environmental impact, CH₄ represents a loss of 2–15% of gross energy intake of ruminants (Johnson and Johnson, 1995). Many strategies, including the use of some secondary metabolites of plants, exist to mitigate CH₄ emissions (Beauchemin et al., 2009; Hristov et al., 2013). Among these plant secondary metabolites, tannins are considered as a promising group of natural additives for CH₄ mitigation. Tannins are present in numerous plants in tropical areas. Depending on their chemical structure and concentration in ruminant diet, tannins may have positive or negative effects on animal responses. A decrease in

performances is often the result of a decrease in intake when tannin-rich plants (TRP) are fed. This decrease is often associated with low palatability (Landau et al., 2000) and can be accompanied by a decrease in diet digestibility (Mueller-Harvey, 2006) and with potential toxicity to the animal (Reid, 1995). The higher protein supply of TRPs, associated with a decrease in rumen protein degradation induced by tannins, can result in improved animal performances, except when the intestinal protein digestibility is reduced. In addition, TRP can have a positive effect on health by reducing gastrointestinal nematode load in grazing ruminants (Waghorn, 2008). A meta-analysis by Jayanegara et al. (2012) showed that condensed (CT) and, to a lower extent, hydrolysable (HT) tannins reduce CH₄ emission, but responses are variable. It is still unclear to which extent CH₄ reduction is associated with adverse effects on digestibility and on some

rumen microbes, so it is imperative to account for these factors before using them as CH₄ mitigation agents. The objective of this study was to investigate the effect of three TRP on enteric CH₄ emission, intake and feed digestion. In this experiment, we used pellets made from these plants as an innovative method of TRP administration and a possible way to enhance voluntary intake. Positive effect of pelleting on intake was reported by several authors (Minson and Milford, 1968; Faichney *et al.*, 2004). In the socio-economic context of Guadeloupe, we assume that the granulation is a technology that will amplify the use of foliage. These, harvested and used fresh, require excessive working time. In a companion paper of this work by Rira *et al.* (2015), fermentation and microbial parameters were described.

Materials and methods

Experimental site and diets

The research was carried out in 2013, during the rainy season, at the experimental animal station of the National Agronomic Research Institute (INRA) of the French West Indies (Guadeloupe, latitude 16.16 N, longitude 61.30 W). Temperatures ranged from 21–25 °C (rainy season) to 27–31 °C (dry season). The mean rainfall on the experimental site is 3000 mm/year. Experimental diets consisted in a hay of tropical natural grassland based on *Dichanthium spp.* fed alone or in association with 3 TRP forages given as pellets at 44% of the daily ration on average. Tannin-rich plants were leaves of *Glyricidia sepium*, *L. leucocephala* and *Manihot esculenta*. The hay came from a 75-day regrowth natural grassland grown with irrigation and mineral fertilisation (100 kg of N/ha/year) in Grande-Terre, northeast Guadeloupe. All the hay came from the same harvest. Tannin-rich plants grew on ferrallitic soils without fertilisation. *Glyricidia sepium* and *Leucaena leucocephala* came from 9 to 12 months fallow farmland. *Manihot esculenta* was collected from a 12-month-old plantation. The young branches (stem and leaves), <6 months old, of the three TRP were harvested then sun-dried for 2 days. The leaves with petioles were isolated from the stem and ground (3 mm screen) then pelleted using a GR150E system (Oliotechnology, Burgun, Wissembourg, France). The average size of the pellets was 12 mm long and 3 mm in diameter. Four diets were compared: *Dichanthium spp.*, given alone *ad libitum* as control (C), *Glyricidia sepium*, *Leucaena leucocephala* and *Manihot esculenta* given as a mixture containing *Dichanthium* hay distributed *ad libitum* and 510 g dry matter TRP (G, L and M diets respectively).

Animals and design

Two sheep breeds were used in two 4 × 4 Latin square designs, Texel (T, *n* = 4) of temperate origin and Blackbelly (BB, *n* = 4) of tropical origin. Rams from both breeds were born in French West Indies. All rams were 2 years old and were reared following European Union recommendations for animal welfare in accordance with the regulations of the Animal Care Committee of INRA. Their body weight was 40.2 ± 3.9 kg for Texel sheep and 51.2 ± 3.7 kg for Blackbelly rams, and each of them was fitted with a rumen cannula. Each period lasted 28 days with 21 days of adaptation to diets and to equipment for gas collection followed by 7 days of measurements of feed intake, total tract digestibility and CH₄ emission. Fermentation and some microbial parameters were also measured at the end of each period, and results were published by Rira *et al.* (2015). Rams were tied in stalls throughout the experiment and had free access to water and salt block. The blocks' composition was (g/kg): Ca (60.0), P (20.0), Mg (10.0), Na (280.0), Zn (17.5), Mn (5.5), Fe (1.5), I (0.03), Co (0.03) and Se (0.01). During the period 4, one Blackbelly ram refused to eat L pellets and was kept on the diet C.

Rams were fed the hay *ad libitum* two times per day at 10-h interval (7 and 17 h), and 510 g of dry matter TRP pellets was offered at 7 h. The amount of pellets was adjusted by progressive incorporation during the period of adaptation to diet to allow the ratio TRP/hay to be around 0.85.

Measurements

Rams were individually weighed at the beginning and the end of each period. Intake and apparent digestibility were determined from the daily weighing of the amounts of diet offered and refused and of the faeces during five consecutive days. Cotton bags were glued to the hindquarters of the animals during the measurement period to collect faeces unsoiled by urine.

Five 200-g samples per period and animal of the offered feeds and refusals, and five faecal samples (10% of the daily excretion) were taken for constituting representative samples for chemical analysis. Daily urinary output was also recorded. Urine was collected daily in 10-l drums containing sulphuric acid (2.5 ml of 10% H₂SO₄ per 100 ml urine), and daily samples of urine were pooled before N determination.

Simultaneously with faeces collection, enteric CH₄ emission was measured over five consecutive days. The sulphur hexafluoride (SF₆) tracer technique (Johnson *et al.*, 1994) was used as described by

Martin *et al.* (2008). Briefly, brass permeation tubes (12.5 mm × 40 mm i.d.), weighing approximately 32 g, were loaded with approximately 600 mg of SF₆ gas (Air Liquide, Mitry-Mory, France) while in liquid N₂. They were then calibrated by bi-weekly weighing for a 10-week period. Permeation rate of SF₆ from the tubes was 1.015 ± 0.038 mg/day. A calibrated permeation tube was introduced into the rumen of each ram, through the cannula, one week before the first experimental period and remained in the rumen throughout the experiment. Representative breath samples from each ram were collected in pre-evacuated (−0.8 atm) polyvinyl chloride 0.7-l cylindrical collection devices by means of capillary and Teflon tubing fitted to a halter. The collection devices were placed at the top of the animal stall and changed every 24 h before the morning feeding. Background concentrations of gases were measured daily in ambient air samples collected in a device placed in the barn with a good natural ventilation. The SF₆ and CH₄ gases were determined upon receipt of samples to the analytical laboratory (between one to two weeks after the last sampling of each period).

Chemical analyses and analytical procedures

Dry matter (DM) content of forage, refusals and faeces were determined by drying in a forced-draught oven at 60 °C until constant weight. Samples for chemical analyses were dried under the same conditions. Diet and faeces samples were milled through a 1 mm screen (Reich hammer mill, Haan Germany) prior to analysis. Organic matter (OM) and N analyses were performed according to AOAC (1990), Methods 923.3 and 992.15, respectively, for OM and N. Lyophilised faecal samples were analysed for ash and N, and fresh samples of urine for N by the same methods as for diets. Crude protein (CP) was estimated as Nx6.25. Cell wall components [neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF) and acid detergent lignin (ADL)] in diet and faecal samples were determined as described by Van Soest *et al.* (1991) using a sequential procedure (AOAC, 2006, Methods 200.04 and 973.18, respectively, for NDF and ADF + ADL). Condensed tannins were extracted in an ultrasonic bath with a 70% (vol/vol) aqueous acetone solution (Giner-Chavez *et al.*, 1997) and isolated with Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). Condensed tannins content was determined using the vanillin–H₂SO₄ method according to Laurent (1975). A 70% (vol/vol) H₂SO₄ solution containing 1% vanillin (wt/vol) was added to the methanolic extract of the plant, and absorbance was measured at 500 nm. Concentra-

tions were determined using as standard: (i) a commercial tannin extract (quebracho) to rank plants according to a well-known standard and (ii) individual extracts of each plant for a more accurate determination of tannin concentration. An individual calibration curve was prepared from CT extracted from each plant, so that the tannin concentration of each plant was determined using its own standard.

Concentrations of SF₆ and CH₄ in breath and ambient air samples were determined by gas chromatography. A gas chromatograph (CP-9003, Varian-Chrompack, les Ulis, France) fitted with an electron capture detector and a Molecular Sieve 0.5 nm column maintained at 60 °C was used for the SF₆ analyses. Another gas chromatograph (Autosystem XL, Perkin Elmer Instruments, Courtaboeuf, France) fitted with a flame ionisation detector and a Porapak N 80–100 mesh column (3 m × 3.2 mm i.d.; Alltech France Templemars, France) maintained at 60 °C was used for determination of CH₄. The carrier gas used was N₂ (30 ml/min) for the SF₆ and He (40 ml/min) for the CH₄. Chromatographic analyses were performed after calibration with standard gases (Air Liquide, Mitry-Mory, France) for SF₆ (202 ppt) and CH₄ (95.7 ppm). Daily CH₄ production was calculated using the permeation rate of SF₆ and the concentrations above the background of SF₆ and CH₄ in the breath sample:

$$\text{CH}_4(\text{g/d}) = \text{SF}_6 \text{ permeation rate}(\text{g/d}) \times [\text{CH}_4]/[\text{SF}_6]$$

Statistical analysis

Means corresponded to 5 days of measurement for intake, total tract digestibility, N balance and CH₄ emission. Statistical analysis was performed using the MIXED procedure of SAS 9.2 release (SAS 2008). Diet, breed and period were fixed effects, and animal was a random effect nested within breed. The experimental unit was the animal.

The global model used was:

$$Y_{ijkl} = m + D_i + B_j + (D \times B)_{ij} + A_k + P_l + e_{ijkl}$$

where m is the mean, D_i is the diet fixed effect ($i = 1-4$), B_j is the breed fixed effect ($j = 1-2$), $(D \times B)_{ij}$ is the interaction between the diet effect and the breed effect, A_k is a random effect associated with animal ($k = 1-8$, P_l is the fixed effect of periods ($l = 1-4$), and e_{ijkl} is the residual term.

Difference between each TRP and C was tested with Dunnett's test. Additionally, the Tukey's test was used

for comparison between the four means. Results of Dunnett's test are given in tables; results of Tukey's test are mentioned in text when relevant. Values are expressed as least square means and standard error of the mean (SEM). Statistical differences were declared significant at $p \leq 0.05$.

Results

Chemical composition

The chemical composition of control hay and TRPs is presented in Table 1. Tannin-rich plants had higher CP content and were less rich in fibre (NDF and ADF) than C hay. Level of CT was similar for L and M when expressed using quebracho standard, L had a higher CT content than M but when it was expressed using their own standards, M had a higher CT content than L. In contrast, G had a CT content that was 2–4 times lower, depending on the standard, than L or M.

Intake and total tract digestibility

Dry matter intake (g/kg LW, g/day) was lower ($p < 0.05$) with the C hay diet than with TRP diets (Table 2). Within TRPs, intake was higher with M diet than with G and L (Tukey's test). Dry matter, OM and fibre intake, expressed in g/kg BW or g/day, was lower ($p < 0.05$) for Texel than Blackbelly.

Dry matter, OM and ADF digestibility did not differ among diets (Table 2). However, NDF digestibility was

lower for the TRP diets than for C diet. Compared to C diet, CP digestibility was lower for M diet, whereas no difference was observed between C, L and G diets. Whatever the diet component, there was no difference between animal genotypes in DM, OM or fibre digestibility, and interactions between diets and breeds were not significant for any parameter.

Nitrogen partition

Nitrogen intake was higher for the TRP diets than for C diet ($p < 0.05$) (Table 3). Faecal N was higher in the 3 TRP diets than in C diet, and higher for M than for G, but did not differ between G and L, and between L and M (Tukey's test). Average ratio between faecal N and N intake was 39%, 33%, 39% and 47% for C, G, L and M diets respectively. Considering the latter ratio, no differences were recorded between ration, except cassava which had a higher ratio than C and G (Tukey's test). Tannin-rich plants decreased the urinary N output, but only G and L diets resulted in less urinary N than C diet, without difference between G and L diets (Tukey's test). Average ratio between urinary N and N intake was 47%, 28%, 28% and 21% for C, G, L and M diets respectively. Considering the latter ratio, no difference was recorded between the tannin-rich plants while the latter led to lower values than those observed with the hay (Tukey's test). N balance was higher for TRPs than C diet without differences among G, L and M diets. Similar results were observed with the ratio N balance/N intake (Tukey's test). The N intake, faecal N, urinary N output and retained N were lower for Texel than for Blackbelly. However, the N intake/LW, faecal N/LW, urinary N output/LW and retained N/LW were similar for Texel and Blackbelly.

Methane emission

Although daily CH_4 (g/day) emission per ram was similar between diets (Table 4), when expressed per DMI or OMI (g/kg) CH_4 emission was reduced with G, L and M compared to the C diet. L and M had the lowest emissions and were also lower than for diet G (Tukey's test). Methane emission expressed as g/kg DDMI or g/kg DOMI was also reduced with L and M; emission did not differ among these later 2 diets (Tukey's test). Daily CH_4 emission per ram was not different between animal breeds, but when expressed relative to DMI, OMI, DDMI or DOMI, CH_4 was lower ($p < 0.05$) for Blackbelly than for Texel. No interaction between diet and breed was observed.

Table 1 Chemical composition [g/kg dry matter (DM)] of control and tannin-rich plants (n = 8)

Attributes	Control Hay	<i>Glyricidia sepium</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>Manihot esculenta</i>
Organic matter	924 (± 16.6)	915 (± 15.6)	913 (± 16.9)	910 (± 17.3)
Crude protein	108 (± 1.8)	262 (± 4.2)	266 (± 4.0)	208 (± 3.5)
Neutral detergent fibre	764 (± 29.0)	387 (± 14.3)	387 (± 15.5)	430 (± 15.1)
Acid detergent fibre	402 (± 14.9)	283 (± 11.3)	252 (± 9.8)	345 (± 13.1)
Condensed tannins				
Using quebracho as standard	ND	18 (± 0.7)	89 (± 3.2)	53 (± 1.9)
Using extracts from each plant as standard	NA	39 (± 1.4)	75 (± 2.8)	92 (± 3.6)

ND, not detected; NA, not analysed.

Table 2 Effect of tropical tannin-rich plants on intake and total tract digestibility in Texel and Blackbelly sheep

Attributes	Diet				Breed		SEM	p value		
	C	G	L	M	BB	T		Diet	Breed	Interaction
Feed intake										
Dry matter g/kg BW	16.4	22.6*	25.2*	28.6*	24.7	21.7	1.86	0.001	0.042	0.464
Organic matter g/kg BW	10.7	13.6*	15.5b*	17.5*	15.4	13.2	1.32	0.003	0.032	0.335
Dry matter g/d	741.6	1069.1*	1146.3*	1291.2*	1250.1	874.0	88.2	0.001	0.001	0.245
Organic matter g/d	685.6	984.1*	1053.7*	1185.7*	1150.1	804.1	81.3	0.001	0.001	0.245
Neutral detergent fibre g/d	566.7	650.1	683.3	797.6*	798.9	550.1	60.5	0.007	0.001	0.324
Acid detergent fibre g/d	298.3	377.2*	384.2*	487.1*	456.8	316.6	32.7	0.001	0.001	0.215
Crude protein g/d	80.2	184.1*	204.8*	196.0*	193.7	138.8	13.7	0.001	0.001	0.234
Total tract digestibility (%)										
Dry matter	69.9	62.8	65.3	64.7	66.4	64.9	3.29	0.197	0.656	0.889
Organic matter	71.2	65.1	66.6	65.8	67.9	66.5	3.13	0.224	0.678	0.889
Neutral detergent fibre	76.2	64.3*	66.9*	66.8*	69.3	67.7	3.34	0.012	0.633	0.775
Acid detergent fibre	74.6	57.1	59.9	59.7	63.9	61.7	3.96	0.224	0.678	0.660
Crude protein	62.4	66.9	59.9	51.7*	61.6	58.8	4.22	0.018	0.540	0.707
Body weight	45.1	47.1	45.6	44.8	51.1	40.2	1.45	0.556	0.001	0.788

C, control hay; G, diet containing *G. sepium*; L, diet containing *L. leucocephala*; M, diet containing *M. esculenta*. BW, body weight; BB, Blackbelly; T, Texel; d, day.

*Within a row indicates differences from control diet ($p < 0.05$; Dunnett's test).

Table 3 Effect of tropical tannin-rich plants on nitrogen balance in Texel and Blackbelly sheep

Attributes	Diet				Breed		SEM	p value		
	C	G	L	M	BB	T		Diet	Breed	Interaction
N intake (g/d)	12.8	29.5*	32.8*	31.4*	30.9	22.2	2.19	0.001	0.001	0.234
Faecal N/N intake	0.38	0.33	0.40	0.48*	0.38	0.41	0.034	0.017	0.533	0.714
Urinary N/N intake	0.50	0.30*	0.28*	0.20*	0.33	0.31	0.047	0.001	0.761	0.899
N balance/N intake	0.12	0.37*	0.32*	0.31*	0.29	0.27	0.047	0.005	0.788	0.874
N intake (g/kg LW)	0.28	0.63*	0.72*	0.70*	0.61	0.55	0.332	0.000	0.089	0.653
Faecal N (g/kg LW)	0.11	0.20*	0.28*	0.33*	0.23	0.23	0.029	0.000	0.959	0.966
Urinary N (g/kg LW)	0.13	0.17*	0.20*	0.14	0.17	0.16	0.017	0.041	0.508	0.309
N balance (g/kg LW)	0.04	0.24*	0.23*	0.22*	0.21	0.16	0.029	0.000	0.183	0.769

C, control hay; G, diet containing *G. sepium*; L, diet containing *L. leucocephala*; M, diet containing *M. esculenta*. BB, Blackbelly; T, Texel; d, day.

*Within a row indicates differences from control diet ($p < 0.05$; Dunnett's test).

Discussion

Chemical composition of tannin-rich plants

Tropical plants are known to contain significant amounts of plant secondary metabolites like CT that are able to suppress methanogenesis and decrease feed intake and digestibility. Chemical composition of the TRP used in this work was in the range of most published data (Meale et al., 2012; Oduguwa et al., 2013; Yadete, 2014). Generally, reported CT contents are variable for a same plant; the CT contents of *L. leucocephala* and *G. sepium* were higher in the present study than in the work by Oduguwa et al., 2013;. In addition, CT content of *M. esculenta* was higher in this

study than reported by Marie-Magdeleine et al. (2010) for the same geographical area. A possible explanation is that CT concentrations vary considerably according to environmental conditions, vegetation conditions and physiological properties of plants (Tiemann et al., 2010). Tannin-rich plants used in this experiment can differ in the type of CT as illustrated by differences in the ranking between *L. leucocephala* and *M. esculenta* depending on the CT standard used (quebracho vs. plant CT). *Glyricidia sepium* contained less CT than the other two TRPs used in this experiment. However, Bhatta et al. (2002) reported that *G. sepium* contains more hydrolysable tannins than CT, contrary to *L. leucocephala*.

Table 4 Effect of tropical tannin-rich plants on methane production in Texel and Blackbelly sheep

Attributes	Diet				Breed		SEM	p value		
	C	G	L	M	BB	T		Diet	Breed	Interaction
CH ₄ (g/d)	22.4	27.8	23.2	24.3	25.5	23.4	6.69	0.223	0.490	0.267
CH ₄ (g/kg DMI)	31.0	26.9*	20.1*	19.8*	21.5	27.3	1.84	0.001	0.027	0.215
CH ₄ (g/kg OMI)	33.6	29.2*	21.8*	21.5*	23.4	29.7	1.99	0.001	0.026	0.210
CH ₄ (g/kg DDMI)	44.4	42.9	31.2*	31.4*	32.8	42.2	2.71	0.002	0.026	0.089
CH ₄ (g/kg DOMI)	47.1	44.9	33.3*	33.5*	34.7	44.7	2.84	0.002	0.027	0.081

C, control hay; G, diet containing *G. sepium*; L, diet containing *L. leucocephala*; M, diet containing *M. esculenta*. BB, Blackbelly; T, Texel; DMI, dry matter intake; OMI, organic matter intake; DDMI, digestible dry matter intake; DOMI, digestible organic matter intake; d, day.

*Within a row indicates differences from control diet ($p < 0.05$; Dunnett's test).

Effects of tannin-rich plants on feed intake, digestibility and nitrogen balance

The effect of TRP inclusion of in the diets cannot be equated to that of the contribution of tannins. The TRP changes the composition of the diet because of its very different chemical composition relative to that of the hay used. Accordingly, variations intake, digestibility and nitrogen balance of mixed rations are partially related to TRP and/or its interaction with hay. Diets containing CT are often associated to decreases in voluntary feed intake. This effect has been attributed to a deficiency in degradable protein reaching the rumen for an adequate microbial growth (Waghorn, 2008) and also to a reduction in palatability (Landau et al., 2000). Our results differ from published data that often describe a reduction or no effect on intake of CT (Bhatta et al., 2002; Animum et al., 2008b). In our case, DM intake increased with increasing CT content. The differences between authors are probably partly explained by CT concentration. CT concentrations >50 g/kg DM in diets may negatively affect feed intake, whereas lower concentrations of CT have no influence on intake by ruminants (Patra and Saxena, 2011). At moderate level, the CT shift in the site of N metabolism from rumen to the lower digestive tract and large intestine (Patra and Saxena, 2011). The apparent digestion of soluble carbohydrates appears to be unaffected by tannins. Depressive effect of CT on organic matter and fibre total tract digestibility may be found at concentration lower than 50 g/kg DM (Patra and Saxena, 2011). The decrease of digestion in turn could reduce intake. In addition to the concentration, the activity of CT varies with its structure (Waghorn, 2008). The 3 TRP tested in the present study were given in pellet form, which may have masked their astringency and thus enhanced intake. In addition, the pelleting of forages increases their intake (Minson and Milford, 1968).

These last authors reported that pelleting increased the mean voluntary intake by sheep 47 per cent for dry matter with only minor differences in response to pelleting mature and young grass. The effect of pelleting on intake is partly explained by a change in the digestive dynamics including a reduction in the residence time of the particles in the rumen (Faichney et al., 2004).

The addition of TRP had no effect on the digestibility of all investigated feed fractions except for that of NDF and CP. In the literature, similar amount of CT did not change (Hariadi and Santoso, 2010) or decreased feed digestibility (Carulla et al., 2005; Animum et al., 2008a; Grainger et al., 2009). Lower NDF digestibility can be explained by four factors: (i) the high level of lignin in tested TRP; (ii) a probable increase of passage rate of particle in rumen linked to pelleting of TRPs; (iii) CT may depress fibre digestion by complexing with lignocellulose thus preventing microbial digestion; and (iv) CT can directly inhibit cellulolytic bacteria, activity of fibrolytic enzymes or both, which may adversely affect fibre degradation. In the present study, we cannot conclude concerning a direct inhibition of cellulolytic bacteria as concentration of three of them (*Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*) was not affected, but microbial activity is not only related to the concentration of bacteria (Rira et al., 2015).

In the present study, M diet resulted in decreased protein digestibility compared to other diets. The general effect of tannins on protein digestion in the rumen is the formation of a tannin-protein complex preventing protein to be degraded by rumen microbes (Mueller-Harvey, 2006). A decrease in protein apparent digestibility when CT are consumed may be due to (i) a decrease of the amounts of protein digested in the rumen and increase of the amounts of protein available for digestion in the small intestine and/or (ii) a lower intestinal digestibility when the tannin-protein

complex is not completely broken down in the abomasum (Mueller-Harvey, 2006). However, the action of CT is not homogeneous and could partly depend on their structural diversity (procyanidin/prodelphinidin ratio for example) (Mueller-Harvey, 2006). The decrease in protein apparent digestibility may have happened for M diet, due to tannin specificity of *M. esculenta* (Marie Magdeleine unpublished data) and/or and a larger cell wall lignification. Perez-Maldonado and Norton (1996) also showed that faecal N increased by 14% when sheep and goats were fed tropical TRP. In the same way, Carulla et al. (2005) and Dschaak et al. (2011) suggest a shift in N excretion resulting in less urinary and more faecal N when diet was supplemented with CT extract. In our experiment, although urinary N daily output increased for G and L diets, urinary N as a percentage of N intake decreased from 47% for C diet down to 21–28% for TRP diets. Our results showed that nitrogen balance was positive with TRP addition, and this effect was not related to CT concentration. It can be noted that Widiawati et al. (2013) also reported a positive N balance for *L. Leucocephala* and *G. sepium* compared to a grass diet.

Antimethanogenic potential of the tested TRP

As indicated previously, compared to fresh foliage consumed without technological processing, pelleting of TRPs has probably changed their digestion with a reduction in retention time in the rumen. These conditions are favourable to the reduction of methane emissions independently of their chemical composition, their tannin content. Tannin-rich plants were used in numerous *in vivo* and *in vitro* studies on CH₄ mitigation, especially *L. leucocephala* and to a lesser degree *G. sepium* (Soliva et al., 2008;., Jayanegara et al., 2012; Soltan et al., 2012;., Soltan et al., 2013). In contrast, the antimethanogen property of *Manihot*

esculenta on animals was not reported before. Our results were consistent with most published data, among others Rira et al. (2015) with the same TRP assayed *in vitro*. Soltan et al. (2013) showed that *L. leucocephala* inhibited CH₄ emission both *in vitro* and *in vivo*. Factors responsible for effects of CT on ruminal CH₄ emission per kg DM are very diverse: decreased fibre digestion, decreased number of cellulolytic bacteria and methanogens (McSweeney et al., 2001), and/or impaired substrate adhesion by fibrolytic microbes (Bento et al., 2005).

In the present study, reduction of CH₄ emission was probably partly the result of the decrease in ruminal fibre digestion due to the formation of CT-cellulose complexes that are resistant to enzymatic digestion (Silanikove et al., 1996). This is suggested by the absence of significant effect on rumen acetate-to-propionate ratio, cellulolytic bacteria and methanogens reported by Rira et al. (2015). Nevertheless, the overall linear relationship between CH₄ emission per kg DM and methanogens population is significant (p = 0.03, Fig. 1) although the highest variation in

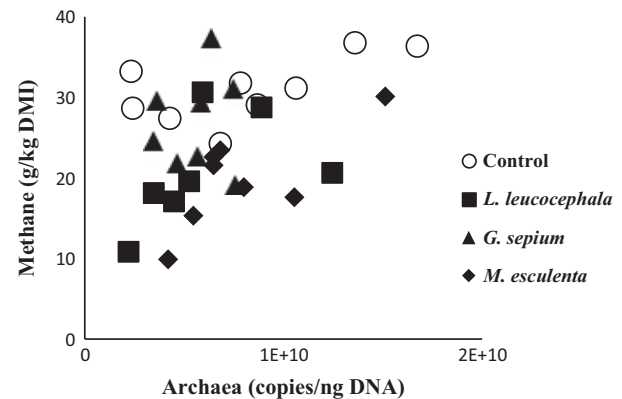


Fig. 1 Relationship between methane emission and archaea population.

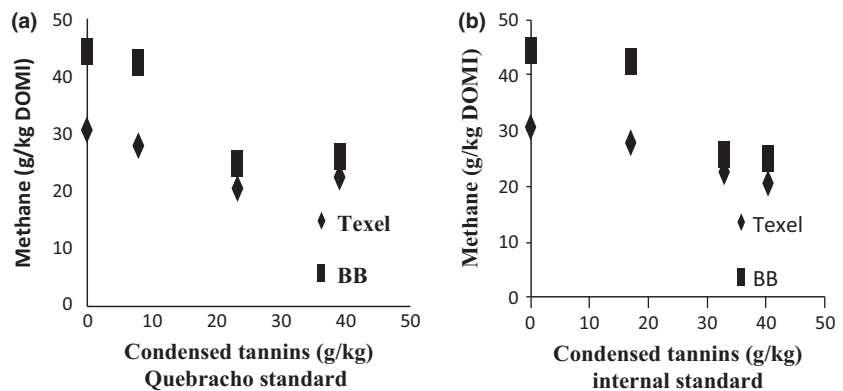


Fig. 2 Relationship between methane emission and condensed tannins content in Texel and Blackbelly sheep using internal standard (b) or Quebracho (a). Internal standard means that standard used for condensed tannins determination in a plant was made of tannins extracted from the plant.

archaea concentration was observed within the control diet, without any differences in methane emission.

Reducing the emission of methane with TRP could also be explained by the increase of intake and accordingly a reduction of transit time (Johnson and Johnson, 1995). In addition, Bonsi *et al.* (1994) noted that supplementation with *L. leucocephala* leaves increased particulate passage rate when added to straw. This may have occurred in our experiment where the leaf part of TRP was given to animals, although C hay has a higher passage rate than straw, but it is likely that the distribution as pellets after grinding resulted in a more rapid passage of particles out of the rumen and thus in higher intake (Minson and Milford, 1968; Owens and Goetsch, 1986). The differences between TRPs on methane emission reduction could be partly explained by their type of tannins (CT vs. HT). Both CT and HT have an antimethanogenic activity (Jayanegara *et al.*, 2011). However, there is an apparent lower magnitude in antimethanogenic effect with HT, compared to CT (Jayanegara *et al.*, 2011).

Rira *et al.* (2015) also indicate a linear relationship between CT content and CH₄ reduction *in vitro*. This tendency is confirmed *in vivo* as CH₄ reduction induced by CT contained in G diet was weaker than for L and M diets (Fig. 2). This latter TRP shows a strong effect on CH₄ emission. It is also necessary to indicate that CT effects should be considered not only by the amount present but also by the size and weight of molecules (Patra and Saxena, 2009; Huang *et al.*, 2010), the number of linkage sites (Mueller-Harvey, 2006) and interaction with other compounds (fibre, proteins and other secondary metabolites). Indeed, the expression of CT by two different standards (Fig. 2) results in a variation in diet ranking for CH₄ emission between L and M; that is, why it is necessary to remain careful in interpretation on CT contents of plants.

Methane emission per kg DM intake was higher for Texel than Blackbelly. This can be partially explained by a lower DM intake for Texel than for Blackbelly. Johnson and Johnson (1995) reported that as feed

intake increases, the energy lost as CH₄ decreases by approximately 1.6% per each level of intake above maintenance. Increasing feed intake is usually associated with increasing fractional passage rate and a decrease of digestibility (Hristov *et al.*, 2013). Although breed variation is considered a minor factor in CH₄ emissions (Fraser *et al.*, 2014), the difference between Texel and Blackbelly could be due to a better adaptation of Blackbelly to tropical plants reflected by a higher intake. The effect of the contribution of CT on CH₄ emission in this essay can be related on one hand to the direct effect of CT, and on the other hand to high levels of ingestion, what is not the case in other reported essays.

Conclusion

An increase in intake was observed with animals consuming TRPs. This result is likely related: (i) change of chemical composition of diets after additions of TRP; (ii) the mode of administration of TRPs as pellets which can be a new method of TRP supply. Condensed tannins contained in TRPs had minor negative effects on overall animal digestion. In contrast, a significant decrease in methane emission is observed when the animals consumed these TRPs, M and L leaves in particular. Before field application, it is necessary to confirm the efficacy of TRPs as pellets to reduce the emission of methane and feed the animals. Moreover, further studies should be conducted with pelleted vs. un-pelleted TRPs to differentiate and understand whether the effect pelleted TRPs comes from CT or the physical presentation.

Acknowledgements

This study was completed with the financial support of the EU FP7 AnimalChange project, of the French National Research Agency (ANR) project ANR-09-STRA-01 EPAD, of Region Guadeloupe and other European funding: FEOGA, FEDER, FSE. The authors thank Tatiana Silou Etienne, Frédéric Pommier and Pierre Justin Dumoulin for their technical assistance.

References

- Animut, G.; Puchala, R.; Goetsch, A. L.; Patra, A. K.; Sahlu, T.; Varel, V. H.; Wells, J., 2008a: Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannin from lespedeza. *Animal Feed Science and Technology* **144**, 212–227.
- Animut, G.; Puchala, R.; Goetsch, A. L.; Patra, A. K.; Sahlu, T.; Varel, V. H.; Wells, J., 2008b: Methane emission by goats consuming different sources of condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology* **144**, 228–241.
- AOAC., 1990: *Official Methods for Analysis*. Association of Official Analysis Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- AOAC., 2006: *Official Methods for Analysis*. Association of Official Analysis Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- Beauchemin, K. A.; McAllister, T. A.; McGinn, S. M., 2009: Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* **4**, 18.

- Bento, M. H. L.; Acamovic, T.; Makkar, H. P. S., 2005: The influence of tannin, pectin, and polyethylene glycol on attachment of 15N-labeled rumen microorganisms to cellulose. *Animal Feed Science and Technology* **122**, 41–57.
- Bhatta, R.; Saravanan, M.; Baruah, L.; Sampath, K. T., 2012: Nutrient content, in vitro ruminal fermentation characteristics and methane reduction potential of tropical tannin-containing leaves. *Journal of the Science Food and Agriculture* **92**, 2929–2935.
- Bhatta, R.; Shinde, A. K.; Vaithyanathan, S.; Sankhyan, S. K.; Verma, D. L., 2002: Effect of Polyethylene glycol-6000 on nutrient intake, digestion and growth of kids browsing *Prosopis cineraria*. *Animal Feed Science and Technology* **101**, 45–54.
- Bonsi, M. L. K.; Osuji, P. O.; Nsahlai, I. V.; Tuah, A. K., 1994: Graded levels of *Sesbania sesban* and *Leucaena leucocephala* as supplements to teff straw given to Ethiopian Menz sheep. *Animal Production* **59**, 235–244.
- Carulla, J. E.; Kreuzer, M.; Machmuller, A.; Hess, H. D., 2005: Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* **56**, 961–970.
- Dschaak, C. M.; Williams, C. M.; Holt, M. S.; Eun, J. S.; Young, A. J.; Min, B. R., 2011: Effects of supplementing condensed tannin extract on intake, digestion, ruminal fermentation, and milk production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **94**, 2508–2519.
- Faichney, G. J.; Teleki, E.; Brown, G. H., 2004: Effect of physical form of a lucerne hay on digestion and rate of passage in sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* **55**, 1253–1262.
- Fraser, M. D.; Fleming, H. R.; Moorby, J. M., 2014: Traditional vs. modern: role of breed type in determining enteric methane emissions from cattle grazing as part of contrasting grassland-based systems. *PLoS ONE* **9**, e107861.
- Gerber, P. J.; Steinfeld, H.; Henderson, B.; Mottet, A.; Opio, C.; Dijkman, J.; Falucci, A.; Tempio, G., 2013: *Tackling Climate Change through Livestock – A Global Assessment of Emissions and Mitigation Opportunities*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome E-ISBN 978-92-5-107921-8.
- Giner-Chavez, B. I.; Van Soest, P. J.; Robertson, J. B.; Lascano, C.; Reed, J. D.; Pell, A. N., 1997: A method for isolating condensed tannins from crude plant extracts with trivalent ytterbium. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **74**, 359–368.
- Grainger, C.; Clarke, T.; Auld, M. J.; Beauchemin, K. A.; McGinn, S. M.; Waghorn, G. C.; Eckard, R. J., 2009: Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science* **89**, 241–251.
- Hariadi, B. T.; Santoso, B., 2010: Evaluation of tropical plants containing tannin on in vitro methanogenesis and fermentation parameters using rumen fluid. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**, 456–461.
- Hristov, A. N.; Oh, J.; Firkins, J. L.; Dijkstra, J.; Kebreab, E.; Waghorn, G.; Makkar, H. P. S.; Adesogan, A. T.; Wang, W.; Lee, C.; Gerber, P. J.; Henderson, B.; Tricarico, J. M., 2013: Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science* **91**, 5045–5069.
- Huang, X. D.; Liang, J. B.; Tan, H. Y.; Yahya, R.; Khamsekhiew, B.; Ho, Y. W., 2010: Molecular weight and protein binding affinity of *Leucaena* condensed tannins and their effects on in vitro fermentation parameters. *Animal Feed Science and Technology* **159**, 81–87.
- Jayanegara, A.; Wina, E.; Soliva, C. R.; Marquardt, S.; Kreuzer, M.; Leiber, F., 2011: Dependence of forage quality and methanogenic potential of tropical plants on their phenolic fractions as determined by principal component analysis. *Animal Feed Science and Technology* **163**, 231–243.
- Jayanegara, A.; Leiber, F.; Kreuzer, M., 2012: Meta-analysis of the relationship between dietary tannins level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **96**, 365–375.
- Johnson, K. A.; Johnson, D. E., 1995: Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* **73**, 2483–2492.
- Johnson, K. A.; Huylar, M.; Westberg, H.; Lamb, B.; Zimmerman, P., 1994: Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ tracer technique. *Environmental Science and Technology* **28**, 359–362.
- Landau, S.; Silanikove, N.; Nitsan, Z.; Barkai, D.; Baram, H.; Provenza, F. D.; Perevolotsky, A., 2000: Short-term changes in eating patterns explain the effects of condensed tannins on feed intake in heifers. *Applied Animal Behaviour Science* **69**, 199–213.
- Laurent, S., 1975: Etude comparative de différentes méthodes d'extraction et de dosage des tannins chez quelques ptéridophytes. (In French.). *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* **83**, 735–752.
- Marie-Magdeleine, C.; Mahieu, M.; Philibert, L.; Despois, P.; Archimède, H., 2010: Effect of cassava (*Manihot esculenta*) foliage on nutrition, parasite infection and growth of lambs. *Small Ruminant Research* **93**, 10–18.
- Martin, C.; Rouel, J.; Jouany, J. P.; Doreau, M.; Chilliard, Y., 2008: Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows with crude linseed, extruded linseed or linseed oil. *Journal of Animal Science* **86**, 2642–2650.
- McSweeney, C. S.; Palmer, B.; McNeill, D. M.; Krause, D. O., 2001: Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* **91**, 83–93.
- Meale, S. J.; Chaves, A. V.; Baah, J.; McAllister, T. A., 2012: Methane production of different forages in in vitro ruminal fermentation. *Asian Australian Journal of Animal Science* **25**, 86–91.
- Minson, D. J.; Milford, R., 1968: The nutritional value of four tropical grasses when fed as chaff and pellets to sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* **8**, 270–276.
- Mueller-Harvey, I., 2006: Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**, 2010–2037.
- Oduguwa, B. O.; Oni, A. O.; Arigbede, O. M.; Adesunbola, J. O.; Sudekum, K. H., 2013: Feeding potential of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) peels ensiled with *Leucaena leucocephala* and *Gliricidia sepium* assessed with West African dwarf goats. *Tropical Animal Health and Production* **45**, 1363–1368.
- Owens, F. N.; Goetsch, A. L., 1986: Digesta passage and microbial protein synthesis. In: L. P. Milligan, W. L. Grovum, A. Dobson (eds), *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants*. Prentice-Hall, NJ, pp. 196–226.
- Patra, A. K.; Saxena, J., 2009: Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial popu-

- lations. *Antonie van Leeuwenhoek* **96**, 363–375.
- Patra, A. K.; Saxena, J., 2011: Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**, 24–37.
- Perez-Maldonado, R. A.; Norton, B. W., 1996: The effects of condensed tannins from *Desmodium intortum* and *Calliandra calothyrsus* on protein and carbohydrate digestion in sheep and goats. *British Journal of Nutrition* **76**, 515–533.
- Reid, J. D., 1995: Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science* **73**, 1516–1528.
- 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.
- SAS., 2008: *Statistical Analysis System Release 8.01*. SAS Institute, Cary, NC.
- Silanikove, N.; Gilboa, N.; Nir, I.; Perevolotsky, A.; Nitsan, Z., 1996: Effect of a daily supplementation of polyethylene glycol on intake and digestion of tannin-containing leaves (*Quercus calliprinos*, *Pistacia lentiscus*, and *Ceratonia siliqua*) by goats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 199–205.
- Soliva, C. R.; Zeleke, A. B.; Clément, C.; Hess, H. D.; Fievez, V.; Kreuzer, M., 2008: *In vitro* screening of various tropical foliages, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* **147**, 53–71.
- Soltan, Y.; Morsy, A. S.; Sallam, S. M. A.; Louvandini, H.; Abdalla, A. L., 2012: Comparative *in vitro* evaluation of forage legumes (prosopis, acacia, atriplex, and leucaena) on ruminal fermentation and methanogenesis. *Journal of Animal and Feed Sciences* **21**, 759–772.
- Soltan, Y.; Morsy, A. S.; Sallam, S. M. A.; Lucas, R. C.; Louvandini, H.; Kreuzer, M.; Abdalla, A. L., 2013: Contribution of condensed tannins and mimosine to the methane mitigation caused by feeding *Leucaena leucocephala*. *Archives of Animal Nutrition* **67**, 169–184.
- Tiemann, T. T.; Franco, L. H.; Ramirez, G.; Kreuzer, M.; Lascano, C. E.; Hess, H. D., 2010: Influence of cultivation site and fertilisation on the properties of condensed tannins and *in vitro* ruminal nutrient degradation of *Calliandra calothyrsus*, *Flemingia macrophylla* and *Leucaena leucocephala*. *Animal Feed Science and Technology* **157**, 30–40.
- Van Soest, P. J.; Robertson, J. B.; Lewis, B. A., 1991: Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* **74**, 3583–3597.
- Waghorn, G., 2008: Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production. Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology* **147**, 116–139.
- Widiawati, Y.; Winugroho, M.; Teleni, E., 2013: Nitrogen kinetics in growing sheep consuming *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium* or *Calliandra calothyrsus* as a sole diet. *Indonesian Journal of Animal and Veterinary Science* **17**, 215–220.
- Yadete, G. K., 2014: Effect of wheat straw urea treatment and *Leucaena leucocephala* foliage hay supplementation on intake, digestibility, nitrogen balance and growth of lambs. *International Journal of Livestock Production* **6**, 88–96.

Publication 4

Potential of tannin-rich plants for modulating rumen microbes and ruminal fermentation in sheep.

Rira M., Morgavi D.P., Archimède H., Marie-Magdeleine C., Popova M., Bousseboua H., Doreau M.

Journal of Animal Science, 2015, 93, 334-347.

Potential of tannin-rich plants for modulating ruminal microbes and ruminal fermentation in sheep¹

M. Rira,^{*2} D. P. Morgavi,^{*} H. Archimède,[†]
C. Marie-Magdeleine,[†] M. Popova,^{*} H. Bousseboua,[‡] and M. Doreau^{*3}

^{*}INRA, UMR 1213 Herbivores, 63122 Saint-Genès Champanelle, France;

[†]INRA, Unité de Recherches Zootechniques, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, France;

and [‡]Ecole Nationale Supérieure des Biotechnologies, Ali Mendjli, BP E66. 25100 Constantine, Algeria

ABSTRACT: The objective of this work was to study nutritional strategies for decreasing methane production by ruminants fed tropical diets, combining in vitro and in vivo methods. The in vitro approach was used to evaluate the dose effect of condensed tannins (CT) contained in leaves of *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala*, and *Manihot esculenta* (39, 75, and 92 g CT/kg DM, respectively) on methane production and ruminal fermentation characteristics. Tannin-rich plants (TRP) were incubated for 24 h alone or mixed with a natural grassland hay based on *Dichanthium* spp. (control plant), so that proportions of TRP were 0, 0.25, 0.5, 0.75, and 1.0. Methane production, VFA concentration, and fermented OM decreased with increased proportions of TRP. Numerical differences on methane production and VFA concentration among TRP sources may be due to differences in their CT content, with greater effects for *L. leucocephala* and *M. esculenta* than for *G. sepium*. Independently of TRP, the response to increasing doses of CT was linear for methane

production but quadratic for VFA concentration. As a result, at moderate tannin dose, methane decreased more than VFA. The in vivo trial was conducted to investigate the effect of TRP on different ruminal microbial populations. To this end, 8 rumen-cannulated sheep from 2 breeds (Texel and Blackbelly) were used in two 4 × 4 Latin square designs. Diets were fed ad libitum and were composed of the same feeds used for the in vitro trial: control plant alone or combined with pellets made from TRP leaves at 44% of the diet DM. Compared to TRP, concentration of *Ruminococcus flavefaciens* was greater for the control diet and concentration of *Ruminococcus albus* was least for the control diet. The methanogen population was greater for Texel than for Blackbelly. By contrast, TRP-containing diets did not affect protozoa or *Fibrobacter succinogenes* numbers. Hence, TRP showed potential for mitigating methane production by ruminants. These findings suggest that TRP fed as pellets could be used to decrease methane production.

Key words: methane, rumen microbial ecosystem, ruminal fermentation, sheep, tannin-rich plants, tropics

© 2015 American Society of Animal Science. All rights reserved.

J. Anim. Sci. 2015.93:334–347

doi:10.2527/jas2014-7961

INTRODUCTION

It has been estimated that enteric methane (CH₄) accounts for 39% of greenhouse gas emissions by livestock supply chains (Gerber et al., 2013). In ruminants, CH₄ originates mainly from enteric fermentation. Research on mitigating CH₄ emissions from ruminants has received much attention, especially during the last decade (Martin et al., 2010). Some plant secondary compounds, in particular tannins, show potential for decreasing enteric CH₄ emissions

¹This research is part of the AnimalChange project funded by the European Community's FP7 Program. It was also supported by other EU funds (FEDER and FEADER) and by the Guadeloupe Region. The first author received a fellowship from the Algerian Ministry of Higher Education and Research.

²Present address: Ecole Nationale Supérieure des Biotechnologies, Ali Mendjli, BP E66, 25100 Constantine, Algeria.

³Corresponding author: michel.doreau@clermont.inra.fr

Received April 18, 2014.

Accepted October 21, 2014.

from ruminants (Jayanegara et al., 2012). Ruminants fed tropical forages containing tannins generally produce less CH₄ than when fed forages without tannins (Archimède et al., 2011). However, tannins are a diverse group of compounds, and information on the efficacy of different tannins contained in plants and their appropriate dose is still fragmentary.

The objectives of the present study were to investigate the effect of including, in a forage diet, 3 tropical tannin-rich plants (TRP) available in numerous countries in large amounts—*Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, and *Manihot esculenta*—on enteric CH₄ production and to evaluate their influence on amount of methanogens, protozoa, and total and main cellulolytic bacteria. For this purpose, 2 experiments were performed: an in vitro trial to evaluate the dose-response effect of these 3 plants on ruminal fermentation and CH₄ production and an in vivo trial to evaluate the effect of including these 3 plants as pellets in a forage diet, based on natural grassland hay, on ruminal fermentation and microbial populations. Replacing part of the diet by TRP in a pelleted form has not been investigated before for its effects on CH₄ production by ruminants, even though it may offer a valuable way to make practical use of TRP on a large scale.

MATERIALS AND METHODS

The in vivo study was performed in the French West Indies (Guadeloupe; 16.16 N, 61.30 W; 3,000 mm annual rainfall and temperatures range of between 21 and 25°C during the rainy season and 27 and 31°C during the dry season). The experiment took place during the rainy season from June to September 2012. The in vitro trial and the microbial ecosystem analyses of the in vivo trial were performed in France (metropolitan). These animals were treated in accordance with the guidelines and regulations for animal experimentation of the French Ministry of Agriculture and other applicable international guidelines for animal experimentation (Canadian Council on Animal Care, 1993).

Plant Origin and Chemical Characterization

Three TRP, *L. leucocephala*, *G. sepium*, and *M. esculenta*, were studied. Each resource was a mixture coming from collections on multiple sites placed on diversified clay soils (deep ferrallitic soils, allophane and halloysite soils, and vertisols). The soils were not fertilized. *Leucaena leucocephala* and *G. sepium* came from 9- to 12-mo-old fallow farmland and *M. esculenta* was collected from 12-mo-old plantations. The younger branches (stems and leaves), less than 6 mo old, of *L. leucocephala*, *G. sepium*, and *M. esculenta* were har-

vested and then sun dried for 2 d. The leaves with petioles were isolated from the stem, ground (through a 3-mm screen), and granulated with a GR150E system (Oliotechnology, Burgun, Wissembourg, France). The average size of the pellets was 12 mm long by 3 mm in diameter.

The forage used as control (Ctl) was hay from a 75-d regrowth of natural grassland based on *Dichanthium* spp. grown with irrigation and mineral fertilization (100 kg of mineral nitrogen·ha⁻¹·yr⁻¹) in Grande-Terre, Northeast Guadeloupe. Before feeding to animals, hay was coarsely chopped with a biomass chopper (Honda 8 HP overhead valve engine, Torrance, CA), resulting in a wide particle size range of approximately 20 to 50 mm in length.

All plant material that was analyzed was ground to pass through a 1-mm sieve and stored at 4°C for analysis according to the Association of Official Analytical Chemists (1990). Organic matter was determined by ashing at 550°C for 6 h (Association of Official Analytical Chemists [AOAC] method number 923.03). Crude protein was determined by the Dumas method (CP; N × 6.25; AOAC method number 992.15). Cell wall components (NDF and ADF) were determined with residual ash (AOAC methods number 200.04 and 973.18). Condensed tannins (CT) were extracted in an ultrasonic bath with a 70% (vol/vol) aqueous acetone solution (Giner-Chavez et al., 1997) and isolated with Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). Condensed tannin content was determined using the vanillin-H₂SO₄ method according to Laurent (1975). A 70% (vol/vol) H₂SO₄ solution containing 1% vanillin (wt/vol) was added to the methanolic extract of the plant, and absorbance was measured at 500 nm. Concentrations were determined using as standard 1) a commercial tannin extract (quebracho) for all plants to rank plants according to tannin concentration and 2) individual extracts of each plant for a more accurate determination of tannin concentration. An individual calibration curve was prepared from CT extracted from each plant, so that the tannin concentration of each plant was determined using its own standard.

In Vitro Experiment

Incubation Procedure. The donor animals were 3 wethers of the Texel breed fitted with a ruminal cannula and weighing 61.5 ± 1.5 kg. They were fed 900 g daily of a hay diet (natural grassland based on *Dichanthium* spp. and grown in Guadeloupe) divided into equal amounts at 0700 and 1900 h and were adapted to this hay for 3 wk before the beginning of incubations.

Three series of 24-h incubations were performed and initiated at 3-d intervals. For each series, a homogenous

500-g sample of ruminal contents was obtained from each animal before morning feeding. Contents were strained through polyester cloth (250- μ m mesh aperture). The liquid phase from the 3 wethers was pooled in equal amounts and sent to the laboratory within 15 min after rumen sampling. Incubations were performed in 100-mL vials. Each incubation series comprised a blank without substrate and 13 vials containing 400 mg of substrate. Substrates were the Ctl, *L. leucocephala*, *G. sepium*, *M. esculenta*, and mixtures of the Ctl and each of the 3 TRP in ratios of 25:75, 50:50, and 75:25. Incubations were performed according to a procedure derived from Goering and Van Soest (1970) using 25 mL of buffer and 15 mL of strained rumen fluid. At the end of incubations, gas production was measured using a pressure transducer, and samples of gas (5 mL) were taken for analysis. Fermentor content was weighed and then centrifuged at $5,000 \times g$ for 10 min at 4°C. For VFA determination, 0.8 mL of filtrate was mixed with 0.5 mL of 4 mg/mL crotonic acid and 20 mg/mL metaphosphoric acid in 0.5 M HCl and frozen at -20°C until analysis. Ruminal liquid filtrate was sampled for VFA analysis as described by Morgavi et al. (2013). For ruminal ammonia (N-NH₃), 1 mL of supernatant was added to 0.1 mL of H₃PO₄ 5% (vol/vol) and frozen at -20°C until analysis.

Chemical Analyses and Calculations.

Gas composition was determined by gas liquid chromatography (Micro GC 3000A; Agilent Technologies, Les Ulis, France) within 2 h after sampling. Individual gas standards were used for calibration. Volatile fatty acids were analyzed by gas chromatography using crotonic acid as the internal standard on a CP 9002 Gas Chromatograph (CP 9002; Chrompack, Middelburg, Germany) using a wall-coated open-tubular fused silica column (0.25 mm i.d. by 25 m) coated with CP-wax 58 FFAP CB (Morgavi et al., 2013). Ruminal ammonia was determined colorimetrically using the automated phenol-hypochlorite method of Weatherburn (1967). Fermented OM (**FOM**; %) was calculated from VFA production according to a stoichiometric equation (Demeyer and Van Nevel, 1975):

$$\text{FOM} = 162 (0.5 \text{ acetate} + 0.5 \text{ propionate} + \text{butyrate} + \text{valerate}) \times 40 / \text{OM introduced in the fermentor},$$

in which VFA are expressed in moles and 40 is the volume of liquid, in milliliters, in the fermentor.

Statistical Analyses. In a first step, an ANOVA that included effects of TRP source (*L. leucocephala*, *G. sepium*, or *M. esculenta*) and proportion of TRP (0, 25, 50, 75, or 100% of the mixture of Ctl hay and TRP source in the substrate) was performed. The values of the 3 runs

were averaged before being used for each TRP source and proportion. The GLM procedure of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) was used. The model was

$$Y = \mu + \text{Source}_i + \text{Proportion}_j + e,$$

in which Y is the dependent variable, μ is the overall mean, and e is the error, i being the nature of the source (3 levels: *L. leucocephala*, *G. sepium* and *M. esculenta*) and j being the 5 levels of proportion: 0, 25, 50, 75 and 100% of the mixture of Ctl hay and TRP source in the substrate. Statistical differences were declared significant at $P \leq 0.05$.

In a second step, VFA and CH₄ production for all TRP and proportions were related to CT content of incubated substrates, determined either using quebracho extract or extracts from each TRP as standard. A covariance analysis was performed according to the model

$$Y = \mu + \text{Source}_i + a \text{ Tannins} + b_i \text{ Tannins} \times \text{Source}_i + e,$$

in which Y is the dependent variable, Tannins is the concentration in CT, Tannins \times Source is the interaction between tannin concentration and the source of TRP (*L. leucocephala*, *G. sepium*, or *M. esculenta*), μ is the overall mean, and e the error, a and b being the coefficients of the model, and i being the nature of the source (3 levels: *L. leucocephala*, *G. sepium* and *M. esculenta*). Statistical differences were declared significant at $P \leq 0.05$. Then, polynomial regressions were tested using the GLM procedure of SAS between VFA concentration and CH₄ as dependent variables and tannin concentration as independent variable according to the model $Y = a + b \text{ Tannins} + c \text{ Tannins}^2 + e$, a , b and c being the coefficients of the equation. To provide more accurate estimates, the nonsignificant term was removed from the model.

Animals and Experimental Design. The research was performed during the rainy season at the experimental animal station of the INRA of the French West Indies (Petit-Bourg, Guadeloupe). Two sheep breeds were used, Texel ($n = 4$) of temperate origin and Blackbelly ($n = 4$) of tropical origin, in two 4×4 Latin square designs, with 1 square per breed. Sheep were 2-yr-old rams. Their BW was 41.2 ± 3.9 kg for Texel and 51.2 ± 3.7 kg for Blackbelly sheep. Each was fitted with a ruminal cannula. Diets consisted of the same Ctl forage as in the in vitro study or in association with 3 treatments in which *L. leucocephala*, *G. sepium*, or *M. esculenta* were given as pellets at an average of 44% of the daily ration. Rams were adapted to each treatment for 21 d before ruminal sample collection and fed twice daily at 0700 and 1900 h. Animals had ad libitum access to forage. Rams were housed in a semiopen barn and had free access to water and salt block at all times.

Table 1. Oligonucleotides used as primers for PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and quantitative PCR (qPCR) analysis

Oligonucleotides	Oligonucleotide sequences	Target	Amplicon length, bp	Use in	Primer references
534R-	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG	<i>rrs</i> bacteria	193	PCR-DGGE	Muyzer et al., 1993
341f-GC	5'-(GC)-CC TAC GGG AGG CAG CAG				
<i>mcrAr</i>	5'-TTC ATT GCR TAG TTW GGR TAG TT	<i>mcrA</i> methanogens	460-490	PCR-DGGE	Luton et al., 2002
<i>mcrAf-GC</i>	5'-(GC)-GGT GGT GTM GGA TTC ACA CAR TAY GCW ACA GC				
<i>qmcA-R</i>	5'-GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC	<i>mcrA</i> methanogens	140	qPCR	Denman et al., 2007
<i>qmcA-F</i>	5'-TTCGGTGGATCDCARAGRGC				
799R2	5'-AACAGGATTAGATACCCTG	<i>rrs</i> bacteria	280	qPCR	Edwards et al., 2007
520F	5'-AGCAGCCCGCGTAAT				
FS586-f	5'-GTTCCGAATTACTGGGCGTAAA	<i>rrs Fibrobacter succinogenes</i>	121	qPCR	Denman and McSweeney, 2006
FS706-r	5'-CGCCTGCCCTGAACTATC				
RF96-f	5'-CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG	<i>rrs Ruminococcus flavefaciens</i>	132	qPCR	Denman and McSweeney, 2006
RF220-r	5'-CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC				
RA1281f	5'-CCC TAA AAG CAG TCT TAG TTC G	<i>rrs Ruminococcus albus</i>	175	qPCR	Koike and Kobayashi, 2001
RA1439r	5'-CCT CCT TGC GGT TAG AAC A				

Ruminal Sampling. Ruminal content (approximately 200 g) samples were collected just before and 3 h after the morning meal and strained through polyester monofilament fabric (250- μ m mesh aperture) to separate the liquid phase. The pH was immediately measured using a portable pH meter (CG837 Ag/AgCl electrode; Schott Geräte, Mainz, Germany). For VFA, ruminal fluid filtrate was collected and analysis was performed according to the above method.

For molecular analysis, approximately 30 g of ruminal content was diluted with 15 mL of ice-cold PBS (pH 6.8) and homogenized using a Polytron grinding mill (Kinematica GmbH, Steinhofhalde, Switzerland) for three 1-min cycles with 1-min intervals on ice. Approximately 0.5 g was transferred into 2-mL tubes and immediately stored at -80°C for DNA extraction. Three milliliters of ruminal fluid was added to 3 mL of methyl green formalin saline (MFS) solution (35 mL/L formaldehyde, 0.14 mM NaCl, and 0.92 mM methyl green) and stored in the dark at room temperature until protozoa were counted.

Deoxyribonucleic Acid Extraction and PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Total DNA was extracted from approximately 200 mg of frozen ruminal sample using the QIAamp DNA purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the protocol of Yu and Morrison (2004). The DNA concentration and quality were checked by the A260 and A280 absorbance ratio in a NanoQuant Plate on a spectrophotometer (Infinity; Tecan, Männedorf, Switzerland). The extracted DNA was diluted to 10 ng/ μ L and used as a template for PCR to amplify the *rrs* gene of total bacteria and the *mcrA* gene for methanogens group. The primers used are listed in Table 1. When PCR products were used for denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), forward primers included a guanine-cytosine clamp (approximately

40 nucleotides). All PCR reactions were performed in a T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) using the conditions described by Sadet et al. (2007) and Popova et al. (2011). Polymerase chain reaction products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gel (wt/vol) to check their size and estimate their concentration using a Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA).

For DGGE analysis, the amount of PCR product loaded on gels was adjusted to 100 ng for both bacterial *rrs* and methanogen *mcrA* genes. Gels had a 6 to 8 (wt/vol) polyacrylamide gradient and a denaturant gradient of 30 to 55% for *rrs* and 10 to 30% for *mcrA*. Electrophoresis was performed in 0.5x Tris - Acetic acid - EDTA buffer (TAE buffer 1x, 40 mM Tris base, 40 mM glacial acetic acid, and 1 mM EDTA) at 200 V and 60°C for 5 h. Gels were silver stained using a commercial kit (Bio-Rad Laboratories) and analyzed using GelCompar II (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Quantitative PCR. The quantitative PCR (qPCR) for total bacteria (*rrs* gene) and methanogens (*mcrA* gene) was accomplished according to Morgavi et al. (2013). The slope and efficiency for *rrs* and *mcrA* primers were -3.45 and 95.59% and -3.43 and 95.09% , respectively, with $R^2 > 0.99$ in both cases. The cellulolytic bacteria *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, and *Ruminococcus albus* were quantified with primers targeting the *rrs* gene (Koike and Kobayashi, 2001; Denman and McSweeney, 2006). The slope and efficiency for each primer pair was, respectively, -3.19 and 105.8% , -3.52 and 92.3% , and -3.54 and 91.5% . The qPCR efficiency with DNA samples was found to be similar to that obtained with the standard curves. For each ruminal content sample, results were expressed as the mean of 3 replicates in *rrs* or *mcrA* copies per gram of ruminal content.

Protozoa Counting. Ruminal fluid/MFS solutions were diluted in an equal volume of PBS before protozoa enumeration under a microscope (400x) in a Neubauer chamber (Dutscher, Brumath, France).

Statistical Analysis. Statistical analyses were performed using the mixed procedure of SAS with treatment, breed, treatment \times breed interaction, and period as fixed effects and animal within breed as random effect according to the model

$$Y = \mu + \text{treatment}_i + \text{breed}_j + \text{treatment} \times \text{breed}_{ij} + \text{period}_k + e.$$

i being the nature of treatment (4 levels: control, *L. leucocephala*, *G. sepium* and *M. esculenta*), j being the animal breed (2 levels, Texel and Blackbelly) and k being the period number (4 levels from 1 to 4)

Orthogonal contrasts were also determined, first between the Ctl diet vs. all TRP (*G. sepium*, *L. leucocephala*, and *M. esculenta*; contrast C1) and second between the Ctl diet and *L. leucocephala* and *M. esculenta* (contrast C2); this latter contrast was calculated because the tannin content of *G. sepium* is much less than that of *L. leucocephala* and *M. esculenta*. For total VFA and N-NH₃ concentrations, an additional analysis was made using DMI and digestible OM as covariate. Statistical differences were declared significant at $P \leq 0.05$.

RESULTS

Chemical Composition

The nutrient composition and tannin content of TRP are shown in Table 2. All the TRP had greater CP content than the Ctl, with the most CP in *L. leucocephala* and *G. sepium*. By contrast, NDF and ADF

Table 2. Chemical composition in grams per kilogram DM of control and tannin-rich plants¹

Item	Ctl	Ll	Gs	Me
OM	924	913	915	910
CP	108	266	262	208
NDF	764	387	387	430
ADF	402	252	283	345
Condensed tannins				
Using extracts from each plant as standard	NA ²	75	39	92
Using quebracho as standard	ND ²	89	18	53

¹Ctl = control (natural grassland hay); Ll = *Leucaena leucocephala*; Gs = *Gliricidia sepium*; Me = *Manihot esculenta*.

²NA = not analyzed; ND = not detected.

contents were less in TRP than in the Ctl. Condensed tannin content of the tested forages ranged from 39 to 92 g/kg DM with standards extracted from each plant and 18 to 89 g equivalent quebracho/kg DM; *L. leucocephala* and *M. esculenta* leaves had greater CT concentration than *G. sepium* leaves.

In Vitro Experiment

Differences in ruminal fermentation among treatments were monitored through the production of total gas and CH₄, VFA concentration, OM degradation, and N-NH₃ content (Table 3). Gas and CH₄ production at 24 h decreased significantly with TRP proportion ($P = 0.03$ and $P = 0.02$, respectively) but did not significantly depend on TRP source ($P = 0.07$ and $P = 0.08$, respectively). When the statistical model included CT concentration as covariate, there was no effect of TRP source for any parameter and the interaction between TRP source and CT was not significant. Figure 1 shows the regression between CH₄ for all TRP with standards extracted from each plant or with quebracho

Table 3. Ruminal fermentation characteristics of 24-h in vitro incubations of tannin-rich plants (TRP)¹

	Ctl		Ll			Gs				Me				SEM	P ²	
	0	25	50	75	100	25	50	75	100	25	50	75	100		Source	Prop.
Percent of TRP																
Gas, mL/24 h	66.2	60.0	59.1	56.3	54.5	65.3	64.1	60.7	64.6	65.9	56.9	53.0	48.2	3.68	0.07	0.03
CH ₄ , mL/24 h	18.1	15.7	15.4	13.2	12.4	16.8	16.7	15.6	17.3	17.2	14.7	13.8	12.5	1.28	0.08	0.02
Total VFA, mM	59.8	59.2	52.4	50.8	48.2	60.9	58.4	57.0	52.8	61.5	54.9	47.4	32.9	4.75	0.16	0.02
VFA, mol/100 mol																
Acetate	66.4	66.3	61.4	62.2	61.6	65.1	61.7	63.6	62.5	64.3	67.3	66.4	63.8	1.72	0.18	0.16
Propionate	20.4	20.3	21.2	20.8	20.1	20.7	21.0	20.0	20.1	20.2	17.9	17.2	16.4	1.04	0.02	0.34
Butyrate	6.4	6.2	7.3	7.3	7.8	6.7	7.5	6.8	7.0	7.3	7.3	7.4	8.3	0.37	0.20	0.02
Branched-chain VFA	4.0	4.2	6.2	5.8	6.1	4.4	6.0	5.9	6.2	5.0	4.7	5.3	6.7	0.50	0.88	0.003
Valerate	2.6	2.8	3.7	3.7	4.2	2.9	3.6	3.5	3.8	3.0	2.7	3.4	4.4	0.33	0.69	0.004
Acetate:propionate	3.3	3.3	2.9	3.0	3.0	3.2	3.0	3.2	3.1	3.2	3.8	4.0	4.0	0.28	0.03	0.86
N-NH ₃ , mg/L	16.9	19.5	20.9	19.6	21.4	20.8	21.6	23.2	21.7	23.1	18.5	22.0	20.9	1.39	0.43	0.02
FOM ³ , %	50.6	49.2	43.7	42.4	40.7	51.2	49.1	48.3	44.7	51.5	46.2	40.4	28.3	3.84	0.14	0.02

¹Ctl = control (natural grassland hay); Ll = *Leucaena leucocephala*; Gs = *Gliricidia sepium*; Me = *Manihot esculenta*.

²Probability of the effect of source of TRP (Source) and proportion of TRP (Prop.) in the fermented substrate.

³FOM = fermented OM.

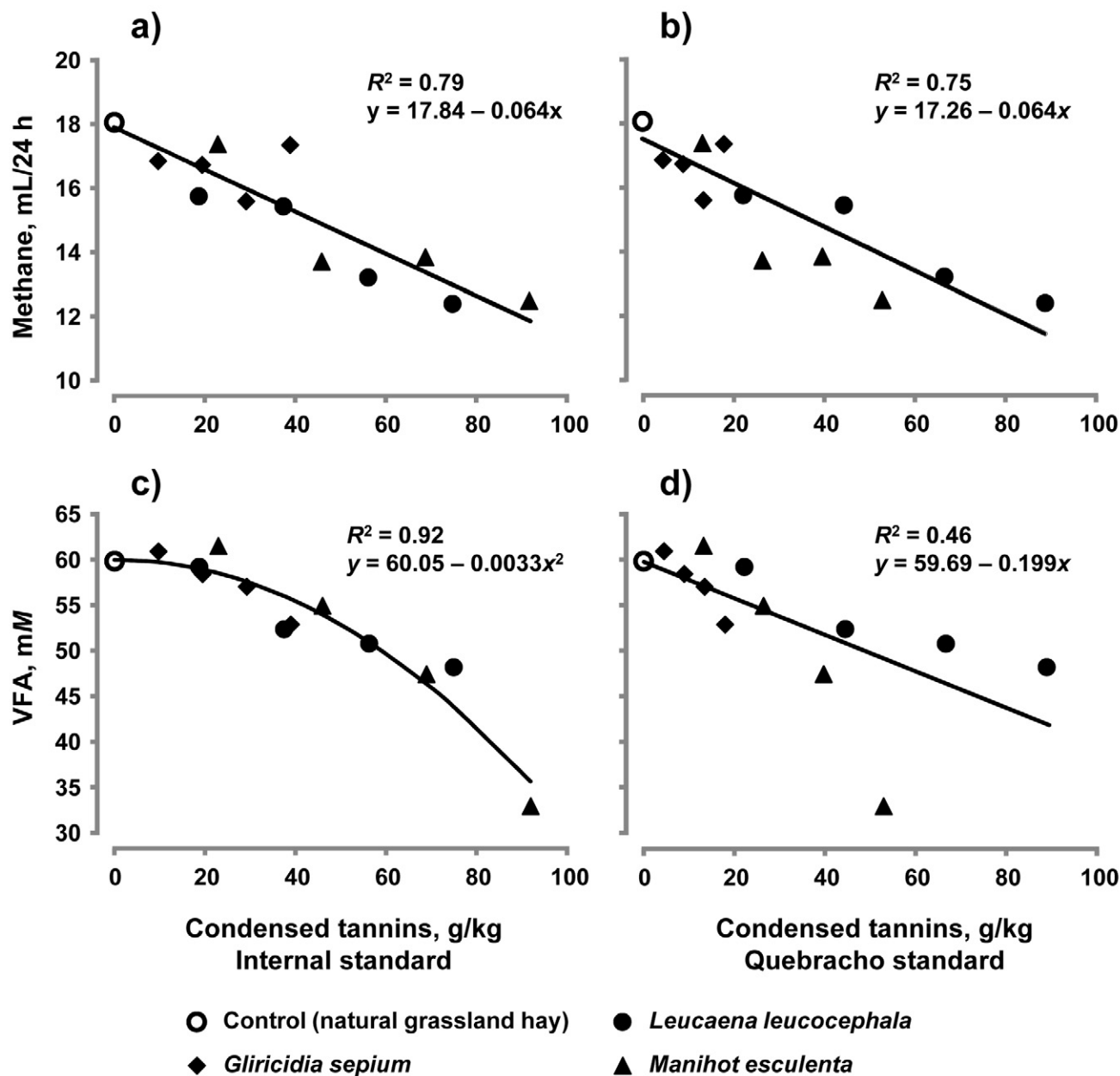


Figure 1. Correlation between methane production and VFA concentration and amount of condensed tannins in vitro. Condensed tannins were estimated using internal standards obtained from each tannin-rich plant (a and c) and using quebracho tannins as standard (b and d). All regressions are significant ($P < 0.0001$).

standard; both linear regressions are highly significant ($P < 0.0001$; $R^2 = 0.79$ and $R^2 = 0.75$, respectively). Quadratic terms of the regression were not significant.

Volatile fatty acid concentration, FOM, and N-NH₃ significantly decreased with TRP ($P = 0.02$) but did not significantly depend on TRP source ($P = 0.16$, $P = 0.14$, and $P = 0.43$, respectively). Neither acetate or propionate proportions nor acetate:propionate ratio varied with TRP proportion ($P = 0.16$, $P = 0.34$, and $P = 0.86$, respectively) with CT dose. However, propionate proportion and the acetate:propionate ratio varied with TRP source ($P = 0.02$ and $P = 0.03$, respectively), being lower and higher, respectively, for *M. esculenta* than for *G. sepium* and *L. leucocephala* (comparison

of means; data not shown). Butyrate, branched-chain VFA, and valerate proportions increased ($P = 0.02$, $P = 0.003$, and $P = 0.004$, respectively) with TRP proportion but did not vary with TRP source. When the statistical model included CT concentration as covariate, there was no effect of TRP source for any parameter and the interaction between TRP source and CT was not significant. Figure 1 shows the regression between VFA concentration and CT concentration for all TRP. When CT were expressed with standards extracted from each plant, the quadratic regression was significant ($P < 0.0001$, $R^2 = 0.92$). When CT were expressed with quebracho standards, the best fit was obtained by linear regression ($P = 0.01$, $R^2 = 0.46$).

Table 4. Dry matter intake, total tract OM digestibility, and ruminal fermentation characteristics before and after feeding in Texel and Blackbelly sheep fed control or tannin-rich diets¹

Item	Texel				Blackbelly				SEM	<i>P</i> -value ²			
	Ctl	L1	Gs	Me	Ctl	L1	Gs	Me		Breed	Trt	C1	C2
DMI, kg/d	0.63	1.00	0.85	1.01	0.85	1.29	1.29	1.57	0.10	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
OM digestibility, %	71.3	66.2	65.0	63.7	71.2	66.9	65.3	68.0	3.99	0.68	0.22	0.05	0.08
Fermentation before feeding													
pH	6.6	6.6	6.3	6.8	6.3	6.4	6.2	6.7	0.09	0.01	<0.001	0.54	0.06
Total VFA, mM	77.7	71.5	86.3	79.1	89.9	87.8	103.0	92.9	4.37	<0.001	0.02	0.37	0.77
VFA, mol/100 mol													
Acetate	74.8	72.4	75.2	74.2	74.0	72.2	72.7	74.4	0.60	0.21	0.03	0.04	0.02
Propionate	15.7	16.7	16.4	16.0	17.2	16.7	17.8	15.8	0.55	0.09	0.15	0.80	0.72
Butyrate	7.8	8.6	6.1	7.8	7.4	9.2	7.7	8.2	0.44	0.34	<0.001	0.15	<0.01
Branched-chain VFA	0.6	0.8	0.9	0.7	0.5	0.6	0.6	0.6	0.09	0.10	0.06	0.01	0.30
Valerate	0.5	0.6	0.5	0.5	0.4	0.6	0.6	0.5	0.05	0.87	0.06	0.02	0.05
Acetate:propionate	4.7	4.3	4.6	4.7	4.3	4.3	4.1	4.7	0.15	0.12	0.11	0.52	0.84
N-NH ₃ , mg/L	5.0	4.6	4.8	4.9	4.5	4.6	4.3	5.0	0.16	0.13	0.11	0.60	0.97
Fermentation 3 h after feeding													
pH	6.6	6.3	6.2	6.6	6.4	6.3	6.3	6.6	0.08	0.59	<0.001	0.03	0.37
Total VFA, mM	75.3	108.2	103.2	101.9	80.9	103.9	110.8	107.6	6.35	0.54	<0.001	<0.001	<0.001
VFA, mol/100 mol													
Acetate	74.6	70.4	73.3	70.4	73.0	70.8	71.4	71.6	0.81	0.57	<0.001	0.001	<0.001
Propionate	15.5	20.1	19.0	17.6	17.0	18.8	19.1	17.1	0.66	0.95	<0.001	0.001	<0.001
Butyrate	8.5	7.7	6.0	10.5	8.4	8.8	8.1	10.2	0.44	0.18	<0.001	0.75	0.02
Branched-chain VFA	0.4	0.4	0.5	0.3	0.5	0.3	0.3	0.3	0.08	0.41	0.09	0.51	0.23
Valerate	0.6	1.0	0.7	0.7	0.6	0.8	0.7	0.6	0.08	0.56	0.01	0.05	0.03
Acetate:propionate	4.8	3.5	3.9	4.0	4.3	3.8	3.8	4.2	0.18	0.81	<0.001	<0.001	<0.001
N-NH ₃ , mg/L	7.2	7.2	7.2	4.3	4.8	3.6	4.0	6.0	1.50	0.09	0.95	0.62	0.59

¹Ctl = control (natural grassland hay); L1 = *Leucaena leucocephala*; Gs = *Gliricidia sepium*; Me = *Manihot esculenta*.

²Treatment × breed interaction was nonsignificant for all variables. Trt = treatment. Tannin-rich diets consisted of 44% leaf pellets of tannin-rich plants and 56% of the Ctl. C1 = Ctl vs. L1, Me, and Gs; C2 = Ctl vs. L1 and Me

In Vivo Experiment

Ruminal Fermentation Characteristics. Ruminal fermentation characteristics of Texel and Blackbelly sheep fed TRP are shown in Table 4. Ruminal pH was greater ($P = 0.01$) for Texel than for Blackbelly before feeding but was not different 3 h after feeding ($P = 0.59$). Volatile fatty acid concentration was greater in TRP diets than for the Ctl diet before and 3 h after feeding ($P = 0.02$ and $P < 0.001$, respectively). When DMI and digestible OM were included as covariates, the effects of TRP on VFA concentration before and after feeding were not modified: covariates were not significant and treatment effect remained significant ($P = 0.02$ before feeding for both covariates and $P = 0.03$ and $P < 0.01$ after feeding when DMI and digestible OM were taken as covariates, respectively). Before feeding, the percentage of propionate and the acetate:propionate ratio did not vary among diets ($P = 0.15$ and $P = 0.11$, respectively), the percentage of acetate decreased ($P = 0.03$), and the percentage of butyrate increased ($P < 0.001$) in TRP diets. By contrast, the percentage of acetate and the acetate:propionate ratio decreased after feeding ($P < 0.001$) whereas that

of propionate and butyrate increased ($P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively) with diets containing TRP. No changes occurred in the percentage of branched-chain VFA before or after feeding ($P = 0.06$ and $P = 0.09$, respectively). Blackbelly sheep had greater total VFA concentration before feeding than Texel sheep ($P < 0.01$) whereas no significant difference among breeds was observed for other parameters before feeding and for any parameter after feeding. When DMI and digestible OM were included as covariates, the effect was unchanged: covariates were not significant and breed effect remained significant before feeding ($P = 0.03$ and $P = 0.02$ for DMI and digestible OM, respectively) and nonsignificant after feeding. In this study, TRP had no effect on N-NH₃ concentrations before or after feeding ($P = 0.11$ and $P = 0.95$, respectively); no effect of breed was observed before or after feeding ($P = 0.13$ and $P = 0.09$, respectively).

Microbial Populations. Results of qPCR amplification of the bacterial *rrs* and archaeal *mcrA* gene copies are summarized in Table 5. Concentration of bacterial *rrs* copies was significantly affected by CT ($P = 0.04$), but this effect did not seem to be related

Table 5. Abundance of total and fibrolytic bacteria and total methanogens determined by quantitative PCR in the rumen of Texel and Blackbelly sheep fed control or tannin-rich diets¹

Item	Texel				Blackbelly				SEM	P-value ²			
	Ctl	Ll	Gs	Me	Ctl	Ll	Gs	Me		Breed	Trt	C1	C2
Total bacteria ³	11.91	11.90	11.80	11.84	11.89	11.96	11.85	11.81	0.041	0.71	0.038	0.24	0.53
<i>Fibrobacter succinogenes</i> ³	9.71	9.79	9.61	9.72	9.67	9.85	9.64	9.68	0.079	0.99	0.14	0.69	0.32
<i>Ruminococcus albus</i> ³	8.00	8.79	8.33	8.49	7.60	8.42	8.34	8.16	0.261	0.19	0.046	0.01	<0.01
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> ³	8.96	8.71	8.53	8.65	8.94	9.03	8.67	8.85	0.154	0.37	0.049	0.047	0.19
Methanogens ⁴	10.00	9.85	9.72	9.84	9.76	9.71	9.70	9.74	0.082	0.04	0.25	0.09	0.19

¹Ctl = control (natural grassland hay); Ll = *Leucaena leucocephala*; Gs = *Gliricidia sepium*; Me = *Manihot esculenta*.

²Treatment × breed interaction was nonsignificant for all variables. Trt = treatment. Tannin-rich diets consisted of 44% leaf pellets of tannin-rich plants and 56% of the Ctl. C1 = Ctl vs. Ll, Me, and Gs; C2 = Ctl vs. Ll and Me.

³*rrs* copy number per gram DM (log₁₀).

⁴*mcrA* copy number per gram DM (log₁₀).

to the presence of CT, as the same effect was not observed for other TRP ($P = 0.24$ and $P = 0.53$ for contrasts C1 and C2, respectively). The effect of TRP on fibrolytic bacteria depended on the species: *R. albus* number was greater ($P = 0.046$) while *R. flavefaciens* number was less ($P = 0.049$) for TRP diets compared with the Ctl diet. The number of *F. succinogenes* were not changed ($P = 0.13$) by TRP. No breed effect was recorded for these bacterial groups ($P = 0.19$, $P = 0.37$, and $P = 0.99$, respectively). Methanogens number did not depend on the presence of TRP in the diet ($P = 0.25$) but was lower for Blackbelly than for Texel ($P = 0.04$).

No differences for bacterial and methanogenic community structures, as analyzed by DGGE, were induced by the TRP diets (data not shown). Bacterial communities clustered by breed (data not shown), but Shannon, Evenness, and Dominance diversity indices, calculated from the *rrs* PCR-DGGE profiles, did not differ ($P = 0.24$, $P = 0.23$, and $P = 0.13$, respectively) between the Ctl and TRP diets (Table 6). No effect ($P = 0.56$, $P = 0.87$, and $P = 0.76$, respectively) on diversity was observed for methanogens calculated from *mcrA* DNA PCR-DGGE profiles.

Contrasting with the absence of effect of diets, the bacterial diversity indices differed between breeds: the Shannon and Evenness indices were greater ($P < 0.0001$ and $P = 0.01$, respectively) for Blackbelly than for Texel while the Dominance index was less ($P < 0.0001$) for Blackbelly. The opposite occurred for methanogens, where Shannon and Evenness indices were greater ($P < 0.0001$ and $P < 0.0005$, respectively) for Texel and the Dominance index was greater ($P < 0.0001$) for Blackbelly.

Total protozoal numbers did not vary among diets before and after feeding ($P = 0.18$ and $P = 0.24$, respectively; Table 7). Large entodiniomorphs (>100 μm) were less ($P < 0.01$) for TRP diets than for the Ctl diet. *Isotricha* spp. were more abundant after feeding for TRP diets than for the Ctl diet, which had the least amount ($P = 0.005$). Small entodiniomorphs (<100 μm) and *Dasytricha* spp. populations were not different among diets before and after feeding for small entodiniomorphs and for *Dasytricha* spp. Breed effect was not significant for total protozoa ($P = 0.94$ and $P = 0.67$ before and after feeding, respectively) and for the different protozoal classes.

Table 6. Diversity indices calculated from denaturing gradient gel electrophoresis profiles of total bacteria and methanogens in the rumen of Texel or Blackbelly sheep fed control or tannin-rich diets¹

Item	Texel				Blackbelly				SEM	P-value ²			
	Ctl	Ll	Gs	Me	Ctl	Ll	Gs	Me		Breed	Trt	C1	C2
Total bacteria													
Shannon	1.43	1.50	1.45	1.48	1.60	1.57	1.59	1.71	0.044	<0.0001	0.24	0.29	0.68
Evenness	0.90	0.91	0.92	0.92	0.93	0.94	0.94	1.00	0.032	0.01	0.23	0.21	0.53
Dominance	0.05	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.040	<0.0001	0.13	0.02	0.02
Methanogens													
Shannon	1.14	1.15	1.15	1.13	0.94	1.00	0.95	0.98	0.028	<0.0001	0.56	0.35	0.31
Evenness	0.93	0.92	0.93	0.90	0.84	0.86	0.83	0.84	0.026	0.0005	0.87	0.74	0.90
Dominance	0.08	0.08	0.08	0.09	0.15	0.13	0.15	0.15	0.014	<0.0001	0.76	0.70	0.56

¹Ctl = control (natural grassland hay); Ll = *Leucaena leucocephala*; Gs = *Gliricidia sepium*; Me = *Manihot esculenta*.

²Treatment effect and treatment × breed interaction were nonsignificant for all variables. Trt = treatment. Tannin-rich diets consisted of 44% leaf pellets of tannin-rich plants and 56% of the Ctl. C1 = Ctl vs. Ll, Me, and Gs; C2 = Ctl vs. Ll and Me.

Table 7. Abundance of ruminal protozoa (log₁₀ cells/mL) in the rumen of Texel or Blackbelly sheep fed control or tannin-rich diets¹

Item	Texel				Blackbelly				SEM	P-value ²			
	Ctl	Ll	Gs	Me	Ctl	Ll	Gs	Me		Breed	Trt	C1	C2
Before feeding													
Total protozoa	4.97	5.02	4.99	5.09	4.95	5.05	5.05	5.01	0.043	0.94	0.18	0.04	0.03
Entodiniomorphs < 100 µm	4.93	4.98	4.96	5.06	4.92	5.01	5.01	4.97	0.047	0.90	0.25	0.06	0.06
Entodiniomorphs > 100 µm	3.52	3.44	3.18	3.35	3.40	3.21	3.13	3.36	0.081	0.10	<0.01	<0.01	0.09
<i>Isotricha</i> spp.	2.20	2.77	2.85	2.77	1.99	1.65	2.41	2.07	0.366	0.18	0.21	0.14	0.35
<i>Dasytricha</i> spp.	3.60	3.60	3.45	3.74	3.35	3.93	3.45	3.69	0.145	0.92	0.10	0.15	0.04
3 h after feeding													
Total protozoa	4.92	4.84	4.97	4.90	4.83	4.92	4.94	4.89	0.042	0.67	0.24	0.32	0.76
Entodiniomorphs < 100 µm	4.87	4.79	4.95	4.85	4.78	4.87	4.90	4.84	0.049	0.63	0.19	0.36	0.87
Entodiniomorphs > 100 µm	3.45	3.01	3.11	3.20	3.24	3.12	3.04	3.12	0.084	0.30	0.011	<0.01	<0.01
<i>Isotricha</i> spp.	2.47	3.12	2.91	3.06	1.64	2.59	2.03	2.56	0.380	0.20	0.005	<0.01	<0.001
<i>Dasytricha</i> spp.	3.68	3.66	3.46	3.81	3.67	3.97	2.90	3.73	0.345	0.72	0.27	0.76	0.68

¹Ctl = control (natural grassland hay); Ll = *Leucaena leucocephala*; Gs = *Gliricidia sepium*; Me = *Manihot esculenta*.

²Treatment × breed interaction was nonsignificant for all variables. Trt = treatment. Tannin-rich diets consisted of 44% leaf pellets of tannin-rich plants and 56% of the Ctl. C1 = Ctl vs. Ll, Me, and Gs; C2 = Ctl vs. Ll and Me.

DISCUSSION

Fiber and CP content of forages used in this study were in the range of values reported by other authors (Assoumaya et al., 2007). However, more variation was observed for CT concentration. For *L. leucocephala*, our results were in the range of published data, but Longo et al. (2012) and Soltan et al. (2013), for example, reported CT contents less than the current study (56 and 23 g/kg DM, respectively); *Gliricidia* spp. CT content is variable and can range between 0.5 (Bhatta et al., 2012) and 83 g/kg DM (Foroughbakhch et al., 2012). In the current study, *M. esculenta* was rich in CT, contrary to studies by Jayanegara et al. (2011) and Marie-Magdeleine et al. (2010), who reported less CT content (4 and 40 g/kg DM, respectively) for the same species. Tannin accumulation is affected by factors such as cultivar, plant maturity, phenological stage, seasonal variations, and soil properties, which also determine degree of tannin polymerization (Waghorn, 2008). In addition, the increased temperature that characterizes the tropics is also directly associated with increased concentrations of secondary compounds in plants. This may result in differences in biological activity among species.

Relationship between Tannins and CH₄ Production

The use of tropical TRP in ruminant diets is considered a promising way to reduce CH₄ production (Jayanegara et al., 2012). Decreased CH₄ production observed in the present study when 3 tropical TRP were used in vitro, especially for *L. leucocephala* and *M. esculenta*, confirmed results reported from in vivo data with the same forages given at 44% of DM diet (31.0 and 22.2

g CH₄/kg DMI for the Ctl and TRP diets, on average; Rira et al., 2013). These results are consistent with most published results (Jayanegara et al., 2012). Soltan et al. (2013) showed that tropical forages, *L. leucocephala* among others, inhibit CH₄ production both in vitro and in vivo. Soliva et al. (2008) reported that *G. sepium* was not very effective at reducing CH₄ production. The weak CH₄ reduction induced by *G. sepium* seems to be linked to its reduced CT content. The current study shows for the first time a strong antimethanogenic action of *M. esculenta*, at variance with the results of Jayanegara et al. (2011). However, in this latter study, CT content was very small. In contrast to the current results, Bhatta et al. (2012) reported that leaves of *L. leucocephala* and *Gliricidia maculata*, a variety close to *G. sepium*, were not effective at reducing CH₄ in vitro. Most divergences with the current results are probably due to a difference in CT content of TRP. Another source of variation that should be taken into account when comparing results from different authors is the method used to quantify CT (Makkar, 2003b). More generally, studies using small to moderate tannin doses did not result in decreased CH₄ production (Beauchemin et al. [2007], with 20 g/kg DM quebracho tannin extract).

The current study used dose–response experiments to determine whether the relationship between CT content and CH₄ production was dose dependent and whether there were minimal and maximal threshold concentrations. In the in vitro study, CH₄ production linearly decreased as the amount of CT increased. This was observed for each TRP as their proportion increased but also when CH₄ production for all the treatments was plotted against CT concentration (Fig. 1). This suggests that CT is at least partially responsible

for this effect, consistent with Huang et al. (2010), who reported linear decreases in CH₄ production with increasing amount of CT in the range of 0 to 50 mg CT/g DM from *L. leucocephala*. A negative correlation was also found between the tannin content and CH₄ production when several sources were plotted, indicating that CH₄ production consistently declined as the CT content increased (Jayanegara et al., 2011). Similarly, Tan et al. (2011) reported a linear and quadratic decrease in total gas and CH₄ production with increasing CT contents from *L. leucocephala*. The same effect was observed by Hess et al. (2006) using a tropical TRP, with only a linear effect. Taken together, these results show the absence of a minimum threshold and a major effect of CT content on CH₄ production. It is often considered that factors other than tannin content may also be responsible for CT effects on ruminal CH₄ production, such as the diversity of CT related to their different chemical structures and activities. Several authors have emphasized that tannin effects should be considered not only by the amount present but also by the size and weight of molecules (Patra and Saxena, 2009; Huang et al., 2010), the number of linkage sites (Mueller-Harvey, 2006), and interaction with other compounds (fiber, proteins, and other secondary metabolites). In line with these hypotheses, Huang et al. (2011) showed with *L. leucocephala* that heavier molecular weight fractions of CT had a greater inhibitory effect on CH₄ production in vitro. Despite this reported effect of the nature of tannins, this work showed that, at least for the 3 TRP studied, CT content is the major driver of changes in fermentation. In addition, we demonstrated that the use of internal standards for CT quantification instead of a common standard improved the relationship between CT content and production of methane and concentration of VFA. Large differences in CT quantification induced by the choice of standards had been shown for 6 TRP including *M. esculenta* and *G. sepium* by Giner-Chavez et al. (1997). Another possible reason for CH₄ decrease may be the decreased NDF content of TRP compared with control forages, which is confounded with the tannin effect and may mask it (Johnson and Johnson, 1995). The positive relationship between cell wall components and in vivo production of CH₄ has already been discussed by many authors (Martin et al., 2010). Hence, reduction in CH₄ production with TRP is attributable not only to CT but could be due in part to differences in other feed composition characteristics.

Relationship with N-NH₃ and VFA Concentration

Ruminal N-NH₃ concentration generally tends to decrease with CT inclusion in the diet. In vitro conditions, Sallam et al. (2010) and Soltan et al. (2013)

showed a decrease in N-NH₃ concentration with *L. leucocephala*. For the current study, in vitro results are not consistent with this tendency and showed an increase in N-NH₃ concentration, confirmed by the increase in branched-chain VFA originating from branched-chain AA. Differences among experiments may be due to differences in incubation conditions, because in vitro N-NH₃ concentration reflects the balance between protein degradation and synthesis and is not easy to interpret.

The current in vitro results were not consistent with the in vivo results. In the latter, N-NH₃ was not impacted by supplementation with TRP, which agrees with in vivo results found by Norrapoke et al. (2012) and Anantasook et al. (2013) with different TRP. There is general agreement that tannins decrease microbial protein degradation, mainly through the formation of tannin-protein complexes, which helps to decrease N-NH₃ concentration. However, in a review, Reed (1995) suggested that CT may 1) increase efficiency of N recycling to the rumen by decreasing ruminal N-NH₃ concentration and promoting urea influx into the rumen and 2) increase the glycoprotein content of saliva and stimulate saliva production, which could, in turn, increase N recycled to the rumen. Therefore, the CT amount in the in vivo experiment may have impacted N recycling, contributing to the lack of a negative effect of CT on ruminal N-NH₃. Another hypothesis is that in the current in vivo experiment, DMI increased in TRP diets (16.5 and 25.8 kg/d for the Ctl and TRP diets, on average; Rira et al., 2013), resulting in a greater concentration of N-NH₃.

A decrease in CH₄ production due to dietary changes can be due to a decrease in the extent of carbohydrate fermentation, and thus VFA production, and/or to a shift of the VFA pattern toward propionate. In the current study, increasing CT amount decreased in vitro total VFA concentration. However, the response of VFA to CT concentration was quadratic whereas the response of CH₄ was linear. This suggests that the mode of action of CT on methanogenesis may differ at low concentrations and at greater concentrations. The effects of CT on ruminal total VFA concentration and VFA pattern vary among studies, depending on CT dose and source. Other studies report that feeding TRP to ruminants reduces total VFA production (Goel and Makkar, 2012). This has been shown especially with tropical forages such as *L. leucocephala* and *G. sepium* (Tan et al., 2011; Bhatta et al., 2012). Soltan et al. (2012) reported a decrease in acetate:propionate ratio, together with increasing propionate with *L. leucocephala*. The dose-dependent decrease of total VFA observed in the current study when TRP were included in the diet is in agreement with a previous study on the dose-response effect of tannins (Getachew et al., 2008). In ad-

dition to the specific effect of CT, the decrease of VFA concentration could also be due to the presence of other secondary metabolites that interact with the CT and can negatively affect VFA concentrations. The tested plants grew in tropical environments where weather conditions (especially heat) favor the synthesis of numerous secondary metabolites such as saponins or essential oils, for example, saponins in *M. esculenta* leaves (Wobeto et al., 2007), which may potentially decrease CH₄ production (Martin et al., 2010). However, such compounds were not determined in our study.

A reduction of total VFA with CT supply was also expected in the current in vivo experiment, at least with *L. leucocephala* and *M. esculenta* because of their increased CT content, but an increase of total VFA with no change of VFA pattern was observed. The decrease of VFA concentration in vivo when TRP were included in the diet is the general trend (Beauchemin et al. [2007], with a quebracho tannin supplement), with no changes in the molar ratios of acetate, propionate, and butyrate (Waghorn and Shelton, 1997). Other in vivo studies with sheep (Priolo et al., 2000) and goats (Silanikove et al., 2006) reported that CT did not affect the VFA concentration in the rumen compared to animals receiving the same diets but supplemented with polyethylene glycol. Carulla et al. (2005) observed no change in total VFA concentration in sheep supplemented with *Acacia mearnsii* extract, but molar proportion of acetate decreased and that of propionate increased in sheep fed diets supplemented with CT, in line with a decrease in CH₄. To our knowledge, there are no in vivo data on VFA concentration for the 3 TRP that were used, so a specific effect of these plants cannot be shown. In the current experiment, the increase in VFA concentration with TRP supply may be due to an increased intake, probably because the TRP were dispensed as pellets. The increased total VFA concentration indicates that despite a reduction in CH₄ production, there was no inhibition of the fermentation. The VFA results also show a discrepancy between in vitro and in vivo conditions, a reminder that caution must be exercised with the interpretation and extrapolation of in vitro data: in vitro VFA concentration reflects production whereas in vivo VFA concentration reflects the balance of production, absorption, and outflow.

Relationship with OM Degradation

The reduction in total gas and CH₄ production in vitro may have been due to a decline in OM digestibility. Digestibility is clearly impaired by increasing amount of CT in many in vitro and in vivo studies. This may be associated with the property of tannins to form complexes with natural polymers such as proteins and carbohydrates

(Mueller-Harvey, 2006), which may therefore reduce their digestibility in the digestive tract of ruminants. In the leaves of trees such as *L. leucocephala* and *G. sepium*, tannins present in the NDF and ADF fractions are already tightly bound to cell walls and proteins, which reduces their digestibility (Makkar, 2003a).

These hypotheses were supported by the in vitro results, which showed a dose-dependent decrease in OM degradation. This was a consequence of VFA decrease, as it was calculated from VFA production. This agrees with Tan et al. (2011), who found a linear decrease of in vitro digestibility with increasing CT content. However, such a relationship is not observed in all experiments. For example, Huang et al. (2011) and Soltan et al. (2013) reported that the decline in CH₄ production with CT of *L. leucocephala* was not caused by a concomitant decrease in total-tract digestibility. Similarly, Carulla et al. (2005) found that an extract of *A. mearnsii* reduced CH₄ production by 12% without decreasing digestibility. The same result was observed in this study for in vivo digestibility measured with the same forages, suggesting that CH₄ mitigation is not simply the result of a reduced ruminal fermentation. However, the lower CH₄ production measured in vivo in this study (Rira et al., 2013) could also be due to a decrease in retention time in the rumen, suggested by the increased feed intake.

Effect on Rumen Microbial Populations

Plant secondary compounds such as CT can act against specific microbial groups so as to mitigate CH₄ production. Protozoa are important hydrogen producers, and reducing their numbers decreases CH₄ production (Guyader et al., 2014). In the current experiment, none of the TRP studied affected ruminal protozoal number. Effects of CT on protozoa are variable. In his review, Makkar (2003a) suggested that there is some evidence for decreased protozoal number in the presence of tannins. This has been confirmed by Animut et al. (2008), who found a linear decrease in protozoa numbers in goats fed various amount of CT-containing forage. By contrast, Carulla et al. (2005) observed that feeding tannins from *A. mearnsii* extract to sheep had no effects on total protozoal population. Similarly, Jayanegara and Palupi (2010) showed that the protozoal population was not affected by CT content in either in vitro or in vivo studies; this tendency was confirmed by the same authors in a meta-analysis that did not reveal any relationship between dietary tannins and protozoal populations (Jayanegara et al., 2012). Patra and Saxena (2009) suggested that the effect of CT on ruminal protozoal populations may depend on the type of plant and thus on the nature and concentration of tannins. To our knowledge,

the in vivo effect of *L. leucocephala*, *G. sepium*, and *M. esculenta* on protozoa has not been reported before, so it is difficult to make definitive conclusions. Sallam et al. (2010) observed a decrease in protozoa with *L. leucocephala*, but for an in vitro trial, and changes in microbial populations during in vitro incubations are difficult to interpret.

In the current study, the presence of CT in feed led to a decrease in total bacteria number without affecting the number of *F. succinogenes*. The population of *R. albus* was greater in the rumen of sheep when fed TRP; on the contrary, the number of *R. flavefaciens* decreased. Pilajun and Wanapat (2013) reported that supplementation with TRP did not change total bacterial number in swamp buffalo. However, other studies demonstrated that TRP reduced bacterial number (Patra and Saxena, 2009; Anantasook et al., 2013); more specifically, *F. succinogenes* was strongly reduced by *L. leucocephala* supply (Longo et al., 2013). The inhibitory activity of tannins against bacteria has been linked to the ability of tannins to form complexes with bacterial cell wall membranes causing morphological changes of the cell wall and secreted extracellular enzymes (Jones et al., 1994). In the current study, the decline of CH₄ production in the absence of any change in N-NH₃ concentration and OM degradation suggests that CT of forages may have a greater affinity for microbial protein than feed protein. Differences between the previous studies and the current study may be due to differences of diet, dose, and activity of tannins and environmental conditions.

The lack of any effect of CT-containing forages on protozoa and bacteria populations in the present study, together with a decrease in CH₄ production, suggest a direct effect of CT on methanogens, but no decrease in methanogen population was observed in the current study. The mitigating effect of tannins is often considered to be due to a decrease in methanogens, as several experiments have shown a decrease in methanogens when TRP are supplied (Tavendale et al., 2005; Animut et al., 2008). Nevertheless, several reports have shown no effect of TRP on methanogens (Norrappoke et al., 2012; Pilajun and Wanapat, 2013). An absence of toxic effect on methanogens when feeding TRP could be related to tannin-degrading enzymes and/or microbial extracellular secretions that reduce the tannin effect (Makkar, 2003a; Anantasook et al., 2013). More studies on methanogens resistance, tolerance, or adaptation to tannins are needed to characterize the causes of this effect. Longo et al. (2013) reported that methanogen populations decreased in the presence of TRP (*L. leucocephala*, among others) but recovered their initial value 24 h after the decrease. Several studies demonstrated that with prolonged tannin exposure, microorganisms develop ways to survive (Mlambo et al., 2007). In ad-

dition, action of CT on methanogens can be due to inhibition of either the population or their activity or both (Tavendale et al., 2005; Popova et al., 2011), and only methanogen amount was measured in the current study. The effect of CT on microbial populations depends on the relative affinity of CT for feed vs. microbial protein. The antimethanogenic activities of tannins may involve the tanning action of functional proteins (enzymes and coenzyme) located at accessible sites in methanogens (Pilajun and Wanapat, 2013). Supplementation with CT from forages showed that bacteria and methanogen diversity indices were not different from the Ctl. These results agree with Longo et al. (2013), who found that diversity indices of the methanogenic community did not change when *L. leucocephala* or other TRP were supplied. The absence of effects of CT on the microbial ecosystem may be due to putative changes in rumen outflow related to the dispensing of TRP as pellets.

Some of the differences in microbial populations among experiments may be due to differences in animal species or breeds. In the current study, a difference in methanogen population and bacterial and methanogen biodiversity between Texel and Blackbelly sheep was observed. King et al. (2011) reported a significant difference of methanogen population structure among Holstein and Jersey cattle, but a similarity of dominant archaeal populations was noted by Jeyanathan et al. (2011) between different ruminant species (sheep, cattle, and red deer). A few studies have found host species differences in the bacterial community of the rumen, but no study has compared the 2 breeds used in the current study.

In conclusion, CT from tropical forages showed, both in vitro and in vivo, a potential for mitigating CH₄ production by ruminants without noteworthy adverse effects on ruminal fermentation or in vivo digestibility. The dose–response relationship was linear, and for the 3 TRP studied, CT dose was the major factor for the response rather than the source of CT. The decreased CH₄ observed when TRP are added cannot be explained by changes of microbes that were minor; other analyses such as methanogen activity need to be performed. Interestingly, at low CT doses, the decrease in CH₄ is not accompanied by a decrease in VFA. Results from the in vivo study suggests that dietary CT from *L. leucocephala*, *M. esculenta*, and to a lesser extent from *G. sepium* in pellet form could be used to mitigate CH₄ production with no marked detrimental effects on other fermentative parameters. These findings are in line with other experiments showing that CT content of forages is a major determinant of their CH₄ production. Nevertheless, the development of the use of TRP in ruminant diets should take into consideration not only CH₄ production but also animal productivity.

LITERATURE CITED

- Anantasook, N., M. Wanapat, A. Cherdthong, and P. Gunun. 2013. Changes of microbial population in the rumen of dairy steers as influenced by plant containing tannins and saponins and roughage to concentrate ratio. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 26:1583–1591.
- Animut, G., R. Puchala, A. L. Goetsch, A. K. Patra, T. Sahlu, V. H. Varel, and J. Wells. 2008. Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. *Anim. Feed Sci. Technol.* 144:212–227.
- Archimède, H., M. Eugène, C. Marie-Magdeleine, M. Boval, C. Martin, D. P. Morgavi, P. Lecomte, and M. Doreau. 2011. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166:59–64.
- Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Assoumaya, C., D. Sauvart, and H. Archimède. 2007. Etude comparative de l'ingestion et de la digestion des fourrages tropicaux et tempérés. (In French.) *INRA Prod. Anim.* 20:383–392.
- Beauchemin, K. A., S. M. McGinn, T. F. Martinez, and T. A. McAllister. 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 85:1990–1996.
- Bhatta, R., M. Saravanan, L. Baruah, and K. T. Sampath. 2012. Nutrient content, in vitro ruminal fermentation characteristics and methane reduction potential of tropical tannin-containing leaves. *J. Sci. Food Agric.* 92:2929–2935.
- Canadian Council on Animal Care. 1993. Guide to the care and use of experimental animals. Vol. 1. 2nd ed. Can. Council. Anim. Care, Ottawa, Canada.
- Carulla, J. E., M. Kreuzer, A. Machmüller, and H. D. Hess. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 56:961–970.
- Demeyer, D. I., and C. J. Van Nevel. 1975. Methanogenesis, an integrated part of carbohydrate fermentation and its control. In: I. W. McDonald and A. C. I. Warner, editors, *Digestion and metabolism in the ruminant*. University of New England, Armidale, NSW, Australia. p. 366–382.
- Denman, S. E., and C. S. McSweeney. 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58:572–582.
- Denman, S. E., N. W. Tomkins, and C. S. McSweeney. 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62:313–322.
- Edwards, J. E., S. A. Huws, E. J. Kim, and A. H. Kingston-Smith. 2007. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62:323–335.
- Foroughbakhch, P. R., A. Carrillo Parra, A. Rocha Estrada, M. A. Alvarado Vazquez, and M. L. Cardenas Avila. 2012. Nutrient content and in vitro dry matter digestibility of *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp. and *Leucaena leucocephala* (Lam. De Wit.). *J. Anim. Vet. Adv.* 11:1708–1712.
- Gerber, P. J., H. Steinfeld, B. Henderson, A. Mottet, C. Opio, J. Dijkman, A. Falucci, and G. Tempio. 2013. Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy.
- Getachew, G., W. Pittroff, D. H. Putnam, A. Dandekar, S. Goyal, and E. J. DePeters. 2008. The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on in vitro rumen fermentation and microbial protein synthesis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 140:444–461.
- Giner-Chavez, B. I., P. J. Van Soest, J. B. Robertson, C. Lascano, J. D. Reed, and A. N. Pell. 1997. A method for isolating condensed tannins from crude plant extracts with trivalent ytterbium. *J. Sci. Food Agric.* 74:359–368.
- Goel, G., and H. P. S. Makkar. 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Trop. Anim. Health Prod.* 44:729–739.
- Goering, H. K., and P. J. Van Soest. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). *Agric. Handbook No. 379*. ARS-USDA, Washington, DC.
- Guyader, J., M. Eugène, P. Nozière, D. P. Morgavi, M. Doreau, and C. Martin. 2014. Influence of rumen protozoa on methane emissions in ruminants: A meta-analysis approach. *Animal* 8:1816–1825.
- Hess, H. D., T. T. Tiemann, F. Noto, J. E. Carulla, and M. Kreuzer. 2006. Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock. *Int. Congr. Ser.* 1293:164–167.
- Huang, X. D., J. B. Liang, H. Y. Tan, R. Yahya, and Y. W. Ho. 2011. Effects of *Leucaena* condensed tannins of differing molecular weights on in vitro CH₄ production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167:373–376.
- Huang, X. D., J. B. Liang, H. Y. Tan, R. Yahya, B. Khamseckhiew, and Y. W. Ho. 2010. Molecular weight and protein binding affinity of *Leucaena* condensed tannins and their effects on in vitro fermentation parameters. *Anim. Feed Sci. Technol.* 159:81–87.
- Jayanegara, A., F. Leiber, and M. Kreuzer. 2012. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 96:365–375.
- Jayanegara, A., and E. Palupi. 2010. Condensed tannin effects on nitrogen digestion in ruminants: A meta-analysis from in vitro and in vivo studies. *Media Peternakan* 33:176–181.
- Jayanegara, A., E. Wina, C. R. Soliva, S. Marquardt, M. Kreuzer, and F. Leiber. 2011. Dependence of forage quality and methanogenic potential of tropical plants on their phenolic fractions as determined by principal component analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 163:231–243.
- Jeyanathan, J., M. Kirs, R. S. Ronimus, S. O. Hoskin, and P. H. Janssen. 2011. Methanogen community structure in the rumens of farmed sheep, cattle and red deer fed different diets. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76:311–326.
- Johnson, K. A., and D. E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73:2483–2492.
- Jones, G., T. McAllister, K. Cheng, and A. Muir. 1994. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop) on growth and proteolysis by 4 strains of rumen bacteria: Resistance of *Prevotella* (*Bacteroides*) *ruminicola* B14. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1374–1378.
- King, E. E., R. P. Smith, B. St-Pierre, and A. D. G. Wright. 2011. Differences in the rumen methanogen populations of lactating Jersey and Holstein dairy cows under the same diet regimen. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:5682–5687.
- Koike, S., and Y. Kobayashi. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204:361–366.
- Laurent, S. 1975. Etude comparative de différentes méthodes d'extraction et de dosage des tannins chez quelques ptéridophytes. (In French.) *Arch. Physiol. Biochem.* 83:735–752.

- Longo, C., A. L. Abdalla, J. Liebich, I. Janzik, J. Hummel, P. S. Correa, K. H. Südekum, and P. Burauel. 2013. Evaluation of the effects of tropical tanniferous plants on rumen microbiota using qRT PCR and DGGE analysis. *Czech J. Anim. Sci.* 58:106–116.
- Longo, C., J. Hummel, J. Liebich, I. C. S. Bueno, P. Burauel, E. J. Ambrosano, A. L. Abdalla, U. Y. Anele, and K. H. Südekum. 2012. Chemical characterization and in vitro biological activity of four tropical legumes, *Stylobolium aterrimum* L., *Stylobolium deeringianum*, *Leucaena leucocephala*, and *Mimosa caesalpiniae*, as compared with a tropical grass, *Cynodon* spp. for the use in ruminant diets. *Czech J. Anim. Sci.* 57:255–264.
- Luton, P. E., J. M. Wayne, R. J. Sharp, and P. W. Riley. 2002. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148:3521–3530.
- Makkar, H. P. S. 2003a. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Rumin. Res.* 49:241–256.
- Makkar, H. P. S. 2003b. Quantification of tannins in tree and shrub foliage: A laboratory analysis. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Marie-Magdeleine, C., M. Mahieu, L. Philibert, P. Despois, and H. Archimède. 2010. Effect of cassava (*Manihot esculenta*) foliage on nutrition, parasite infection and growth of lambs. *Small Rumin. Res.* 93:10–18.
- Martin, C., D. P. Morgavi, and M. Doreau. 2010. Methane mitigation in ruminants: From microbe to the farm scale. *Animal* 4:351–365.
- Mlambo, V., J. L. N. Sikosana, F. L. Mould, T. Smith, E. Owen, and I. Mueller-Harvey. 2007. The effectiveness of adapted rumen fluid versus PEG to ferment tannin-containing substrates in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136:128–136.
- Morgavi, D. P., C. Martin, and H. Boudra. 2013. Fungal secondary metabolites from *Monascus* spp. reduce rumen methane production in vitro and in vivo. *J. Anim. Sci.* 91:848–860.
- Mueller-Harvey, I. 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 86:2010–2037.
- Muyzer, G., E. C. De Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695–700.
- Norrapoke, T., M. Wanapat, and S. Wanapat. 2012. Effects of protein level and mangosteen peel pellets (Mago-pel) in concentrate diets on rumen fermentation and milk production in lactating dairy crossbreds. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 25:971–979.
- Patra, A. K., and J. Saxena. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: A review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek* 96:363–375.
- Pilajun, R., and M. Wanapat. 2013. Microbial population in the rumen of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) as influenced by coconut oil and mangosteen peel supplementation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97:439–445.
- Popova, M., C. Martin, M. Eugène, M. M. Mialon, M. Doreau, and D. P. Morgavi. 2011. Effect of fibre-and starch-rich finishing diets on methanogenic Archaea diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166:113–121.
- Priolo, A., G. Waghorn, M. Lanza, L. Biondi, and P. Pennisi. 2000. Polyethylene glycol as a means for reducing the impact of condensed tannins in carob pulp: Effects on lamb growth performance and meat quality. *J. Anim. Sci.* 78:810–816.
- Reed, J. D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Anim. Sci.* 73:1516–1528.
- Rira, M., C. Marie-Magdeleine, H. Archimède, D. P. Morgavi, and M. Doreau. 2013. Effect of condensed tannins on methane emission and ruminal microbial populations. In: J. W. Oltjen, E. Kebreab, and H. Lapierre, editors, Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands. p. 501–502.
- Sadet, S., C. Martin, B. Meunier, and D. P. Morgavi. 2007. PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal* 1:939–944.
- Sallam, S. M. A. H., I. C. S. Bueno, P. B. Godoy, E. F. Nozella, D. M. S. S. Vitti, and A. L. Abdalla. 2010. Ruminant fermentation and tannins bioactivity of some browses using a semi-automated gas production technique. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 12:1–10.
- Silanikove, N., S. Landau, D. Or, D. Kababya, I. Bruckental, and Z. Nitsan. 2006. Analytical approach and effects of condensed tannins in carob pods (*Ceratonia siliqua*) on feed intake, digestive and metabolic responses of kids. *Livest. Sci.* 99:29–38.
- Soliva, C. R., A. B. Zeleke, C. Clément, H. D. Hess, V. Fievez, and M. Kreuzer. 2008. In vitro screening of various tropical foliages, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147:53–71.
- Soltan, Y., A. S. Morsy, S. M. A. Sallam, H. Louvandini, and A. L. Abdalla. 2012. Comparative in vitro evaluation of forage legumes (prosopis, acacia, atriplex, and leucaena) on ruminal fermentation and methanogenesis. *J. Anim. Feed Sci.* 21:759–772.
- Soltan, Y., A. S. Morsy, S. M. A. Sallam, R. C. Lucas, H. Louvandini, M. Kreuzer, and A. L. Abdalla. 2013. Contribution of condensed tannins and mimosine to the methane mitigation caused by feeding *Leucaena leucocephala*. *Arch. Anim. Nutr.* 67:169–184.
- Tan, H. Y., C. C. Siao, N. Abdullah, J. B. Liang, X. D. Huang, and Y. W. Ho. 2011. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 169:185–193.
- Tavendale, M. H., L. P. Meagher, D. Pacheco, N. Walker, G. T. Attwood, and S. Sivakumaran. 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123:403–419.
- Waghorn, G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147:116–139.
- Waghorn, G., and I. Shelton. 1997. Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on the nutritive value of pasture for sheep. *J. Agric. Sci.* 128:365–372.
- Weatherburn, M. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39:971–974.
- Wobeto, C., A. D. Corrêa, C. M. P. De Abreu, C. D. Dos Santos, and H. V. Pereira. 2007. Antinutrients in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaf powder at three ages of the plant. *Cienc. Tecnol. Aliment. (Campinas, Braz.)* 27:108–112.
- Yu, Z., and M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* 36:808–813.

**Chapitre 4 : Effet de la nature des tanins, condensés
ou hydrolysables, sur la fermentation ruminal *in vitro*
et la dégradabilité *in situ* : focus sur le devenir
des tanins**

Présentation de l'expérimentation

Le manque de données concernant les tanins hydrolysables nous a conduit à envisager l'étude des effets de ce type de tanins, et de leur association avec des tanins condensés, sur la production de CH₄ en relation avec les fermentations ruminales, la dégradation dans le rumen et l'écosystème microbien. Ce travail a été conduit dans le centre INRA Auvergne- Rhône-Alpes (UMRH, Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle), responsable des expérimentations M. Doreau,

Deux expérimentations ont été menées successivement. La première était un essai *in vitro* sur moutons Texel alimentés avec un fourrage tropical, dont le protocole était similaire à celui de la publication 4. Il a été découpé en trois sous-essais visant pour le premier à établir une courbe dose-réponse pour deux sources de tanins hydrolysables, le second à étudier les éventuels synergies ou antagonismes entre deux sources de tanins hydrolysables, le troisième à étudier les éventuelles synergies entre tanins hydrolysables et tanins condensés. Les mesures ont été la production de gaz totaux et de CH₄, ainsi que la production d'acides gras volatils en 24 h d'incubation. La seconde était un essai *in situ* mené sur vaches Holstein alimentées avec un fourrage de zone tempérée. Les sachets incubés dans le rumen ont servi à établir une cinétique de dégradation de la matière sèche, de l'azote et des parois sur une durée de 96 h, à étudier le devenir des différentes fractions de tanins condensés dans le rumen, et à analyser par séquençage le microbiote (bactéries, protozoaires et archées méthanogènes) présent à l'intérieur des sachets.

Les travaux ont intégralement été conduits à Theix, sauf les analyses des tanins hydrolysables qui ont été mises au point et réalisées à l'Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie de Constantine (Ali Mendjli, 25100 Constantine, Algérie).

Un premier enjeu était de trouver des sources de tanins pertinentes. Pour les tanins condensés, nous avons pris les trois sources provenant de Guadeloupe utilisées dans les expérimentations du chapitre 3 (*Leucaena leucocephala*, *Glyricidia sepium*, et *Manihot esculenta*). Nous souhaitons une autre plante d'usage très commun sous les tropiques, et très riche en tanins ; *Calliandra calothyrsus* correspondait à cela, et a été récolté par une équipe du CIRAD à la Réunion, en zone tropicale humide. Pour les tanins hydrolysables, il fallait éliminer toutes les sources susceptibles d'entraîner une toxicité pour l'animal, et trouver des sources riches en tanins hydrolysables. La première contrainte a permis d'éliminer un certain nombre de plantes. La seconde s'est heurtée au très faible nombre de plantes pour laquelle on disposait d'analyses fiables. *Acacia nilotica* a été repéré facilement, et a été récoltée en zone

tropicale sèche au Sénégal par une équipe du CIRAD. Nous avons également ciblé la feuille de bananier (*Musa. spp.*). L'analyse des tanins, réalisée postérieurement à l'essai sur animaux, a révélé que la feuille de bananier était riche en tanins condensés mais pauvre en tanins hydrolysables. Les données bibliographiques avaient malheureusement été obtenues par la méthode de Folin-Ciocalteu, qui comme cela a été dit dans le chapitre « Etat de l'art », est très imprécise. Dans l'expérimentation, *Musa. spp* a donc été classée comme riche en tanins condensés.

Par rapport à l'utilisation classique de la méthode *in situ* dite aussi « *in sacco* » ou « des sachets de nylon », deux innovations ont été pratiquées. La première est l'analyse de trois fractions des tanins condensés (libres, liées aux fibres, liées aux protéines) avant et après l'incubation en sachets, afin d'en déterminer la disparition. A notre connaissance, un travail similaire n'avait jamais été fait. La deuxième est l'analyse du microbiote ruminal à l'intérieur du sachet pour les différentes plantes riches en tanins. A notre connaissance, seuls deux essais ont été réalisés avec cette méthodologie dans la même équipe (Edwards et al., 2007 ; Huws et al., 2013), mais ils avaient pour objectif de suivre l'initiation de la colonisation des sachets par le microbiote ruminal, mais pas de comparer l'effet des tanins de différent aliments sur le microbiote ruminal à l'intérieur du microenvironnement du sachet. Pour les analyses du microbiote ruminal, l'ADN a été extrait selon le protocole décrit par Yu et Morrison, (2004). L'ADN génomique total a été envoyé au Roy J. Carver Biotechnology Center (Illinois, États-Unis) pour l'amplification des fluides et le séquençage des Illumina à l'aide d'amorces ciblant le gène bactérien 16S rRNA (région V3-V5), le gène des archées 16S rRNA et le gène 18S rRNA pour les protozoaires. Les données de séquençage ont été analysées à l'aide du pipeline IM Tornado (Jeraldo et al., 2014) et à la taxonomie assignée selon Silva v128. Les séquences des archées méthanogènes ont été analysées suivant le pipeline QIIME standard (Caporaso et al., 2010) et la taxonomie assignée à RIM DB (Seedorf et al., 2014).

Chacune de ces expérimentations a fait l'objet d'une publication. L'essai *in vitro* constitue la publication 5 (Rira et al., 2019). Cette publication a été incluse dans un numéro de Journal of Animal Science dont une série d'articles était consacrée à la production de CH₄ entérique. L'essai *in situ* qui constitue la publication 6 (Rira et al.,) n'a pas pu être soumis avant la remise de ce manuscrit en raison de délais liés aux différentes étapes du séquençage. Elle n'inclut donc pas les aspects liés au microbiote. Il a été décidé d'intégrer les résultats concernant le microbiote dans la publication plutôt que d'en faire une publication séparée.

Publication 5

Methanogenic potential of tropical feeds rich in hydrolyzable tannins

Rira M., Morgavi D.P., Genestoux L., Djibiri S., Sekhri I., Doreau M.

Journal of Animal Science, 2019, 97, 2700-2710.

Methanogenic potential of tropical feeds rich in hydrolyzable tannins^{1,2}

Moufida Rira,^{*,†,3} Diego P. Morgavi,^{†,◊} Lucette Genestoux,[†] Sihem Djibiri,^{*} Ines Sekhri,^{*} and Michel Doreau[†]

^{*}Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie, Ali Mendjli, BP E66, 25100 Constantine, Algeria; and

[†]INRA, VetAgro Sup, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champagnelle, France

ABSTRACT: The present study was carried out to determine the effect of *Acacia nilotica*, a tropical plant rich in hydrolyzable tannins (HT), on rumen fermentation and methane (CH₄) production in vitro. We used leaves and pods from *A. nilotica* alone and combined. The combination of HT from *A. nilotica* leaves and pods and condensed tannins (CT) from *Calliandra calothyrsus* and *Leucaena leucocephala* were also evaluated to assess potential differences in biological activity between HT and CT. Four series of 24-h incubations were performed using rumen contents of 4 sheep fed a tropical grass (natural grassland based on *Dichanthium* spp.). A first experiment tested different levels of replacement of this tropical forage (control [CTL] without tannins) by *A. nilotica* leaves or pods: 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 and 100:0. A second experiment tested the mixture of *A. nilotica* leaves and pods in different proportions: 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, and 0:100. A third experiment tested the 50:50 combination of *A. nilotica* leaves or pods with *C. calothyrsus* and *L. leucocephala*. *Acacia nilotica* pods and leaves had a high content of HT (350 and 178 g/

kg DM, respectively), whereas *C. calothyrsus* and *L. leucocephala* had a high content of CT (361 and 180 g/kg DM, respectively). The inclusion of HT from *A. nilotica* leaves and pods decreased CH₄ production dose-dependently ($P < 0.01$). Total replacement of the CTL by *A. nilotica* decreased CH₄ production by 64 and 55% with leaves and pods, respectively. Pods were richer in HT than leaves, but their antimethanogenic effect did not differ ($P > 0.05$). Although *A. nilotica* leaves and pods inhibited fermentation, as indicated by the lower gas production and VFA production ($P < 0.01$), this effect was less pronounced than for CH₄. Volatile fatty acid production decreased by 12% in leaves and by 30% in pods when compared with the CTL alone. Positive associative effect was reported for VFA, when HT-rich sources and CT-rich sources were mixed. Combining the 2 sources of HT did not show associative effects on fermentation or CH₄ production ($P > 0.05$). Hydrolyzable tannin-rich sources were more effective in suppressing methanogenesis than CT-rich sources. Our results show that HT-rich *A. nilotica* leaves and pods have the potential to reduce ruminal CH₄ production.

Key Words: *Acacia nilotica*, methane, hydrolyzable tannins, rumen fermentation, ruminant

© The Author(s) 2019. Published by Oxford University Press on behalf of the American Society of Animal Science. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

J. Anim. Sci. 2019.97:2700–2710

doi: 10.1093/jas/skz199

¹This work was funded by the AnimalChange project, which received funding from the European Commission FP7 Food, Agriculture and Fisheries, Biotechnology. We thank Harry Archimède (INRA, Guadeloupe) for the supply of *Leucaena leucocephala* and control forage; Philippe Lecomte and Bérénice Bois (CIRAD, Senegal) for the supply of *Acacia nilotica* and Emanuel Tillard (CIRAD, Réunion island) for the supply of *Calliandra calothyrsus*; the staff of UE 1414

Herbipôle (INRA, Theix), especially André Guittard, for animal care and management; and Angélique Torrent for determination of condensed tannin contents.

²The authors declared no conflict of interest.

³Corresponding author: moufida_r@yahoo.fr

Received January 7, 2019.

Accepted March 20, 2019.

INTRODUCTION

Enteric methane (CH_4) accounts for 39% of global greenhouse gas emissions from the livestock sector (Gerber et al., 2013). A strategy to reduce CH_4 production is the use of tannin-rich feeds. Tannins are classified into hydrolyzable tannins (HT) and condensed tannins (CT). The decrease in CH_4 yield (g CH_4 per kg DMI) using tannins has been ascribed to the lower degradability of feeds due to reduced digestibility of feeds induced by the formation of complexes, mainly with proteins, and to a direct negative impact on microbial populations (Jayanegara et al., 2015; Pineiro-Vazquez et al., 2015). Condensed tannins are recognized for their antimethanogenic potential, which particularly depends on the source, type, and level of CT in the plant (Rira et al., 2015). Few studies have addressed the ability of HT to reduce CH_4 production. A major factor of low animal productivity in tropical regions is the inadequate quantity and quality of forage available in the dry season. Leaves of leguminous trees are a valuable source of forage for ruminants (Goodchild and McMeniman, 1994). They are often rich in CT, which may limit their digestibility in the rumen; they also contain other polyphenolic compounds such as HT, which have not yet been investigated. We hypothesized that HT contained in *Acacia nilotica* would inhibit methanogenesis without impairing rumen fermentation. Hence, we studied the effect of HT contained in *A. nilotica* leaves and pods used at different doses to establish whether a potential reduction in CH_4 production is dissociated from total gas and VFA production. A second objective was to study whether there is any associative effect on CH_4 production and rumen fermentation when using different mixtures of *A. nilotica* leaves and pods and mixtures of *A. nilotica* with CT-rich plants (*Calliandra calothyrsus* and *Leucaena leucocephala*).

MATERIALS AND METHODS

Origin and Chemical Characterization of Plants

Three legume shrubs were collected from tropical areas. *Acacia nilotica* ssp. *nilotica* was chosen because of its high HT content. Two morphological parts were studied: leaves and pods, which are both consumed by animals during the dry season. *Acacia* samples were collected from the Ferlo region of Senegal in January 2017 at mid dry season. The Ferlo region has a mean annual rainfall of 200 to 400 mm and mean temperature of 28 to 30 °C.

Calliandra calothyrsus and *L. leucocephala*, which are rich in CT, were chosen because they are among the most widely used forage trees in humid tropics. *Calliandra calothyrsus* was collected in the Réunion Island from ~2 m high native shrubs; crown leaves were harvested in December 2016 at a late vegetative stage. *Leucaena leucocephala* was collected in Guadeloupe, Grande-Terre Island, from natural shrubs with regrowth of less than 6 mo. The forage used as control (CTL) was hay made from a 75-d regrowth of natural grassland based on *Dichanthium* spp. harvested in December 2016 in Guadeloupe, Grande-Terre Island. Fresh material was air-dried at a maximum of 40 °C, ground to pass through a 1-mm screen, placed in airtight plastic containers, and stored until use.

Gross composition of plants was determined according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990). Organic matter was determined by ashing at 550 °C for 6 h (AOAC, 1990; method 923.03). Crude protein was determined by the Dumas method ($\text{N} \times 6.25$; AOAC, 1990; method 992.15). Cell wall components (NDF and ADF) were determined using sodium sulfite, with heat-stable amylase and including residual ash (AOAC, 1990; methods 200.04 and 973.18). Dry matter digestibility was predicted following a sequential hydrolysis with pepsin in 0.1 N HCl and then with fungal cellulase (Aufère and Michalet-Doreau, 1988). Different fractions of CT in plants were extracted as described by Terrill et al. (1992). Total CT was the sum of free-extractable, protein-bound, and fiber-bound fractions. Free CT were extracted using a mixture of acetone:water:diethyl ether (4.7:2.0:3.3), followed by extraction of protein-bound CT using boiling sodium dodecyl sulfate containing 2-mercaptoethanol. Fiber-bound CT was determined on the residue remaining from the extraction of protein-bound CT. Condensed tannin concentrations in all 3 fractions were determined spectrophotometrically at 550 nm (model Lambda 25, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) by a modified butanol-HCl procedure (Porter et al., 1986, modified by Terrill et al., 1992), and total CT was the sum of 3 fractions. Quebracho extract was used as standard.

For HT, the rhodanine method was used for determination of gallotannins (Inoue and Hagerman, 1988). The potassium iodate method was used to estimate total HT (gallotannins and ellagitannins; Hartzfeld et al., 2002). The rhodanine assay detects only free gallic acid, so esters must be hydrolyzed before determination. The assay uses oxygen-free acid hydrolysis followed by specific staining of gallic

acid by rhodanine (Sigma–Aldrich). Hydrolyzable tannins were extracted with a 70% aqueous acetone solution in an ultrasonic bath, for 20 min. The hydrolysis was performed in 2 N H₂SO₄ at 100 °C for 26 h. Absorbance was measured at 520 nm with spectrophotometer (model 6715, Jenway, Villepinte, France). The gallotannin content was calculated as the difference between values from nonhydrolyzed and hydrolyzed samples. The potassium iodate method consists of the conversion of HT to methyl gallate (Sigma–Aldrich) via methanolysis, followed by oxidation with potassium iodate. Oxidation of methyl gallate by potassium iodate forms a chromophore, which is determined spectrophotometrically at 525 nm. The methyl gallate concentration was calculated from a standard methyl gallate calibration curve. Ellagitannins were calculated using the difference between total HT and gallotannins.

Procedure for In Vitro Fermentation and Measurements

Fermentations were performed using a batch technique (Rira et al., 2015). The donor animals were 4 Texel wethers fitted with a ruminal cannula and weighing 80.7 ± 6.9 kg. Management of experimental animals followed the guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture and other applicable guidelines and regulations for animal experimentation in the European Union (European Commission, 2010). Approval number for ethical evaluation was APAFIS#8218-2016121517182412 v1. Wethers were daily fed 900 g hay (natural grassland based on *Dichanthium* spp.) divided into equal amounts at 0700 and 1900 h. Wethers were adapted to the diet for 2 wk before being used as donors. Four series of 24-h incubations were performed; for each series, rumen fluid from one wether was used. Samples of ruminal contents were obtained through the cannula before morning feeding. Contents were strained through a polyester monofilament cloth (250-µm mesh aperture). A thermos flask that was saturated with CO₂ just before taking rumen fluid was used to transport the samples to the laboratory. The flask was filled to the top to reduce contact with air. The liquid phase was sent to the laboratory within 10 min after rumen sampling.

Incubations were performed in 100-mL vials containing 400 mg of feed sample, 25 mL of anaerobic buffer (Goering and Van Soest, 1970, modified by Mould et al., 2005), and 15 mL of strained rumen fluid. Vials were gassed with CO₂, sealed to ensure anaerobic conditions, and then placed in a water bath

at 39 °C for 24 h. Three experiments were performed simultaneously in each incubation series. Experiment 1 was designed to determine the effects of replacement of CTL forage by *A. nilotica* leaves or pods on CH₄ and VFA production. Mixtures of CTL and *A. nilotica* leaves and of CTL and *A. nilotica* pods were incubated in ratios of 0:100, 25:75, 50:50, 75:25, and 100:0. Experiment 2 was used to study additivity or associativity, that is, synergy or antagonism, between *A. nilotica* leaves and pods. Combinations of *A. nilotica* leaves and pods were incubated at ratios of 0:100, 25:75, 50:50, 75:25, and 100:0. Experiment 3 examined additivity or associativity between CT and HT. Hydrolyzable tannin sources (*A. nilotica* leaves and pods) and CT sources (*C. calothyrsus* and *L. leucocephala*) were used alone and as combinations of CT- and HT-rich sources in a 50:50 ratio (4 combinations: *A. nilotica* leaves:*C. calothyrsus*, *A. nilotica* leaves:*L. leucocephala*, *A. nilotica* pods:*C. calothyrsus*, *A. nilotica* pods:*L. leucocephala*).

Sample Collection and Analyses

Gas production was measured at 24 h using a pressure transducer. After recording pressure, a gas sample (5 mL) was taken for CH₄ analysis. Gas composition was determined by gas–liquid chromatography (Micro GC 3000A; Agilent Technologies, Les Ulis, France) within 2 h after sampling. Gas molar concentration was calibrated using a certified standard. For VFA determination, 0.8 mL of filtrate was mixed with 0.5 mL of 4 mg/mL crotonic acid and 20 mg/mL metaphosphoric acid in 0.5 M HCl and frozen at –20 °C until analysis. Volatile fatty acids were analyzed by gas chromatography using crotonic acid as internal standard on a Perkin Elmer Clarus 580 GC (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) equipped with a Stabilwax-DA column (30 m by 0.53 mm i.d.; Morgavi et al., 2013).

Statistical Analysis

Data were analyzed using the PROC MIXED procedure in SAS 9.4 (SAS Inst. Inc., Cary, NC). The model included as fixed effects 1) HT source (Exp. 1, *n* = 2) or CT source:HT source combination (Exp. 3, *n* = 4); 2) CTL:HT ratio (Exp. 1, *n* = 5), *A. nilotica* pod:leaf ratio (Exp. 2, *n* = 5), or HT source:CT source ratio (Exp. 3, *n* = 3); and 3) interactions between ratio and source (Exp. 1) and between ratio and source combination (Exp. 3). Animal was taken as a random effect for all experiments. Differences between ratios were also analyzed using linear and quadratic contrasts. Effects were declared significant at *P* < 0.05.

Table 1. Gross chemical composition, tannin content (g/kg DM), and in vitro digestibility of *Acacia nilotica*, *Calliandra calothyrsus*, and *Leucaena leucocephala*

Item	Control	<i>Acacia nilotica</i> leaves	<i>Acacia nilotica</i> pods	<i>Calliandra calothyrsus</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>
OM	927	921	956	956	897
CP	84	115	140	217	336
NDF	701	159	227	333	223
ADF	326	106	152	228	125
CT ¹	ND	80	157	361	180
HT ¹					
Gallotannins	ND ¹	31	84	6	Trace
Ellagitannins	ND	147	266	27	13
HT:(HT + CT)	ND	0.69	0.69	0.08	0.07
In vitro DM digestibility,%	52.9	83.0	72.0	40.6	74.5

¹HT = hydrolyzable tannins; CT = condensed tannins; ND = not detected.

Table 2. Effect of increasing level of replacement of control forage by *Acacia nilotica* leaves and pods on total gas, methane, and VFA production in vitro

Item	Control		% of <i>Acacia nilotica</i> leaves				% of <i>Acacia nilotica</i> pods				P-value			
											Ratio ¹			
	25	50	75	100	25	50	75	100	SEM	Source	Linear	Quadratic	Source × ratio	
Total gas, mL/24 h	34.41	37.10	34.28	32.25	25.61	36.77	31.00	28.07	23.26	1.502	0.027	<0.001	<0.001	0.48
Methane, mL/24 h	3.92	4.24	3.34	2.69	1.41	4.08	2.86	2.44	1.76	0.263	0.42	<0.001	0.002	0.40
Total VFA, mM/24 h	45.61	45.77	44.78	41.47	40.17	44.66	40.55	37.07	31.98	2.342	0.001	<0.001	0.13	0.10
VFA composition, %														
Acetate	54.15	62.98	65.11	68.75	70.44	61.02	61.93	63.99	68.05	2.221	0.022	<0.001	0.051	0.67
Propionate	19.08	20.43	19.07	16.45	16.31	22.81	22.25	20.58	18.08	1.232	<0.001	0.002	<0.001	0.21
Butyrate	19.92	9.66	9.13	8.85	8.47	8.98	8.23	7.19	6.28	0.847	0.050	<0.001	<0.001	0.72
Isobutyrate	1.40	1.51	1.11	0.67	0.38	1.40	1.33	1.29	0.92	0.322	0.010	<0.001	0.056	0.07
Isovalerate	2.30	2.61	2.62	2.05	1.20	2.49	2.65	2.83	2.26	0.705	0.040	0.039	0.003	0.10
Valerate	2.91	2.65	2.77	3.08	3.11	3.07	3.40	3.97	4.28	0.456	<0.001	<0.001	0.31	0.17
Caproate	0.25	0.16	0.20	0.15	0.09	0.22	0.21	0.15	0.13	0.045	0.42	0.002	0.77	0.92
Acetate:propionate	2.88	3.12	3.49	4.27	4.39	2.72	2.84	3.13	3.90	0.332	0.002	<0.001	0.01	0.24

¹Ratio between control forage and *Acacia nilotica* leaves or pods.

RESULTS

The chemical composition and tannin content of plants are presented in Table 1. High concentrations in HT were observed only in *A. nilotica* pods and leaves, with a high proportion of ellagitannins (76% and 82%, respectively). All tested plants were rich in total CT. The highest content of total CT was detected in *C. calothyrsus* (361 g/kg DM). The lowest CT content was recorded for *A. nilotica* leaves (80 g/kg DM). In vitro digestibility of plants ranged from 83.0% to 40.6%.

Experiment 1: Dose-Response of HT Sources

Table 2 shows total gas, CH₄, and VFA production, after 24 h of fermentation. Replacing CTL with *A. nilotica* leaves and pods resulted in a linear and quadratic reduction of total gas and CH₄ production ($P < 0.001$). The decrease in gas production was

greater for pods than for leaves ($P = 0.027$), but there was no source effect on CH₄ production. Total VFA production decreased linearly with increasing levels of *A. nilotica* ($P < 0.001$), the effect being greater with pods than with leaves ($P = 0.001$). Acetate and valerate proportions and the acetate:propionate ratio increased with the level of replacement of CTL by *A. nilotica* leaves and pods, whereas propionate, butyrate, isobutyrate, and isovalerate decreased. Acetate and butyrate proportions and the acetate:propionate ratio were lower for *A. nilotica* pods than for leaves, whereas propionate, isobutyrate, isovalerate, and valerate proportions were higher for *A. nilotica* pods than for leaves. Source × dose interaction was not significant for all parameters.

Experiment 2: Mixture of HT Sources

Effects of HT mixture on gas, CH₄, and total VFA production are presented in Table 3. The

Table 3. Effect of *Acacia nilotica* leaf:pod ratio on total gas, methane, and VFA production in vitro

Item	Homogeneous: leaf:pod ratio					SEM	P-value of ratio	
	0:100	25:75	50:50	75:25	100:0		Linear contrast	Quadratic contrast
Total gas, mL/24 h	23.26	26.55	26.88	18.16	25.61	2.506	0.64	0.93
Methane, mL/24 h	1.76	1.87	1.29	1.07	1.41	0.237	0.062	0.36
Total VFA, mM/24 h	31.98	35.03	36.30	38.52	40.17	2.263	<0.001	0.71
VFA composition, %								
Acetate	68.05	71.80	70.68	69.77	70.44	2.599	0.73	0.52
Propionate	18.08	15.80	17.05	16.90	16.31	1.398	0.59	0.71
Butyrate	6.28	6.08	7.05	8.13	8.47	0.966	0.004	0.59
Isobutyrate	0.92	0.67	0.51	0.49	0.38	0.310	0.005	0.34
Isovalerate	2.26	2.02	1.52	1.46	1.20	0.773	0.008	0.68
Valerate	4.28	3.50	3.13	3.15	3.11	0.587	0.011	0.10
Caproate	0.13	0.13	0.08	0.10	0.09	0.034	0.16	0.63
Acetate:propionate	3.90	4.99	4.19	4.18	4.39	0.608	0.93	0.67

Table 4. Effect of combination of condensed tannin-rich and hydrolyzable tannin-rich sources on total gas, methane, and VFA production in vitro

Item	HT:CT ratio ¹			SEM	P-value			
	100:0	50:50	0:100		Ratio linear	Ratio quadratic	Combination	Ratio × combination
Total gas, mL/24 h	24.43	24.95	20.27	0.854	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Methane, mL/24 h	1.58	1.95	2.13	0.142	<0.001	0.19	<0.001	<0.001
Total VFA, mM/24 h	36.08	38.67	34.34	3.830	0.238	0.001	<0.001	<0.001
VFA composition, %								
Acetate	69.24	66.69	63.11	1.464	<0.001	0.61	0.13	0.69
Propionate	17.19	18.90	21.55	0.694	<0.001	0.44	0.002	0.09
Butyrate	7.38	6.05	5.91	0.742	0.002	0.13	0.018	0.24
Isobutyrate	0.65	1.48	2.01	0.281	<0.001	0.23	0.036	0.37
Isovalerate	1.73	3.16	3.69	0.683	<0.001	0.053	0.026	0.18
Valerate	3.69	3.48	3.49	0.501	0.32	0.52	0.005	0.22
Caproate	0.11	0.24	0.25	0.035	<0.001	0.014	0.32	0.58
Acetate:propionate	4.14	3.57	3.00	0.191	<0.001	0.98	0.027	0.44

¹Ratio between HT source and CT source; HT sources: *Acacia nilotica* leaves and pods; CT sources: *Leucaena leucocephala* and *Calliandra calothyrsus*. Values are means of the 4 combinations between the 2 sources of CT and the 2 sources of HT.

pod:leaf ratio had no effect on gas and CH₄ production. However, total VFA increased linearly with increased proportions of leaves. Acetate and propionate proportions and the acetate:propionate ratio were unaffected by the pod:leaf ratio; butyrate increased linearly and minor VFA (isobutyrate, valerate, isovalerate) decreased linearly when the pod:leaf ratio increased ($P < 0.01$).

Experiment 3: Combination of HT and CT Sources

The effects of combining HT sources (*A. nilotica* leaves and pods) and CT sources (*L. leucocephala* and *C. calothyrsus*) on total gas, CH₄, and total VFA production are shown in Table 4. The presence of CT sources increased CH₄ production but decreased total gas produced ($P < 0.001$), whereas VFA was greater in the HT:CT (50:50) ratio than when each tannin source was used alone ($P < 0.001$, quadratic

effect). There was a significant ratio × combination interaction for total gas, CH₄, and VFA production ($P < 0.001$). Figure 1 shows the nature of this interaction for CH₄ production. In particular, the 50:50 mixture of CT-rich *C. calothyrsus* with *A. nilotica* leaves results in a negative associative effect as more CH₄ than expected was produced. In contrast, the 50:50 mixture of *C. calothyrsus* and *A. nilotica* pods produced less CH₄ than expected. For VFA production (Fig. 2) and total gas production (Supplementary Fig. 1), a positive associative effect occurred, when HT-rich plants were mixed with CT-rich plants in a 50:50 ratio. The total VFA and gas production observed for all 4 HT:CT mixtures were higher than predicted.

Individual VFA displayed linear responses to the variation in HT:CT ratio ($P < 0.001$). Acetate and butyrate proportions decreased and propionate, isobutyrate, and isovalerate increased

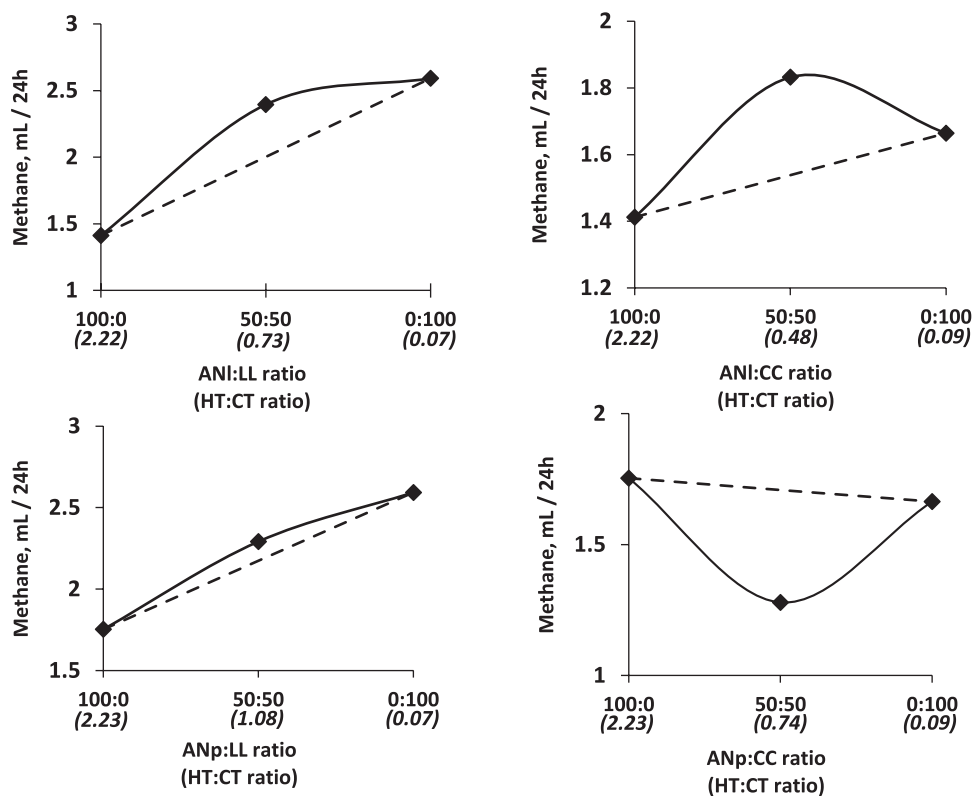


Figure 1. Effect of combination of hydrolyzable tannin sources and condensed tannin sources on methane production. ANI = *Acacia nilotica* leaves, ANp = *Acacia nilotica* pods, LL = *Leucaena leucocephala*, CC = *Calliandra calothyrsus*. HT:CT ratio is between brackets.

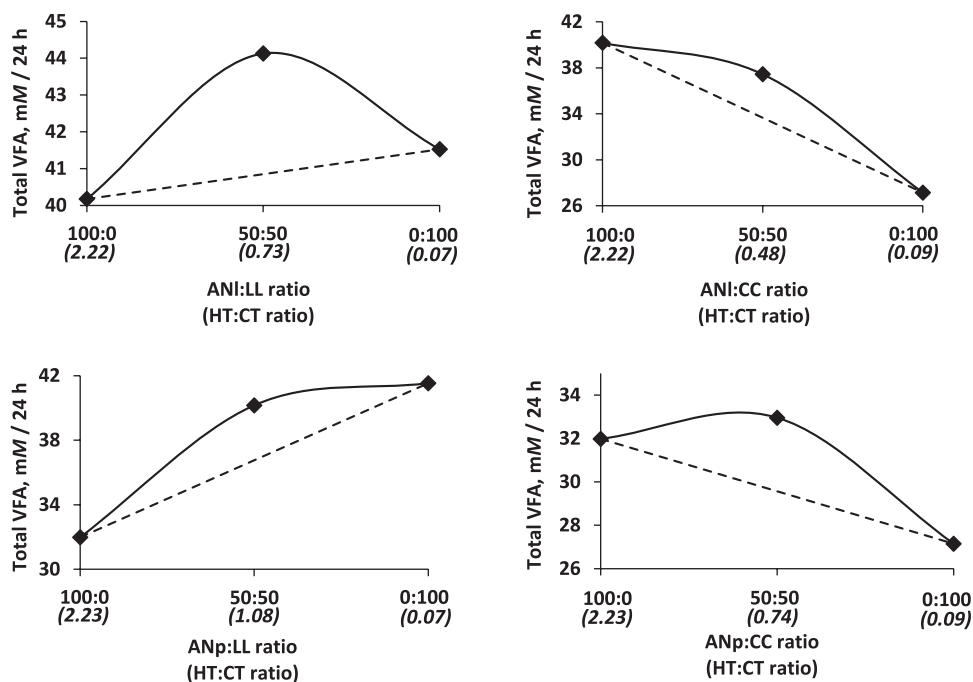


Figure 2. Effect of combination of hydrolyzable tannin and condensed tannin sources on VFA production. ANI = *Acacia nilotica* leaves, ANp = *Acacia nilotica* pods, LL = *Leucaena leucocephala*, CC = *Calliandra calothyrsus*. HT:CT ratio is between brackets.

with increasing proportions of CT. The effect of mixing HT and CT sources was significant for all individual VFA except for acetate. The ratio \times combination interaction was not significant for any individual VFA ($P > 0.05$).

DISCUSSION

In this study, we tested whether the use of tropical tannin-rich plants reduces CH_4 production in vitro. We used plants instead of extracts because it is the prevailing and most practical way

of providing these secondary plant compounds to animals in the tropics. The effect of plants is discussed considering their HT and CT content, but it is acknowledged that the influence of other plant constituents cannot be entirely dissociated from that of tannins.

Variability of Tannin Content of Plants

Accurate information on the HT content of plants is scarce. Hydrolyzable tannins are often calculated by difference between total phenols or total tannins measured by the Folin–Ciocalteu method and CT measured by the butanol–HCl method. In our study, total HT content was determined by methods, which specifically measured the content in total HT and gallotannins. A more accurate method using HPLC showed a wide variety of phenolic compounds in *A. nilotica*, including HT and CT that were identified but not quantified (Mueller-Harvey et al., 1987; Al-Wakeel et al., 2007); among them caffeic acid is one of the most important. The concentration of HT that we found in *A. nilotica* leaves is in the range of values reported in other studies using nonspecific methods that estimated HT by the difference between total tannins and CT (Rubanza et al., 2005; Alam et al., 2007). Note that some authors have found in *A. nilotica* leaves lower HT contents than in the present study (Gemed and Hassen, 2015; Pal et al., 2015) or no HT (Zabré et al., 2018). The concentration of HT in *Acacia* pods was high in our experiment, but Goel et al. (2015) also reported high values (186 g/kg DM, estimated by the difference between total tannins and CT). In our leaf and pod samples, ellagitannins were predominant compared with gallotannins, as reported in plants containing HT (Hassanat and Benchaar, 2013). A similar ratio between these fractions was obtained by Alam et al. (2007) in *Acacia* leaves. The amount of CT in *A. nilotica* is controversial. Some studies have reported 5 g/kg DM (Nsahlai et al., 2011; Pal et al., 2015) others 146 g/kg DM (Phale and Madibela, 2006). In our samples, pods were richer in CT than leaves; the same trend was reported by Nsahlai et al. (2011). For *L. leucocephala* used in this work, the amount of CT was higher than that previously found in plants of the same origin but using the vanillin-HCl method for CT detection (Rira et al., 2015). The CT content of *C. calothyrsus* was also relatively high, but similar to the maximum CT content reported in the literature (368 g/kg DM, Tuwei et al., 2003). Between-study discrepancies in values of HT and CT contents depend on

the methodology used for tannin determination (Makkar, 2000 for CT and HT; Schofield et al., 2001 for CT). We hypothesize that the method of analysis that we used for CT, which involves a double-extraction procedure, extracts more tannins than most methods reported in the literature. In addition, many factors such as type of subspecies (e.g., Mahdi et al., 2006, for *A. nilotica* pods), plant stage of maturity, location, climatic conditions (e.g., Tuwei et al., 2003 for *C. calothyrsus*), and soil characteristics are determinants of tannin concentration in plants.

Ruminants in tropical areas voluntarily browse leaves and pods of *A. nilotica* during the dry season, especially at the end when grasses became scarce. In addition, breeders often cut leaves and pods to feed their animals, especially small ruminants. Hydrolyzable tannins are potentially toxic to ruminants because their degradation by ruminal microbes generates pyrogallol, which has hepatotoxic and nephrotoxic effects (Reed, 1995). Although some HT-rich plants such as *Terminalia oblongata* and *Clidemia hirta* have been reported to produce acute toxicity, the supplementation of goats with *A. nilotica* leaves (25% of the diet; Rubanza et al., 2007) or pods (31% of the diet; Hidosa and Gemiyo, 2017) improved weight gain and increased feed intake without any adverse effect on digestibility. In addition, detannification of *A. nilotica* pods using different methods did not improve intake and digestibility by goats suggesting the nontoxic character of the plant (Tshabalala et al., 2013).

Effects of Increasing Level of HT Sources on Rumen Fermentation and CH₄ Production

The effects of HT on rumen fermentation and CH₄ production are less documented than those of CT. In addition, most studies have tested HT extracts and there is little information on HT-rich forages, which are the easiest way of supplying desirable secondary plant compounds to ruminants. The present study used as source of HT *A. nilotica*, a plant widely distributed in dry tropical and subtropical areas in Africa and Asia (Heuzé et al., 2016). We considered 2 fractions eaten by animals: leaves and pods. Despite the presence of CT in *A. nilotica* leaves and pods, it is assumed that effects on CH₄ production are mainly due to HT because 1) they represent 70% of total tannins and 2) direct comparisons between HT and CT extracts have shown that HT are as effective as (Hassanat and Benchaar, 2013) or more effective than CT (Jayanegara et al., 2015; Min et al., 2015)

in reducing ruminal CH₄ production. However, it is possible that some effects observed with *A. nilotica* could be due to compounds other than tannins such as saponins (Solomon-Wisdom and Shittu, 2010) that are known for their antimethanogenic properties (Martin et al., 2010).

The decrease in CH₄ production that we observed was consistent with data obtained by Pal et al. (2015) who used *A. nilotica* leaves (37.7 g/kg DM of HT, 4.6 g/kg DM of CT) and found a greater inhibition of CH₄ production with *A. nilotica* than with other tannin-containing plants. Compared with a control, Zabré et al. (2018) did not find a decrease in CH₄ production with a subspecies of *A. nilotica* rich in CT but poor in HT, whereas a strong decrease was observed with a sample of *Acacia raddiana* rich in HT. Among HT, ellagitannins are probably the major CH₄ inhibitor (Baert et al., 2016). In our study, increasing proportions of *Acacia* in the diet linearly decreased both CH₄ and total VFA, but the decrease in CH₄ was up to 3- to 6-fold higher than the decrease in total VFA. For instance, pure *A. nilotica* leaves decreased CH₄ by 64% and total VFA by 11% when compared with CTL, whereas pure *A. nilotica* pods decreased CH₄ by 55% and total VFA by 29%. A similar result was found by Gemedu (2015) who observed a 33% reduction in CH₄ production when lucerne was replaced by 30% of *A. nilotica* in a sheep diet. In contrast, the concentration of VFA and organic matter digestibility were not affected. Also, in accordance with our results, HT extracts of chestnut (*Castanea sativa*) and valonea (*Quercus aegilops*) induced a stronger decrease in CH₄ than in VFA production in vitro (Hassanat and Benchaar, 2013; Min et al., 2015). The effect of HT on the VFA profile is more inconsistent. In our study, the acetate:propionate ratio increased, which is not in line with the CH₄ decrease; this could be explained by the ruminal degradation of HT by tannin-degrading bacteria into acetate and butyrate (Goel et al., 2005). Electron acceptors, such as caffeic acid, which is present in *A. nilotica*, may have favored the production of acetate (Cord-Ruwisch et al., 1988). Other studies have reported the opposite trend with chestnut extract (Jayanegara et al., 2015) or no effect on acetate:propionate ratio with chestnut and valonea extracts (Hassanat and Benchaar, 2013; Min et al., 2015). Few studies have tested the effect of HT on rumen fermentation and CH₄ production in vivo. High amounts of HT from chestnut extract (9% of the diet) markedly decreased digestibility in goats and sheep (Zimmer and Cordesse, 1996), whereas a lower dose of chestnut extract (1.5% of the diet)

failed to affect CH₄ production and rumen concentration of VFA in steers (Krueger et al., 2010).

Acacia nilotica pods were more detrimental for fermentation than *A. nilotica* leaves because they generate less gas and total VFA, whereas the effect on CH₄ production did not differ. On the contrary, Nsahlai et al. (2011) did not show a difference in gas production and DM degradability between leaves and pods of *A. nilotica* but, although they reported a much higher CT content in pods than in leaves, HT content and CH₄ production were not measured. Our results are consistent with the HT content in leaves and pods for gas and VFA production, but the absence of difference in CH₄ production is difficult to explain. Several hypotheses can be proposed but each of them needs support from experimental data: 1) the nature of HT differs between leaves and pods, as suggested by Salminen and Karonen (2011), and 2) the presence in *A. nilotica* of other antinutritional compounds, such as saponins and alkaloids, which have been found in leaves by Solomon-Wisdom and Shittu (2010), may be involved in the decrease in CH₄ production. It is also possible that CH₄ production cannot decrease beyond a certain threshold of HT concentration.

Based on data mainly obtained using CT, it is recognized that the decrease in CH₄ production is due to 1) the decrease in carbohydrate fermentation and 2) a specific action of tannins on microbes involved in CH₄ production. The impairment in carbohydrate fermentation when HT are fed can be due to the inhibition of fiber-degrading microbes and to the decrease in carbohydrate hydrolases involved in feed degradation processes (McSweeney et al., 2001; Nsahlai et al., 2011). Results from this study, however, suggest that the main mechanism by which HT reduced CH₄ production was by affecting microbes. The negative effect of HT on protozoa, which are hydrogen producers, and methanogens, which convert hydrogen into CH₄, has been demonstrated with purified extracts of HT from chestnut and sumach (*Rhus typhina*; Jayanegara et al., 2015) or with tannic acid (Yang et al., 2017). The difference of action between CT and HT is illustrated by 2 results. First, Jayanegara et al. (2015) comparing HT and CT extracts found that the decrease in in vitro digestibility was higher for CT than for HT, but that the opposite was observed for CH₄ production; second, Zabré et al. (2018) reported that an HT-rich plant (*A. raddiana*) decreased the population of methanogens, but that a sample of *A. nilotica* rich in CT but poor in HT significantly decreased the concentration of anaerobic fungi and fiber-degrading bacteria. In addition, Bhatta et al. (2009) reported a greater

decrease of CH₄ with a mixture of HT and CT than with HT alone; this was attributed to a greater antimethanogen and antiprotozoal activity of the combination of HT and CT than of HT alone. All these results suggest that HT might be more effective than CT for CH₄ mitigation.

Associative Effects of Combination of HT and CT Sources

We hypothesized first that combining the 2 sources of HT may result in associative effects on CH₄ inhibition without noticeable effects on the extent of fermentation. The HT composition varies between organs (Baert et al., 2017) and according to the season for a given plant organ (Hatano et al., 1986). The leaves and pods that we tested were harvested at different periods of the year. In our study, CH₄ and VFA production varied linearly with changes of the leaf:pod ratio. This does not allow conclusions to be drawn about differences in HT composition between leaves and pods. However, the results suggest that there is no advantage in storing pods and leaves of *A. nilotica* to give them at the same time to animals.

Associative effects may be more likely between HT- and CT-rich feeds than between 2 HT-rich feed because of major differences between these 2 tannin classes. However, the literature is scarce on this topic. Jayanegara et al. (2013) reported that combining a tannin-poor plant with HT- or CT-rich plants resulted in an associative effect on CH₄ production that was reduced more than expected from the sum of individual plants. These authors suggested that associative effects of combining feeds on CH₄ production are observed when combining plants that differ greatly in their CH₄ production potential, which is not the case for the HT- and CT-rich plants used in this study. It can be hypothesized that differences between combinations are explained by the HT:CT ratio. It is noted that both HT-rich sources had similar ratios (2.22 vs. 2.23 for *A. nilotica* leaves and pods, respectively). Likewise, both CT sources were similar (0.07 vs. 0.09 for *L. leucocephala* and *C. calothyrsus*, respectively). This suggests that the HT:CT ratio is not the main driver of the differences between combinations. These differences could be explained by other plant secondary compounds. Saponins, flavonoids, terpenoids, and alkaloids that may interfere with tannins were shown in *A. nilotica* leaves (Solomon-Wisdom and Shittu 2010).

Our experiment showed that the effect of combining HT and CT plants produced more VFA than

expected from an additive response. This effect is moderate but statistically significant. This may suggest that fiber degradation is less affected when the 2 classes of tannins are mixed, perhaps because of a less negative effect on bacterial activity. If the associative response of VFA to the mixture of HT and CT is confirmed in vivo, it could be interesting to develop mixed cultures of HT- and CT-rich trees in the same area.

CONCLUSION

Few studies have assessed the effects of HT on CH₄ production, particularly using a plant that grows in the tropics. This work shows that *A. nilotica* strongly inhibits CH₄ production without marked adverse effects on rumen fermentation in vitro. The effect of *A. nilotica* on CH₄ production was more marked than that of CT-rich plants such as *C. calothyrsus* and *L. leucocephala*. This may reveal that HT are more suitable for CH₄ mitigation than CT. Indeed, the use of CT for mitigation is often questioned because of their negative effect on diet digestibility. The interest of HT should be confirmed in vivo; long-term trials are needed to conclude about the possible adaptation of rumen microbes to HT. It is also necessary to determine the optimal level of HT to avoid their possible toxicity. If the use of *A. nilotica* is developed in the future, both leaves and pods can contribute to CH₄ decrease, taking advantage of consumption at different periods of the year.

LITERATURE CITED

- Alam, M. R., M. R. Amin, A. K. M. A. Kabir, M. Moniruzzaman, and D. M. McNeill. 2007. Effect of tannins in *Acacia nilotica*, *Albizia procera* and *Sesbania acculeata* foliage determined in vitro, in sacco, and in vivo. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 20:220–228. doi:10.5713/ajas.2007.220
- Al-Wakeel, S. A. M., M. A. Gabr, A. A. Hamid, and W. Abu-El-Soud. 2007. Allelopathic effects of *Acacia nilotica* leaf residue on *Pisum sativum* L. *Allelopathy J.* 19:411–422.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. AOAC, Washington, DC.
- Aufrère, J., and B. Michalet-Doreau. 1988. Comparison of methods for predicting digestibility of feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 20:203–218. doi:10.1016/0377-8401(88)90044-2
- Baert, N., J. Kim, M. Karonen, and J. P. Salminen. 2017. Inter-population and inter-organ distribution of the main polyphenolic compounds of *Epilobium angustifolium*. *Phytochemistry* 134:54–63. doi:10.1016/j.phytochem.2016.11.003
- Baert, N., W. F. Pellikaan, M. Karonen, and J. P. Salminen. 2016. A study of the structure-activity relationship of oligomeric ellagitannins on ruminal fermentation in vitro. *J. Dairy Sci.* 99:8041–8052. doi:10.3168/jds.2016-11069

- Bhatta, R., Y. Uyeno, K. Tajima, A. Takenaka, Y. Yabumoto, I. Nonaka, O. Enishi, and M. Kurihara. 2009. Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *J. Dairy Sci.* 92:5512–5522. doi:10.3168/jds.2008-1441
- Cord-Ruwisch, R., H. J. Seitz, and R. Conrad. 1988. The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Arch. Microbiol.* 149:350–357. doi:10.1007/BF00411655
- European Commission. 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Off. J. Eur. Union L 276/33–L 276/79. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=EN> (Accessed 25 December 2018.)
- Gemeda, B. S. 2015. Use of selected tropical feeds and additives as modulators of rumen fermentation and methanogenesis in ruminants. PhD Diss. Pretoria Univ., South Africa.
- Gemeda, B. S., and A. Hassen. 2015. Effect of tannin and species variation on in vitro digestibility, gas, and methane production of tropical browse plants. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 28:188–199. doi:10.5713/ajas.14.0325
- Gerber, P. J., H. Steinfeld, B. Henderson, A. Mottet, C. Opio, J. Dijkman, A. Falcucci, and G. Tempio. 2013. Tackling climate change through livestock – a global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy.
- Goel, G., A. K. Puniya, C. N. Aguilar, and K. Singh. 2005. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften* 92:497–503. doi:10.1007/s00114-005-0040-7
- Goel, G., M. Raghav, V. Beniwal, and A. K. Puniya. 2015. Anaerobic degradation of tannins in *Acacia nilotica* pods by *Enterococcus faecalis* in co-culture with ruminal microbiota. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 61:31–33. doi:10.2323/jgam.61.31
- Goering, H. K., and P. J. Van Soest. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). *Agric. Handbook No. 379*. ARS-USDA, Washington, DC.
- Goodchild, A. V., and N. P. McMeniman. 1994. Intake and digestibility of low quality roughage when supplemented with leguminous browse. *J. Agric. Sci.* 122:151–160. doi:10.1017/S0021859600065904
- Hartzfeld, P. W., R. Forkner, M. D. Hunter, and A. E. Hagerman. 2002. Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *J. Agric. Food Chem.* 50:1785–1790. doi:10.1021/jf0111155
- Hassanat, F., and C. Benchaar. 2013. Assessment of the effect of condensed (acacia and quebracho) and hydrolysable (chestnut and valonea) tannins on rumen fermentation and methane production in vitro. *J. Sci. Food Agric.* 93:332–339. doi:10.1002/jsfa.5763
- Hatano, T., R. Kira, M. Yoshizaki, and T. Okuda. 1986. Seasonal changes in the tannins of *Liquidambar formosana* reflecting their biogenesis. *Phytochemistry* 25:2787–2789. doi:10.1016/S0031-9422(00)83742-5
- Heuzé, V., G. Tran, M. Eugène, D. Bastianelli, and F. Lebas. 2016. Babul (*Acacia nilotica*). Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. <https://www.feedipedia.org/node/346> (Accessed 23 October 2018.)
- Hidosa, D., and D. Gemiyo. 2017. Replacement of commercial concentrate with *Acacia nilotica* pod meal on feed intake, digestibility and weight gain of Boer × Woyto-Guji crossbred goats. *Am. J. Agric. Forest.* 5:192–197. doi:10.11648/j.ajaf.20170506.13
- Inoue, K. H., and A. E. Hagerman. 1988. Determination of gallotannin with rhodanine. *Anal. Biochem.* 169:363–369. doi:10.1016/0003-2697(88)90296-5
- Jayanegara, A., G. Goel, H. P. Makkar, and K. Becker. 2015. Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 209:60–68. doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.08.002
- Jayanegara, A., S. Marquardt, E. Wina, M. Kreuzer, and F. Leiber. 2013. In vitro indications for favourable non-additive effects on ruminal methane mitigation between high-phenolic and high-quality forages. *Br. J. Nutr.* 109:615–622. doi:10.1017/S0007114512001742
- Krueger, W. K., H. Gutierrez-Bañuelos, G. E. Carstens, B. R. Min, W. E. Pinchak, R. Gomez, R. C. Anderson, N. A. Krueger, and T. D. A. Forbes. 2010. Effects of dietary tannin source on performance, feed efficiency, ruminal fermentation, and carcass and non-carcass traits in steers fed a high-grain diet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 159:1–9. doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.05.003
- Mahdi, H., K. Palmina, and I. Glavtch. 2006. Characterization of *Acacia nilotica* as an indigenous tanning material of Sudan. *J. Trop. For. Sci.* 18:181–187.
- Makkar, H. 2000. Quantification of tannins in tree foliage: A laboratory manual for the FAO/IAEA co-ordinated research project on ‘Use of nuclear and related techniques to develop simple tannin assays for predicting and improving the safety and efficiency of feeding ruminants of tanniniferous tree foliage’. (No. INIS-XA--553). Joint FAO/IAEA of Nuclear Techniques in Food and Agriculture.
- Martin, C., D. P. Morgavi, and M. Doreau. 2010. Methane mitigation in ruminants: From microbe to the farm scale. *Animal* 4:351–365. doi:10.1017/S1751731109990620
- McSweeney, C. S., B. Palmer, D. M. McNeill, and D. O. Krause. 2001. Microbial interactions with tannins: Nutritional consequences for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91:83–93. doi:10.1016/S0377-8401(01)00232-2
- Min, B. R., W. E. Pinchak, R. C. Anderson, and R. Puchala. 2015. Bloat mitigation potential of plant tannins and yucca extracts based on in vitro ruminal fermentation and methane gas production from wheat forage. *Int. J. Res. Stud. Agric. Sci.* 1–6:1–13.
- Morgavi, D. P., C. Martin, and H. Boudra. 2013. Fungal secondary metabolites from *Monascus* spp. reduce rumen methane production in vitro and in vivo. *J. Anim. Sci.* 91:848–860. doi:10.2527/jas.2012-5665
- Mould, F. L., R. Morgan, K. E. Kliem, and E. Krystallidou. 2005. A review and simplification of the in vitro incubation medium. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123–124:155–172. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.05.002
- Mueller-Harvey, I., J. D. Reed, and R. D. Hartley. 1987. Characterisation of phenolic compounds, including flavonoids and tannins, of ten Ethiopian browse species by

- high performance liquid chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 39:1–14. doi:10.1002/jsfa.2740390102
- Nsahlai, I. V., F. N. Fon, and N. A. D. Basha. 2011. The effect of tannin with and without polyethylene glycol on in vitro gas production and microbial enzyme activity. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 41.
- Pal, K., A. K. Patra, A. Sahoo, and P. K. Kumawat. 2015. Evaluation of several tropical tree leaves for methane production potential, degradability and rumen fermentation in vitro. *Livest. Sci.* 180:98–105. doi:10.1016/j.livsci.2015.07.011
- Phale, O., and O. R. Madibela. 2006. Concentration of soluble condensed tannins and neutral detergent fibre-bound tannins in fodder trees and forage crops in Botswana. *J. Biol. Sci.* 6:320–323
- Porter, L. J., L. N. Hrstich, and B. G. Chan. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Photochemistry* 25:223–230. doi:10.1016/S0031-9422(00)94533-3
- Pineiro-Vazquez, A. T., J. R. Canul-Solís, J. A. Alayón-Gamboa, A. J. Chay-Canul, A. J. Ayala-Burgos, C. F. Aguilar-Pérez, F. J. Solorio-Sánchez, and J. C. Ku-Vera. 2015. Potential of condensed tannins for the reduction of emissions of enteric methane and their effect on ruminant productivity. *Arch. Med. Vet.* 47:263–272. doi:10.4067/S0301-732X2015000300002
- Reed, J. D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Anim. Sci.* 73:1516–1528. doi:10.2527/1995.7351516x
- Rira, M., D. P. Morgavi, H. Archimède, C. Marie-Magdeleine, M. Popova, H. Bousseboua, and M. Doreau. 2015. Potential of tannin-rich plants for modulating ruminal microbes and ruminal fermentation in sheep. *J. Anim. Sci.* 93:334–347. doi:10.2527/jas.2014-7961
- Rubanza, C. D. K., M. N. Shem, S. S. Bakengesa, T. Ichinohe, and T. Fujihara. 2007. Effects of *Acacia nilotica*, *A. polyacantha* and *Leucaena leucocephala* leaf meal supplementation on performance of Small East African goats fed native pasture hay basal forages. *Small Rumin. Res.* 70:165–173. doi:10.1016/j.smallrumres.2006.02.008
- Rubanza, C. D. K., M. N. Shem, R. Otsyina, S. S. Bakengesa, T. Ichinohe, and T. Fujihara. 2005. Polyphenolics and tannins effect on in vitro digestibility of selected *Acacia* species leaves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119:129–142. doi:10.1016/j.anifeedsci.2004.12.004
- Salminen, J. P., and M. Karonen. 2011. Chemical ecology of tannins and other phenolics: We need a change in approach. *Funct. Ecol.* 25:325–338. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01826.x
- Schofield, P., D. M. Mbugua, and A. N. Pell. 2001. Analysis of condensed tannins: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91:21–40. doi:10.1016/S0377-8401(01)00228-0
- Solomon-Wisdom, G. O., and G. A. Shittu. 2010. *In vitro* antimicrobial and phytochemical activities of *Acacia nilotica* leaf extract. *J. Med. Plant Res.* 4:1232–1234. doi:10.5897/JMPR09.136
- Terrill, T. H., A. M. Rowan, G. B. Douglas, and T. N. Barry. 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *J. Sci. Food Agric.* 58:321–329. doi:10.1002/jsfa.2740580306
- Tshabalala, T., J. L. N. Sikosana, and E. Chivandi. 2013. Nutrient intake, digestibility and nitrogen retention in indigenous goats fed on *Acacia nilotica* fruits treated for condensed tannins. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 43:457–463. doi:10.4314/sajas.v43i4.2
- Tuwei, P. K., J. N. N. Kangara, I. Mueller-Harvey, J. Poole, F. K. Ngugi, and J. L. Stewart. 2003. Factors affecting biomass production and nutritive value of *Calliandra calothyrsus* leaf as fodder for ruminants. *J. Agric. Sci.* 141:113–127. doi:10.1017/S002185960300340X
- Yang, K., C. Wei, G. Y. Zhao, Z. W. Xu, and S. X. Lin. 2017. Effects of dietary supplementing tannic acid in the ration of beef cattle on rumen fermentation, methane emission, microbial flora and nutrient digestibility. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)* 101:302–310. doi:10.1111/jpn.12531
- Zabré, G., A. Kaboré, B. Bayala, C. Patricia Spoto, N. L. Leando, V. Niderkorn, H. H. Tamboura, H. Hoste, H. Louvandini, and A. L. Abdalla. 2018. In vitro rumen fermentation characteristics, methane production and rumen microbial community of two major *Acacia* species used in Sahelian region of Burkina Faso. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 21:357–366.
- Zimmer, N., and R. Cordesse. 1996. Digestibility and ruminal digestion of non-nitrogenous compounds in adult sheep and goats: Effects of chestnut tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 61:259–273. doi:10.1016/0377-8401(95)00940-X

.

Publication 6

Composition and ruminal fate of tannins from tropical plants: Correlation with in situ degradability and in vitro methane production

Rira M., Morgavi D.P., Popova M., Torrent A., Genestoux L., Maxin G., Doreau M.

En préparation, soumission envisagée pour Animal

.

1 **Composition and ruminal fate of tannins from tropical plants: Correlation**
2 **with in situ degradability and in vitro methane production**

3

4 **M. Rira^{1,2†}, D.P. Morgavi^{1†}, M. Popova¹, A. Torrent¹, L. Genestoux¹, G. Maxin¹, and M. Doreau¹**

5

6 ¹INRA, VetAgro Sup, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

7 ²Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie, Ali Mendjli, BP E66, 25100 Constantine, Algeria

8

9 †E-mail: moufida_r@yahoo.fr; diego.morgavi@inra.fr

10

11 **Abstract**

12

13 The aim of the study was to explore the anti-methanogenic potential of tannins-rich plants and
14 elucidate relationship between carbohydrate degradation, the disappearance of condensed
15 tannins fractions and rumen fermentation characteristics. Four leguminous: *Acacia nilotica*
16 pods, *Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia sepium*, and *Leucaena leucocephala* leaves and the
17 leaves of two agricultural by-products: *Manihot esculenta* and *Musa spp.* were used. Plants
18 were analysed to quantify amounts of hydrolysable tannins, free condensed tannins, protein-
19 bound condensed tannins and fibre-bound condensed tannins. In experiment 1, dry matter and
20 nitrogen degradability and disappearance of tannin fractions in the rumen were studied *in situ*.
21 In experiment 2, plants were tested for their methane mitigation potential comparatively to a
22 forage control without tannins (*Dichanthium spp.*), using an *in vitro* system. All plants
23 contained more than 10 g/kg of condensed tannins, and *Acacia nilotica* was especially rich in

24 hydrolysable tannins. A large fraction of condensed tannins was bound to proteins, ranging
25 between 32 and 61% for *Acacia nilotica* and *Gliricidia sepium*, respectively. Hydrolysable
26 and free condensed tannins from all plants completely disappeared after 24 h incubation in the
27 rumen. The disappearance of protein-bound condensed tannins varied among plants with
28 *Gliricidia sepium* showing the highest proportion (92.9%), *Manihot esculenta* and *Musa spp*
29 leaves having intermediate values of disappearance. Whereas for *Calliandra calothyrsus*
30 leaves no disappearance was observed. Fibre-bound condensed tannins disappearance did not
31 vary between plants, on average 82% disappearance. Dry matter and nitrogen degradability
32 and gas production were higher for *Gliricidia sepium*, *Manihot esculenta*, *Leucaena*
33 *leucocephala* and *Acacia nilotica* than for *Calliandra calothyrsus* and *Musa spp*. *In vitro* gas
34 production was high for control and low *Musa spp*. Compared to control, *Acacia nilotica*,
35 *Calliandra calothyrsus* and *Musa spp* reduced methane production but only *Acacia nilotica*
36 reduced methane production without affecting DM and N degradability. Total volatile fatty
37 acids production for *Gliricidia sepium* and *Manihot esculenta* leaves was similar to control.
38 However, the production of volatile fatty acids from *Calliandra calothyrsus* leaves was ~50%
39 of control. *Acacia nilotica* pods showed a potent methane suppressing properties and owing to
40 its high *in vitro* fermentation and *in situ* degradability it could be used in diets for its
41 antimethanogenic properties.

42

43 **Keywords:** tropical plants; hydrolysable tannins; condensed tannins; methane, *in situ*
44 degradability

45

46 **Introduction**

47 Feed availability is a major limitation in many tropical ruminant production systems. One way
48 by which farmers increase forage availability in these grazing systems is the use of
49 leguminous trees as a diet supplement. Leaves from leguminous trees are recognized as a
50 high quality feed resource (Alonso-Díaz et al., 2010). They are generally rich in protein and
51 thus balance the nutrition of animals grazing tropical grasses poor in protein (Le Houérou,
52 1980). However, they remain underused because of the presence of tannins, often present at

53 high level. High concentrations of tannins can reduce voluntary feed intake and nutrient
54 digestibility. The decrease in nutritive value is associated with their ability to bind to proteins
55 from feeds and enzymes, and to structural carbohydrates present in plant cell walls. However,
56 at lower concentrations tannins can have positive effects like reducing methane (CH₄)
57 production (Goel and Makkar, 2012) because they affect organic matter digestibility and/or
58 because they inhibit microbial populations. The actions of condensed tannins on CH₄
59 production include a direct effect on methanogens, complexation to fibre and proteins, and a
60 reduction in nutrient availability (Tavendale et al. 2005).

61 Tannins are conventionally classified into two major groups: hydrolysable tannins
62 (HT) and condensed tannins (CT). Hydrolysable tannins consist of polyphenols (gallic acid
63 and/or hexahydroxydiphenic acid) ester-linked to a hexose moiety. In contrast, CT are
64 polymers of flavan-3-ol (e.g., catechin) or flavan-3,4-diol (proanthocyanidins) linked by C–C
65 or C–O–C bonds which give compounds of varying molecular weight. Condensed tannins are
66 found in different fractions in plants: free, protein-bound, and fibre-bound (Terrill et al., 1992;
67 Mueller-Harvey and McAllan, 1992; Schofield et al., 2001). A better understanding of the
68 effects of HT-rich and CT-rich forages on nutrient digestibility and CH₄ mitigation properties
69 would improve management of such resources. The relationship between carbohydrate
70 degradation and the disappearance of CT fractions must be established for developing feeding
71 strategies to overcome undesirable effects when using tannin-rich forages. This knowledge
72 would be of considerable importance for the efficient utilization of these forages in the
73 tropics.

74 Our objectives were therefore 1) to study relationships between DM, N and fibre
75 degradation of one hand, and the amount and the disappearance of the different tannin
76 fractions in the rumen on the other hand; 2) to compare DM and N degradation of these
77 forages with fermentation parameters determined with the same species and 3) to evaluate if
78 the mitigation of CH₄ production with tannin-rich plants was due to their CT and/ or HT
79 content. To achieve these objectives, we used 6 forages from leguminous trees and
80 agricultural by-products, differing by the amount and nature of tannins. We carried out an *in*
81 *situ* experiment, in order to determine the ruminal degradation of forage components
82 including the different tannin fractions, and an *in vitro* experiment, in order to measure CH₄
83 production and carbohydrate fermentation.

84

85 **Material and methods**

86 *Plant material*

87 Four tree species and two crops by-products rich in tannins available in the tropics were
88 selected. The leguminous trees were: *Acacia nilotica* pods, *Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia*
89 *sepium* and *Leucaena leucocephala* leaves. The by-products were cassava (*Manihot*
90 *esculenta*) leaves and banana (*Musa spp.*) leaves. These species are consumed by ruminants
91 and cover a large range of digestibility and of CT and/or HT content.

92 *Acacia nilotica* samples were collected from the Ferlo region of Senegal (15°N, 15°W)
93 having a mean annual rainfall of 200-400 mm and a mean temperature of 28-30°C. *Gliricidia*
94 *sepium*, *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* and *Musa spp.* were collected in
95 Guadeloupe, Basse-Terre Island (16°N, 61°W), having a mean annual rainfall of 1500-2000
96 mm and a mean temperature of 24-28°C. *Calliandra calothyrsus* was collected from native
97 shrubs in the south of the Réunion Island (21°S, 55°E) having a mean annual rainfall of 1000-
98 1500 mm and a mean temperature of 20-24°C; leaves were harvested at a late vegetative
99 stage. For *in vitro* measurements, a forage poor in tannins was used as a control. This forage
100 was hay from a 75-d regrowth of natural grassland based on *Dichanthium spp.* harvested in
101 Guadeloupe, Grande-Terre Island, France. Following collection, fresh material was dried at
102 40°C to avoid degradation or modification of tannins, ground to pass through a 1-mm grid and
103 placed in air-tight plastic bags. Upon receipt at the laboratory in Metropolitan France,
104 samples were stored at room temperature until use for *in situ* and *in vitro* measurements.

105

106 *Experiment 1: In situ rumen degradation*

107 Three rumen-cannulated Holstein dry cows were used for the study with an average body
108 weight of 737 ± 40 kg. Cows were housed in individual pens and fed natural grassland hay,
109 first cycle, containing 91.5, 1.33, 62.5 and 35.1 g/kg DM of organic matter (OM), N, NDF
110 and ADF, respectively. A fixed amount of 7.6 kg DM of hay was offered to each cow twice a

111 day: 2/3 at 0900 h, 1/3 at 1600 h. Water was on free access. *In situ* ruminal incubations
112 started after 15 days of adaptation to the diet.

113 Feeds were incubated in the rumen for 3, 6, 12, 24, 48 and 96 h. Three g of ground
114 samples were put into 5.5 × 12 cm polyester bags (pore size ca. 50 µm, model R1020,
115 Ankom, Fairport, NY). Bags were hooked to a stainless steel weight and placed in the ventral
116 sac of the rumen at 0800 h. Two successive series of incubations were performed for each
117 cow. Each series had one bag per feed and incubation time for measurements of DM, N and
118 NDF degradation. After 3, 6, 12, 24, 48 and 96 h incubation, bags were removed from the
119 rumen, immersed in cold water and then washed under running tap water until the water
120 became clear. Zero time disappearance was obtained by washing 2 non-incubated bags per
121 feed in similar conditions. Bags were kept at 4°C for 48 h then were washed in a washing
122 machine without detergent until clean water was obtained (4 cycles of 10 min), then dried at
123 40°C for 96 h and weighed to determine rumen residual DM content. For measurements of
124 CT disappearance, two bags containing 3 g of feed as specified above were incubated in the
125 rumen for each feed, each series and each cow. Bags were removed after 24 h incubation and
126 were treated as above.

127 For both *in situ* and *in vitro* experiments, management of experimental animals
128 followed the guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture and other
129 applicable guidelines and regulations for animal experimentation in the European Union
130 (European Commission, 2010). Approval number for ethical evaluation was APAFIS#8218-
131 20161151782412

132

133 *Experiment 2: In vitro fermentation*

134 Fermentations were performed using a batch technique (Rira et al., 2015). The donor animals
135 were 4 Texel wethers fitted with a ruminal cannula and weighed on average 80.7 ± 6.9 kg.
136 Wethers were fed daily 900 g hay (natural grassland based on *Dichanthium spp.*) divided into
137 equal amounts at 0700 and 1900 h. Wethers were adapted to the diet for 2 weeks before being
138 used as donors. Four series of 24-h incubations were performed, one per wether. In each
139 series, control forage and the 6 tannin-rich forages were incubated in duplicate. Samples of

140 ruminal contents were obtained through the cannula prior to morning feeding. Contents were
141 strained through a polyester monofilament cloth (250- μ m mesh aperture). The liquid phase
142 was sent to the laboratory within 10 min after rumen sampling. Incubations were performed in
143 100-mL vials containing 400 mg of feed sample, 25 mL of buffer (Goering and Van Soest,
144 1970, modified by Mould et al., 2005) and 15 mL of strained rumen fluid. Vials were gassed
145 with CO₂, sealed to ensure anaerobic conditions, and then placed in a water bath at 39 °C for
146 24 h.

147 *In vitro* gas production was measured at 24 h using a pressure transducer. After
148 recording pressure, a gas sample (5 mL) was taken for CH₄ analysis. For VFA determination,
149 0.8 mL of filtrate was mixed with 0.5 mL of 4 mg/mL crotonic acid and 20 mg/mL
150 metaphosphoric acid in 0.5 M HCl and frozen at -20°C until analysis.

151

152 *Chemical analyses*

153 Feeds and feed residues in bags were analysed according to the Association of Official
154 Analytical Chemists (AOAC, 1990). Organic matter in feeds was determined by ashing at
155 550°C for 6 h (AOAC method number 923.03). Nitrogen (N) in feeds and feed residues was
156 determined by the Dumas method, and crude protein (CP) was taken as N x 6.25 (AOAC
157 method number 992.15). For residues at 24, 48 and 96 h, residues of the 3 cows were pooled
158 in order to get enough residue for analysis. Cell wall components in feeds (NDF, ADF, ADL)
159 were determined using sodium sulphite, without heat-stable amylase and including residual
160 ash (AOAC methods number 200.04 and 973.18). Enzymatic dry matter digestibility was
161 estimated in feeds by hydrolysis with pepsin in 0.1 N HCl then with fungal cellulose (Aufrère
162 et al., 1988).

163 Soluble CT, protein-bound CT and fiber-bound CT fractions in tannin-rich plants
164 samples were extracted and analysed according to Terrill et al. (1992). A 0.5 g sample was
165 extracted thrice with a mixture of 20 mL of acetone/water (7:3, v/v), and 10 mL of diethyl
166 ether. The tubes were vortexed for 1 min and centrifuged at 27000 \times g for 15 min, at 4°C. After
167 each extraction, the upper layer was discarded and the lower diethyl ether and acetone layer
168 was transferred to a 100 mL volumetric flask and then solvents were evaporated under a

169 stream of gaseous N for 10 min. The combined fraction was made up to 100 mL with distilled
170 water, and used for quantification of the soluble CT fraction. The soluble CT fraction was
171 determined using the butanol/HCl assay (Porter et al., 1986), by adding 1 mL of the aqueous
172 extract to 6 mL of *n*-butanol/HCl (95:5, v/v). This was then vortexed for 30 s, heated at 95°C
173 on a water bath for 75 min and cooled in ice. The absorbance of the red anthocyanidin
174 products (i.e., CT) was measured at 550 nm. The solid residues obtained following extraction
175 of soluble CT were used to determine protein-bound CT. Residues were heated at 95 °C on a
176 water bath for 45 min with 15 mL of 10 g/L aqueous sodium deodocyl sulphate (SDS)
177 containing 45 mL of 2-mercaptoethanol (SDS solution). The mixture was centrifuged for 15
178 min at 27000×g and the supernatant was transferred to a 100 mL volumetric flask. The
179 process was repeated thrice, the supernatants were pooled and the volume made up to 100 mL
180 with the SDS solution. The protein-bound CT fraction was estimated by the butanol/HCl, as
181 described above. Fibre-bound CT were directly measured in the solid residue. Ten mL of
182 butanol/HCl plus 1 mL of SDS solution was directly added to the solid residue. The mixture
183 was heated at 100°C on a water bath for 75 min. The samples were then cooled, and
184 centrifuged at 27000×g for 15 min before the absorbance of the supernatant was measured at
185 550 nm, as described above. The concentration of CT in soluble, protein-bound and fibre-
186 bound fractions was calculated with a standard calibration curve of purified quebracho
187 tannins.

188 For HT, the rhodanine method was used for determination of gallotannins in feeds
189 (Inoue and Hagerman, 1988). This method detects only free gallic acid, so esters must be
190 hydrolysed before determination. The assay uses oxygen-free acid hydrolysis followed by
191 specific staining of gallic acid by rhodanine (Sigma-Aldrich, U.S.A.). Hydrolysable tannins
192 were extracted with a 70% aqueous acetone solution in an ultrasonic bath, for 20 min. The
193 hydrolysis was performed in 2 N H₂SO₄ at 100 °C for 26 h. Absorbance was measured at 520
194 nm. The gallotannin content was calculated as the difference between values from non-
195 hydrolysed and hydrolysed samples. The potassium iodate (KIO₃) method was used to
196 estimate total HT (gallotannins and ellagitannins) in feeds (Hartzfeld et al., 2002). This
197 method consists of the conversion of HT to methyl gallate (Sigma-Aldrich, U.S.A.) via
198 methanolysis, followed by oxidation with potassium iodate. Oxidation of methyl gallate by
199 KIO₃ forms a chromophore, which is determined spectrophotometrically at 525 nm. The
200 methyl gallate concentration was calculated from a standard methyl gallate calibration curve.
201 Ellagitannins were calculated as the difference between total HT and gallotannins.

202 After *in vitro* fermentation, gas composition was determined by gas chromatography
203 (Micro GC 3000A; Agilent Technologies, Les Ulis, France) within 2 h after sampling. Gas
204 molar concentration was calibrated using a certified standard. Volatile fatty acids were
205 analysed by gas chromatography using crotonic acid as internal standard on a Perkin Elmer
206 Clarus 580 GC (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) equipped with a Stabilwax-DA column
207 (30 m by 0.53 mm i.d.) (Morgavi et al., 2013).

208

209 *Calculations and statistical analyses*

210 Rumen degradability (D) of DM and N were calculated using an exponential model with lag
211 time (Dhanao, 1988):

$$212 \quad D(t) = a + b(1 - e^{-c(t-L)})$$

213 where D = rumen degradability; t = degradation time (0, 3, 6, 12, 24, 48 and 96 h); a = rapidly
214 degradable fraction (%); b = slowly degradable fraction (%) ; c = degradation rate constant of
215 the b fraction (h⁻¹); L= lag time before the beginning of degradation of the b fraction (h).

216 The nonlinear procedure (PROC NLIN) of SAS (Statistical Analysis System, 2008)
217 was used to fit degradation data to the model. This model was chosen after a preliminary
218 comparison of models with or without lag time, because lag time was higher than 3 h for 4 of
219 the 6 feeds, and because the model with lag time globally led to lower sum of squares than the
220 model without lag time. The theoretical degradability derived from the model (TDm) was
221 calculated from the equation:

$$222 \quad TDm = a + [b \times c / (c + kp)]$$

223 where kp is the passage rate of solid contents out of the rumen. A unique value of 0.04 h⁻¹ was
224 used for all feeds. Rumen degradability of NDF did not fit to the exponential model due to a
225 linear degradation rate for *Calliandra calothyrsus* and to erratic variations for other two
226 forages so that TDm could not be calculated. For NDF calculations of degradability, we used
227 instead a stepwise method (Kristensen et al. 1982):

228 $TDS = \sum_{(i=0 \text{ to } n)} (Dt_{(i+1)} - Dt_i) \times p(t_i, t_{i+1})$
 229 where $(Dt_{(i+1)} - Dt_i)$ is the amount of feed degraded between times t_{i+1} and t_i . and $p(t_i, t_{i+1})$ is
 230 the proportion of feed remaining in the rumen between times t_i and t_{i+1} with $p_{t_i} = e^{-kpt_i}$. The
 231 same calculation was also made for DM and N degradability in order to highlight the low
 232 difference between TDM and TDS results.

233 From VFA production in the *in vitro* experiment, fermented organic matter (FOM)
 234 was calculated by the stoichiometric equation of Demeyer and Van Nevel (1975):
 235 $FOM = 162 (0.5 \text{ acetate} + 0.5 \text{ propionate} + \text{butyrate} + \text{valerate})$ where FOM is expressed in
 236 mg and VFA in mmol.

237 Data of both experiments were submitted to the same mixed model using the MIXED
 238 procedure of SAS (2008) including feed ($n = 6$ for *in situ* experiment and $n = 7$ for *in vitro*
 239 experiment) as fixed effect and animal ($n = 3$ for *in situ* experiment and $n = 4$ for *in vitro*
 240 experiment) as random effect. Differences between feeds were analysed using the Tukey t-
 241 test. Effects were declared significant when $P < 0.05$. Principal component analysis was
 242 performed using Minitab[®] version 17 software (Minitab Inc., State College, PA). Average
 243 values for each of the 6 tannin-rich plants were included for 19 variables: 7 from chemical
 244 composition, 5 from experiment 1 and 7 from experiment 2.

245

246 Results

247 *Chemical composition of forages*

248 The CP concentrations varied among forages and ranged from 336 g/kg DM in *Leucaena*
 249 *leucocephala* to 69 g/kg DM in *Musa spp.* (Table 1). Fibre concentrations were high for
 250 *Dichanthium spp.* and *Musa spp.* (701 and 653 g/kg DM for NDF and 326 and 349 g/kg DM
 251 ADF, respectively). The ADL concentration fell within the range of 20-69 g/kg DM for
 252 control and *Manihot esculenta* leaves, respectively. Enzymatic DM digestibility was high for
 253 *Acacia nilotica* pods, *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium* and *Manihot esculenta*
 254 leaves (745, 720, 714 and 668 g/kg DM, respectively), moderate for control (529 g/kg DM),
 255 and low for *Musa spp.* and *Calliandra calothyrsus* leaves (406 and 359 g/kg DM,
 256 respectively).

257 Fractionation of CT revealed differences among forages (Table 1). Free CT fraction
258 was higher for *Calliandra calothyrsus* leaves and *Acacia nilotica* pods (194 and 91 g/kg DM,
259 respectively) than for *Manihot esculenta*, *Leucaena leucocephala*, *Musa spp*, and *Gliricidia*
260 *sepium* leaves. For all forages, a large proportion of CT was bound to protein compared to
261 fibre-bound CT fractions (~ 80 vs 30.5 g/kg DM, on average).

262 The greatest concentration in HT was observed for *Acacia nilotica* pods (350 g/kg
263 DM), followed by *Calliandra calothyrsus* leaves (33 g/kg DM). For the others forage leaves,
264 HT content was negligible, the least concentration was obtained in *Musa spp* leaves (4 g/kg
265 DM). For all forages, ellagitannins are predominant compared to gallotannins, and represent
266 76% and 82% of total HT for *Acacia nilotica* pods and *Calliandra calothyrsus* leaves,
267 respectively.

268

269 In situ dry matter, N and NDF degradability

270 Dry matter and CP ruminal degradation parameters varied with plant species (Table 2). For
271 DM, *Acacia nilotica* pods had the highest soluble fraction (a), while the lowest value was
272 obtained for *Calliandra calothyrsus* leaves. *Leucaena leucocephala* and *Manihot esculenta*
273 leaves had similar values of a 37.3 and 39.2%, respectively. The potentially degradable
274 fraction (b) was similar for *Leucaena leucocephala* and *Manihot esculenta* leaves (45.7 and
275 41.4%, respectively) and both of them were significantly greater than that of *Acacia nilotica*
276 pods, *Gliricidia sepium* and *Calliandra calothyrsus* leaves which had comparable values
277 (30.4, 26.7 and 25.2%, respectively). The lowest value was recorded for *Musa spp* leaves
278 (14%). The rate of degradation of the insoluble fraction (c) was higher for *Manihot esculenta*
279 leaves (0.189 h⁻¹) compared to the other plants. *Calliandra calothyrsus* leaves were the most
280 slowly degraded (0.022 h⁻¹). A lag time was shown for all forages except for *Calliandra*
281 *calothyrsus*. Dry matter degradability was the highest for *Acacia nilotica* pods, *Gliricidia*
282 *sepium* and *Manihot esculenta* leaves, with *Leucaena leucocephala* leaves being intermediate
283 and *Musa spp* and *Calliandra calothyrsus* leaves the lowest. The theoretical degradability
284 calculated according to the model and according to a stepwise calculation gave similar results
285 with the same ranking.

286 The soluble fraction (a) of N was highest for *Manihot esculenta* leaves (47.5%)
 287 compared to *Calliandra calothyrsus* leaves which had the lowest value (24.7%) (Table 2).
 288 *Acacia nilotica* pods, *Leucaena leucocephala* and *Gliricidia sepium* leaves exhibited greater b
 289 values (~ 53.5%, on average) than the other forages, and there was no difference between
 290 *Calliandra calothyrsus* and *Manihot esculenta* leaves (45.1 and 45.0%, respectively). As for
 291 DM, c value was highest for *Manihot esculenta* and lowest for *Calliandra calothyrsus* leaves
 292 (0.155 vs 0.013%). *Acacia nilotica* pods *Leucaena leucocephala* and *Musa spp* leaves were
 293 degraded at the same rate (~ 0.037%, on average). *Manihot esculenta* leaves had the highest N
 294 degradability, followed by *Leucaena leucocephala* leaves (76.2 and 65.7%, respectively).
 295 *Acacia nilotica* pods and *Gliricidia sepium* leaves had similar N degradability (63.7 and
 296 61.8%, respectively). Both *Musa spp* and *Calliandra calothyrsus* leaves had the lowest N
 297 degradability (~ 33.2%, on average). As for DM, the N theoretical degradability calculated
 298 according to the model and according to a stepwise calculation were similar.

299 Theoretical NDF degradability calculated with the stepwise method ranged between
 300 28.4% and 35.8% for *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala*, *Musa spp* and *Manihot*
 301 *esculenta* leaves. *Acacia nilotica* pods and *Calliandra calothyrsus* leaves was characterised by
 302 much lower values with 14.5% and 6.3%, respectively.

303

304 *Condensed tannins, N and NDF disappearance*

305 Results of 24-h tannins, N and NDF disappearance are presented in Table 3. Disappearance of
 306 total CT was significantly different between forages ($P < 0.01$) and ranged from 58.2% for
 307 *Calliandra calothyrsus* leaves to 94.9% for *Gliricidia sepium*. Free CT completely
 308 disappeared (100%) after 24 h, for all plant species except for *Acacia nilotica* pods and
 309 *Calliandra calothyrsus* leaves (98.3 and 97.4%, respectively). For protein-bound CT,
 310 *Gliricidia sepium* leaves exhibited the highest proportion of disappearance (92.9%) while for
 311 *Calliandra calothyrsus* leaves no disappearance was observed. *Manihot esculenta* and *Musa*
 312 *spp* leaves showed similar intermediate values of disappearance. Despite numerical
 313 differences, no significant difference among forages was observed for fibre-bound CT ($P >$
 314 0.05). They disappeared at 82.1%, on average.

315 In order to compare the disappearance of N and protein-bound CT on one hand, and of
316 NDF and fibre-bound CT on the other hand, the disappearance of N and NDF was calculated
317 after 24 h of incubation in the rumen. NDF disappearance was highest for *Manihot esculenta*,
318 *Leucaena leucocephala* and *Gliricidia sepium* leaves (~36.3%, on average), intermediate for
319 *Musa spp* leaves (27.8%) and lower for *Acacia nilotica* pods and *Calliandra calothyrsus*
320 leaves: 11.5 and 5.1%, respectively. Nitrogen disappearance was high and relatively similar
321 for *Manihot esculenta* leaves, *Leucaena leucocephala* leaves, *Gliricidia sepium* leaves and
322 *Acacia nilotica* pods (~74.3%, on average). However, it was low for *Calliandra calothyrsus*
323 and *Musa spp* leaves: 31.7 and 33.8%, respectively.

324

325 *In vitro* ruminal fermentation of forages

326 Table 4 shows total gas, CH₄ and VFA production, after 24 h of fermentation. Compared to
327 control, total gas production was highest for *Gliricidia sepium* leaves (28.01 mL/ 24h) and
328 lowest for *Musa spp* leaves (11.90 mL/ 24h) (P < 0.001). Methane production was the highest
329 and did not differ significantly for control, *Gliricidia sepium* and *Manihot esculenta* leaves,
330 whereas *Acacia nilotica* pods and *Calliandra calothyrsus* leaves exhibited the lowest CH₄
331 production when compared to control (P < 0.001). *Leucaena leucocephala* leaves generated
332 intermediate value. Total VFA production was different between forages (P < 0.001), being
333 higher with control, *Gliricidia sepium* and *Manihot esculenta* leaves (~ 48.7 mM/24h on
334 average). *Calliandra calothyrsus* leaves showed the lowest total VFA production (27.14
335 mM/24h). All forages produced more acetate than control (54.15% of total VFA). Propionate
336 proportion ranged from 23.67 for *Leucaena leucocephala* to 17.2% for *Manihot esculenta*
337 leaves, control being intermediate. Acetate:propionate ratio was the lowest for *Leucaena*
338 *leucocephala*, and the highest for *Acacia nilotica* ; the ratio was intermediate for the other
339 tannin-rich plants. Fermented organic matter when expressed in mg / 24 h or in % of OM was
340 higher for control and *Gliricidia sepium* leaves than for other forages, with the lowest value
341 for *Calliandra calothyrsus* leaves.

342 *Relationships between tannins content and in vitro and in situ parameters*

343 Interaction between tannins content and *in vitro* and *in situ* parameters are presented through a
344 Principal Component Analysis. Figure 1 shows the first two axes which explain 70% of total
345 variability: eigen values are 49 and 21% for axis 1 and axis 2, respectively. The different
346 indicators of the extent of ruminal degradation of carbohydrates are close: IVDMD obtained
347 by chemical analysis, DM degradability *in situ*, total gas production, VFA production and
348 FOM *in vitro*. *In situ* DM and N degradabilities and *in vitro* CH₄ production are opposed to
349 total CT content and to CT fractions (protein-bound CT and fibre-bound CT). Hydrolysable
350 tannins are correlated to *in situ* DM and N degradabilities and *in vitro* CH₄ and VFA
351 production but opposed to CT content. NDF content is opposed to *in vitro* CH₄ production.

352

353 Discussion

354 *Tannin composition of forage species*

355 All plant species used in this experiment were rich in CT; however, reported concentrations
356 are highly variable in the literature. The amount of CT in *Acacia nilotica* is inconsistent: some
357 studies reported 5 g/kg DM (Nsahlai et al., 2011; Pal et al., 2015) others 146 g/kg DM (Phale
358 and Madibela, 2006). For *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* and *Gliricidia sepium*,
359 Yusiati et al., (2018) reported a low CT content, but Molina-Botero et al. (2019) reported a
360 CT content of *Gliricidia sepium* higher found in this study. For the plant species used in this
361 work, the amount of CT was higher than that previously reported in plants of the same origin
362 but using the vanillin-H₂SO₄ method for CT detection (Rira et al., 2015). The CT content of
363 *Calliandra calothyrsus* reported in this experiment is similar to the maximum CT content
364 reported in the literature (368 g/kg DM, Tuwei et al., 2003). Generally, when using targeted
365 extraction of different fractions of CT, total CT concentration is high. Several authors
366 reported high values of CT when they extracted bound CT and free CT separately (Rubanza et
367 al., 2005, Gasmi-Boubaker et al., 2005, Dentinho and Bessa, 2016). We hypothesise that the
368 method of analysis that we used for CT, which involves a double-extraction procedure and
369 different solvents, extracts more tannins than more rapid methods. In fact, extraction of free
370 CT from the vacuole is very fast whereas the complete extraction of the cell wall-associated
371 fraction is 14 times longer than the extraction of the vacuolar fraction (Hanlin et al., 2010).
372 Moreover, it is well established that a variable but often important fraction of tannins may

373 resist to acetone/water extraction (Dentinho and Bessa, 2016) but can be recovered in other
374 solvents like SDS/ mercaptoethanol for protein-bound CT.

375 The proportions of the three CT fractions mentioned in the literature are variable
376 depending on studies and feeds, but the general ranking is: free CT > protein-bound CT >
377 fibre-bound CT for plants used in this study such as *Leucaena leucocephala* and *Calliandra*
378 *calothyrsus*; (Terrill et al. (1992), Jackson et al. (1996), Palmer et al. (2000), Dentinho and
379 Bessa (2016)). However, exceptions were noted by some authors like Rubanza et al. (2005)
380 who reported that protein-bound CT were higher than free CT in six species of *Acacia*, among
381 others *Acacia nilotica*, and Perez-Maldonado and Norton (1996) who reported similar
382 proportions of free, protein- and fibre bound-CT with a *Desmodium*. In our trial, the ranking
383 varied with species, and protein-bound tannins were higher than free tannins for 4 plants
384 among 7. An atypical and unexplained result was the very low free CT proportion for
385 *Gliricidia sepium*, but Jackson et al. (1996) and Giner-Chavez et al. (1997) reported similar
386 results.

387 In animal nutrition studies, the HT content of plant species is often unmeasured, or
388 measured using non-specific methods: they are often calculated by difference between total
389 tannins and CT measured by the butanol-HCl method, total tannins being calculated by
390 difference between the Folin-Ciocalteu method before and after addition of
391 polyvinylpolypyrrolidone, a tanning-binding agent. In our study, total HT content was
392 determined with methods which specifically measured the content in total HT and
393 gallotannins. Among plant species studied, only *Acacia nilotica* appears rich in HT (Rira et
394 al., 2019). Goel et al. (2015) also reported high values (186 g/kg DM, estimated by the
395 difference between total tannins and CT). Yusiati et al., (2018) determined HT using Folin-
396 Ciocalteu and butanol-HCl methods and found higher HT contents for *Leucaena leucocephala*,
397 and *Gliricidia sepium*, and similar contents for *Manihot esculenta* compared to our study. Few
398 measurements of HT are available for these forages because there are known as sources of
399 CT, but they are also a minor source of HT.

400 Variation in HT and CT contents among studies can be due to factors other than
401 methodology, such as type of subspecies (e.g. Mahdi et al., 2006, for *Acacia nilotica* pods),
402 plant stage of maturity, location, climatic conditions (e.g. Tuwei et al., 2003 for *Calliandra*
403 *calothyrsus*), and soil characteristics which are determinants of tannin concentration in plants.

404 Results obtained on forage samples used in this experiment cannot be considered as reference
405 of the species. Data from Giner-Chavez et al. (1997) show that for a same species, condensed
406 tannins content can vary within a 4- to 6-fold range, depending on plant origin.

407

408 *Fate of tannins in the rumen*

409 Data related to tannin disappearance in the digestive tract of ruminants are scarce.
410 Hydrolysable tannins can be degraded in the rumen (Brooker et al., 1994, Goel et al., 2005).
411 This degradation due to microbial enzymes starts with the action of a tannase which results in
412 gallic acid, followed by a decarboxylation resulting in different phenolic compounds, acetate
413 and butyrate among others (Bhat et al., 1998, Patra et al., 2012; Singh et al., 2012). Degraded
414 products are absorbed and excreted in urine (Murdiati et al., 1992). For this reason, we did
415 not quantify them after incubation; even if they will be undegraded, HT would be washed out
416 of the bags.

417 Most authors agree that there is no evidence for free CT degradation by microbes in
418 the rumen (McSweeney et al., 2001, Patra et al., 2012); there is no data about CT absorption
419 by the rumen wall and it has been shown that there is no post-ruminal absorption of CT
420 (Terrill et al., 1994). A 100% ruminal disappearance of free CT is logical because they are
421 water-soluble and are washed out of the bags. Disappearance was higher than 97% but not
422 total for *Acacia nilotica* pods and *Calliandra calothyrsus* leaves. This may be an analytical
423 artefact, but can be explained by the linkage of a part of dietary free CT with dietary proteins
424 or fibre, or with microbial enzymes which makes them insoluble. A 99% disappearance of
425 free CT of *Calliandra calothyrsus* between mouth and faeces was observed by Perez-
426 Maldonado and Norton (1996).

427 It may be hypothesized that the disappearance of CT linked to proteins is proportional
428 to N degradation in the rumen. However, the relation observed in this study did not support
429 this hypothesis. Only *Calliandra calothyrsus* has simultaneously a low N degradation and no
430 disappearance of protein-bound tannins. A negative value for disappearance was even
431 obtained. This may be due to a technical bias. As reported by Dentinho and Bessa (2016)
432 interactions with the insoluble matrix, proteins, polysaccharides and other polymers can

433 decrease the solubility of tannins in the extractant, underestimating tannin content of feed.
434 Another hypothesis is a linkage of dietary free CT with proteins. According to Hagerman
435 (1989), if CT are present in excess, all proteins available are tannin-bound, leading to
436 insoluble complexes. This is the case for *Calliandra calothyrsus* which contains 361 and 217
437 g/kg of total tannins and proteins, respectively. The disappearance of the other plants of our
438 trial ranged from 21 to 98%; Perez-Maldonado and Norton (1996) found a disappearance of
439 45% for *Desmodium* hay. This range of variation between plants may be due either to
440 differences in strength of binding between protein and tannins, or to the possible washing out
441 of the bags of a part of proteins.

442 The fibre-bound CT generally represent a small proportion of the total CT content of
443 plant species, but their disappearance in the rumen is very variable: between 61 and 98%
444 according to the species in our trial. On the contrary, Degen et al. (2015) found that only 40%
445 of fibre-bound tannins disappeared between mouth and faeces, but most of remaining tannins
446 were bound to ADF and ADL fractions, and amounts of ADF- and ADL-bound tannins was
447 higher in faeces than in intake. Perez-Maldonado and Norton (1996) found a disappearance of
448 70% in fibre-bound tannins from *Desmodium* between mouth and faeces, but only 3 to 10% of
449 disappearance between intake and flow leaving abomasum. Taken together, these results
450 apparently inconsistent show the extent of changes in tannin-fibre binding postruminally.
451 Fibre and tannins are bound, as protein and tannins, by hydrogen bonds and hydrophobic
452 interactions, and Dentinho and Bessa (2016) showed that these interactions are reversible;
453 tannins are released at pH 2, in the abomasum, and can bind between pH 6 and 8, in the
454 rumen and the large intestine. As a consequence, our results can be compared only with *in*
455 *vitro* incubations by Terrill et al. (1994); the very high disappearance they found could be due
456 to the use of purified CT, of which the origin was not reported in the publication.

457

458 *In situ dry matter, N and fibre degradation*

459 *In situ* DM theoretical degradability varied from ~32% for *Calliandra calothyrsus* and *Musa*
460 *spp* to ~65% for the other 4 species. These values were close to N theoretical degradability for
461 the 6 plants: ~34% for *Calliandra calothyrsus* and *Musa spp*, 61-66% for *Leucaena*
462 *leucocephala*, *Glyricidia sepium* and *Acacia nilotica*, and 76% for *Manihot esculenta*. The

463 DM degradability for *Calliandra calothyrsus* was explained by a 58% disappearance of
464 condensed tannins, which represent one third of plant DM, compensated for by a 6%
465 degradability of NDF. The degradability of *Musa spp.* was explained by a 31% degradability
466 of NDF, which represents 65% of DM. In both cases the rate constant *c* was very low. The
467 high degradability of the other 4 plants was due in part to the extensive degradability of CT,
468 and to the total disappearance of HT from bags. For the other 4 plants theoretical
469 degradability is similar, but content in CT or total tannins is very different among plants,
470 showing that tannin content is not a main driver of DM degradability. These values are often
471 different from literature data, but a comparison is difficult, because chemical composition,
472 especially in fibre, lignin and tannin content, varies among studies due to differences in origin
473 and vegetative stage of samples. Khazaal et al. (1993) did not find a relationship between total
474 extractible tannins of plants and DM disappearance after incubation *in situ*. Even when our
475 results are similar to literature data, this can correspond to different mechanisms. For instance,
476 Cheema et al. (2011) reported similar DM degradability for *Acacia nilotica* but a lower
477 soluble fraction (*a*) and a higher rate constant (*c*) than in our study.

478

479 *Methane production: relationship with dry matter degradability and tannin content*

480 Rumen *in situ* degradability, fermentation estimated through *in vitro* gas or VFA production,
481 and *in vitro* CH₄ production are negatively correlated to CT content of plants as suggested by
482 the PCA, both being reduced by CT, whereas rumen fermentation and CH₄ production vary in
483 the same way. Compared to control, *Acacia nilotica*, *Calliandra calothyrsus* and *Musa spp*
484 reduced CH₄ production to the same extent but probably not for the same reasons. The low
485 CH₄ production of *Musa spp* is a consequence of a very low DM and NDF degradability.
486 However, an inhibition of fermentation by other secondary compounds is not excluded:
487 Marie-Magdeleine et al. (2010) found large amounts of polyphenols other than tannins in
488 *Musa spp* leaves. For *Acacia nilotica* and *Calliandra calothyrsus*, tannins are the most
489 plausible cause of CH₄ inhibition suggested by lower CH₄ percentage in total gas for *Acacia*
490 *nilotica* versus other plants. Tannin concentration is often considered as the most influential
491 factor affecting ruminal fermentation (Patra and Saxena, 2011). However, it is obvious that
492 the response could also vary between different tannin sources supplemented at a similar level.
493 *Calliandra calothyrsus* had the highest CT content and CH₄ inhibition is dose-dependent
494 regardless of the plant species, as shown by Rira et al. (2015). Naumann et al. (2018) reported

495 that structural features of CT has a limited effect on *in vitro* CH₄ production and on the ability
496 to tannins to bind with proteins. The *Acacia nilotica* contains CT but is especially rich in HT,
497 and Rira et al. (2019) showed that HT could be more efficient to reduce CH₄ than CT. In this
498 study, *Gliricidia sepium* and *Manihot esculenta* did not decrease CH₄ production. In previous
499 experiments, *Gliricidia sepium* was less effective than *Leucaena leucocephala* and *Manihot*
500 *esculenta* to decrease methane *in vitro* (Rira et al., 2015) and *in vivo* (Archimède et al., 2016).
501 The absence of effect of *Manihot esculenta* on CH₄ production in this study is unexpected, but
502 is consistent with the large variability of response of CH₄ production to CT for a same plant
503 (Piluzza et al., 2014).

504 Several authors have reported that HT can reduce CH₄ production without
505 compromising overall ruminal fermentation, but to date only extracts were studied: Bhatta et
506 al. (2009) with chestnut and myrabolam, Hassanat and Benchaar (2013) with chestnut and
507 valonea, Jayanegara et al. (2015) with chestnut and sumach and Salami et al. (2018) with
508 chestnut and tara. This has been recently confirmed *in vitro* for the first time with HT of a
509 whole plant, *Acacia nilotica* (Rira et al., 2019). It is likely that HT do not interfere with rumen
510 fermentation because they do not bind to protein or fibre, and do not have an inhibitory effect
511 on rumen microbes, due to their rapid disappearance in the rumen.

512

513 *Conclusion*

514 *In situ* technique combined with analyses of the different fractions of CT in feeds and bag
515 residues is a valuable tool to understand the mechanisms underlying the effects of tannins on
516 degradability. All plant species were characterized by CT content greater than the threshold
517 value that affects both nutrient utilization and CH₄ production in the rumen, but they were
518 well degraded except *Calliandra calothyrsus*, because the sample used in this work was
519 extremely rich in CT and *Musa spp.* which was very high in fibre. However, the most
520 remarkable result is the strong antimethanogenic effect of *Acacia nilotica* pods, which were
521 particularly rich in HT. This study confirms that HT-rich plants have an interesting potential
522 to decrease CH₄ production without negative effect of carbohydrate fermentation. Provided
523 they are not toxic, as it is the case for *Acacia nilotica*, their practical use in feeding ruminants
524 should be investigated more extensively.

525

526 **Acknowledgements**

527 The authors are indebted to Harry Archimède (INRA, Guadeloupe Island), Emmanuel Tillard
528 (CIRAD, Réunion Island), and Philippe Lecomte and Bérénice Bois (CIRAD, Senegal) who
529 provided the feeds used in this work. The authors sincerely thank all the staff of UE 1414
530 Herbipôle (INRA, 63122 Saint-Genès Champanelle) for their technical collaboration in
531 animal care and management and to Anna Roche for her contribution to condensed tannins
532 analysis.

533

534 **References**

535 Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA and Hoste H 2010. Tannins in
536 tropical tree fodders fed to small ruminants: a friendly foe?. *Small Ruminant Research* 89,
537 164-173.

538 AOAC 1990. *Official methods of analysis*. 15th ed. AOAC, Washington, DC.

539 Archimède H, Rira M, Barde DJ, Labirin F, Marie-Magdeleine C, Calif B, Periacarpin F,
540 Fleury J, Rochette Y, Morgavi DP and Doreau M 2016. Potential of tannin-rich plants,
541 *Leucaena leucocephala*, *Glyricidia sepium* and *Manihot esculenta*, to reduce enteric methane
542 emissions in sheep. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 100, 1149-1158.

543 Aufrère J and Michalet-Doreau B 1988. Comparison of methods for predicting digestibility of
544 feeds. *Animal Feed Science and Technology* 20, 203–218.

545 Bhat TK, Singh B and Sharma OP 1998. Microbial degradation of tannins-a current
546 perspective. *Biodegradation* 9, 343–357.

- 547 Bhatta R, Uyeno Y, Tajima K, Takenaka A, Yabumoto Y, Nonaka I, Enishi O and Kurihara
548 M 2009. Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid
549 production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *Journal of Dairy Science*
550 92, 5512-5522.
- 551 Brooker JD, O'Donovan LA, Skene I, Clarke K, Blackall L and Muslera P 1994.
552 *Streptococcus caprinus* sp. nov., a tannin-resistant ruminal bacterium from feral goats. *Letters*
553 *in Applied Microbiology* 18, 313-318.
- 554 Cheema UB, Sultan JI, Javaid A, Akhtar P and Shahid M 2011. Chemical composition,
555 mineral profile and in situ digestion kinetics of fodder leaves of four native
556 trees. *Pakistan Journal of Botany* 43, 397-404.
- 557 Degen AA, Becker K, Makkar HP and Borowy N 1995. *Acacia saligna* as a fodder tree for
558 desert livestock and the interaction of its tannins with fibre fractions. *Journal of the Science of*
559 *Food and Agriculture* 68, 65-71.
- 560 Demeyer DI and Van Nevel CJ 1975. Methanogenesis, an integrated part of carbohydrate
561 fermentation and its control. In: I. W. McDonald and A. C. I. Warner, editors, *Digestion and*
562 *metabolism in the ruminant*. University of New England, Armidale, NSW, Australia. p. 366–
563 382.
- 564 Dentinho MTP and Bessa RJB 2016. Effect of tannin source and pH on stability of tannin-
565 protein and fibre complexes. *Revista de Ciências Agrárias Portugal* 39, 114-121.
- 566 Dhanoa MS 1988. On the analysis of dacron bag data for low degradability feeds. *Grass and*
567 *Forage Science* 43, 441–444.
- 568 European Commission. 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the
569 Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.
570 Official Journal of the *European Union* L 276/33–L 276/79.[http://eur-lex.europa.eu/legal](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=EN)
571 [content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=EN](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=EN) (Accessed 25 December 2018.)

- 572 Gasmi-Boubaker A, Kayouli C and Buldgen A 2005. In vitro gas production and its
573 relationship to in situ disappearance and chemical composition of some Mediterranean browse
574 species. *Animal Feed Science and Technology* 123, 303-311.
- 575 Giner-Chavez BI, Van Soest PJ, Robertson JB, Lascano C, Reed JD and Pell AN 1997. A
576 method for isolating condensed tannins from crude plant extracts with trivalent
577 ytterbium. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 74, 359-368.
- 578 Goel G and Makkar HP 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and
579 saponins. *Tropical Animal Health and Production* 44, 729-739.
- 580 Goel G, Puniya AK, Aguilar CN and Singh K 2005. Interaction of gut microflora with tannins
581 in feeds. *Naturwissenschaften* 92, 497–503.
- 582 Goel G, Raghav M, Beniwal V and Puniya AK 2015. Anaerobic degradation of tannins in
583 *Acacia nilotica* pods by *Enterococcus faecalis* in co-culture with ruminal microbiota. *The*
584 *Journal of General and Applied Microbiology* 61, 31-33.
- 585 Goering HK and Van Soest PJ 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures,
586 and some applications. *Agric. Handbook No. 379. ARS-USDA, Washington, DC.*
- 587 Hagerman AE 1989. Chemistry of tannin-protein complexation. In *Chemistry and*
588 *significance of condensed tannins. Springer Boston MA, 323-333.*
- 589 Hanlin RL, Hrmova M, Harbertson JF and Downey MO 2010. Condensed tannin and grape
590 cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Australian Journal of*
591 *Grape and Wine Research* 16, 173-188.
- 592 Hartzfeld PW, Forkner R, Hunter MD and Hagerman AE 2002. Determination of
593 hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate.
594 *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1785-1790.

- 595 Hassanat F and Benchaar C 2013. Assessment of the effect of condensed (acacia and
596 quebracho) and hydrolysable (chestnut and valonea) tannins on rumen fermentation and
597 methane production in vitro. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93, 332-339.
- 598 Inoue KH and Hagerman AE 1988. Determination of gallotannin with rhodanine. *Analytical*
599 *Biochemistry* 169:363–369
- 600 Jackson FS, Barry TN, Lascano C and Palmer B 1996. The extractable and bound condensed
601 tannin content of leaves from tropical tree, shrub and forage legumes. *Journal of the Science*
602 *of Food and Agriculture* 71, 103-110.
- 603 Jayanegara A, Goel G, Makkar HP and Becker K 2015. Divergence between purified
604 hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and
605 microbial population in vitro. *Animal Feed Science and Technology* 209, 60–68.
- 606 Khazaal K, Markantonatos X, Nastis A and Ørskov ER 1993. Changes with maturity in fibre
607 composition and levels of extractable polyphenols in Greek browse: effects on in vitro gas
608 production and in sacco dry matter degradation. *Journal of the Science of Food and*
609 *Agriculture* 63, 237-244.
- 610 Kristensen ES, Møller PD and Hvelplund T 1982. Estimation of the effective protein
611 degradability in the rumen of cows using the nylon bag technique combined with the outflow
612 rate. *Acta Agriculturae Scandinavica* 32, 123-127.
- 613 Le Houerou HN 1980. Browse in Africa. The current state of knowledge. In: *Proceedings of the International*
614 *Symposium on Browse in Africa*, Addis Ababa, April 8–12, 1980. International Livestock Centre for Africa, PO
615 Box 3689, Addis Ababa, Ethiopia
- 616 Mahdi H, Palmira K and Glavtch I 2006. Characterization of *Acacia nilotica* as an indigenous
617 tanning material of Sudan. *Journal of Tropical Forest Science*, 181-187.

- 618 Marie-Magdeleine C, Boval M, Philibert L, Borde A and Archimède H 2010. Effect of
619 banana foliage (*Musa x paradisiaca*) on nutrition, parasite infection and growth of
620 lambs. *Livestock Science* 131, 234-239.
- 621 McSweeney CS, Palmer B, McNeill DM and Krause DO 2001. Microbial interactions with
622 tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 91,
623 83-93.
- 624 Molina-Botero IC, Arroyave-Jaramillo J, Valencia-Salazar S., Barahona-Rosales R, Aguilar-
625 Pérez CF, Burgos AA, Arango J and Ku-Vera JC 2019. Effects of tannins and saponins
626 contained in foliage of *Gliricidia sepium* and pods of *Enterolobium cyclocarpum* on
627 fermentation, methane emissions and rumen microbial population in crossbred heifers.
628 *Animal Feed Science and Technology* 251, 1-11.
- 629 Morgavi DP, Martin C and Boudra H 2013. Fungal secondary metabolites from *Monascus*
630 spp. reduce rumen methane production in vitro and in vivo. *Journal of Animal Science* 91,
631 848–860.
- 632 Mould FL, Morgan R, Kliem KE and Krystallidou E 2005. A review and simplification of the
633 in vitro incubation medium. *Animal Feed Science and Technology* 123, 155-172.
- 634 Mueller-Harvey I and McAllan AB 1992. Tannins: their biochemistry and nutritional
635 properties. *Advances in Plant Cell Biochemistry and Biotechnology* 1, 151-217.
- 636 Murdiati T. B, McSweeney CS and Lowry JB 1992. Metabolism in sheep of gallic acid,
637 tannic acid and hydrolysable tannin from *Terminalia oblongata*. *Australian Journal of*
638 *Agricultural Research* 43, 1307-1319.
- 639 Naumann H, Sepela R, Rezaire A, Masih S, Zeller W, Reinhardt L, Robe JT , Sullivan ML
640 and Hagerman A 2018. Relationships between structures of condensed tannins from Texas
641 legumes and methane production during in vitro rumen digestion. *Molecules* 23, 2123.

- 642 Nsahlai IV, Fon FN and Basha NAD 2011. The effect of tannin with and without
643 polyethylene glycol on in vitro gas production and microbial enzyme activity. *South African*
644 *Journal of Animal Science* 41, 337-344.
- 645 Pal K, Patra AK, Sahoo A and Kumawat PK 2015. Evaluation of several tropical tree leaves
646 for methane production potential, degradability and rumen fermentation in vitro. *Livestock*
647 *Science* 180, 98–105.
- 648 Palmer B, Jones RJ, Wina E and Tangendjaja B 2000. The effect of sample drying conditions
649 on estimates of condensed tannin and fibre content, dry matter digestibility, nitrogen
650 digestibility and PEG binding of *Calliandra calothyrsus*. *Animal Feed Science and*
651 *Technology* 87, 29-40.
- 652 Patra AK and Saxena J 2011. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism
653 and ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 24-37.
- 654 Patra AK, Min BR and Saxena J 2012. Dietary tannins on microbial ecology of the
655 gastrointestinal tract in ruminants. In *Dietary phytochemicals and microbes*. Springer
656 Dordrecht, 237-262.
- 657 Perez-Maldonado RA and Norton BW 1996. Digestion of 14 C-labelled condensed tannins
658 from *Desmodium intortum* in sheep and goats. *British Journal of Nutrition* 76, 501-513.
- 659 Phale O and Madibela OR 2006. Concentration of soluble condensed tannins and neutral
660 detergent fibre-bound tannins in fodder trees and forage crops in Botswana. *Journal of*
661 *Biological Sciences* 6, 320–323.
- 662 Piluzza G, Sulas L and Bullitta S 2014. Tannins in forage plants and their role in animal
663 husbandry and environmental sustainability: a review. *Grass and Forage Science* 69, 32-48.
- 664 Porter LJ, Hrstich LN and Chan BG 1986. The conversion of procyanidins and
665 prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25, 223-230.

- 666 Rira M, Morgavi DP, Archimède H, Marie-Magdeleine C, Popova M, Bousseboua H and
667 Doreau M 2015. Potential of tannin-rich plants for modulating ruminal microbes and ruminal
668 fermentation in sheep. *Journal of Animal Science* 93, 334-347.
- 669 Rira M, Morgavi DP, Genestoux L, Djibiri S, Sekhri I and Doreau M 2019. Methanogenic
670 potential of tropical feeds rich in hydrolysable tannins. *Journal of Animal Science* 97, 2700–
671 2710.
- 672 Rubanza CDK, Shem MN, Otsyina R, Bakengesa SS, Ichinohe T and Fujihara T 2005.
673 Polyphenolics and tannins effect on in vitro digestibility of selected *Acacia* species
674 leaves. *Animal Feed Science and Technology* 119, 129-142.
- 675 Schofield P, Mbugua DM and Pell AN 2001. Analysis of condensed tannins: a
676 review. *Animal Feed Science and Technology* 91, 21-40.
- 677 Singh B, Bhat TK, Sharma OP, Kanwar SS, Rahi P and Gulati A 2012. Isolation of tannase-
678 producing *Enterobacter ludwigii* GRT-1 from the rumen of migratory goats. *Small Ruminant*
679 *Research* 102, 172-176.
- 680 Statistical Analysis System. 2008. SAS/STAT 9.2 User's Guide SAS Institute, Cary, NC.
- 681 Tavendale MH, Meagher LP, Pacheco D, Walker N, Attwood GT and Sivakumaran S 2005.
682 Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago*
683 *sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed*
684 *Science and Technology* 123, 403-419.
- 685 Terrill TH, Rowan AM, Douglas GB and Barry TN 1992. Determination of extractable and
686 bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal
687 grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 58, 321-329.

688 Terrill TH, Waghorn GC, Woolley DJ, McNabb WC and Barry TN 1994. Assay and digestion
689 of 14 C-labelled condensed tannins in the gastrointestinal tract of sheep. *British Journal of*
690 *Nutrition* 72, 467-477.

691 Tuwei PK, Kangara JNN, Mueller-Harvey I, Poole J, Ngugi FK and Stewart JL 2003. Factors
692 affecting biomass production and nutritive value of *Calliandra calothyrsus* leaf as fodder for
693 ruminants. *Journal of Agricultural Science* 141, 113–127.

694 Yusiati LM, Kurniawati A, Hanim C and Anas MA 2018. Protein binding capacity of
695 different forages tannin. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol.
696 119, No. 1, p. 012007). IOP Publishing.

697

Table 1 Chemical composition and enzymatic digestibility, in g/kg DM, of plants used in experiments

	<i>Dichantium spp.</i>	<i>Acacia nilotica</i> Pods	<i>Calliandra calothyrsus</i> Leaves	<i>Gliricidia sepium</i> Leaves	<i>Leucaena leucocephala</i> leaves	<i>Manihot esculenta</i> leaves	<i>Musa spp</i> leaves
Organic matter	927	956	956	891	897	914	895
Crude protein	84	140	217	250	336	294	69
NDF	701	227	333	240	223	285	653
ADF	326	152	228	147	125	202	349
ADL	20	38	63	57	46	69	63
Total condensed tannins	ND	157	361	112	180	166	128
Free	ND	91	194	5	54	59	38
Linked to protein	ND	51	125	69	83	95	57
Linked to fibre	ND	15	42	38	43	12	33
Hydrolysable tannins	ND	350	33	9	13	12	4
Gallotannins	ND	84	6	Traces	Traces	Traces	Traces
Ellagitannins	ND	266	27	9	13	12	4
Enzymatic DM digestibility	529	720	406	714	745	668	359

ND: not detected

Table 2 Dry matter and N degradability¹ in the rumen

	<i>Acacia nilotica</i> pods	<i>Calliandra calothyrsus</i> Leaves	<i>Gliricidia sepium</i> leaves	<i>Leucaena leucocephala</i> leaves	<i>Manihot esculenta</i> leaves	<i>Musa spp</i> leaves	SEM	P Value
Dry matter degradability								
a (%)	53.5 ^a	22.1 ^e	49.5 ^b	37.3 ^c	39.2 ^c	27.7 ^d	0.88	< 0.001
b (%)	30.4 ^b	25.2 ^b	27.6 ^b	45.7 ^a	41.4 ^a	14.0 ^c	1.86	< 0.001
a + b (%)	84.0 ^a	47.3 ^b	77.2 ^a	83.1 ^a	80.6 ^a	41.8 ^b	1.92	< 0.001
c (h ⁻¹)	0.038 ^{ab}	0.022 ^b	0.170 ^{ab}	0.075 ^{ab}	0.189 ^a	0.027 ^b	0.0337	0.013
L (h)	4.24 ^{ab}	0.00 ^b	5.84 ^a	2.68 ^{ab}	5.95 ^a	4.90 ^{ab}	1.595	0.026
TDm ² (%)	65.2 ^a	30.9 ^c	65.6 ^a	63.3 ^b	66.0 ^a	32.2 ^c	0.46	< 0.001
TDs ² (%)	65.7 ^a	32.0 ^b	65.1 ^a	63.8 ^a	65.5 ^a	33.2 ^b	0.70	< 0.001
N degradability								
a (%)	40.1 ^b	24.7 ^e	37.8 ^{bc}	35.6 ^c	47.5 ^a	29.7 ^d	0.74	< 0.001
b (%)	58.6 ^a	45.1 ^{ab}	47.3 ^a	54.6 ^a	45.0 ^{ab}	13.4 ^b	6.29	0.004
a + b (%)	98.7 ^a	69.8 ^{ab}	85.1 ^a	90.2 ^a	92.6 ^a	43.1 ^b	6.34	< 0.001
c (h ⁻¹)	0.031 ^{bc}	0.013 ^c	0.076 ^b	0.054 ^{bc}	0.155 ^a	0.025 ^{bc}	0.0115	< 0.001
L (h)	1.88 ^{bc}	0.00 ^c	5.95 ^a	0.52 ^c	5.40 ^{ab}	8.54 ^a	0.912	< 0.001
TDm ² (%)	63.7 ^c	33.2 ^d	61.8 ^c	65.7 ^b	76.2 ^a	33.3 ^d	0.57	< 0.001
TDs ² (%)	64.1 ^c	34.7 ^e	61.1 ^d	66.2 ^b	75.7 ^a	34.1 ^e	0.64	< 0.001
NDF degradability								
TDs ² (%)	14.5 ^c	6.3 ^d	28.4 ^b	30.0 ^b	35.8 ^a	30.7 ^{ab}	1.27	< 0.001

¹ Degradation D was modelled according to the equation $D(t) = a + b(1 - e^{-c(t+L)})$ where a is the rapidly degraded fraction, b the slowly degraded fraction, c the rate of degradation of fraction b, t the time of incubation in the rumen and L the lag time.

² TDm : theoretical degradability calculated according to the model ; TDs : theoretical degradability calculated according to a stepwise calculation.

Table 3 Disappearance (%) of condensed tannins, N and neutral detergent fibre in the rumen after 24 h of incubation

	<i>Acacia nilotica</i>	<i>Calliandra calothyrsus</i>	<i>Gliricidia Sepium</i>	<i>Leucaena Leucocephala</i>	<i>Manihot esculenta</i>	<i>Musa spp</i>	SEM	P Value
Condensed tannins	73.0 ^d	58.2 ^e	94.9 ^a	77.8 ^{cd}	88.6 ^{ab}	84.3 ^{bc}	2.10	<0.001
Free	98.3	97.4	100.0	100.0	100.0	100.0	-	-
Linked to protein	21.3 ^d	-7.8 ^e	92.9 ^a	58.0 ^c	83.0 ^{ab}	72.7 ^{bc}	3.24	<0.001
Linked to fibre	83.0	60.8	98.0	87.9	76.4	86.4	8.23	0.10
N	65.3 ^b	31.7 ^c	68.8 ^b	73.9 ^b	89.1 ^a	33.8 ^c	2.93	0.001
NDF	11.5 ^{ab}	5.1 ^b	31.6 ^{ab}	33.8 ^{ab}	43.4 ^a	27.8 ^{ab}	8.21	0.012

Table 4 *In vitro* ruminal fermentation of plants

	Control	<i>Acacia nilotica</i>	<i>Calliandra calothyrsus</i>	<i>Gliricidia sepium</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>Manihot esculenta</i>	<i>Musa spp</i> leaves	SEM	P value
Total gas production (mL / 24h)	34.41 ^a	23.26 ^c	16.25 ^d	28.01 ^b	24.28 ^{bc}	27.95 ^b	11.90 ^d	1.630	< 0.001
Methane production (mL / 24h)	3.92 ^a	1.75 ^c	1.66 ^c	3.54 ^a	2.59 ^b	4.00 ^a	1.41 ^c	0.201	< 0.001
Total VFA production (mM / 24h)	45.61 ^a	31.98 ^{bc}	27.14 ^c	52.49 ^a	41.53 ^{ab}	48.11 ^a	31.96 ^{bc}	3.251	< 0.001
VFA ¹ composition (%)									
Acetate	54.15 ^b	68.05 ^a	65.01 ^a	63.56 ^a	61.21 ^{ab}	64.92 ^a	62.79 ^{ab}	2.079	0.003
Propionate	19.08 ^{ab}	18.07 ^b	19.43 ^{ab}	18.34 ^b	23.67 ^a	17.20 ^b	18.20 ^b	1.084	0.010
Butyrate	19.92 ^a	6.28 ^{bc}	5.32 ^c	9.21 ^{ab}	6.50 ^{bc}	8.28 ^{bc}	6.77 ^{bc}	0.861	< 0.001
Isobutyrate	1.40 ^{bc}	0.92 ^c	2.24 ^{ab}	2.19 ^{ab}	1.78 ^{bc}	2.25 ^{ab}	2.97 ^a	0.319	< 0.001
Isovalerate	2.30 ^b	2.26 ^b	4.24 ^a	3.19 ^{ab}	3.13 ^{ab}	3.52 ^{ab}	4.28 ^a	0.761	0.005
Valerate	2.91 ^b	4.28 ^{ab}	3.46 ^{ab}	3.30 ^{ab}	3.52 ^{ab}	3.67 ^{ab}	4.64 ^a	0.469	0.010
Caproate	0.25 ^{abc}	0.13 ^c	0.29 ^{ab}	0.21 ^{abc}	0.20 ^{abc}	0.16 ^{bc}	0.35 ^a	0.045	0.003
Acetate:propionate	2.88 ^{ab}	3.90 ^a	3.41 ^{ab}	3.49 ^{ab}	2.59 ^b	3.78 ^{ab}	3.47 ^{ab}	0.281	0.038
(Acetate + butyrate):propionate	3.94	4.25	3.69	3.99	2.86	4.27	3.84	0.301	0.060
Fermented organic matter (mg / 24 h)	177 ^a	112 ^{bc}	90 ^c	180 ^a	142 ^{ab}	165 ^a	105 ^{bc}	11.3	< 0.001
Fermented organic matter (% OM)	47.3 ^{ab}	28.8 ^{cd}	23.4 ^d	51.0 ^a	39.0 ^{bc}	44.9 ^{ab}	29.9 ^{cd}	2.95	< 0.001

¹VFA: volatile fatty acids.

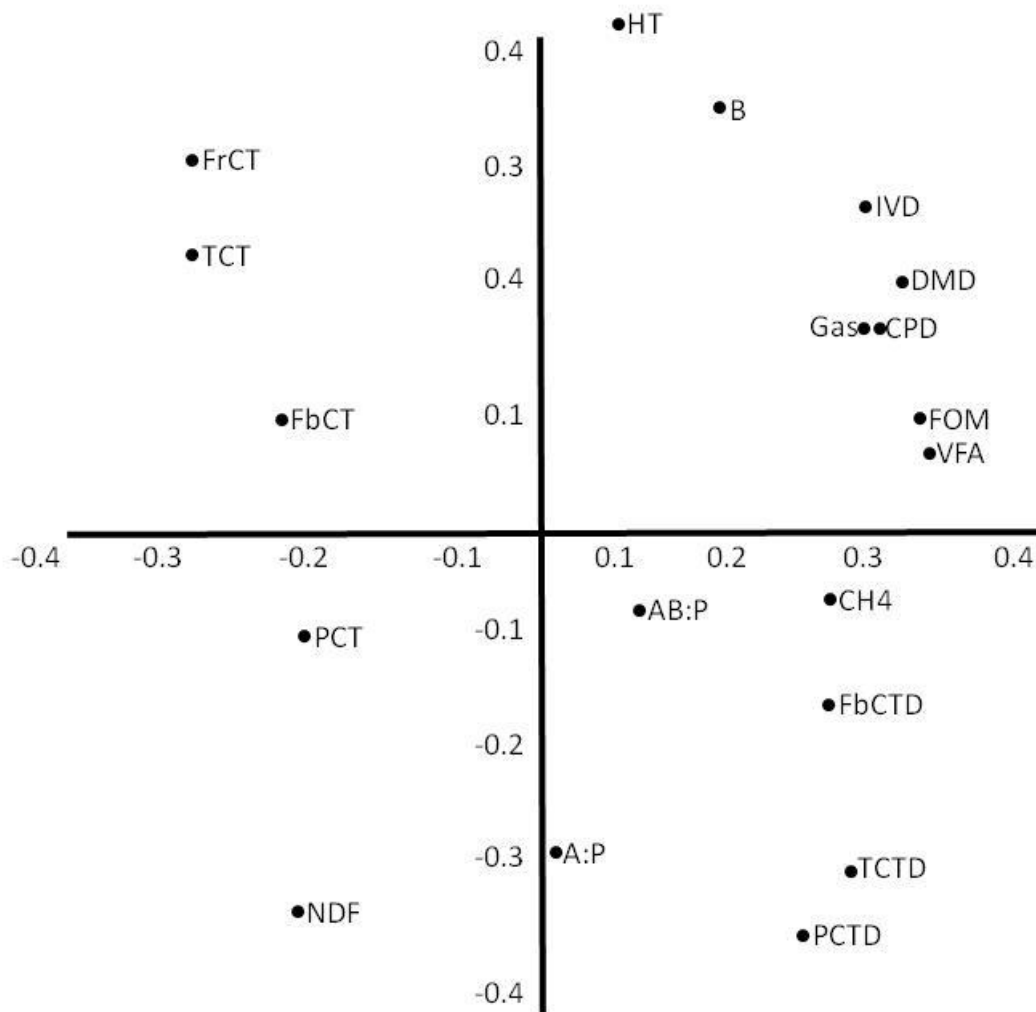


Fig.1 Principal component analysis: contribution of variables of feed characterization, and from Experiment 1 and Experiment 2.

Abcissa and intercept represent the two main components accounting for 49 and 21% of total variability, respectively. Figures are eigenvalues of the correlation matrix. Observations are average values for each tannin-rich feed (n = 6). Variables of feed characterization: NDF: neutral detergent fiber; FbCT: fibre-bound condensed tannins; FrCT: free condensed tannins; PCT: protein-bound condensed tannins; TCT: total condensed tannins; HT: hydrolysable tannins; IVD: *in vitro* digestibility. Variables from Exp. 1: DMD: dry matter degradability; CPD: crude protein degradability; FbCTD: fibre-bound condensed tannins disappearance; PCTD: protein-bound condensed tannins disappearance; TCTD: total condensed tannins disappearance. Variables from Exp. 2: VFA: total volatile fatty acid production; A:P: acetate:propionate ratio; AB:P: (acetate + butyrate):propionate ratio; B: butyrate, % total volatile fatty acids; CH4: methane production; Gas: total gas production; FOM: fermented organic matter.

Chapitre 5 : Discussion générale

Nous n'aborderons dans cette discussion que les points les plus significatifs de ce travail, en la focalisant sur la production de CH₄ entérique chez les ruminants en zone tropicale et le rôle des tanins pour la réduire, mais aussi sur des aspects peu étudiés comme le devenir des tanins dans le rumen. Les aspects plus périphériques par rapport au sujet de la thèse ne seront pas repris ici.

I. Fourrages tropicaux et méthane

À son échelle, la communauté scientifique réagit à l'état d'urgence que nous impose le réchauffement climatique : elle a donc placé, entre autres, le CH₄ parmi les sujets de recherche prioritaires. Sur les dernières décennies, de nombreuses études sur ce GES ont vu le jour dans le but tout d'abord de comprendre les sources émettrices de CH₄ parmi les activités anthropiques, puis de rechercher un moyen de lutter contre la méthanogénèse.

I.1/ Particularités des fourrages tropicaux : composition chimique et type de photosynthèse

Les pays tropicaux sont pointés du doigt en raison de la faible productivité animale par kg de lait ou de viande (Gerber et al., 2011) due en grande partie à la faible digestibilité des fourrages tropicaux. Celle-ci est due à une teneur en parois (NDF, ADF) et en lignine plus élevée que celle de fourrages tempérés à un stade de végétation comparable (Assoumaya et al., 2007). De plus, les graminées tropicales se caractérisent par un fort potentiel de production en raison de leur type de photosynthèse en C₄, par rapport à la photosynthèse en C₃ pour les graminées tempérées (Wilson, 1994). Les comparaisons directes entre animaux alimentés avec des graminées tempérées ou tropicales au sein d'une même étude sont rares dans la littérature, encore plus celles qui s'intéressent aux différences fermentaires et microbiennes entre un génotype tempéré et un génotype tropical sous le même environnement. Le premier objectif de notre travail a été de mesurer les émissions de CH₄ entérique de graminées tropicales et tempérées différant par leur stade de maturité et leur composition chimique par des ovins tropicaux (Blackbelly) et tempérés (Texel), simultanément sous un climat tropical et tempéré. Nous rappelons que notre étude est une première qui a nécessité le voyage par bateau des fourrages tropicaux des Antilles vers la France et des fourrages tempérés de la France vers les Antilles, en maintenant les conditions expérimentales identiques sur les deux sites tout au long de l'expérience. Ceci a permis une interprétation plus fine des différences entre le site tropical et le site tempéré dans la production de CH₄, la fermentation ruminale, et l'écosystème microbien.

Les résultats obtenus ont montré que les fourrages tropicaux utilisés étaient plus riches en fibres que les fourrages tempérés (742 et 604 g/kg MS, respectivement), quel que soit le stade de maturité du fourrage. Cette différence est représentative de ce qui est observé dans la bibliographie. Inversement les fourrages tempérés se caractérisent par leur teneur en protéines légèrement supérieure par rapport aux fourrages tropicaux (108 et 94 g/kg MS, respectivement). Les différences de teneur en fibres et en protéines entre les foins de bonne et de mauvaise qualité d'origine tropicale et tempérée étaient importantes, de sorte que les fourrages étudiés recouvraient la forte diversité trouvée dans les conditions de la pratique. Le stade de maturité a une influence majeure sur la composition des fourrages. L'augmentation des fibres et la diminution des protéines associées à l'avancement en âge de la repousse sont des tendances classiquement observées chez les graminées en C4 et en C3. Le métabolisme énergétique de base de la photosynthèse explique l'écart entre les graminées de climat tempéré qui ont un cycle de carbone en C3 et les espèces de climat tropical qui ont un cycle en C4. Ces cycles aboutissent à la production de glucides plus ou moins complexes, le principal étant la cellulose. Le cycle en C4 est beaucoup plus efficace en milieu tropical et fonctionne avec moins d'azote que celui en C3 ; les espèces en C4 ont un développement optimal à des températures plus élevées que les espèces en C3 (entre 30 et 40°C et 15 et 20 °C, respectivement) et leur croissance est rapide, exploitant au maximum une période de végétation courte. Les plantes en C3 ne produisent des chaînes carbonées qu'en présence de lumière, alors que les plantes en C4 emmagasinent de l'énergie pour permettre à la plante de produire des chaînes carbonées la nuit, d'où leur croissance plus rapide (Klein et al., 2014). Globalement les graminées en C4 sont plus pauvres en sucres solubles (-40 g/kg MS) et en protéines (-38 g MAT/kg MS) et plus riches en fibres (+160 g NDF/ kg MS) que celle en C3 (Tableau 2) (Archimède et al., 2011).

Tableau 2. Principales caractéristiques des graminées en C4 comparativement aux graminées en C3 et aux pailles (d'après Assoumaya et al., 2007)¹.

Item	Graminées en C4		Graminées en C3		Paille	
	Moyenne (ET)	n	Moyenne (ET)	n	Moyenne (ET)	n
NDF (g/kg MS)	701 (88)	529	541 (136)	685	760(70)	54
MAT (g/kg MS)	97 (45)	679	134 (62)	796	54 (29)	71
dMO (%)	59,8 (7,6)	563	64,0 (10,1)	490	51,5 (5,8)	59
MS%PV	1,95 (0,6)	590	2,03 (0,7)	527	1,63 (0,6)	55

1 ET= écart type ; n= nombre de traitements.

I.2/ Part de l'environnement dans la production de méthane et les processus ruminiaux

L'effet propre du site d'expérimentation, en zone tempérée ou tropicale, n'est significatif ni pour l'ingestion rapportée au poids vif (mode d'expression le plus pertinent en raison des différences de poids entre les animaux des deux races dans les deux sites), ni pour la production de CH₄, la concentration en AGV, ou la population de protozoaires totaux. L'absence de variation de l'ingestion signifie que les différences d'ingestion des fourrages entre la zone tempérée et la zone tropicale sont dues à la nature des fourrages. Par contre, en milieu tropical, la digestibilité et le temps de séjour des particules sont plus élevés, ainsi que la population de bactéries totales et d'archées méthanogènes, alors que celle d'une catégorie de protozoaires, les petits entodiniomorphes, est plus faible. La variation de la digestibilité est certainement due à un effet de la température ambiante, dont il a été montré que l'augmentation entraînait un accroissement du temps de séjour des aliments dans le rumen (revue de Morand-Fehr et Doreau, 2001) ; il est possible qu'elle soit également liée à une augmentation de la population bactérienne, bien qu'il eût été préférable de connaître l'activité des bactéries. La plus faible quantité de petits entodiniomorphes en milieu tropical a pu entraîner une plus faible prédation des bactéries, ce qui pourrait expliquer leur nombre accru. Un changement dans la diversité et la structure du microbiote ruminal avec la température et l'humidité avait été observé par Tajima et al. (2007) et Romero-Perez et al. (2011), mais ces auteurs n'avaient pas quantifié les bactéries. Les bactéries cellulolytiques que nous avons ciblées n'ont pas été affectées par le site, à l'exception de *Fibrobacter succinogenes*, qui était plus abondante dans le site tempéré. Mais cette espèce dégrade les fibres sans produire de H₂,

et ses variations n'entraînent donc pas de changement de la production de CH₄ (Chaucheyras-Durand et al., 2010). Au contraire, la population des espèces cellulolytiques productrices de H₂ et générant donc du CH₄ comme les *Ruminococci* (Morgavi et al., 2010) n'a pas varié avec le site.

La différence de quantité d'archées méthanogènes que nous avons observée entre milieu tempéré et milieu tropical n'avait à notre connaissance jamais été montrée auparavant. Toutefois, elle n'a pas été suffisante pour entraîner des différences de production de CH₄ ; on peut penser que la population d'archées méthanogènes n'est pas un facteur essentiel régissant la production de CH₄.

I.3/ Effet de la nature des fourrages sur la production de méthane

Le schéma expérimental de cet essai, permettant de différencier les effets du site de ceux de la nature des fourrages, a ainsi permis de montrer la prédominance de l'effet fourrage, tant sur l'ingestion que sur la production de CH₄. L'ingestion a été plus élevée pour les graminées en C3 que pour les graminées en C4, mais la digestibilité des graminées en C4 était inférieure à celle des graminées en C3. Ces résultats sont en accord avec la littérature (Leng 1990, Kennedy 1995, Assoumaya et al., 2007). L'ingestion d'un fourrage est liée à son temps de séjour dans le rumen qui lui-même varie dans le même sens que sa teneur en fibres ; logiquement dans notre essai le temps de séjour dans le rumen a été plus faible pour les graminées tropicales.

Concernant la production de CH₄, les graminées en C3 génèrent moins de CH₄ quel que soit son mode d'expression (g/kg MSI ou MODI). Il est admis que les graminées tropicales sont associées à des émissions de CH₄ plus élevées par kg de MS ingérée que les graminées tempérées (Kurihara et al., 1999; Ulyatt et al., 2002) en liaison avec une plus grande lignification et, par suite, avec un temps de séjour plus long des aliments dans le rumen. Toutefois, les comparaisons directes entre les graminées tropicales et tempérées sont très rares, à notre connaissance seuls Margan et al. (1988) ayant trouvé une production de CH₄ plus élevée de 23% avec des graminées en C4 qu'avec des graminées en C3 dans un même site. Archimède et al. (2011) ont conclu d'une méta-analyse portant sur 22 études que les émissions de CH₄ étaient plus élevées de 12 % pour les ruminants alimentés avec des graminées en C4 que pour ceux alimentés avec des graminées en C3. Pour les graminées en C4, les émissions de CH₄ ont été plus élevées avec le foin de mauvaise qualité. En revanche,

aucun effet du stade de maturité n'a été observé pour les graminées en C3. L'effet du stade de maturité sur les émissions de CH₄ pour les fourrages en C3 est controversé : absence de différence pour certains auteurs (Pinares-Patiño et al., 2003; Molano et Clark, 2008; Hart et al., 2009), émissions plus élevées avec un stade de maturité avancé pour d'autres (Boadi et al., 2002 ; Jonker et al., 2015). Cette absence de cohérence est dû au fait qu'un stade de maturité avancé entraîne une augmentation de la teneur en parois, qui tend à augmenter la production de CH₄, et une baisse de digestibilité, ce qui tend à la réduire.

Dans notre étude il n'y avait aucun effet du type de fourrage (C3 ou C4) sur le nombre de protozoaires, de bactéries totales et cellulolytiques ou d'archées méthanogènes. Pitta et al. (2010) ont montré une forte variation de diversité des bactéries ruminales pour des bouvillons alimentés avec des fourrages en C3 ou en C4 mais ces auteurs n'ont pas quantifié les populations. Nous avons trouvé une interaction importante entre le site et le type de fourrage pour les bactéries totales, *Ruminoccus albus*, les archées méthanogènes et les protozoaires. Ces populations étaient plus élevées avec les fourrages tropicaux dans le site tropical, ce qui suggère que la dégradation des fourrages en C4 de mauvaise qualité est une caractéristique des tropiques et nécessite des communautés microbiennes plus denses. Il était permis de penser qu'il y aurait plus d'archées méthanogènes avec les fourrages tropicaux, puisqu'ils ont produit plus de CH₄ que les fourrages tempérés. Toutefois Zhou et al. (2011) et Danielsson et al. (2012) ont trouvé que la production de CH₄ n'était pas liée à la population totale d'archées méthanogènes. La production de CH₄ pourrait être liée à l'activité des archées méthanogènes plutôt qu'à leur abondance (Popova et al., 2011).

I.4/ Effet du génotype sur la production de méthane et les processus ruminiaux

Dans notre essai, deux races de moutons ont été choisies : le Texel originaire d'Europe et sélectionné pour la viande, et le Blackbelly, race moins productive originaire des Caraïbes. Il n'y a eu aucun effet de la race sur l'ingestion, la digestibilité, la production de CH₄ par jour ou par kg de MS, les AGV et les critères du microbiote que nous avons étudiés. Nous avons par contre observé des interactions entre la race et le site pour l'ingestion et le CH₄, et entre la race et le fourrage pour l'ingestion ; aucune interaction n'a été significative pour la digestibilité. L'absence d'effet de la race sur la digestibilité est assez étonnant, car s'il y a peu de variation pour des races productives issues de la même zone géographique (par exemple Doreau et Diawara, 2003 entre bovins Charolais et Holstein), il y a souvent des différences entre une race productive de zone tempérée et une race moins productive de zone tropicale, en

particulier pour des fourrages de mauvaise qualité (Wilkes et al., 2012, entre moutons Damara et Merinos). Ces différences sont attribuées à une meilleure digestion microbienne et à un recyclage accru de l'azote chez les races adaptées à leur milieu. Dans notre cas, l'absence d'effet de la race pourrait être due à une faible différence de microbiote ruminal entre les Texel et les Blackbelly. En effet, les moutons utilisés dans l'essai sont nés et ont été élevés près de leurs sites expérimentaux respectifs ; or l'établissement du microbiote ruminal est influencé par l'exposition nutritionnelle et/ou environnementale chez les jeunes animaux après la naissance (Saro et al., 2018) même si l'animal hôte exerce un effet de contrôle sur son propre microbiote (Danielsson et al., 2012). Ce résultat corrobore des études montrant que les populations d'archées méthanogènes, des bactéries et des protozoaires ne diffèrent pas entre races (Rooke et al., 2014 pour les bovins). Un dernier élément expliquant l'absence de différences entre races est que les conditions climatiques au cours de cet essai n'étaient pas suffisamment extrêmes pour favoriser des réponses adaptatives différenciant entre les races.

L'absence d'un effet de la race sur les émissions de CH₄ confirme des données de la littérature sur vaches laitières (Münger et Kreuzer, 2008, entre Holstein, Simmental et Jersey) et sur bouvillons (Fraser et al., 2014, entre un génotype productif et Welsh Black). Nos résultats montrent en revanche une production de CH₄ plus élevée pour les Blackbelly sous climat tempéré, tandis que le contraire a été observé sous climat tropical. Ces différences ne sont pas expliquées par des différences dans le microbiote. Il est possible que les mesures que nous avons réalisées, qui portaient sur des quantités de certaines souches bactériennes ou d'archées méthanogènes, ne soient pas appropriées pour mettre en évidence des différences de microbiote, comme le feraient des analyses plus poussées de métagénomique ou des mesures portant sur l'activité du microbiote plutôt que sur la quantité d'archées ou de bactéries. Ainsi l'ensemble des travaux sur le microbiote ruminal semble avoir établi qu'il n'existe pas de lien entre la production de CH₄ et le nombre d'archées méthanogènes.

L'ingestion volontaire a été plus élevée pour les Blackbelly que pour les Texel dans le site tropical alors qu'aucune différence n'a été enregistrée dans le site tempéré. Ce résultat indique une adaptation réduite des Texel aux environnements chauds et humides. On peut supposer que les moutons Texel qui, pendant les heures les plus chaudes de la journée, ont respiré rapidement et ont été sensiblement affectés par la chaleur (observation visuelle), réduisent leur ingestion pour diminuer leur température interne. Comme la production de CH₄ par kg de MS est plus élevée en France pour les Blackbelly et aux Antilles pour les Texel, cela explique qu'il n'y ait pas d'interaction entre la race et le site pour le CH₄ exprimé en

g/jour. Concernant l'interaction race-fourrage sur l'ingestion, celle-ci a été plus élevée pour les Texel que pour les Blackbelly pour les graminées en C3 de mauvaise qualité, alors qu'elle était plus élevée pour les Blackbelly que pour les Texel pour les graminées en C4 de mauvaise qualité. Hunter et Siebert (1985) ont suggéré une interaction entre le génotype et la qualité du fourrage entre *Bos taurus* et *Bos indicus*. Les *Bos taurus* ingéraient moins de fourrages de mauvaise qualité que *Bos indicus*, alors qu'aucune différence n'a été observée entre les génotypes pour les fourrages de bonne qualité.

II. Plantes tropicales et tanins : leur caractérisation et leur estimation

Les fourrages tropicaux présentent la particularité d'être riches en métabolites secondaires, entre autres les tanins qui peuvent être considérés comme une arme à double tranchant. En effet, ces molécules ont la capacité de se fixer aux protéines et aux fibres résultant en une diminution de la dégradation des protéines et des fibres alimentaires dans le rumen mais aussi en une perturbation des activités microbiennes. Ces mêmes aspects négatifs peuvent également être considérés comme positifs sur la méthanogenèse ruminale et la fermentation post ruminale, Ainsi les propriétés des tanins ont alimenté l'idée que les fourrages riches en tanins pourraient être utilisés comme additifs pour l'alimentation animale sous forme d'extraits, ou sous forme de plante entière en remplacement des fourrages classiques. De plus, la plupart des fourrages riches en tanins sont relativement bon marché à cultiver, leurs avantages, effet antiparasitaire entre autres, pourraient facilement compenser leurs coûts, ce qui en fait une solution très attrayante pour limiter certains problèmes environnementaux en production de ruminants, en particulier dans les pays en développement, comme indiqué précédemment dans l'Etat de l'Art.

II.1/ Choix des tanins étudiés

Les principales plantes riches en tanins utilisées actuellement dans l'alimentation des ruminants en zone tropicale sont des légumineuses, souvent arbustives, ce terme incluant généralement les arbres (Roothart et Paterson, 1997). Les plus répandues dans les tropiques humides sont *Leucaena leucocephala* et *Calliandra calothyrsus*, qui peuvent être cultivées à grande échelle en Afrique subsaharienne et Asie du Sud afin que les rameaux récoltés soient distribués aux animaux. Mais il existe une très grande variété de légumineuses arbustives présentes sur les pâturages, et fournissant une nourriture de complément aux animaux, surtout

en saison sèche : *Sesbania*, différentes espèces d'*Acacia*,... Il y a aussi des arbustes autres que des légumineuses, et des légumineuses herbacées comme différentes espèces de *Desmodium*, et enfin des sous-produits de culture, actuellement mal valorisés, de bananier ou de manioc par exemple. Nous avons souhaité utiliser des ressources très utilisées dans la pratique, ainsi que des sous-produits potentiellement intéressants. Ainsi les feuilles de manioc ont fait l'objet d'études en Afrique subsaharienne (Fasae et al., 2009), aux Antilles (Marie-Magdeleine et al., 2010a) et en Asie du Sud-est (Supriyadi et al., 2014). Il en est de même des feuilles et pseudotroncs de bananier aux Antilles (Marie-Magdeleine et al., 2010b), où un système intégrant les productions de bananes et de ruminants a été proposé (Archimède et al., 2012). Les légumineuses herbacées ne pouvaient pas être utilisées, car elles sont intégrées dans la prairie naturelle, et donc disponibles en trop faible quantité pour des études, contrairement aux zones tempérées où elles sont fréquemment cultivées en prairie artificielle (sainfoin, lotier, sulla).

Les études présentées dans le chapitre 3 ont été réalisées en collaboration avec le centre INRA de Guadeloupe, et portaient sur des sources de tanins condensés. Les tanins condensés sont de loin les plus utilisés pour l'alimentation des ruminants ; c'est sur eux que portent la plupart des études concernant les tanins, mais leurs effets sur la méthanogenèse comportent encore des incertitudes. Le schéma expérimental adopté, avec un essai *in vivo* en carré latin, limitait les sources de tanins étudiées à 3. Le choix a porté sur les deux légumineuses arbustives les plus répandues sur place : *Leucaena leucocephala* et *Gliricidia sepium*, et sur la feuille de manioc *Manihot esculenta*. A noter qu'en Guadeloupe les légumineuses arbustives sont souvent présentes dans des haies, et que *Calliandra calothyrsus* est absente.

Les études présentées dans le chapitre 4 ont été réalisées à l'INRA de Theix en Auvergne, sur des plantes riches en tanins condensés ou hydrolysables, et comme il n'y avait pas d'essai *in vivo*, elles pouvaient porter sur un nombre plus important de plantes. Nous avons voulu garder les trois plantes utilisées dans les études du chapitre 3, avec de nouveaux échantillons prélevés en Guadeloupe. Nous avons également obtenu un échantillon de *Calliandra calothyrsus* fourni par le CIRAD de la Réunion.

Le choix d'étudier en parallèle des tanins hydrolysables a été motivé par les connaissances limitées sur leurs effets au niveau du fonctionnement du rumen. Ils sont peu utilisés dans l'alimentation des ruminants en raison de leur réputation de toxicité pour l'animal (Reed, 1995), alimentée par des études rapportant des toxicoses (Zhu et al., 1992

avec l'acide tannique; Pérez et al., 2011 avec la feuille d'un chêne (*Quercus pyrenaica*)), les plantes tropicales les plus souvent citées pour leur toxicité étant *Clidemia hirta* et *Terminalia oblongata*. Toutefois, toutes les plantes contenant des tanins hydrolysables ne sont pas toxiques, et il est maintenant connu que la toxicité du chêne, par exemple, est principalement due à des phénols de faible poids moléculaire plutôt qu'aux tanins (Butler et Rogler, 1992), Aussi, depuis quelques années les recherches sur les tanins ont élargi leur champ d'intérêt et ont montré des résultats *in vitro* prometteurs avec les tanins hydrolysables sur la fermentation ruminale (Pellikaan et al., 2011; Hassanat et Benchaar, 2013). Une étude bibliographique préalable des teneurs en tanins hydrolysables reportées dans la littérature nous a conduit à sélectionner la feuille et le pseudotrunc de bananier, cités comme riches à la fois en tanins hydrolysables et condensés (Ally et Kunjikutty, 2000) et une espèce d'acacia, *Acacia nilotica*, cette dernière étant une source typique des tropiques secs (zones sahéliennes) mais qui semblait particulièrement riche en tanins hydrolysables (Barman et Rai, 2008), et dont les feuilles comme les gousses contenaient des tanins et étaient consommés par les animaux. Des résultats expérimentaux obtenus chez la chèvre faisaient état d'effets positifs sur l'ingestion, d'absence d'effet sur la digestibilité et d'absence de toxicité lorsque *Acacia nilotica* était incorporé à raison de 25% de feuilles (Rubanza et al., 2007) ou 31% de gousses (Hidoza et Gemiyo, 2017) dans la ration. En outre, la détannification des gousses d'*Acacia nilotica* à l'aide différentes méthodes n'a pas amélioré l'absorption et la digestibilité par des chèvres suggérant le caractère non toxique de cette plante (Tshabalala et al., 2013).

II.2/ Teneurs des plantes étudiées en tanins hydrolysables

Dans les essais de nutrition ou d'alimentation animale où la chimie des tanins n'est pas l'objet d'étude, la teneur des plantes en tanins hydrolysables est souvent calculée indirectement par différence entre les tanins totaux et tanins condensés mesurée par la méthode butanol-HCl ; les tanins totaux étant calculés par la méthode de Folin-Ciocalteu avant et après précipitation des tanins par l'addition du PVPP. Dans notre étude, la teneur totale en tanins hydrolysables a été déterminée par des méthodes qui mesuraient spécifiquement la teneur totale en tanins hydrolysables et en gallotannins pour essayer de donner une estimation précise, compte tenu de l'importance de ces molécules dans notre étude. C'est probablement pour cette raison que nous n'avons pas trouvé de tanins hydrolysables dans la partie fourragère du bananier, car les analyses disponibles avaient utilisé la méthode de Folin-Ciocalteu, qui donne des résultats parfois aléatoires. Parmi les

espèces végétales étudiées, seule *Acacia nilotica* s'est révélée riche en tanins hydrolysables. La concentration des tanins hydrolysables que nous avons trouvée dans les feuilles d'*Acacia nilotica* se situe dans la plage des valeurs rapportées dans d'autres études utilisant des méthodes non spécifiques qui ont estimé les tanins hydrolysables par la différence entre les tanins totaux et tanins condensés (Rubanza et al., 2005; Alam et al., 2007). Cependant, certains auteurs ont trouvé des teneurs en tanins hydrolysables plus faibles que dans la présente étude (Gemedà et Hassen, 2015; Pal et al., 2015) ou carrément une absence des tanins hydrolysables (Zabré et al., 2018), ces derniers auteurs trouvant au contraire une concentration importante de tanins hydrolysables dans *Acacia raddiana*, ce qui n'avait pas été signalé auparavant. L'utilisation de la HPLC a montré une grande variété de composés phénoliques dans *Acacia nilotica*, y compris les tanins hydrolysables et condensés qui ont été identifiés mais non quantifiés (Mueller-Harvey et al., 1987; Al-Wakeel et al., 2007); parmi eux, l'acide caféique est l'un des plus importants. La concentration de tanins hydrolysables dans les gousses d'*Acacia nilotica* était élevée dans notre expérience, mais Goel et al, (2015) ont également rapporté une valeur supérieure (186 g/ kg MS, estimée par la différence entre les tanins totaux et les tanins condensés). Dans nos échantillons de feuilles et de gousses, les ellagitanins étaient prédominants par rapport aux gallotanins. Ceci est tout à fait logique car les ellagitanins sont plus communs que les gallotanins dans les plantes. La prédominance des ellagitanins par rapport aux gallotanins a également été observée par Alam et al. (2007) pour les feuilles d'*Acacia nilotica* et de deux autres espèces, et par Hassanat et Benchaar (2013) pour des extraits de châtaignier et de chêne riches en tanins hydrolysables.

Nous avons montré que les plantes riches en tanins condensés contiennent également de petites quantités de tanins hydrolysables. Ceci est peu connu, car les plantes reconnues pour leur teneur élevée en tanins condensés ne sont généralement pas l'objet d'analyse des tanins hydrolysables. Toutefois Yusiati et al, (2018) ont indirectement déterminé les tanins hydrolysables par la méthode de Folin-Ciocalteu et de butanol-HCl et ont trouvé des teneurs en tanins hydrolysables plus élevées pour *Leucaena leucocephala* et *Gliricidia sepium*, et une teneur semblable à la nôtre pour *Manihot esculenta*. Wina et al. (2000) ont rapporté une teneur plus faible de tanins hydrolysables pour *Calliandra calothyrsus* (< 0,3%). On peut admettre que ces plantes sont une source majeure de tanins condensés et une source mineure de tanins hydrolysables. Dans ce qui suit, on considèrera que les effets observés sur la méthanogenèse sont attribués en majorité aux tanins condensés pour *Leucaena leucocephala*, *Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia sepium*, *Manihot esculenta* et *Musa* (bananier) et aux tanins

hydrolysables pour *Acacia nilotica*, tout en ayant conscience des effets possibles des deux catégories de tanins et d'autres composés secondaires.

II.3/ Teneurs des plantes étudiées en tanins condensés

Concernant les méthodes d'analyse des tanins condensés, la bibliographie est abondante et diversifiée. Les études vont des procédés d'extraction aux méthodes de détermination jusqu'à l'élucidation de leur structure chimique (relation activité-structure chimique). L'un des grands défis auxquels ce domaine de recherche est confronté provient de la diversité des structures chimiques que les mots « tanins condensés » englobent. En effet, une seule plante peut synthétiser des dizaines, parfois même des centaines de molécules de tanins condensés, sous forme soluble ou insoluble. C'est pourquoi dans les études du chapitre 4 nous avons analysé les trois fractions de tanins condensés : libres (ou extractibles ou solubles) et liés aux protéines ou aux fibres (insolubles) afin de donner une estimation précise des différentes fractions de tanins pour tenter de comprendre les interactions liées à chacune de ces fractions dans le rumen. Par ailleurs, dans les méthodes d'analyse colorimétrique, la nature du standard influe sur le résultat, probablement en raison de l'effet de la structure des tanins sur l'absorbance. C'est pourquoi dans les études du chapitre 3 nous avons utilisé comme standard pour chaque plante un extrait de tanin condensé du commerce (quebracho) d'une part, et l'extrait purifié de la plante d'autre part. Nous ne l'avons pas fait pour les plantes utilisées dans les études du chapitre 4, en raison de leur grand nombre et du temps considérable nécessaire pour purifier un échantillon. Enfin, nous n'avons pas utilisé la même méthode colorimétrique pour les deux séries d'étude. Nous avons employé la méthode vanilline – H₂SO₄ dans la première série, car c'est la méthode en usage à l'INRA de Guadeloupe, où a été effectuée la détermination colorimétrique, et la méthode butanol-HCl dans la deuxième série, car l'analyse complète a été faite à l'INRA de Theix, et nous souhaitons employer la méthode qui est considérée de plus en plus comme la référence.

Les plantes étudiées dans ce travail de thèse s'avèrent très riches en tanins condensés ; toutefois, la concentration est très variable d'une étude à l'autre. L'accumulation des tanins condensés dans la plante dépend de plusieurs paramètres ; certains sont liés à l'environnement comme la sécheresse, la concentration de CO₂ et la fertilité du sol (les sols acides favorisent la synthèse de tanins) ; d'autres sont liés aux propriétés des plantes comme l'espèce, la partie végétale utilisée et le stade maturité. La quantité des tanins condensés dans *Acacia nilotica* est controversée. Certaines études ont rapporté 5 g/kg de MS (Nsahlai et al., 2011; Pal et al.,

2015), d'autres 146 g/kg de MS (Phale et Madibela, 2006). Pour *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* et *Gliricidia sepium*, Yusiati et al. (2018) ont observé une faible teneur en tanins condensés, mais Molina-Botero et al. (2019) ont rapporté une teneur en tanins condensés de *Gliricidia sepium* supérieure à la nôtre. La teneur en tanins condensés de *Calliandra calothyrsus* rapportée dans cette expérience est similaire à la teneur maximale en tanins condensés relevée dans la littérature (368 g/kg de MS, Tuwei et al., 2003), mais des teneurs nettement plus faibles ont été reportées. La teneur très élevée que nous avons observée peut s'expliquer par l'âge élevé de la plante : l'échantillon récolté était une plante native à un stade de récolte très tardif. Souvent, lorsqu'on utilise l'extraction ciblée de différentes fractions des tanins condensés, la concentration totale est élevée. Plusieurs auteurs ont rapporté des valeurs élevées de tanins condensés lorsqu'ils extrayaient séparément les tanins condensés libres et les tanins condensés liés (Gasmi-Boubaker et al., 2005 ; Dentinho et Bessa, 2016). Nous supposons que la méthode d'analyse que nous avons utilisée pour le dosage des tanins condensés qui implique une double extraction et différents solvants, extrait plus de tanins condensés que les méthodes qui impliquent une seule extraction. En fait, l'extraction des tanins condensés libres des vacuoles est très rapide, tandis que l'extraction complète de la fraction associée à la paroi cellulaire est 14 fois plus longue que l'extraction de la fraction vacuolaire (Hanlin et al., 2010). De plus, il est bien établi qu'une fraction variable mais souvent importante des tanins peut résister à l'extraction d'acétone/eau (Dentinho et Bessa, 2016) mais peut être récupérée dans d'autres solvants comme le SDS/mercaptoéthanol pour les tanins condensés liés aux protéines. Toutefois, pour les 5 plantes testées dans notre étude et pour lesquelles d'autres auteurs ont fait une séparation des 3 fractions de tanins condensés, ce sont nos résultats qui sont les plus élevés (Tableau 3) (Jackson et al., 1996 ; Giner-Chavez et al., 1997 ; Rubanza et al., 2005 ; Pires Pereira et al., 2018).

Dans nos premières études, nous avons analysé *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* et *Gliricidia sepium* par la méthode de la vanilline H₂SO₄ en utilisant un standard commercial qui est le quebracho et les standards internes pour chaque plante. Les résultats obtenus montrent que, par rapport au standard de la plante, le quebracho résulte en une forte sous-estimation des tanins condensés pour *Manihot esculenta* et *Gliricidia sepium* et une légère surestimation pour *Leucaena leucocephala*. Les résultats de Giner-Chavez et al. (1997) avaient montré que pour une même concentration l'absorbance est plus élevée pour *Manihot esculenta* que pour *Gliricidia sepium*, et la plus faible pour le quebracho. Mais le résultat concernant *Leucaena leucocephala* est surprenant et inexplicable car on aurait pu penser que l'utilisation du standard interne de la plante maximisait la concentration en tanins. Selon

Giner-Chavez et al. (1997), l'utilisation d'un standard interne comme référence dans le dosage des tanins condensés par la méthode butanol-HCl est le meilleur choix, les standards externes comme les cyanidines et les delphinidines sous-estimant la teneur en tanins condensés parce que ces substances génèrent des chromophores dont l'absorbance à 550 nm est élevée. Inversement l'absorbance des chromophores produits à partir des tanins du quebracho a été inférieure à celle obtenue avec les standards internes des plantes résultant en une surestimation de la teneur en tanins condensés. L'utilisation des standards internes est considérée comme la référence car ils ont une structure chimique similaire à de l'échantillon à tester. Au contraire, compte tenu des écarts importants entre les études dosant les tanins condensés et pour résoudre ce problème, Hagerman et Butler (1989) ont recommandé que le quebracho soit le tanin condensé utilisé comme standard avec la méthode du butanol-HCl. De ce fait, c'est le standard le plus utilisé dans les études d'alimentation des ruminants.

Quel que soit le standard utilisé, les concentrations en tanins condensés dans les études du chapitre 3 sont plus faibles comparativement aux concentrations mesurées par la méthode du butanol-HCl pour les mêmes espèces végétales dans les études du chapitre 4. Certes les échantillons n'étaient pas les mêmes, mais l'importance des différences de concentration laisse penser à un effet de la technique d'analyse.

Nos résultats sont en adéquation avec Terrill et al. (1992) qui rapportent des teneurs plus faibles de tanins condensés avec la méthode vanilline-HCl mais en opposition avec les résultats de Jackson et al. (1996) et Perez-Maldonado et Norton (1996b) qui ont observé une concentration plus élevée des tanins condensés avec la méthode vanilline-HCl par rapport à la méthode butanol-HCl. Comme cela a été mentionné plus haut, les teneurs élevées que nous avons obtenues avec la méthode butanol-HCl peuvent s'expliquer en partie par le fait que nous avons pratiqué une double extraction, en appliquant scrupuleusement le protocole de Terrill et al. (1992).

Tableau 3. Proportion de tanins condensés extractibles, liés aux protéines et liés aux fibres des plantes étudiées : comparaison avec la bibliographie.

Plantes et auteurs	TC totaux (g/kg MS)	% TC extractibles	% TC liés aux protéines	% TC liés aux fibres
<i>Gliricidia sepium</i>				
Nos résultats (publication 6)	112	4	62	34
Jackson et al. (1996)	41	0,2	92	8
Giner-Chavez et al. (1997) ¹	48-104	0-53	44-93	3-20
Giner-Chavez et al. (1997) ²	85-104	0	85-90	10-15
Pires Pereira et al. (2018)	36	ND ⁴	97	ND
<i>Calliandra calothyrsus</i>				
Nos résultats (publication 6)	361	54	35	11
Jackson et al. (1996)	58	87	11	2
Jackson et al. (1996) ³	194	81	15	4
Perez-Maldonado et Norton (1996b)	75	63	16	21
<i>Leucaena leucocephala</i>				
Nos résultats (publication 6)	180	30	46	24
Jackson et al. (1996)	60	91	7	2
<i>Manihot esculenta</i>				
Nos résultats (publication 6)	166	36	57	7
Giner-Chavez et al. (1997) ¹	44-145	73-85	14-26	1
Giner-Chavez et al. (1997) ²	38-84	68-84	15-30	1-2
<i>Acacia nilotica</i>				
Nos résultats (publication 6)	157	58	32	10
Rubanza et al. (2005)	53	33	42	25

¹ feuilles immatures, 4 échantillons

² feuilles matures, 2 échantillons

³ *Calliandra sp.*

⁴ ND : non déterminé

II.4/ Importance relative des trois fractions de tanins condensés

Les proportions des trois fractions de tanins condensés mentionnées dans la littérature varient selon les études et les aliments, mais le classement est généralement le suivant : tanins condensés extractibles > tanins condensés lié aux protéines > tanins condensés liés aux fibres (par exemple Terrill et al., 1992 (pour 3 plantes) ; Jackson et al., 1996 (pour 14 plantes)). Toutefois, des exceptions ont été notées par certains auteurs comme Rubanza et al, (2005) qui ont signalé une proportion de tanins condensés liée aux protéines plus élevée que celle des tanins extractibles chez six espèces d'*Acacia*, notamment *Acacia nilotica*. Une tendance similaire a été observée par Mupangwa et al. (2000) sur 3 plantes. Pour leur part, Perez-Maldonado et Norton (1996b) ont signalé des proportions similaires de tanins condensés extractibles, liés aux protéines et aux fibres avec *Desmodium*. Pires Pereira et al. (2018) n'ont pas détecté de tanins liés aux fibres dans les 7 plantes qu'ils ont étudiées ; on peut attribuer ce résultat à une mauvaise maîtrise de la technique. Dans notre essai, le classement variait selon les espèces; un résultat atypique et inexplicé était la très faible proportion de tanins condensés extractibles pour *Gliricidia sepium* mais ce résultat concorde avec les résultats de trois autres auteurs pour la même plante (Jackson et al., 1996 ; Giner-Chavez et al., 1997 ; Pires Pereira et al., 2018) quelle que soit sa provenance et le standard (interne ou commercial) utilisé pour l'expression des résultats. Cette plante contiendrait une fraction significative de tanins extractibles seulement quand les feuilles sont immatures (Giner-Chavez et al., 1997). Pour *Manihot esculenta*, le classement des fractions par ordre d'importance est le même dans nos études que dans deux résultats de la bibliographie (Giner-Chavez et al., 1997) mais nos résultats sont très différents de ceux de Jackson et al. (1996) pour *Leucaena leucocephala* (30 et 91% de tanins extractibles, respectivement). La distribution des tanins condensés dans les fractions solubles et insolubles (tanins condensés libres et liés aux protéines ou aux fibres) dans une plantes pourrait être en partie sous contrôle génétique, car les croisements interspécifiques de *Sesbania sesban* et *Sesbania goetzei* réalisé par Reed (2001) indiquent que la fraction insoluble des tanins condensés est un caractère héréditaire. De plus, la méthode de collecte et de manipulation des fourrages peut également avoir un effet important sur les valeurs obtenues car des complexes tanins condensés-protéines et/ou tanins condensés-fibres peuvent se former (Renard et al., 2017).

III. Tanins et dégradation microbienne

III.1/ Devenir des tanins dans le rumen

Les données relatives à la disparition des tanins dans le tube digestif des ruminants sont rares. Cependant, il est admis que les tanins hydrolysables peuvent être dégradés dans le rumen (Goel et al., 2005). Cette dégradation, due aux enzymes microbiennes, commence par l'action d'une tannase qui aboutit à la formation de l'acide gallique, suivie d'une décarboxylation résultant en différents composés phénoliques, acétate et butyrate entre autres (Bhat et al., 1998, Patra et al., 2012; Singh et al., 2012). Les produits dégradés sont absorbés et excrétés dans l'urine (Murdiati et al., 1992). Pour cette raison, nous ne les avons pas quantifiés après incubation; même s'ils n'étaient pas dégradés, ils seraient lessivés hors des sachets de nylon.

Le devenir des tanins condensés dans le système digestif des ruminant est très ambigu, pour cause les limites méthodologiques qui entravent souvent leur détermination dans les différents compartiments digestifs, car souvent les composants des digesta interfèrent avec les essais colorimétriques. Les résultats obtenus avec les tanins condensés purifiés sont généralement limités, et l'utilisation de traceurs radioactifs est rare. En outre, on ne sait pas si les tanins de ces extraits purifiés présentent les mêmes caractéristiques que la plante entière. La plupart des auteurs conviennent qu'il n'y a pas de preuve de la dégradation des tanins condensés libres par les microorganismes dans le rumen, cette propriété a été mise en évidence la première fois par Makkar et al. (1995a,b). Ces auteurs ont exposé les microorganismes du rumen à de petites quantités de tanins condensés de quebracho, en utilisant une technique *in vitro* de simulation du rumen (RUSITEC) pendant 8 jours afin d'induire des enzymes capables de dégrader ces molécules. Toutefois, il n'y avait pas de dégradation des tanins condensés par ces microorganismes exposés, suggérant que ces derniers sont dépourvus de l'équipement enzymatique qui leur permet de dégrader les tanins condensés et que celui-ci ne peut être induit même après 8 jours d'exposition aux tanins condensés. Des études ultérieures sont arrivées à la même conclusion (McMahon et al., 2000 ; McSweeney et al., 2001a,b ; Patra et al., 2012). Il n'y a pas de données sur l'absorption des tanins condensés libres par la paroi du rumen; il a seulement été démontré qu'il n'y a pas d'absorption post-ruminale des tanins condensés (Terrill et al., 1994), ces auteurs ont trouvé que 89 % des tanins condensés de *Lotus pedunculatus* marqués par radioactivité et injectés dans l'abomasum de moutons adaptés à un régime à base de lotus ont été récupérés dans le tube digestif. Même si la radioactivité n'a pas été détecté dans le sang, une disparition totale

(à 100%) des tanins condensés libres dans le rumen est logique car ils sont solubles dans l'eau et sont probablement lessivés hors des sachets de nylon. La disparition était supérieure à 97 % mais pas totale pour les gousses d'*Acacia nilotica* et les feuilles de *Calliandra calothyrsus*. Il peut s'agir d'un artefact analytique, mais peut s'expliquer également par la liaison d'une partie des tanins condensés aux protéines et/ou fibres alimentaires ; ou avec les enzymes microbiennes qui les rendent insolubles. Une disparition de 99 % des tanins condensés libres de *Calliandra calothyrsus* entre la bouche et les fèces a été rapportée par Perez-Maldonado et Norton (1996a). Dans une autre étude, ces auteurs ont constaté que 67 % du traceur radioactif ont été absorbés (non présents dans les digesta) chez les moutons recevant une infusion ruminale de tanins condensés de *Desmodium* marqués au ^{14}C . Ces chercheurs ont rapporté que 72% du traceur radioactif ont été perdus dans le rumen et 28 % en phase post-ruminale. De plus, 10% du ^{14}C infusé a été excrété dans l'urine (Perez-Maldonado et Norton, 1996b). En utilisant les techniques colorimétriques pour analyser les tanins libres et liés aux protéines dans les digesta, ces auteurs ont conclu que les tanins condensés libres ou leurs produits de dégradation pourraient être absorbés dans le système gastro-intestinal des ruminants. Cependant, les mécanismes responsables de cette dégradation et les raisons des contradictions des résultats n'ont pas encore été expliqués.

On peut penser que la disparition des tanins condensés liés aux protéines est proportionnelle à la dégradation de l'azote dans le rumen. Cependant, la relation trouvée dans notre essai est lâche. Seule *Calliandra calothyrsus* présente simultanément une faible dégradation de l'azote et aucune disparition de tanins liés aux protéines avec une valeur négative de disparition. Cela peut être dû à un biais technique comme Dentinho et Bessa (2016) l'ont signalé, les interactions avec la matrice insoluble formée entre les protéines, les polysaccharides et d'autres polymères peuvent diminuer la solubilité des tanins dans le solvant, sous-estimant ainsi la teneur en tanins condensés des aliments. Une autre hypothèse est la complexation des tanins condensés libres avec les protéines alimentaires.

Selon Hagerman (1989), si les tanins condensés sont présents en excès, toutes les protéines disponibles sont piégées, ce qui entraîne la formation de complexes insolubles. C'est le cas pour *Calliandra calothyrsus* qui contient respectivement 361 et 217 g/kg de tanins condensés et de protéines totaux. La disparition des tanins condensés des autres plantes de notre essai se situe entre 21 et 98%; Perez-Maldonado et Norton (1996a) ont constaté une disparition de 45% des tanins condensés du foin de *Desmodium*. Cette variation entre les plantes peut être due soit à des différences de force des liaisons entre les protéines et

les tanins condensés, soit au lessivage possible d'une partie des protéines des sachets de nylon.

Les tanins condensés liés aux fibres représentent généralement une faible proportion de la teneur totale en tanins condensés des espèces végétales, mais leur disparition dans le rumen est très variable : entre 61 et 98 % selon les espèces dans notre essai, Terrill et al. (1994) ont observé une disparition de 97 à 99 % des tanins condensés purifiés d'origine inconnue lorsqu'elle a été incubée pendant 4 heures dans le rumen. Néanmoins, Degen et al. (1995) ont constaté que seulement 40 % des tanins liés aux fibres disparaissaient entre la bouche et les fèces, mais que la plupart des tanins restants étaient liés aux fractions ADF et ADL, que ces fractions de tanins condensés liés étaient plus élevées dans les fèces que dans l'ingéré. Perez-Maldonado et Norton (1996a) ont constaté une disparition de 70 % entre la bouche et les fèces des tanins liés aux fibres de *Desmodium*, mais seulement 3 à 10 % de la disparition entre l'ingestion et le flux sortant de l'abomasum. Dans l'ensemble, ces résultats, apparemment divergents, montrent l'ampleur des interactions post-ruminales entre les tanins condensés et les fibres.

Comme pour les protéines, les tanins condensés se lient aux fibres par des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes, Dentinho et Bessa (2016) ont montré que ces interactions sont réversibles, et que les tanins sont libérés à pH 2, dans l'abomasum, et qu'ils peuvent se lier entre pH 6 et 8, dans le rumen et le gros intestin. Par conséquent, nos résultats ne peuvent être comparés qu'avec les incubations *in vitro* de Terrill et al. (1994); la très forte disparition qu'ils ont constatée pourrait être due à l'utilisation de tanins condensés purifiée, dont l'origine est non précisée. Bien qu'aucune différence significative entre les espèces végétales n'ait été trouvée dans notre essai, des différences numériques ont été observées.

III.2/ Tanins et dégradation de l'azote et des parois

L'incorporation de plantes ou d'extraits riches en tanins dans les régimes des ruminants est souvent associée à une diminution de l'ingestion et de la digestibilité attribuée à une réduction du niveau d'ingestion (Landau et al., 2000) et une carence en protéines dégradables nécessaire à la croissance optimale des microorganismes du rumen (Waghorn, 2008). Ces aspects ont été abordés dans les publications 3, 4 et 6 de cette thèse où la digestibilité de *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* a été étudié *in vivo*, la fermentation ruminale de ces mêmes plantes a été étudiée *in vitro* et celle d'*Acacia nilotica*, *Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala*, *Manihot*

esculenta et *Musa spp* a été étudiée *in situ* et *in vitro*. Les principaux résultats sont rassemblés dans le tableau 4.

Pour l'essai *in vivo*, nos résultats diffèrent de ceux publiés par plusieurs auteurs qui décrivent souvent une réduction ou une absence d'effet sur l'ingestion des tanins condensés (Bhatta et al., 2002; Animut et al., 2008b ; Malik et al., 2017 ; Lima et al., 2019). Dans notre cas l'ingestion volontaire a augmenté avec les tanins condensés. Peu d'auteurs ont observé un accroissement d'ingestion avec l'apport de tanins. Dans un essai de Carulla et al. (2005), l'ingestion a augmenté quand un extrait d'*Acacia mearnsii* a été inclus dans le régime. La même tendance a été observée par Bhatta et al. (2005), pour les tanins condensés issus de *Prosopis cineraria* (contenant 13,3% de tanins condensés). Mais la tendance générale est que la consommation de fourrages à forte teneur en tanins condensés (généralement > 5% de la matière sèche) réduit significativement l'ingestion volontaire, tandis que des concentrations inférieures à 5% de matière sèche n'ont pas d'influence sur l'ingestion (Aerts et al., 1999 ; Patra et Saxena, 2011). La raison majeure de la diminution de l'ingestion avec les tanins condensés est une réduction de la palatabilité des aliments liée à l'astringence des tanins condensés. Dans notre cas le fait de donner les plantes riches en tanins sous forme de granulés a sûrement masqué leur astringence ce qui a favorisé l'ingestion. Par ailleurs, il y a aussi une raison tenant à une diminution de l'encombrement de la ration, par rapport à un fourrage long. Minson et Milford (1968) ont rapporté que la distribution d'un foin de graminées sous forme de granulés a augmenté l'ingestion volontaire de 47% en moyenne chez des moutons.

De même, Hung et al. (2013) ont rapporté une augmentation de l'ingestion quand *Leucaena leucocephala* a été incorporée dans le régime sous forme de granulés. L'effet des granulés sur l'ingestion s'explique aussi par une réduction du temps de séjour des particules dans le rumen, dans la mesure où elles sont déjà sous forme de particules fines (Faichney et al., 2004). Contrairement à nous, Tan et al. (2012) ont rapporté que la forme granulée améliore la digestibilité de la plupart des nutriments chez le bovin, ce qui suggère que ce procédé pourrait être utilisé comme moyen pour augmenter non seulement l'ingestion mais aussi la digestibilité. L'incorporation de plantes riches en tanins condensés n'a pas modifié significativement la digestibilité de la MO, malgré une diminution numérique de 5 à 6 points selon les sources de tanins. Dans la littérature, les tanins condensés ne changent pas (Hariadi et Santoso, 2010 ; Malik et al., 2017 ; Lima et al., 2019) ou diminuent la digestibilité des aliments (Carulla et al., 2005; Animut et al., 2008 a; Grainger et al., 2009, Kamel et al. 2019).

Tableau 4. Récapitulatif des valeurs de digestibilité ou de dégradabilité mesurées dans les différents essais, *in vivo*, *in situ* ou *in vitro*

	Critère	Témoin	<i>Leucaena</i>	<i>Gliricidia</i>	<i>Manihot</i>	<i>Calliandra</i>	<i>Musa</i>	<i>Acacia</i>
Matière sèche (DT MS : dégradabilité théorique de la matière sèche) ou Matière organique (dMO : digestibilité de la matière organique ; MOF : matière organique fermentée)								
Publi 3 <i>In vivo</i>	dMO %	71,2	65,1	66,6	65,8			
Publi 6 <i>In situ</i>	DT MS %		63,3	65,6	66,0	30,9	32,2	65,2
Publi 4 <i>In vitro</i>	MOF %	50,6	40,7	44,7	28,3			
Publi 6 <i>In vitro</i>	MOF %	47,3	39,0	51,0	44,9	23,4	29,9	28,8
NDF (dNDF : digestibilité du NDF ; D 24 h NDF : dégradabilité à 24 h du NDF)								
Publi 3 <i>In vivo</i>	dNDF %	76,2	64,3	66,9	66,8			
Publi 6 <i>In situ</i>	D 24 h NDF		30,0	28,4	35,8	6,3	30,7	14,5

La variabilité de la réponse vis-à-vis de la digestibilité est souvent attribuée à la concentration des tanins condensés ; la digestibilité est affectée lorsque la concentration en tanins condensés dépasse le seuil de 5%.

La plus faible digestibilité du NDF des plantes riches en tanins par rapport au témoin peut être expliquée par trois facteurs : (i) une augmentation du taux de sortie des particules du rumen liée à la granulation ; (ii) les tanins condensés compromettent la digestion des fibres en formant des complexes résistant à la digestion microbienne; et (iii) les tanins peuvent ralentir ou inhiber l'activité des bactéries impliquées dans la dégradation des fibres.

Dans l'essai *in vivo*, *Manihot esculenta* a entraîné une diminution de la digestibilité des protéines par rapport aux autres plantes, et donc une excrétion d'azote fécal plus

forte. L'effet des tanins sur la digestion des protéines est probablement dû à la formation de complexes protéines-tanins qui préviennent la dégradation des protéines par les microorganismes du rumen (Mueller-Harvey, 2006). Une diminution apparente de la digestibilité des protéines lorsque les plantes riches en tanins sont consommées peut être due à (i) une diminution des quantités de protéines digérées dans le rumen et augmentation des quantités de protéines disponibles pour la digestion dans l'intestin grêle et/ou (ii) une diminution de la digestibilité intestinale lorsque les complexes protéines-tanins ne sont pas complètement dissociés dans l'abomasum (Mueller-Harvey, 2006).

La dégradabilité de l'azote dans le rumen et la disparition des tanins liés aux protéines dans le rumen ont été plus élevées pour *Manihot esculenta* que pour les deux autres plantes riches en tanins ; il faut donc chercher d'autres hypothèses. L'action des tanins condensés pourrait dépendre en partie de leur diversité structurale (procyanidine/prodelphinidine ratio par exemple) (Mueller-Harvey, 2006). Indépendamment de l'action des tanins condensés, la diminution de la digestibilité apparente des protéines pour *Manihot esculenta* pourrait être due à une plus grande lignification de la paroi cellulaire. Cette hypothèse n'est toutefois pas confirmée par des estimations de la teneur en lignine obtenues par SPIR (données non présentées dans la publication) qui est de l'ordre de 50 g/kg pour les 4 fourrages.

Les résultats de l'essai *in situ* montrent des dégradabilités de la matière sèche étonnamment proches des valeurs de digestibilité rapportées pour les mêmes plantes dans l'essai *in vivo*. En revanche, pour une raison inexplicée, les dégradabilités *in situ* du NDF sont beaucoup plus faibles que les digestibilités *in vivo*. Les quantités de matière organique fermentées dans les essais *in vitro* sont d'un ordre de grandeur plus faible que la digestibilité *in vivo* ou la dégradabilité *in situ*, ce qui est normal, et peu différentes entre plantes (à l'exception de *Manihot esculenta* dans l'un des deux essais *in vitro*), ce qui montre une cohérence entre les résultats obtenus par les différentes approches, *in vivo*, *in situ* et *in vitro*. Pour *Calliandra calothyrsus* et *Musa spp* la dégradabilité était faible, à peu près la moitié de la valeur rapportée pour les autres plantes. La même tendance était observée pour la dégradabilité de l'azote. La faible dégradabilité de *Calliandra calothyrsus* s'explique par la disparition de 58% des tanins condensés, qui représentent un tiers de la matière sèche de la plante, compensée par une dégradation de 6% du NDF. La faible dégradabilité de la matière sèche pour *Musa spp* s'explique par une faible dégradation, de 31%, du NDF, qui représente 65% de la matière sèche de la plante. La forte dégradabilité des 4 autres plantes est

certainement due en partie à la dégradation des tanins condensés et la disparition totale des tanins hydrolysables (spécialement pour *Acacia nilotica*) des sachets.

Pour *Acacia nilotica*, *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala* et *Manihot esculenta*, la dégradabilité théorique est similaire, mais la teneur en tanins condensés ou en tanins totaux est très différente d'une plante à l'autre, ce qui montre que la teneur en tanin n'est pas le principal facteur qui détermine la dégradabilité. Les valeurs obtenues sont souvent différentes des données de la littérature, mais la comparaison semble difficile, parce que la composition chimique, en particulier la teneur en fibres, en lignine et en tanins, varie selon les études en raison des différences d'origine et de stade végétatif des échantillons. Khazaal et al. (1993) n'ont pas trouvé de lien entre les tanins totaux extractibles des plantes et la disparition de la matière sèche *in situ*. Même lorsque nos résultats correspondent aux données de la littérature, cela peut correspondre à différents mécanismes : la dégradation de la matière sèche pour l'*Acacia nilotica* est similaire à celle d'une étude précédente (Cheema et al., 2011), mais avec une fraction soluble inférieure (a) et une vitesse de dégradation (c) plus élevée.

III.3/ Tanins condensés et microbiote ruminal

Au début des années 2000, diverses expériences *in vivo* ont commencé à montrer le potentiel anti-méthanogène des plantes et des extraits riches en tanins condensés chez les ruminants (Woodward et al., 2001, 2002; Waghorn et al., 2002; Puchala et al., 2005). Ces résultats prometteurs ont motivé le besoin de comprendre comment les tanins pourraient inhiber la méthanogenèse et pour répondre à cette question les chercheurs se sont dirigés vers l'analyse des différentes populations microbiennes du rumen en menant des études aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* sur les changements quantitatifs et qualitatifs dans ces populations en réponse à l'apport de tanins, avec des méthodes de plus en plus sophistiquées.

En agissant directement ou indirectement sur la méthanogenèse, les tanins condensés ont la capacité de perturber plus ou moins la production de CH₄ ruminal. Les principales questions qui doivent être abordées sont : quels sont les mécanismes précis par lesquels les tanins agissent sur les microorganismes? Quelles sont les caractéristiques chimiques des tanins condensés responsables de ces interactions? Les tanins condensés peuvent-ils diminuer la méthanogénèse sans altérer la dégradabilité des aliments, c'est-à-dire agissent-ils préférentiellement sur certains groupes microbiens par rapport à d'autres? En effet, les tanins condensés peuvent directement agir sur les archées méthanogènes ou sur les microorganismes

qui leur sont associés et qui interviennent en amont de la méthanogenèse comme les protozoaires et les bactéries cellulolytiques (fournisseurs de H₂), compromettant de ce fait la digestibilité. Dans la publication 4, nous avons essayé de répondre à ces questions de recherche en mesurant *in vivo* la quantité et la diversité des bactéries totales, des principales bactéries cellulolytiques, des protozoaires et des archées méthanogènes.

Les résultats ont montré que les tanins condensés de *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala* et *Manihot esculenta* n'ont eu aucun effet sur le nombre de protozoaires. La littérature rapporte des effets différents des tanins condensés sur la population des protozoaires ; ils varient de l'absence d'effet à un effet très négatif (revues de Makkar, 2003 ; Patra et Saxena, 2009). Dans les études *in vitro* de courte durée (système batch) les diminutions de population sont fréquentes. Ainsi, Bhatta et al. (2015) ont noté une diminution de la population des protozoaires ciliés du rumen en testant *in vitro* des plantes tropicales ayant une concentration de tanins de 26 % et 14 %. Sallam et al. (2010) ont observé une diminution des protozoaires *in vitro* avec *Leucaena leucocephala*. L'effet est plus prononcé sur les holotriches. Monforte-Briceno et al. (2005) ont testé *in vitro* les propriétés de défaunation de 15 arbres fourragers, qui contiennent des teneurs variables de tanins condensés. Sur les 15 fourrages, l'effet inhibiteur sur les protozoaires s'observait chez les fourrages dont la teneur en tanins condensés était supérieure à 10% de la matière sèche, soit *Acacia farnesiana*, *Calliandra calothyrsus* et *Lysiloma latisiliquum* pour lesquels le nombre de protozoaires était réduit à zéro au bout de 24 h. Les changements dans les populations microbiennes pendant les incubations *in vitro* sont toutefois difficiles à interpréter parce qu'elles ne reproduisent pas parfaitement ce qui se passe dans le rumen : les systèmes *in vitro* peuvent induire des biais liés en particulier à une baisse du pH, et à un milieu artificiel (tampon artificiel, source azotée simple et non protéines) pouvant avoir une action pour réduire les protozoaires. C'est pour cette raison que nous n'avons pas compté les protozoaires dans l'essai *in vitro* (publication 4). Quelques études rapportent une diminution des protozoaires associée à l'emploi des tanins *in vivo* (Lima et al., 2019 ; Malik et al., 2017). Wann et al. (2019) ont rapporté une diminution des protozoaires, mais leur essai est peu convaincant car la plante étudiée (bambou) contient des quantités modérées de tanins condensés, mais des quantités importantes de saponines. Inversement, Carulla et al. (2005) ont rapporté une inefficacité de l'extrait de tanins d'*Acacia mearnsii* sur la population de protozoaires chez des moutons. Le même résultat est rapporté *in vivo* par Piñeiro-Vázquez et al. (2018) sur des génisses avec les tanins condensés de *Leucaena leucocephala* et par Baruah

et al. (2019) sur des moutons avec une source de tanins hydrolysables et une source de tanins condensés. De même, Jayanegara et Palupi (2011) ont montré que la population de protozoaires n'était pas affectée par les tanins condensés, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*; cette tendance a été confirmée par les mêmes auteurs dans deux méta-analyses qui n'ont révélé aucune relation entre les tanins et la population de protozoaires (Jayanegara et al., 2012, 2018ab). Patra et Saxena (2009) ont suggéré que l'effet des plantes riches en tanins condensés sur les populations de protozoaires dépend de la nature et de la concentration des tanins, il est donc difficile de tirer des conclusions définitives.

Dans la présente étude, le nombre de bactéries totales a diminué en présence de plantes riches en tanins condensés sans que le nombre *Fibrobacter succinogenes* ne soit affecté. La population de *Ruminococcus albus* était plus grande dans le rumen des moutons consommant les plantes riches en tanins condensés ; cependant, le nombre de *Ruminococcus flavefaciens* a diminué. Pilajun et Wanapat (2013) ont rapporté une invariabilité du nombre des bactéries totales déterminées par PCR quantitative. Cependant, d'autres études utilisant la PCR quantitative ont démontré que les tanins condensés entraînaient une diminution du nombre de bactéries (Patra et Saxena, 2009; Anantasook et al., 2013 ; Ridwan et al., 2019 ; Sharifi et al., 2019). Carrasco et al. (2017) ont noté une modification de la composition du microbiote ruminal chez des bouvillons Holstein, en réponse aux tanins condensés ; le séquençage à haut débit des amplicons 16S rRNA a montré une réduction de l'abondance de *Prevotella* et de *Fibrobacter* en faveur de la population des *Ruminococcaceae*. Sharifi et al. (2019) ont également rapporté une sensibilité dose-dépendante de la population de *Ruminococcus albus* et de *Fibrobacter succinogenes*, cependant la population de *Ruminococcus flavefaciens* n'a pas été touchée. *Fibrobacter succinogenes* a également été fortement réduite par *Leucaena leucocephala* (Longo et al., 2013), bien que cette bactérie ne soit pas productrice d'H₂ contrairement aux autres bactéries cellulolytiques et donc que sa réduction n'affecte pas la méthanogénèse. Les tanins condensés impactent aussi la diversité des bactéries ; ceci a été montré par Min et al. (2014b) par le séquençage à haut débit, où le nombre des *Bacteroides* et de *Firmicutes* a augmenté *in vivo* avec les tanins condensés comparativement à un témoin. La même tendance a été rapportée par Diaz-Carrasco et al. (2017) avec un ratio *Firmicutes* : *Bacteroides* plus élevé en présence de tanins *in vivo*.

L'activité inhibitrice des tanins condensés vis-à-vis des bactéries est liée à la capacité des tanins condensés à former des complexes avec les parois bactériennes provoquant des changements morphologiques qui perturbent leur attachement. Les tanins condensés

précipitent les enzymes extracellulaires sécrétés (Jones et al., 1994). Dans la présente étude, la réduction de la production de CH₄ et l'absence d'effet sur la concentration d'ammoniac et la dégradation de la matière organique suggèrent que les tanins condensés contenu dans les fourrages testés peuvent avoir une plus grande affinité pour les protéines microbiennes que pour les protéines alimentaires.

L'absence d'effet des fourrages contenant des tanins condensés sur les populations de protozoaires et des bactéries dans la présente étude, avec une diminution de la production de CH₄, suggère un effet direct de ces molécules sur les archées méthanogènes, mais aucune diminution de la population d'archées méthanogènes n'a été observée. Le pouvoir anti-méthanogène des tanins condensés est souvent attribué à une réduction de la population d'archées méthanogènes, comme quelques expériences l'ont montré avec des plantes riches en tanins condensés en utilisant des techniques allant de la culture bactérienne jusqu'au séquençage (Tavendale et al., 2005; Animut et al., 2008a ; puchala et al., 2012 ; Diaz-Carrasco et al., 2017 ; Ridwan et al., 2019). Inversement, plusieurs rapports ont échoué à montrer un effet inhibiteur des tanins condensés sur la population des archées méthanogènes (Norrapoke et al., 2012; Pilajun et Wanapat, 2013). Des études approfondies sur la résistance, la tolérance ou l'adaptation des archées méthanogènes aux tanins condensés sont nécessaires pour caractériser les causes de cette résistance. Longo et al. (2013) ont observé que la population des archées méthanogène a diminuée en présence de plantes riches en tanins (*Leucaena leucocephala*, entre autres) *in vitro* mais que celle-ci a récupéré sa valeur initiale au bout de 24 h. L'action des tanins condensés sur les archées méthanogènes peut être due à une action létale sur les individus ou à l'inhibition de leur activité ou des deux (Tavendale et al., 2005; Popova et al., 2011) ; dans notre étude seule la quantité des archées méthanogènes a été mesurée. L'effet des tanins condensés sur les populations microbiennes dépend de l'affinité relative des tanins condensés pour les protéines alimentaires par rapport aux protéines microbiennes. Les activités anti-méthanogènes des tanins condensés peuvent être dues à la précipitation des protéines fonctionnelles (enzymes et coenzyme) situées sur des sites accessibles inhibant de ce fait l'activité de cette population (Pilajun et Wanapat, 2013). Il convient de noter que la majorité des archées méthanogènes libres est souvent intégrée dans un biofilm à la surface des particules végétales où le H₂ est produit par les bactéries cellulolytiques (Leng, 2014); de ce fait elles sont protégées et ne peuvent pas être inhibées par les agents anti-méthanogènes comme les tanins condensés.

Dans la majorité des essais, il n'y a pas eu de lien entre la production de CH₄ et le nombre d'archées méthanogènes. Les variations alors observées dans les émissions de CH₄ sont liées à des modifications de la diversité des archées méthanogènes, ou de leur activité. Une relation structure-activité a été mise en évidence par Saminathan et al., (2016) grâce à une approche métagénomique, ces auteurs ont rapporté que les fractions de tanins condensés de différents poids moléculaires provenant de *Leucaena leucocephala*, avaient modifié la taille et la diversité des populations d'archées méthanogènes *in vitro* ; ils ont montré que l'abondance relative du groupe *Thermoplasmata* a augmenté avec l'augmentation du poids moléculaire des fractions de tanins condensés, tandis que le groupe prédominant d'archées méthanogènes *Methanobrevibacter* a significativement été réduit. De même, les résultats issus de l'étude métagénomique rapportée par Min et al. (2014a) ont indiqué que l'incorporation des écorces de pin (source de tanins condensés) dans le régime alimentaire de chèvres a sélectivement modifié la population des bactéries et des archées méthanogènes. Similairement, Tan et al. (2011b) ont rapporté une modification de la diversité de la population d'archées méthanogènes chez des bovins consommant des tanins condensés, comparativement à un témoin : le nombre d'archées méthanogènes appartenant aux ordres des *Methanomicrobiales* et des *Methanobacteriales* est divisé par 2 et 5, respectivement.

Pour conclure, l'utilisation d'un composé particulier comme inhibiteur dans la ration engendrent des changements de diversité ou d'activité des archées méthanogènes en raison d'une moindre disponibilité en H₂ (Popova et al., 2011). Bien qu'a priori très peu de genres soient présents dans le rumen, les études sur la diversité des archées méthanogènes se poursuivent en employant les techniques les plus modernes de biologie moléculaire, et de nouvelles séquences sont constamment découvertes. Comme dans tout écosystème, les actions ciblant des microorganismes particuliers suscitent inévitablement des réponses des autres populations présentes au sein du rumen. Pour être efficaces, les stratégies de lutte contre la méthanogenèse doivent prendre en considération la réaction de l'ensemble de la communauté microbienne ruminale.

IV/ Tanins et méthane entérique

IV.1/ Tanins condensés et méthane

L'utilisation des plantes tropicales riches en tanins condensés dans les régimes alimentaires des ruminants est une voie prometteuse pour réduire la production de CH₄

(Jayanegara et al., 2012 ; Huang et al., 2018). La fermentation entérique et la production de CH₄ sont fortement influencées par les plantes riches en tanins condensés. Souvent la fermentation ruminale et la production de CH₄ sont inversement proportionnelles à la concentration de tanins condensés. C'est le cas dans les résultats présentés dans les publications 3 et 4. Dans les essais reportés dans le publication 3, *Manihot esculenta* et *Leucaena leucocephala* avaient un effet anti-méthanogène plus élevé que *Gliricidia sepium*, *in vivo* et *in vitro*, mais cette différence s'expliquait par une teneur en tanins condensés nettement plus faible pour *Gliricidia sepium*. Dans l'essai reporté dans le publication 4, les plantes testées dans cette étude ont baissé la production de CH₄ avec des amplitudes différentes. Comparativement au témoin, *Acacia nilotica*, *Calliandra calothyrsus* et *Musa spp.* ont un fort pouvoir anti-méthanogène ; nous ne commenterons pas ici les résultats d'*Acacia nilotica*, dont les effets sont probablement plus liés aux tanins hydrolysables qu'aux tanins condensés (voir section suivante). Par rapport à *Calliandra calothyrsus* et *Musa spp.*, *Leucaena leucocephala* a un effet moins marqué. Quant à *Gliricidia sepium* et *Manihot esculenta*, ils n'ont pas d'effet significatif par rapport au témoin.

Les résultats que nous avons obtenus avec *Leucaena leucocephala* dans les deux essais confirment les résultats de la bibliographie, car cette plante a fait l'objet de plusieurs études *in vitro* et *in vivo*. Soltan et al. (2013) ont montré que plusieurs fourrages tropicaux, dont *Leucaena leucocephala*, inhibaient la production de CH₄ *in vitro* et *in vivo*. Pal et al. (2015) ont étudié 18 plantes tropicales ayant différents teneurs en tanins condensés, et ont rapporté une faible production de CH₄ pour *Acacia nilotica* et *Leucaena leucocephala*.

La très faible production de CH₄ pour *Calliandra calothyrsus* (58% de réduction par rapport au témoin) est certainement due à sa teneur en tanins très élevée. Des résultats de la bibliographie font état de réductions de CH₄ moins fortes, mais les échantillons étudiés sont moins riches en tanins : *in vivo*, *Calliandra calothyrsus* (17% de tanins condensés) a réduit de manière modérée la production de CH₄ (Tiemann et al., 2008a) ; *in vitro* la même plante mais à 7% de tanins condensés a entraîné une baisse de CH₄ attribuée à une faible dégradation des fibres (Tiemann et al., 2008b). Dans le cas de *Musa spp.* (64% de réduction de production de CH₄ par rapport au témoin), il est probable que la cause de la réduction de méthanogénèse est essentiellement liée à une faible dégradabilité du NDF; l'action d'autres composés secondaires non identifiés n'est toutefois pas à exclure.

Une contradiction entre les différents essais que nous avons menés apparaît clairement pour *Gliricidia sepium* et *Manihot esculenta*. *In vitro*, *Gliricidia sepium* réduit la production

de CH₄ (publication 4) ou non (publication 6). *In vivo*, elle ne la réduit pas (publication 3). Soliva et al. (2008) ont déjà signalé que *Gliricidia sepium* n'était pas très efficace pour réduire la production de CH₄. Le faible pouvoir anti-méthanogène de *Gliricidia sepium* semble être lié à une teneur modérée en tanins condensés, mais il y a probablement une autre cause, qui reste à déterminer. Dans le cas de *Manihot esculenta*, l'effet antiméthanogène était élevé dans les essais des publications 3 et 4 ; l'absence d'effet dans l'essai de la publication 6 est difficilement explicable.

La grande variabilité des réponses sur la méthanogenèse que nous avons obtenues, ainsi que celles de la bibliographie laissent supposer une large plage de réponse d'un essai à l'autre pour une même plante, comme l'ont suggéré Piluzza et al. (2014). Indépendamment de la variation liée à la méthodologie d'analyse des tanins, la teneur en parois des plantes et la dégradation de ces parois joue un rôle important dans la production de H₂, précurseur du CH₄ (Martin et al., 2010), les tanins ont une double action due à leur effet sur le microbiote, d'une part en réduisant la dégradation des parois dans le rumen, d'autre part directement par une action négative sur les archées méthanogènes.

La question d'un seuil de tanins pour observer une baisse de CH₄ n'est pas résolue. Un de nos objectifs était l'étude de la relation dose-réponse afin de déterminer si la relation entre la teneur en tanins condensés et la production de CH₄ dépendait de la dose et donc s'il y avait un seuil minimal de teneur en tanins condensés pour observer un effet sur la production de CH₄. Dans les conditions *in vitro* de notre étude (publication 4), la production de CH₄ a diminué de façon linéaire avec l'augmentation de la dose employée. Huang et al. (2010) ont constaté une diminution linéaire de la production de CH₄ avec une quantité de tanins condensés comprise entre 0 et 50 mg /g MS de *Leucaena leucocephala*. Tiemann et al. (2008a) ont noté une réduction linéaire des émissions quotidiennes de CH₄ avec l'inclusion de *Calliandra calothyrsus* (17,5% de tanins condensés) dans le régime alimentaire (150 ou 300 g/kg de MS). Une corrélation négative a été également trouvée entre la teneur en tanins et la production de CH₄ (Jayanegara et al., 2012). De même, Tan et al. (2011a) a signalé une diminution linéaire et quadratique de la production de gaz et de CH₄ avec une augmentation de la teneur en tanins condensés de *Leucaena leucocephala*. La même tendance a été observée par Hess et al. (2006) pour *Calliandra calothyrsus*. Au contraire, quelques essais réalisés avec des doses modérées de tanins (20 g/kg de MS d'extrait de tanin de quebracho) ont été inefficaces pour réduire la production de CH₄ (Beauchemin et al., 2007). De même, Bhatta et al. (2012) ont signalé que les feuilles de *Leucaena leucocephala* et de *Gliricidia*

maculata, une variété proche de *Gliricidia sepium*, n'entraînent pas une réduction de CH₄ *in vitro*. Toutefois, pris ensemble, ces résultats vont assez nettement dans le sens de l'absence d'un seuil minimal pour l'obtention d'un effet anti-méthanogène.

En dehors de la teneur en tanins condensés, leur structure chimique qui détermine leur activité biologique pourrait jouer un rôle. L'activité des tanins condensés semble liée à des propriétés telles que la taille et le poids des molécules (Patra et Saxena, 2009; Huang et al., 2010), le nombre de sites de liaisons (Mueller-Harvey, 2006), et les interactions avec d'autres composés (fibres, protéines, et d'autres métabolites secondaires). En concordance avec ces hypothèses, Huang et al. (2011) ont montré que l'inhibition de la production de CH₄ *in vitro* était autant plus grande que le poids moléculaire des tanins condensés augmentait chez *Leucaena leucocephala*. Malgré ces observations, notre travail a montré que la teneur en tanins condensés est le principal moteur des changements qui se produisent au cours de la fermentation ruminale. De même, Naumann et al. (2013b, 2018) ont montré que les différences de poids moléculaire entre les tanins condensés de légumineuses tropicales, entre autres *Leucaena retusa* et *Acacia angustissima* n'étaient pas corrélées avec la production de CH₄ *in vitro* et que l'activité biologique des tanins dépend plutôt de la teneur globale en tanins condensés de la plante.

IV.2/ Tanins hydrolysables et méthane

Les effets des tanins hydrolysables sur les fermentations dans le rumen et la production de CH₄ sont moins connus que ceux des tanins condensés. Néanmoins, les données récentes sur les effets anti-méthanogènes potentiels des tanins hydrolysables montrent clairement la nécessité de reconsidérer leur activité contre la méthanogénèse ruminale (Pellikaan et al., 2011; Hassanat et Benchaar, 2013). De plus, le peu d'études qui existe sur le sujet ont testé des extraits de tanins hydrolysables plutôt que des plantes fourragères riches en tanins hydrolysables, pour lesquelles les informations sont limitées, alors qu'elles sont le moyen le plus facile de fournir les composés végétaux secondaires désirables pour les ruminants. Dans la présente étude, *Acacia nilotica* a été utilisée comme source de tanins hydrolysables ; cette dernière est une plante largement distribuée dans les zones tropicales et subtropicales sèches en régions d'Afrique et d'Asie (Heuzé et al., 2016). Nous avons examiné 2 fractions de cette plante, consommées par les animaux: feuilles et gousses. Malgré la présence de tanins condensés dans les feuilles et les gousses d'*Acacia nilotica*, il est supposé

que les effets sur la production de CH₄ sont principalement dus aux tanins hydrolysables car : i) ils représentent 70 % du contenu global en tanins et ii) les comparaisons directes entre les extraits de tanins hydrolysables et les tanins condensés ont montré que les tanins hydrolysables sont aussi efficaces que les tanins condensés (Hassanat et Benchaar, 2013) ou plus efficaces que les tanins condensés (Pellikaan et al., 2011 ; Jayanegara et al., 2015; Min et al., 2015) dans l'inhibition de la production de CH₄. Cependant, il est possible que certains effets observés avec *Acacia nilotica* soient dus à des composés autres que les tanins comme les saponines (Solomon-Wisdom and Shittu, 2010) qui sont connues pour avoir dans certains cas des propriétés anti-méthanogènes (Martin et al., 2010).

La diminution de la production de CH₄ que nous avons observée était conforme aux données obtenues par Pal et al. (2015) qui ont utilisé des feuilles d'*Acacia nilotica* (37,7 g/kg MS de tanins hydrolysables ; 4,6 g/kg de MS de tanins condensés) et ont trouvé une plus grande inhibition de la production de CH₄ avec *Acacia nilotica* qu'avec d'autres plantes riches en tanins. Par rapport à un témoin, Zabré et al. (2018) n'ont pas constaté de diminution de la production de CH₄ avec une sous-espèce d'*Acacia nilotica* riche en tanins condensés mais pauvre en tanins hydrolysables, alors qu'une forte diminution a été observée avec un échantillon d'*Acacia raddiana* riche en tanins hydrolysables. Parmi eux, les ellagitanins sont probablement le principal inhibiteur de CH₄ (Baert et al., 2016). Dans notre étude, la diminution de la production de CH₄ et des AGV totaux était dose-dépendante, mais la diminution du CH₄ a été 3 à 6 fois plus élevée que celle des AGV. Par exemple, les feuilles d'*Acacia nilotica* ont diminué de 64% la production de CH₄ et de 11% celle des AGV totaux, comparativement au foin témoin. Quant aux gousses d'*Acacia nilotica*, une diminution de 55% pour le CH₄ était accompagnée d'une baisse de 29% des AGV totaux. Des résultats similaires ont été rapportés par Gameda (2015) qui a observé un taux de 33 % de réduction de la production de CH₄ lorsque la luzerne a été remplacée par 30% d'*Acacia nilotica* dans un régime de mouton, en revanche, la concentration des AGV totaux et la digestibilité de la matière organique n'ont pas été affectées. En outre, et conformément à nos résultats, les extraits de tanins hydrolysables de châtaignier (*Castanea sativa*) et de chêne (*Quercus aegilops*) induisent une diminution plus marquée du CH₄ que celle de la production d'AGV totaux *in vitro* (Hassanat et Benchaar, 2013; Min et al., 2015). Les effets des tanins hydrolysables sur le profil des AGV totaux sont plus variables. Dans notre étude, le ratio acétate:propionate a augmenté, ce qui en théorie ne va pas dans le sens d'une diminution de la production de CH₄, car la production d'acétate et de propionate est respectivement productrice

et consommatrice de H₂. La même tendance a été rapportée par Pellikaan et al. (2011) qui stipulent que les tanins hydrolysables génèrent plus d'acétate que les tanins condensés. Cela pourrait s'expliquer par la dégradation ruminale des tanins hydrolysables par des bactéries dégradant les tanins en acétate et butyrate (Goel et al., 2005). Des accepteurs d'électrons, tels que l'acide caféique, qui est présent dans *Acacia nilotica*, peuvent avoir favorisé la production de l'acétate (Cord-Ruwisch et al., 1988). D'autres études ont signalé la tendance inverse avec l'extrait de châtaignier (Jayanegara et al., 2015) ou aucun effet sur le ratio acétate:propionate avec les extraits de châtaignier et de chêne (Hassanat et Benchaar, 2013; Min et al., 2015).

Rares sont les études qui ont testé l'effet des tanins hydrolysables sur la fermentation et la production de CH₄ *in vivo*. Une forte teneur en tanins hydrolysables de l'extrait de châtaignier (9 % du régime alimentaire) a résulté en une considérable diminution de la digestibilité chez des chèvres et des moutons (Zimmer et Cordesse, 1996), alors qu'une plus faible dose d'extrait de châtaignier (1,5 % du régime alimentaire) n'a pas affecté la production de CH₄ ainsi que la concentration des AGV totaux chez des bouvillons (Krueger et al., 2010).

Les gousses d'*Acacia nilotica* ont plus fortement impacté la fermentation que les feuilles d'*Acacia nilotica* résultant en une production moindre de gaz et d'AGV totaux, alors que l'effet sur la production de CH₄ ne différait pas entre les deux parties de la plante. Au contraire, Nsahlai et al. (2011) n'ont pas montré de différence de production de gaz et de dégradation de la matière sèche entre les feuilles et les gousses d'*Acacia nilotica* mais, bien qu'ils aient signalé une teneur en tanins condensés beaucoup plus élevée dans les gousses que dans les feuilles, la teneur en tanins hydrolysables et la production de CH₄ n'ont pas été mesurées. Nos résultats sont cohérents avec le contenu en tanins hydrolysables dans les feuilles et les gousses pour la production de gaz et les AGV totaux, mais l'absence de différence concernant la production de CH₄ est difficile à expliquer. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées. La première est que la nature des tanins hydrolysables diffère entre feuilles et gousses, comme suggéré par Salminen et Karonen (2011); dans les feuilles, on peut penser que les ellagitanins agissent plus sélectivement contre les archées méthanogènes que sur les autres populations bactériennes du rumen et peuvent également avoir des propriétés anti-protozoaires, ce qui se traduit par une inhibition de la production de CH₄ par réduction de la production de H₂ sans pour autant que la fermentation ruminale ne soit entravée, contrairement aux gousses dont la concentration des ellagitanins est élevée. De plus, Pellikaan et al. (2011) ont rapporté que les ellagitanins de type tellimagrandine I et II étaient des agents inhibiteurs très sélectifs vis-à-vis des archées méthanogènes par opposition aux

tanins condensés, aux gallotanins et aux autres ellagitanins, qui ont une action plus largement antibactérienne (Hou et al., 2000; Kamijo et al., 2008). Il est possible que la nature des ellagitanins varie entre gousses et feuilles, bien qu'il n'y ait aucune connaissance à ce sujet. La seconde hypothèse, déjà évoquée ci-dessus, est la présence dans *Acacia nilotica* d'autres composés antinutritionnels, tels que les saponines, qui ont été trouvés dans les feuilles par Solomon-Wisdom et Shittu (2010) mais pourraient être en concentration différentes entre les feuilles et les gousses. Il est également possible que la production de CH₄ ne puisse diminuer au-delà d'un certain seuil de concentration de tanins hydrolysables. Bien sûr les hypothèses émises nécessitent une validation expérimentale.

Contrairement aux tanins condensés, pour lesquels la diminution de la production de CH₄ est due d'une part à la diminution de la fermentation des glucides et d'autre part à une action spécifique des tanins sur les microorganismes impliqués dans la production de CH₄, il est probable que le principal mécanisme par lequel les tanins hydrolysables entraînent la réduction de la production de CH₄ est leur effet direct sur les microorganismes. C'est ce que suggèrent les résultats de notre étude, et c'est l'analyse qu'en ont tiré Vasta et al. (2019) dans une récente revue. L'effet négatif des tanins hydrolysables sur les protozoaires, qui sont de forts producteurs de H₂, et sur les archées méthanogènes, qui convertissent l'H₂ en CH₄, a été démontré avec extraits purifiés de tanins hydrolysables de châtaignier et de sumac (Jayanegara et al., 2015), de châtaignier et de valonea (Witzig et al., 2018) ou avec l'acide tannique (Yang et al., 2017). L'action négative des tanins hydrolysables sur la population d'archées méthanogènes a récemment été montrée par Zabré et al. (2018) sur *Acacia raddiana*, une plante voisine d'*Acacia nilotica*. Il ne semble pas y avoir d'action négative sur la population de bactéries cellulolytiques, mais un changement de leur composition a été observé avec des extraits de châtaignier et de valonea par Witzig et al. (2018). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que les tanins hydrolysables pourraient être plus efficaces que les tanins condensés pour l'atténuation du CH₄.

IV.3/ Interaction entre tanins hydrolysables et condensés

Un des objectifs de ce travail était de déterminer si la combinaison de deux plantes riches en tanins hydrolysables et en tanins condensés agissait sur les fermentations de manière additive (relation linéaire lorsque la proportion de chacune varie) ou de manière associative (relation curvilinéaire, dite aussi quadratique, l'effet du mélange pouvant stimuler ou réduire les fermentations par rapport aux plantes employées individuellement). Nous avons d'abord

supposé que la combinaison des 2 sources de tanins hydrolysables pouvait entraîner des effets associatifs sur l'inhibition du CH₄ sans effets perceptibles sur la fermentation. La composition des tanins hydrolysables varie entre les organes (Baert et al., 2017) et selon la saison pour un organe végétal donné (Hatano et al., 1986). Dans notre étude, la production de CH₄ et d'AGV totaux a varié de façon linéaire avec changements du rapport feuille:gousse. Cela ne permet pas de tirer des conclusions sur les différences de tanins hydrolysables entre les feuilles et les gousses. Cependant, les résultats suggèrent qu'il n'y a aucun avantage à stocker les gousses et les feuilles d'*Acacia nilotica*, qui sont à maturité à des saisons différentes, pour les donner en même temps aux animaux. Les effets associatifs sont plus probables entre les plantes riches en tanins hydrolysables et les plantes riches en tanins condensés, plutôt qu'entre 2 sources de tanins hydrolysables en raison des différences majeures entre ces 2 classes de tanins. Cependant, la littérature est rare sur ce sujet. Il existe très peu d'études *in vitro* concernant l'influence des mélanges de fourrages riches en tanins sur la production de CH₄ et les paramètres de fermentation et dans le peu qui existe les chercheurs n'ont pas spécifiquement testé la linéarité ou la non-linéarité des effets de la combinaisons (Seresinhe et al., 2014). Hess et al. (2006) ont testé une légumineuse riche en tanins (*Calliandra calothyrsus*, provenant de deux pays différents) et une légumineuse à faible teneur en tanins (*Cratylia argentea*) seule ou en combinaison et ont rapporté des effets linéaires sur la production de CH₄. Inversement, Jayanegara et al. (2013) ont rapporté un effet associatif sur la production de CH₄ en combinant une plante pauvre en tanins avec des plantes riches en tanins hydrolysables ou en tanins condensés ; celle-ci était plus faible que la valeur prévue de la somme des plantes individuelles si la réponse avait été linéaire. Ces auteurs ont suggéré que les effets associatifs de la combinaison sur la production de CH₄ sont observés lorsque la combinaison est faite entre des plantes très différentes dans leur potentiel de production de CH₄, ce qui n'est pas le cas pour les plantes utilisées dans cette étude. Sinz et al. (2019) ont rapporté que les combinaisons d'*Acacia mearnsii* (connu pour sa richesse en tanins condensés) avec d'autres plantes riches en tanins et en polyphénols étaient plus efficaces pour réduire le CH₄ que l'acacia seul, indiquant que des combinaisons binaires peuvent être synergiques, mais que l'effet était additif pour les AGV. Toutefois ces auteurs ne donnent pas de composition précise en tanins des plantes étudiées.

Les différences de résultats liées à la nature des combinaisons pourraient en théorie être expliquées par le rapport tanins hydrolysables : tanins condensés. Mais il faut noter que les deux sources de tanins hydrolysables utilisées dans notre étude avaient des rapports

semblables (2,22, 2,23 pour les feuilles et les gousses d'*Acacia nilotica*, respectivement). De même, les deux sources de tanins condensés avaient des ratios similaires (0,07, 0,09 pour *Leuceana leucocephala* et *Calliandra calothyrsus*, respectivement). Cela suggère que le rapport tanins hydrolysables : tanins condensés n'est pas le principal facteur des différences entre les combinaisons. Une nouvelle fois, ces différences pourraient également être expliquées par la présence d'autres composés secondaires végétaux comme les saponines présentes dans les feuilles d'*Acacia nilotica* (Solomon-Wisdom et Shittu (2010)).

Notre expérience a montré que l'effet de combiner des plantes contenant des tanins hydrolysables et des tanins condensés résulte en une plus forte production d'AGV totaux. Cet effet est modéré mais statistiquement significatif. Cela peut suggérer que la dégradation des fibres est moins affectée lorsque les deux classes de tanins sont mélangées, probablement en raison d'un effet négatif moindre sur l'activité bactérienne. Si une réponse de type associativité sur la production d'AGV totaux était confirmée *in vivo*, il serait intéressant de développer des cultures mixtes d'arbres riches en tanins hydrolysables et en tanins condensés dans la même zone.

Conclusion et perspectives

La production de CH₄ entérique est une voie métabolique essentielle chez les ruminants, qui permet d'éliminer l'H₂ produit lors de la dégradation des glucides dans le rumen, et permettant le maintien de conditions physico-chimiques optimales pour l'écosystème microbien ruminal. Or ce gaz fait partie du panier des gaz pointés pour leur responsabilité dans le réchauffement climatique que les communautés politique et scientifique se sont engagées à réduire. Plusieurs travaux ont vu le jour dans le but tout d'abord de comprendre les sources émettrices parmi les activités anthropiques, puis de rechercher un moyen de lutter contre la méthanogenèse en respectant au maximum les performances des animaux. C'est dans cette optique que s'inscrivent les travaux de cette thèse qu'on peut diviser en deux parties.

La première partie avait pour principal objectif de confirmer ou d'infirmer les données de la FAO par rapport à la forte contribution des pays tropicaux à la production de CH₄ (publications 1 et 2). Plus particulièrement, ce projet visait à évaluer l'effet global de l'environnement tropical avec ses composantes : fourrage en C4 et génotype animal adapté aux tropiques (Blackbelly) sur la digestibilité, la fermentation et les émissions de CH₄, et de le comparer à l'environnement tempéré avec les mêmes composantes (fourrage en C3 et génotype animal adapté aux zones tempérées Texel). Il ressort que les différences dans les émissions de CH₄ entérique par les ovins dans le site tempéré et tropical sont multifactorielles et ont été influencées par le type de fourrage (C3 contre C4), le génotype et les interactions avec l'environnement. Le plan expérimental original utilisé dans cette étude a permis de mettre en évidence une interaction entre le génotype et le l'emplacement géographique qui n'ont jamais été signalés auparavant. Il a également été démontré que chaque génotype est adapté à l'environnement dans lequel il vit : en effet le génotype indigène de la région tropicale, Blackbelly, alimenté avec des fourrages en C4 dans le site tropical produit des quantités de CH₄ comparables au génotype Texel alimenté avec des fourrages en C3 dans le site tempéré. Au niveau du microbiote ruminal, les différences observées entre site tropical et tempéré étaient intrinsèques à la localisation géographique et ne pouvaient pas être attribuées au type de fourrage ni au génotype. Bien que les populations de bactéries totales et d'archées méthanogènes fussent plus abondantes dans le site tropical, celle-ci n'a pas été associée à une plus forte production de CH₄, ce qui montre la capacité d'adaptation de chaque génotype à son environnement, suggérée par l'interaction génotype-site. Ces travaux remettent en question l'hypothèse générale selon laquelle les émissions de CH₄ entérique liées à la

consommation de fourrages sont plus importantes dans les régions tropicales que dans les régions tempérées.

La deuxième partie de ce travail avait pour objectif la valorisation de certains fourrages tropicaux comme agents anti-méthanogènes en raison de leur richesse en tanins hydrolysables et/ou en tanins condensés on combinant des essais *in vitro*, *in vivo* et *in situ*.

L'étude *in vivo* de l'introduction de plantes contenant des tanins condensés à raison de 40% du régime sous forme de granulés a montré un potentiel de réduction de CH₄ entérique (publication 3). *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* et, dans une moindre mesure, *Gliricidia sepium* sont bien consommés sans effets indésirables sur la fermentation ruminale et la digestibilité, avec une augmentation de l'ingestion volontaire. Ceci suggère que la granulation pourrait constituer un mode d'administration des plantes riches en tanins condensés connues pour leur astringence. En outre, la granulation des fourrages permet une augmentation de l'ingestion. *In vitro*, la relation dose-réponse était linéaire pour les plantes étudiées (publication 4); la dose de tanins condensés a donc été le principal facteur de la réponse plutôt que la source. La réduction de CH₄ suite à l'ajout de ces trois plantes riches en tanins condensés n'a pas pu être expliquée par les changements du microbiote ruminal, qui ont été mineurs; ce résultat n'apporte pas une exception à la constatation qu'il n'existe pas de lien entre la production de CH₄ et le nombre d'archées méthanogènes.

L'étude *in vitro* réalisée sur les tanins hydrolysables contenus dans *Acacia nilotica* montre que cette plante a la capacité d'inhiber fortement la production de CH₄ sans effets négatifs marqués sur la fermentation ruminale (publication 5). L'effet d'*Acacia nilotica* sur la production de CH₄ était plus marqué comparativement aux plantes riches en tanins condensés, *Calliandra calothyrsus* et *Leucaena leucocephala*, testées dans la même étude. Ceci suggère que les tanins hydrolysables conviennent mieux pour réduire la production de CH₄ que les tanins condensés. L'association de plantes riches en tanins hydrolysables et en tanins condensés n'a pas permis de dégager de possibles synergies sur la production de CH₄; seul un effet associatif entre plantes riches en tanins hydrolysables et en tanins condensés a été obtenu, résultant en une concentration supérieure d'AGV par rapport à un effet additif.

L'étude *in situ* et *in vitro* de la relation entre la dégradation des protéines et des fibres dans le rumen et la disparition des tanins condensés liés aux protéines ou aux fibres d'une part, la production de CH₄ d'autre part, permet une amélioration des connaissances et ouvre des perspectives sur ce sujet (publication 6). Un aspect novateur de ces travaux a été

l'application de la technique *in situ* aux analyses des différentes fractions de tanins condensés dans les aliments et les résidus de sachets pour comprendre les mécanismes sous-jacents des effets des tanins condensés sur la dégradabilité. Toutes les espèces végétales étudiées ont été caractérisées par une teneur en tanins supérieure à la valeur seuil qui entraîne une réduction à la fois de l'utilisation des nutriments et de la production de CH₄ dans le rumen, mais elles ont été bien dégradées sauf *Calliandra calothyrsus*, parce que l'échantillon utilisé dans ce travail était extrêmement riche en tanins condensés, et *Musa spp* qui était très riche en fibres. Contrairement à ce que l'on supposait, un taux de disparition élevé de tanins condensés liés aux protéines et aux fibres a été obtenu. Pour *Acacia nilotica*, *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala* et *Manihot esculenta*, la production de CH₄ était peu liée à la teneur en tanins condensés ou en tanins totaux, mais le résultat le plus remarquable a été le fort effet anti-méthanogène des gousses d'*Acacia nilotica*, qui étaient particulièrement riches en tanins hydrolysables. Cette étude confirme que les plantes riches en tanins hydrolysables ont un potentiel intéressant pour diminuer la production de CH₄ sans effet négatif sur la fermentation des glucides dans la mesure où on utilise des espèces non toxiques pour l'animal.

Les principaux résultats concernant les tanins hydrolysables et les tanins condensés évoqués dans cette thèse pour réduire la production de CH₄ offrent des pistes prometteuses. Cependant, pour une même plante envisagée pour la réduction de la méthanogénèse, les réponses obtenues restent variables et difficilement prévisibles en raison de facteurs non encore déterminés. La condition pour que les tanins hydrolysables et les tanins condensés soient une stratégie optimale est une meilleure compréhension du fonctionnement de l'écosystème ruminal avec ces différents groupes microbiens ; en particulier en ce qui concerne les interactions entre les différentes populations microbiennes et les mécanismes impliquant le H₂. La réussite de ce projet repose sur la réalisation de recherches supplémentaires, indispensables, incluant des essais à long terme. Les études sur l'effet de la nature des fourrages et l'influence de leurs métabolites secondaires sur la production de CH₄ sont à développer. Au-delà de l'enjeu de la réduction de la méthanogénèse, il ne faut pas perdre de vue qu'il faut considérer les effets potentiels de ces métabolites secondaires sur l'ingestion, la digestibilité de la ration et les performances des animaux. En pratique, au sein des élevages, l'objectif est de réduire les émissions de CH₄ par exploitation ou par kg de produit. La diminution des émissions de CH₄ représente un grand enjeu pour les productions extensives en conditions tropicales et subtropicales, avec des contraintes spécifiques, comme la nécessité d'améliorer simultanément l'efficacité des productions. Enfin, il ne faut pas

négliger l'effet de tanins hydrolysables et condensés sur l'émission des autres GES ou sur le stockage de carbone par les sols. La réduction des émissions de CH₄ ne doit pas se faire aux dépens de celle des autres GES et engendrer une dégradation du bilan de ces derniers, ou avoir d'autres impacts sur l'environnement. Cela nécessite une analyse du système de production complet par analyse du cycle de vie, et une meilleure connaissance de la capacité de stockage du carbone par les sols tropicaux, en particulier les pâturages, car les données obtenues en zone tempérée ne sont pas transposables. Ces études ont débuté il y a quelques années et doivent être poursuivies.

Dans la lignée du travail réalisé ici, les perspectives de recherches futures devront plus que par le passé concerner les tanins hydrolysables, mais néanmoins améliorer les connaissances permettant de lever des freins à l'utilisation des tanins condensés. Les principales pistes d'étude sont les suivantes :

- ✓ Caractériser le microbiote ruminal par une approche de métagénomique et de métatranscriptomique qui permettent d'étudier de façon globale l'écosystème microbien ruminal. La métatranscriptomique rend compte de la diversité fonctionnelle réelle et des activités métaboliques exprimées dans le rumen ; elle serait particulièrement utile pour évaluer les réponses du microbiote aux tanins. Enfin, d'autres méthodes permettraient de cibler l'ensemble des fonctions biochimiques en étudiant les enzymes ou les produits des réactions enzymatiques, comme la métaprotéomique ou la métabolomique.
- ✓ Confirmer les effets des tanins hydrolysables à long terme pour conclure sur l'adaptation possible du microbiote ruminal à ces molécules.
- ✓ Déterminer le niveau optimal d'introduction des tanins hydrolysables et des tanins condensés dans les rations pour éviter les effets secondaires néfastes liés à la toxicité pour les premiers et à la perturbation des fonctions digestives pour les seconds.
- ✓ Tester l'effet de la présentation physique et du mode d'administration des plantes riches en tanins (granulés vs fourrage haché ou long) pour quantifier l'effet de la granulation sur l'ingestion, la digestibilité et la production de CH₄.
- ✓ Etudier les possibilités de développement de plantations d'*Acacia nilotica* à grande échelle dans les tropiques secs dans un cadre de sylvopastoralisme et évaluer la capacité anti-méthanogène d'autres plantes riches en tanins hydrolysables.

Bibliographie

- Aboagye, I. A., Oba, M., Koenig, K. M., Zhao, G. Y., Beauchemin, K. A. 2019. Use of gallic acid and hydrolyzable tannins to reduce methane emission and nitrogen excretion in beef cattle fed a diet containing alfalfa silage. *Journal of animal science*, 97, 2230-2244. DOI: 10.1093/jas/skz101.
- Aerts, R. J., Barry, T. N., McNabb, W. C. 1999. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 75, 1-12. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(99\)00062-6](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(99)00062-6)
- Alam, M. R., Amin, M. R., Kabir, A. K. M. A., Moniruzzaman, M., McNeill, D. M. 2006. Effect of Tannins in *Acacia nilotica*, *Albizia procera* and *Sesbania acculeata* Foliage Determined In vitro, In sacco, and In vivo. *Asian-australasian journal of animal sciences*, 20, 220-228. <https://doi.org/10.5713/ajas.2007.220>
- Ally, K., Kunjikutty, N. 2000. Studies on tannin contents of locally available tree leaves commonly fed to goats in Kerala. *Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 31, 1-4.
- Al-Wakeel, S. A. M., Gabr, M. A., Hamid, A. A., Abu-El-Soud, W. M. 2007. Allelopathic effects of *Acacia nilotica* leaf residue on *Pisum sativum* L. *Allelopathy Journal*, 19, 411-422.
- Anantasook, N., Wanapat, M., Cherdthong, A., Gunun, P. 2013. Changes of microbial population in the rumen of dairy steers as influenced by plant containing tannins and saponins and roughage to concentrate ratio. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 26, 1583. DOI: 10.5713/ajas.2013.13182
- Animut, G., Puchala, R., Goetsch, A. L., Patra, A. K., Sahlu, T., Varel, V. H., Wells, J. 2008a. Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. *Animal Feed Science and Technology*, 144, 212-227. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2007.10.014
- Animut, G., Puchala, R., Goetsch, A. L., Patra, A. K., Sahlu, T., Varel, V. H., Wells, J. 2008b. Methane emission by goats consuming different sources of condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 144, 228-241. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2007.10.015
- Archimède, H., Eugène, M., Marie-Magdeleine, C., Boval, M., Martin, C., Morgavi, D. P., Lecomte, P., Doreau, M. 2011. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Animal Feed Science and Technology*, 166-167, 59-64. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.003>
- Archimède, H., Gourdine, J. L., Fanchone, A., Tournebize, R., Bassien-Capsa, M., González-García, E. 2012. Integrating banana and ruminant production in the French West Indies. *Tropical Animal Health and Production*, 44, 1289-1296.
- Assoumaya, C., Sauvart, D., Archimède, H., 2007. Etude comparative de l'ingestion et de la digestion des fourrages tropicaux et tempérés. *INRA Production Animale*, 20, 383-392.
- Bach, A., Calsamiglia, S., Stern, M. D. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 88, 9-21. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73133-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73133-7)
- Bae, H. D., McAllister, T. A., Yanke, J., Cheng, K. J., Muir, A. D. 1993. Effects of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2132-2138.
- Baert, N., Kim, J., Karonen, M., Salminen, J. P. 2017. Inter-population and inter-organ distribution of the main polyphenolic compounds of *Epilobium angustifolium*. *Phytochemistry*, 134, 54-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.11.003>
- Baert, N., Pellikaan, W. F., Karonen, M., Salminen, J. P. 2016. A study of the structure-activity relationship of oligomeric ellagitannins on ruminal fermentation in vitro. *Journal of Dairy Science*, 99, 8041-8052. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11069>

- Barahona, R., Lascano, C. E., Cochran, R., Morill, J., Titgemeyer, E. C. 1997. Intake, digestion, and nitrogen utilization by sheep fed tropical legumes with contrasting tannin concentration and astringency. *Journal of Animal Science*, 75, 1633–1640. DOI:10.2527/1997.7561633x
- Barman, K., Rai, S. N. 2008. In vitro nutrient digestibility, gas production and tannin metabolites of *Acacia nilotica* pods in goats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21, 59-65. <https://doi.org/10.5713/ajas.2008.60161>
- Barone, C. D., Zajac, A. M., Ferguson, S. M., Brown, R. N., Reed, J. D., Krueger, C. G., Petersson, K. H. 2019. In vitro screening of 51 birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.; Fabaceae) strains for anti-parasitic effects against *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, 146, 828-836. DOI:10.1017/S0031182018002214
- Barry, T. N., McNabb, W. C. 1999. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition*, 81, 263-272.
- Baruah, L., Malik P. K., Kolte A. P., Goyal P., Dhali, A., Bhatta R. 2019. Rumen methane amelioration in sheep using two selected tanniferous phyto-leaves. *Carbon Management*, 1-10. <https://DOI.org/10.1080/17583004.2019.1605480>
- Basarab, J. A., Beauchemin, K. A., Baron, V. S., Ominski, K. H., Guan, L. L., Miller, S. P., Crowley, J. J. 2013. Reducing GHG emissions through genetic improvement for feed efficiency: effects on economically important traits and enteric methane production. *Animal*, 7, 303-315.
- Bate-Smith, E. C. 1954. Leuco-anthocyanins. 1. Detection and identification of anthocyanidins formed from leuco-anthocyanins in plant tissues. *Biochemical Journal*, 58, 122-125.
- Bate-Smith E. C. 1973. Haemanalysis of tannins: The concept of relative astringency. *Phytochemistry*, 12, 907–912. DOI:10.1016/0031-9422(73)80701-0
- Bate-Smith, E. C. 1977 Astringent Tannins of *Acer* Species. *Phytochemistry*, 16, 1421-1426. [https://DOI.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88795-6](https://DOI.org/10.1016/S0031-9422(00)88795-6)
- Bayourthe, C., Ali-Haimoud-Lekhail, D. 2014. Les extraits de plantes chez le ruminant: effets sur les fermentations dans le rumen et la qualité lipidique des produits animaux. *Productions Animales*, 27, 317-328.
- Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., Martinez, T. F., McAllister, T. A. 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 85, 1990–1996. DOI:10.2527/jas.2006-686
- Beauchemin, K. A., McAllister, T. A., McGinn, S. M. 2009. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 4, 1-18. DOI: 10.1079/PAVSNNR20094035
- Becker, P. M., Wikselaar, P. G., Franssen, M. C. R., Vos, R. C. H., Hall, R. D., Beekwilder, J. 2013. Evidence for a hydrogen-sink mechanism of (+)catechin-mediated emission reduction of the ruminant greenhouse gas methane. *Metabolomics*, 10, 179-189.
- Benchaar, C., McAllister, T. A., Chouinard, P. Y. 2008. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. *Journal of Dairy Science*, 91, 4765-4777.
- Benchaar, C., Greathead, H. 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 338-355. DOI:10.1016/j.anifeeds.2011.04.024
- Bhat, T. K., Singh, B., Sharma, O. P. 1998. Microbial degradation of tannins—a current perspective. *Biodegradation*, 9, 343-357.

- Bhatta, R., Shinde, A. K., Vaithyanathan, S., Sankhyan, S. K., Verma, D. L. 2002. Effect of polyethylene glycol-6000 on nutrient intake, digestion and growth of kids browsing *Prosopis cineraria*. *Animal Feed Science and Technology*, 101, 45-54. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00180-3](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00180-3)
- Bhatta, R., Vaithyanathan, S., Shinde, A. K., Jakhmola, R. C. 2005. Effect of feeding complete feed block containing *Prosopis cineraria* leaves and polyethylene glycol (PEG)-6000 on nutrient intake, its utilization, rumen fermentation pattern and rumen enzyme profile in kids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1788-1794. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2111>
- Bhatta, R., Uyeno, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Yabumoto, Y., Nonaka, I., Enishi, O., Kurihara, M. 2009. Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *Journal of Dairy Science*, 92, 5512–5522. DOI: 10.3168/jds.2008-1441
- Bhatta, R., Saravanan, M., Baruah, L., Sampath, K. T. 2012. Nutrient content, in vitro ruminal fermentation characteristics and methane reduction potential of tropical tannin-containing leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2929-2935. DOI:10.1002/jsfa.5703
- Bhatta, R., Saravanan, M., Baruah, L., Prasad, C. S. 2015. Effects of graded levels of tannin-containing tropical tree leaves on in vitro rumen fermentation, total protozoa and methane production. *Journal of Applied Microbiology*, 118, 557-564. DOI: 10.1111/jam.12723
- Boadi, D. A., Wittenberg, K. M., McCaughey, W. 2002. Effects of grain supplementation on methane production of grazing steers using the sulphur (SF₆) tracer gas technique. *Canadian Journal of Animal Science*, 82, 151-157. <https://doi.org/10.4141/A01-038>
- Bodas, R. N., Prieto, N. R., Garcia-Gonzalez, R. S., Andres, S., Giraldez, F. J., Lopez, S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176, 78–93. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010
- Borreani, G., Peiretti P. G., Tabacco, E. 2003. Evolution of yield and quality of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* scop.) in the spring growth cycle. *Agronomie*, 23, 193-201. DOI: 10.1051/agro:2002082
- Brooker, J. D., O'Donovan, L. A., Skene, I., Clarke, K., Blackall, L., Muslera, P. 1994. *Streptococcus caprinus* sp. nov., a tannin-resistant ruminal bacterium from feral goats. *Letters in Applied Microbiology*, 18, 313–318. <https://DOI.org/10.1111/j.1472-765X.1994.tb00877.x>
- Brunet, S., Fourquaux, I., Hoste, H. 2001. Ultrastructural changes in the third-stage infective larvae of ruminant nematodes treated with sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. *Parasitology International*, 60, 149-424. DOI:10.1016/j.parint.2010.09.011
- Brunet, S., Martinez-Ortiz De Montellano, C., Torres Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro C. A., Aguilar-Caballero, A. J., Capetillo-Leal, C., Hoste, H. 2008. Effects of the consumption of *Lysiloma latisilliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology*, 157, 81-88. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.07.013
- Bunglavan, S. J., Dutta, N. 2013. Use of tannins as organic protectants of proteins in digestion of ruminants. *Livestock Science*, 4, 67-77.
- Burns, R. E. 1971. Method for estimation of tannin in grain sorghum 1. *Agronomy Journal*, 63, 511-512. DOI:10.2134/agronj1971.00021962006300030050x
- Butler, L. G., Rogler, J. C. 1992. Biochemical mechanisms of the antinutritional effects of tannins. In ACS Symposium series, American Chemical Society, 506, 298-304. DOI: 10.1021/bk-1992-0506.ch023
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, Fierer, N., Pena, A. G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A.,

- Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight R.. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7, 335.
- Carulla, J. E., Kreuzer, M., Machmuller, A., Hess, H. D. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56, 961–970. <https://DOI.org/10.1071/AR05022>
- Chaucheyras-Durand, F., Masségla, S., Fonty, G., Forano, E., 2010. Influence of the composition of the cellulolytic flora on the development of hydrogenotrophic microorganisms, hydrogen utilization, and methane production in the rumens of gnotobiotically reared lambs. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 7931-7937. DOI: 10.1128/AEM.01784-10
- Cheema, U. B., Sultan, J. I., Javaid, A., Akhtar, P., Shahid, M. 2011. Chemical composition, mineral profile and in situ digestion kinetics of fodder leaves of four native trees. *Pakistan Journal of Botany*, 43, 397-404.
- Chiquette, J., Costerton, J. W., Cheng, K. J., Milligan, L. P. 1988. Effect of tannins on the digestibility of two isosynthetic strains of Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) using in vitro and in sacco techniques. *Canadian Journal of Animal Science*, 68, 751–754. DOI:10.4141/cjas88-084
- Chiquette, J., Cheng, K. J., Rode, L. M., Milligan, L. P. 1989. Effect of tannin content in two isosynthetic strains of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) on feed digestibility and rumen fluid composition in sheep. *Canadian Journal of Animal Science*, 69, 1031-1039.
- Cieslak, A., Zmora, P., Pers-Kamczyc, E., Szumacher-Strabel, M. 2012. Effects of tannins source (*Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation in vivo. *Animal Feed Science and Technology*, 176, 102-106. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2012.07.012
- Cord-Ruwisch, R., Seitz, H. J., Conrad, R. 1988. The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Archives of Microbiology*, 149, 350-357.
- Cottle, D. J., Nolan, J. V., Wiedemann, S. G. 2011. Ruminant enteric methane mitigation: a review. *Animal Production Science*, 51, 491-514.
- Danielsson, R., Schnürer, R., Arthurson, V., Bertilsson, J. 2012. Methanogenic population and CH₄ production in Swedish dairy cows fed different levels of forage. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 6172-6179. DOI: 10.1128/AEM.00675-12
- Dean, J. F., Middelburg, J. J., Röckmann, T., Aerts, R., Blauw, L. G., Egger, M., Jetten, M.S. M., de Jong, A. E. E., Meisel, O. H., Rasigraf, O., Slomp, C. P., in't Zandt, M. H., Dolman, A. J. 2018. Methane feedbacks to the global climate system in a warmer world. *Reviews of Geophysics*, 56, 207–250. <https://DOI.org/10.1002/2017RG000559>
- Degen, A. A., Becker, K., Makkar, H. P., Borowy, N. 1995. *Acacia saligna* as a fodder tree for desert livestock and the interaction of its tannins with fibre fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 68, 65-71. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740680111>
- Delehanty, J. B., Johnson, B. J., Hickey, T. E., Pons, T., Ligler F. S. 2007. Binding and neutralization of lipopolysaccharides by plant proanthocyanidins. *Journal of Natural Products*, 70, 1718-1724. DOI:10.1021/np0703601
- Denman, S. E. McSweeney, C. S. 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, 58, 572–582. DOI:10.1007/s11306-013-0554-5
- Dentinho, M. T. P., Bessa, R. J. B. 2016. Effect of tannin source and pH on stability of tannin-protein and fibre complexes. *Revista de Ciências Agrárias (Portugal)*, 39, 114-121.

- Deschamps, A. M. 1982. Nutritional capacities of bark and wood decaying bacteria with particular emphasis on condensed tannin degrading strains. *European Journal of Forest Pathology*, 12, 252-257.
- Deshpande, S. S., Cheryan, M., Salunkhe, D. K., Luh, B. S. 1986. Tannin analysis of food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 24, 401-449.
- Díaz Carrasco, J. M., Cabral, C., Redondo, L. M., Pin Viso, N. D., Colombatto, D., Farber, M. D., Fernandez Miyakawa, M. E. 2017. Impact of chestnut and quebracho tannins on rumen microbiota of bovines. *BioMed Research International*, 2017, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2017/9610810>
- Doreau, M., Diawara, A. 2003. Effect of level of intake on digestion in cows: influence of animal genotype and nature of hay. *Livestock Production Science*, 81, 35-45. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00227-0](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00227-0)
- Doreau, M., Martin, C., Eugène, M., Popova, M., Morgavi, D.P. 2011. Leviers d'action pour réduire la production de méthane entérique par les ruminants. In : *Gaz à effet de serre en élevage bovin : le méthane*. Doreau M., Baumont R., Perez J.M. (Eds). Dossier, INRA Productions Animales, 24, 461-474.
- Doreau, M., Bamière, L., Pellerin, S., Lherm, M., Benoit, M. 2014. Mitigation of enteric methane for French cattle: Potential extent and cost of selected actions. *Animal Production Science*, 54, 1417-1422.
- Doreau, M., Martin C., Morgavi D.P. 2017. Réduire les émissions de méthane entérique par l'alimentation des ruminants. *Viande et produits carnés*, VPC-2017-33-2-1.
- Doreau, M., Arbre, M., Popova, M., Rochette, Y., Martin, C. 2018. Linseed plus nitrate in the diet for fattening bulls: effects on methane emission, animal health and residues in offal. *Animal*, 12, 501-507.
- Dzowela, B. H., Hove, L., Topps, J. H., Mafongoya, P. L. 1995. Nutritional and anti-nutritional characters and rumen degradability of dry matter and nitrogen for some multipurpose tree species with potential for agroforestry in Zimbabwe. *Animal Feed Science and Technology*, 55, 207-214.
- Edelmann, A., Lendl, B. 2002. Toward the optical tongue: Flow-through sensing of tannin-protein interactions based on FTIR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*. 124, 14741-14747. <https://DOI.org/10.1021/ja026309v>
- Edwards, J. E., Huws, S. A., Kim, E. J., & Kingston-Smith, A. H. 2007. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, 62, 323-335.
- Ephraim, E., Odenyo, A., Ashenafi, M. 2005. Isolation and characterization of tannin-degrading bacteria from faecal samples of some wild ruminants in Ethiopia. *Animal Feed Science and Technology*, 118, 243-253. <https://dx.DOI.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.10.015>
- Esatbeyoglu, T., Wray, V., Winterhalter, P. 2010. Dimeric procyanidins: screening for B1 to B8 and semisynthetic preparation of B3, B4, B6, and B8 from a polymeric procyanidin fraction of white willow bark (*Salix alba*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7820-7830. DOI: 10.1021/jf101023e
- Eugène, M., Archimède, H., Doreau, M., Giger-Reverdin, S., Sauvant, D. 2018. Enteric methane emissions from ruminants fed forages: a meta-analysis on the role of tannins content. *Proc. Symp. Emissions of Gas and Dust from Livestock – Saint-Malo, France – May 21-24, 2017*, 3p
- Faichney, G. J., Teleki, E., Brown, G. H. 2004: Effect of physical form of a lucerne hay on digestion and rate of passage in sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*, 55, 1253-1262. <https://doi.org/10.1071/AR04138>
- FAO. 2009. The state of food and agriculture. Livestock in the balance. FAO, Rome, Italy, 166 p.
- FAO. 2010 Greenhouse Gas Emissions from the Dairy Sector. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

- Fasae, O. A., Adu, I. F., Aina, A. B. J., Elemo, K. A. 2009. Production, defoliation and storage of cassava leaves as dry season forage for small ruminants in smallholder crop–livestock production system. *Agricultura Tropical et Subtropica*, 42, 15-19.
- Field, J. A., Kortekaas, S., Lettinga, G. 1989. The Tannin theory of methanogenic toxicity. *Biological Wastes*, 29, 241–262. [https://DOI.org/10.1016/0269-7483\(89\)90016-5](https://DOI.org/10.1016/0269-7483(89)90016-5)
- Filippich, L. J., Zhu, J., Oelrichs, P., Alsalami, M. T., Doig, A. J., Cao, G. R., English, P. B. 1991. Hepatotoxic and nephrotoxic principles in *Terminalia oblongata*. *Research in Veterinary Science*, 50, 170-177. [https://DOI.org/10.1016/0034-5288\(91\)90101-S](https://DOI.org/10.1016/0034-5288(91)90101-S)
- Finlay, B. J., Esteban, G., Clarke, K. J., Williams, A. G., Embley, T. M., Hirt, R. P. 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters*, 117, 157-161.
- Forabosco, F., Chitchyan, Z., Mantovani, R. 2017. Methane, nitrous oxide emissions and mitigation strategies for livestock in developing countries: A review. *South African Journal of Animal Science*, 47, 268-280.
- Fraser, M. D., Fleming, H. R., Moorby, J. M. 2014. Traditional vs modern: role of breed type in determining enteric methane emissions from cattle grazing as part of contrasting grassland-based systems. *PloS one*, 9, e107861. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0107861>
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F. J., Fernández, M., Mantecón, A. R. 2000. Digestive utilization of quebracho-treated soya bean meal in sheep. *Journal of Agricultural Science*, 134, 101-108. DOI: 10.1017/S0021859699007261
- Frutos, P., Raso, M., Hervás, G., Mantecón, Á. R., Pérez, V., Giráldez, F. J. 2004. Is there any detrimental effect when a chestnut hydrolysable tannin extract is included in the diet of finishing lambs?. *Animal Research*, 53, 127-136. DOI: 10.1051/animres:2004001
- Garg, S. K., Makkar, H. P., Nagal, K. B., Sharma, S. K., Wadhwa, D. R., Singh, B. 1992. Oak (*Quercus incana*) leaf poisoning in cattle. *Veterinary and human toxicology*, 34, 161-164.
- Gasmi-Boubaker, A., Kayouli, C., Buldgen, A. 2005. In vitro gas production and its relationship to in situ disappearance and chemical composition of some Mediterranean browse species. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 303-311. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.017>
- Gemeda, B. S. 2015. Use of selected tropical feeds and additives as modulators of rumen fermentation and methanogenesis. PhD Diss. Pretoria Univ., South Africa.
- Gemeda, B. S., Hassen, A. 2015. Effect of tannin and species variation on in vitro digestibility, gas, and methane production of tropical browse plants. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 28, 188. <https://dx.doi.org/10.5713/2Fajas.14.0325>
- Gerber, P., Vellinga, T., Opio, C., Steinfeld, H. 2011. Productivity gains and greenhouse gas emissions intensity in dairy systems. *Livestock Science*, 139, 100-108. DOI:10.1016/j.livsci.2011.03.012
- Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A., Tempio, G. 2013. Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.
- Giner-Chavez, B. I., Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lascano, C., Reed, J. D., Pell, A. N. 1997. A method for isolating condensed tannins from crude plant extracts with trivalent ytterbium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 359-368. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199707\)74:3<359::AID-JSFA811>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199707)74:3<359::AID-JSFA811>3.0.CO;2-C)
- Goel, G., Makkar, H. P. 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical animal health and production*, 44, 729-739. DOI:10.1007/s11250-011-9966-2

- Goel, G., Puniya, A. K., Singh, K. 2005. Tannic acid resistance in ruminal streptococcal isolates. *Journal of Basic Microbiology*, 45, 243–245. DOI:10.1002/jobm.200410517
- Goel, G., Raghav, M., Beniwal, V., Puniya, A. K. 2015. Anaerobic degradation of tannins in *Acacia nilotica* pods by *Enterococcus faecalis* in co-culture with ruminal microbiota. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 61, 31-33. DOI 10.2323/jgam.61.31
- Gonçalves, R., Mateus, N., De Freitas, V. 2011. Inhibition of alpha-amylase activity by condensed tannins. *Food Chemistry*, 125, 665-672. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.061>
- Grabber, J. H., Zeller, W. E., Mueller-Harvey, I. 2013. Acetone enhances the direct analysis of procyanidin- and prodelphinidin-based condensed tannins in *Lotus* species by the butanol–HCl–iron assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 2669-2678. DOI: 10.1021/jf304158m
- Grainger, C., Clarke, T., Auld, M. J., Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., Waghorn, G. C., Eckard, R. J. 2009. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*, 89, 241-251. <https://doi.org/10.4141/CJAS08110>
- Grainger, C., Beauchemin, K. A. 2011. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production?. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 308-320. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2011.04.021
- Grasel, F., Dos, S., Ferrão, M. F., Wolf, C. R. 2016. Development of methodology for identification the nature of the polyphenolic extracts by FTIR associated with multivariate analysis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 153, 94-101. DOI: 10.1016/j.saa.2015.08.020
- Guyader, J., Eugène, M., Nozière, P., Morgavi, D. P., Doreau, M., Martin, C. 2014. Influence of rumen protozoa on methane emissions in ruminants: A meta-analysis approach. *Animal*, 8, 1816-1825.
- Guyader, J., Eugène, M., Doreau, M., Morgavi, D. P., Gérard, C., Martin, C. 2016. Tea saponin reduced methanogenesis in vitro but increased methane yield in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100, 1845-1855.
- Hagerman, A. E., Butler, L. G. 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 256, 4494–4497.
- Hagerman, A. E., Butler, L. G. 1989. Choosing the appropriate methods and standards for assaying tannin. *Journal of Chemical Ecology*, 15, 1795-1810. DOI: 10.1007/BF01012267
- Hagerman, A. E. 1989. Chemistry of tannin-protein complexation. In *Chemistry and significance of condensed tannins* (pp. 323-333). Springer, Boston, MA.
- Hagerman, A. E., Butler, L. G. 1994. Assay of condensed tannins or flavonoid oligomers and related flavonoids in plants. *Methods in Enzymology*, 234, 429-437. DOI: 10.1016/0076-6879(94)34113-3
- Hagerman, A. E. 2011. *Tannin handbook*. Miami University, Oxford, Ohio. 120p. <http://www.users.muohio.edu/hagermae>
- Hanlin, R. L., Hrmova, M., Harbertson, J. F., Downey, M. O. 2010. Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16, 173-188. DOI: 10.1111/j.1755-0238.2009.00068.x
- Hansen, T.V. A., Fryganas, C., Acevedo, N., Carballo, L. R. Thamsborg, S. M., Mueller-Harvey, I., Williams, A. R. 2016. Proanthocyanidins inhibit *Ascaris suum* glutathione-S-transferase activity and increase susceptibility of larvae to levamisole in vitro. *Parasitology International*, 65, 336–339. DOI:10.1016/j.parint.2016.04.001

- Hariadi, B. T., Santoso, B. 2010: Evaluation of tropical plants containing tannin on in vitro methanogenesis and fermentation parameters using rumen fluid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 456–461. DOI: 10.1002/jsfa.3839.
- Hart, K. J., Martin, P. G., Foley, P. A., Kenny, D. A., Boland, T. M. 2009. Effect of sward dry matter digestibility on methane production, ruminal fermentation, and microbial populations of zero-grazed beef cattle. *Journal of Animal Science*, 87, 3342-3350. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-1786>
- Hartzfeld, P. W., Forkner, R., Hunter, M. D., Hagerman, A. E. 2002. Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1785-1790. DOI: 10.1021/jf0111155
- Haslam, E. 1986. Hydroxybenzoic Acids and the Enigma of Gallic Acid. In: Conn, E.E. (Ed.), *The Shikimic Acid Pathways*. Plenum Press, London (20), 163–200 (Chapter 7).
- Haslam, E. 1989. *Plant Polyphenols - Vegetables and Tannins Revisited*. 9th ed. Cambridge: Cambridge University Press. 230 pp.
- Hassanat, F., Benchaar, C. 2013. Assessment of the effect of condensed (acacia and quebracho) and hydrolysable (chestnut and valonea) tannins on rumen fermentation and methane production in vitro. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 332-339. DOI: 10.1002/jsfa.5763
- Hatano, T., Kira, R., Yoshizaki, M., Okuda, T. 1986. Seasonal changes in the tannins of *Liquidambar formosana* reflecting their biogenesis. *Phytochemistry*, 25, 2787-2789. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83742-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83742-5)
- Hattas, D., Julkunen-Tiitto, R. 2012. The quantification of condensed tannins in African savanna tree species. *Phytochemistry Letters*, 5, 329-334. DOI:10.1016/j.phytol.2012.02.013
- Heckendorn, F., Häring, D. A., Maurer, V., Senn, M., Hertzberg, H. 2007. Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Veterinary Parasitology*, 146, 123–134. DOI:10.1016/j.vetpar.2007.01.009
- Herrero, M., Thornton, P. K., Gerber, P., Reid, R. S. 2009. Livestock, livelihoods and the environment: understanding the trade-offs. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 1, 111-120. DOI 10.1016/j.cosust.2009.10.003
- Hervás, G., Frutos, P., Serrano, E., Mantecón, A. R., Giráldez, F. J. 2000. Effect of tannic acid on rumen degradation and intestinal digestion of treated soya bean meals in sheep. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, 135, 305-310. <https://DOI.org/10.1017/S0021859699008151>
- Hervás, G., Pérez, V., Giráldez, F. J., Mantecón, A. R., Almar, M. M., Frutos, P. 2003. Intoxication of sheep with quebracho tannin extract. *Journal of Comparative Pathology*, 129, 44-54. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(02\)00168-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(02)00168-8)
- Hess, H. D., Tiemann, T. T., Noto, F., Franzel, S., Lascano, C. E., Kreuzer, M. 2006. The effects of cultivation site on forage quality of *Calliandra calothyrsus* var. Patulul. *Agroforestry Systems*, 68, 209-220. DOI : 10.1007/s10457-006-9010-0
- Hess, H. D., Mera, M. L., Tiemann, T. T., Lascano, C. E., Kreuzer, M. 2008. In vitro assessment of the suitability of replacing the low-tannin legume *Vigna unguiculata* with the tanniferous legumes *Leucaena leucocephala*, *Flemingia macrophylla* or *Calliandra calothyrsus* in a tropical grass diet. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 105-115.
- Heuzé, V., Tran, G., Eugène, M., Bastianelli, D., Lebas, F. 2016. Babul (*Acacia nilotica*). *Feedipedia*, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. <https://www.feedipedia.org/node/346>

- Hidosa, D., Gemiyo, D. 2017. Replacement of Commercial Concentrate with *Acacia nilotica* Pod Meal on Feed Intake, Digestibility and Weight Gain of Boer x Woyto-Guji Crossbred Goats. *American Journal of Agriculture and Forestry*, 5, 192-197. DOI: 10.11648/j.ajaf.20170506.13
- Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J. F., Sandoval-Castro, C. A. 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary Parasitology*, 186, 18-27. DOI:10.1016/j.vetpar.2011.11.042
- Hou, A. J., Liu, Y. Z., Yang, H., Lin, Z. W., Sun, H. D. 2000. Hydrolyzable tannins and related polyphenols from *Eucalyptus globulus*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2, 205-212. <http://dx.doi.org/10.1080/10286020008039912>
- Hristov, A. N., Oh, J., Firkins, J. L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H. P. S., Adesogan, A. T., Yang, W., Lee, C., Gerber, P. J., Henderson, B., Tricarico, J. M. 2013a. Special topics—Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of animal science*, 91, 5045-5069. DOI: 10.2527/jas.2013-6583
- Hristov, A. N., Ott, T., Tricarico, J., Rotz, A., Waghorn, G., Adesogan, A., Dijkstra, J., Montes, F., Oh, J., Kebreab, E., Oosting, S. J., Gerber P. J., Henderson, B., Makkar, H. P. S., Firkins, J. L. 2013b. Special topics—Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: III. A review of animal management mitigation options. *Journal of Animal Science*, 91, 5095-5113. DOI: 10.2527/jas.2013-6585
- Huang, X. D., Liang, J. B., Tan, H. Y., Yahya, R., Khamseekhiew, B., Ho, Y. W. 2010. Molecular weight and protein binding affinity of *Leucaena* condensed tannins and their effects on in vitro fermentation parameters. *Animal Feed Science and Technology*, 159, 81-87. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.05.008>
- Huang, X. D., Liang, J. B., Tan, H. Y., Yahya, R., Ho, Y. W. 2011. Effects of *Leucaena* condensed tannins of differing molecular weights on in vitro CH₄ production. *Animal feed Science and Technology*, 166, 373-376. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.026>
- Huang, Q., Liu, X., Zhao, G., Hu, T., Wang, Y. 2018. Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. *Animal Nutrition*, 4, 137-150. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.004>
- Hung, L. V., Wanapat, M., Cherdthong, A. 2013. Effects of *Leucaena* leaf pellet on bacterial diversity and microbial protein synthesis in swamp buffalo fed on rice straw. *Livestock Science*, 151, 188-197. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.11.011>
- Hunter, R. A., Siebert, B. D. 1985. Utilization of low-quality roughage by *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle: 2. The effect of rumen-degradable nitrogen and sulphur on voluntary food intake. *British journal of Nutrition*, 53, 649-656. <https://doi.org/10.1079/BJN19850074>
- Huws, S. A., Mayorga, O. L., Theodorou, M. K., Onime, L. A., Kim, E. J., Cookson, A. H., Newbold, C. J., Kingston-Smith, A. H. 2013. Successional colonization of perennial ryegrass by rumen bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 56, 186-196.
- Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., Shimamura, T. 1993. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1147, 132-136. DOI:10.1016/0005-2736(93)90323-r
- Inoue, K. H., Hagerman, A. E. 1988. Determination of gallotannin with rhodanine. *Analytical Biochemistry* 169, 363-369. DOI:10.1016/0003-2697(88)90296-5
- INRA, 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins - Besoins des animaux - Valeurs des aliments - Tables INRA Quae, Versailles, France.
- INRA, 2018. INRA feeding system for ruminants. Nozière, P., Sauvant, D., Delaby, L. Eds - Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Pays-Bas.

- IPCC, 2007: Agriculture. In climate change 2007: Mitigation. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. (Metz, B., Davidson, O. R., Bosch, P. R., Dave, R., Meyer, L. A. eds), Cambridge University Press, UK.
- IPCC, 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer eds.). IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.
- Islam, M., Lee, S. S. 2019. Advanced estimation and mitigation strategies: a cumulative approach to enteric methane abatement from ruminants. *Journal of Animal Science and Technology*, 61, 122-137. <https://doi.org/10.5187/jast.2019.61.3.122>
- Jackson, F. S., Barry, T. N., Lascano, C., Palmer, B. 1996. The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree, shrub and forage legumes. *Journal of Science in Food and Agriculture*, 71, 103-110. [https://DOI.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199605\)71:1](https://DOI.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199605)71:1)
- Jayanegara, A., Palupi, E. 2011. Condensed tannin effects on nitrogen digestion in ruminants: A meta-analysis from in vitro and in vivo studies. *Media Peternakan*, 33, 176. <http://dx.doi.org/10.5398/medpet.2010.33.3.176>
- Jayanegara, A., Leiber, F., Kreuzer, M. 2012. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96, 365-375. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2011.01172.x
- Jayanegara, A., Marquardt, S., Wina, E., Kreuzer, M., Leiber, F. 2013. In vitro indications for favourable non-additive effects on ruminal methane mitigation between high-phenolic and high-quality forages. *British Journal of Nutrition*, 109, 615-622. DOI: 10.1017/S0007114512001742
- Jayanegara, A., Goel, G., Makkar, H. P., Becker, K. 2015. Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 209, 60-68. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2015.08.002
- Jayanegara, A., Sujarnoko, T. U., Ridla, M., Kondo, M., Kreuzer, M. 2018a. Silage quality as influenced by concentration and type of tannins present in the material ensiled: A meta-analysis. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103, 456-465. DOI: 10.1111/jpn.13050
- Jayanegara, A., Ridla, M., Laconi, E. B., Nahrowi, N. 2018b. Tannin as a feed additive for mitigating enteric methane emission from livestock: meta-analysis from RUSITEC experiments. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 434, 012108. doi:10.1088/1757-899X/434/1/012108
- Jayanegara, A., Sarwono, K. A., Kondo, M., Matsui, H., Ridla, M., Laconi, E. B., Nahrowi. 2018c. Use of 3-nitrooxypropanol as feed additive for mitigating enteric methane emissions from ruminants: a meta-analysis. *Italian Journal of Animal Science*, 17, 650-656. DOI: 10.1080/1828051X.2017.1404945
- Jeraldo, P., Kalari, K., Chen, X., Bhavsar, J., Mangalam, A., White, B. Nelson, H., Kocher, J. P., Chia, N. 2014. IM-TORNADO: a tool for comparison of 16S reads from paired-end libraries. *PloS one*, e114804.
- Johnson, K. A., Johnson, D. E. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73, 2483-2492. <https://DOI.org/10.2527/1995.7382483x>
- Jones, G. A., McAllister, T. A., Muir, A. D., Cheng, K. J. 1994. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1374-1378.
- Jones, R. J., Meyer, J. H. F., Bechaz, F. M., Stoltz, M. A., Palmer, B., Van der Merwe, G. 2001. Comparison of rumen fluid from South African game species and from sheep to digest tanniniferous browse. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52, 453-460. <https://DOI.org/10.1071/AR00107>

- Jonker, A., Muetzel, S., Molano, G., Pacheco D., 2015. Effect of fresh pasture forage quality, feeding level and supplementation on methane emissions from growing beef cattle. *Animal Production Science*, 56, 1714-1721. <https://doi.org/10.1071/AN15022>
- Kahiya, C., Mukaratirwa, S., Thamsborg, S. M. 2003. Effects of *Acacia nilotica* and *Acacia karoo* diets on *Haemoncus contortus* infection in goats. *Veterinary Parasitology*, 115, 265-274. DOI:10.1016/s0304-4017(03)00213-9
- Kamel, H. E., Al-Dobaib, S. N., Salem, A. Z. 2019. Dietary supplementation of sunflower oil and quebracho tannins in sheep feeding: In vivo nutrient digestibility, nitrogen utilization and in vitro ruminal degradation kinetics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 4211-4217. DOI: 10.1002/jsfa.9651
- Kamijo, M., Kanazawa, T., Funaki, M., Nishizawa, M., Yamagishi, T. 2008. Effects of *Rosa rugosa* petals on intestinal bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72, 773-777. DOI: 10.1271/bbb.70645
- Karakurt, I., Aydin, G., Aydiner, K. 2012. Sources and mitigation of methane emissions by sectors: a critical review. *Renewable Energy*, 39, 40-48.
- Karonen, M., Loponen, J., Ossipov, V., Pihlaja, K. 2004. Analysis of procyanidins in pine bark with reversed-phase and normal-phase high-performance liquid chromatography- electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 522, 105-112. DOI: 10.1016/j.aca.2004.06.041
- Kennedy, P. M. 1995. Comparative adaptability of herbivores to tropical environments. In: Recent developments in the nutrition of herbivores (ed. M. Journet, E. Grenet, M-H. Farce, M. Theriez, C. Demarquilly), Ed. INRA Paris, pp. 309-228.
- Khanbabaee, K., van Ree, T. 2001. Tannins: classification and definition. *Natural product reports*, 18, 641-649.
- Khazaal, K., Markantonatos, X., Nastis, A., Ørskov, E. R. 1993. Changes with maturity in fibre composition and levels of extractable polyphenols in Greek browse: effects on in vitro gas production and in sacco dry matter degradation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 63, 237-244. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740630210>
- Klein, H. D., Rippstein, G., Huguenin, J., Toutain, B., Guerin, H., Louppe, D. 2014. *Les cultures fourragères*. Éditions Quae.
- König, M., Scholz, E., Hartmann, R., Lehmann, W., Rimpler, H. 1994. Ellagitannins and complex tannins from *Quercus petraea* bark. *Journal of natural products*, 57, 1411-1415.
- Krause, D. O., Smith, W. J. M., Brooker, J. D., McSweeney C. S. 2005. Tolerance mechanisms of streptococci to hydrolyzable and condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 121, 59-75. <https://DOI.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.02.008>
- Krueger, W. K., Gutierrez-Bañuelos, H., Carstens, G. E., Min, B. R., Pinchak, W. E., Gomez, R. R., Anderson, R. C., Krueger, N. A., Forbes, T. D. A. 2010. Effects of dietary tannin source on performance, feed efficiency, ruminal fermentation, and carcass and non-carcass traits in steers fed a high-grain diet. *Animal Feed Science and Technology*, 159, 1-9. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2010.05.003
- Kumar, R., Singh, M. 1984. Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 447-453. <https://DOI.org/10.1021/jf00123a006>
- Kumar, R., Vaithyanathan, S. 1990. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 30, 21-38. [https://DOI.org/10.1016/0377-8401\(90\)90049-E](https://DOI.org/10.1016/0377-8401(90)90049-E)

- Kumar, K., Chaudhary, L. C., Agarwal, N., Kamra, D. N. 2014. Isolation and Characterization of Tannin-Degrading Bacteria from the Rumen of Goats Fed Oak (*Quercus semicarpifolia*) Leaves. *Agricultural Research*, 3, 377–385. DOI:10.1007/s40003-014-0121-y
- Kurihara, M., Magner, T., Hunter, R. A., McCrabb, G. J. 1999. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. *British Journal of nutrition*, 81, 227-234. <https://doi.org/10.1017/S0007114599000422>
- Landau, S., Silanikove, N., Nitsan, Z., Barkai, D., Baram, H., Provenza, F. D., Perevolotsky, A. 2000. Short-term changes in eating patterns explain the effects of condensed tannins on feed intake in heifers. *Applied Animal Behaviour Science*, 69, 199-213. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(00\)00125-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(00)00125-8)
- Lavin, S. R. 2012. Plant phenolics and their potential role in mitigating iron overload disorder in wild animals. *Journal of Zoo Wildlife Medicine*, 43, S74-S82. <https://DOI.org/10.1638/2011-0132.1>
- Lee, C., Beauchemin, K. A. 2014. A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. *Canadian Journal of Animal Science*, 94, 557-570. DOI:10.4141/CJAS-2014-069
- Leng, R. A. 1990. Factors affecting the utilization of poor-quality forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutrition Research Reviews*, 3, 277–303. <https://doi.org/10.1079/NRR19900016>
- Leng, R. A. 2014. Interactions between microbial consortia in biofilms: a paradigm shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation. *Animal Production Science*, 54, 519-543. <http://dx.doi.org/10.1071/AN13381>
- Lima, P. R., Apdini, T., Freire, A. S., Santana, A. S., Moura, L. M. L., Nascimento, J. C. S., Rodrigues, R. T. S., Dijkstra, J., Garcez Neto, A. F., Queiroz, M. A. Á., Menezes, D. R. 2019. Dietary supplementation with tannin and soybean oil on intake, digestibility, feeding behavior, ruminal protozoa and methane emission in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 249, 10-17. <https://DOI.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.01.017>
- Lindroth, R. L., Hwang, S. Y. 1996. Clonal variation in foliar chemistry of quaking aspen (*Populus tremuloides* Michx.). *Biochemical Systematics and Ecology*, 24, 357–64. [https://DOI.org/10.1016/0305-1978\(96\)00043-9](https://DOI.org/10.1016/0305-1978(96)00043-9)
- Lindroth, R. L., Osier, T. L., Barnhill, H. R. H., Wood, S. A. 2002. Effects of genotype and nutrient availability on phytochemistry of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) during leaf senescence. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30, 297–307. DOI: 10.1016/s0305-1978(01)00088-6
- Liu, L. L., King, J. S., Giardina, C. P., Booker, F. L. 2009. The influence of chemistry, production and community composition on leaf litter decomposition under elevated atmospheric CO₂ and tropospheric O₃ in a Northern hardwood ecosystem. *Ecosystems*, 12, 401–16.
- Longo, C., Abdalla, A. L., Liebich, J., Janzik, I., Hummel, J., Correa, P. S., Sudekum K. H., Burauel, P. 2013. Evaluation of the effects of tropical tanniferous plants on rumen microbiota using qRT PCR and DGGE analysis. *Czech Journal of Animal Science*, 58, 106-16.
- MacAdam, J. W., Villalba, J. J. 2015. Beneficial effects of temperate forage legumes that contain condensed tannins. *Agriculture*, 5, 475–491. DOI:10.3390/agriculture5030475
- Makkar, H. P., Becker, K. 1993. Vanillin-HCl method for condensed tannins: effect of organic solvents used for extraction of tannins. *Journal of Chemical Ecology*, 19, 613-621.
- Makkar, H. P., Becker, K., Abel, H. J., Szegletti, C. 1995a. Degradation of condensed tannins by rumen microbes exposed to quebracho tannins (QT) in rumen simulation technique (RUSITEC) and effects of QT on fermentative processes in the RUSITEC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69, 495-500. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740690414>

- Makkar, H. P., Blümmel, M., Becker, K. 1995b. In vitro effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69(4), 481-493. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740690413>
- Makkar, H. P. S., Becker, K. 1998. Adaptation of cattle to tannins: role of proline-rich proteins in oak-fed cattle. *Animal Science*, 67, 277-281. <https://doi.org/10.1017/S1357729800010031>
- 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. [https://DOI.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00142-1](https://DOI.org/10.1016/S0921-4488(03)00142-1)
- Malik, P. K., Kolte, A. P., Bakshi, B., Baruah, L., Dhali, A., Bhatta, R. 2017. Effect of tamarind seed husk supplementation on ruminal methanogenesis, methanogen diversity and fermentation characteristics. *Carbon Management*, 8, 319-329. DOI: 10.1080/17583004.2017.1357403
- Mané, C., Souquet, J. M., Olle, D., Verries, C., Veran, F., Mazerolles, G., Cheynier, V., Fulcrand, H. 2007. Optimization of simultaneous flavanol, phenolic acid, and anthocyanin extraction from grapes using an experimental design: application to the characterization of Champagne grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7224-33. DOI: 10.1021/jf071301w
- Margan, D. E., Graham, N. M., Minson, D. J., Searle, T. W. 1988. Energy and protein values of four forages, including a comparison between tropical and temperate species. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 28, 729-736.
- Marie-Magdeleine, C., Mahieu, M., Philibert, L., Despois, P., Archimède, H. 2010a. Effect of cassava (*Manihot esculenta*) foliage on nutrition, parasite infection and growth of lambs. *Small Ruminant Research*, 93, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.04.024>
- Marie-Magdeleine, C., Boval, M., Philibert, L., Borde, A., Archimède, H. 2010b. Effect of banana foliage (*Musa x paradisiaca*) on nutrition, parasite infection and growth of lambs. *Livestock Science*, 131, 234-239. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.04.006>
- Marles, M. A. S, Gruber, M. Y, Scoles, G. J., Muir, A. D. 2003. Pigmentation in the developing seed coat and seedling leaves of *Brassica carinata* is controlled at the dihydroflavonol reductase locus. *Phytochemistry*, 62, 663-72. DOI:10.1016/s0031-9422(02)00488-0
- Martin, C., Morgavi, D. P., Doreau, M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*, 4, 351-365. DOI:10.1017/s1751731109990620
- Martin C., Ferlay A., Mosoni P., Rochette Y., Chilliard Y., Doreau M. 2016. Increasing linseed supply in dairy cow diets based on hay or corn silage: effect on enteric methane emissions, digestion and rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 99, 3445-3456.
- Martinez-Ortiz De Montellano, C., Vargas-Mangaña A. J., Canul-Ku H. L., Miranda-Soberanis R., Capetillo-Leal C., Sandoval-Castro C. A., Hoste H., Torres-Acosta J. F. 2010. Effects of a tropical tannin-rich plant, *Lysiloma latisiliquum*, on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Parasitology International*, 172, 283-290. DOI:10.1016/j.vetpar.2010.04.040
- Maxson, E. D., Rooney, L. W. 1972. Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. *Cereal Chemistry*, 49, 719-728.
- McAllister, T. A., Bae, H. D., Jones, G. A., Cheng, K. J. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of animal science*, 72, 3004-3018. <https://doi.org/10.2527/1994.72113004x>
- McAllister, T. A., Newbold, C. J. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48, 7-17. DOI:10.1071/ea07218
- McLeod, M. N. 1974. Plant tannins-their role in forage quality. *Nutrition Abstracts and Reviews*. 44, 803-815.

- McMahon, L. R., McAllister, T. A., Berg, B. P., Majak, W., Acharya, S. N., Popp, J. D., Coulman, B.E., Wang, Y., Cheng, K. J. 2000. A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Canadian Journal of Plant Science*, 80, 469-485. <https://doi.org/10.4141/P99-050>
- McSweeney, C. S., Kennedy, P. M., John, A. 1988. Effect of ingestion of hydrolysable tannins in *Terminalia oblongata* on digestion in sheep fed *Stylosanthes hamata*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 39, 235-244. <https://doi.org/10.1071/AR9880235>
- McSweeney, C. S., Palmer, B., McNeill, D. M., Krause, D. O. 2001a. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 83–93. DOI:10.1016/S0377-8401(01)00232-2
- McSweeney, C. S., Palmer, B., Bunch, R., Krause, D. O. 2001b. Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 78-88. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01220.x>
- Meale, S. J., McAllister, T. A., Beauchemin, K. A., Harstad, O. M., Chaves, A. V. 2012. Strategies to reduce greenhouse gases from ruminant livestock. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A–Animal Science*, 62, 199-211. DOI: 10.1080/09064702.2013.770916
- Mehansho, H., Hagerman, A. E., Clements, S., Butler, L. G., Rogler, J., Carlson, D. M. 1983. Modulation of proline-rich protein biosynthesis in rat parotid-glands by sorghums with high tannin levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 80, 3948–3952. DOI: 10.1073/pnas.80.13.3948
- Min, B. R., Barry, T. N., Attwood, G. T., McNabb, W. C. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal feed science and technology*, 106, 3-19. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00041-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00041-5)
- Min, B. R., Solaiman, S., Shange, R., Eun, J. S. 2014a. Gastrointestinal bacterial and methanogenic Archaea diversity dynamics associated with condensed tannins-containing pine bark diet in goats using 16S rDNA amplicon pyrosequencing. *International Journal of Microbiology*, 2014, 1-11. DOI: 10.1155/2014/141909
- Min, B. R., Wright, C., Ho, P., Eun, J. S., Gurung, N., Shange, R. 2014b. The effect of phytochemical tannins-containing diet on rumen fermentation characteristics and microbial diversity dynamics in goats using 16S rDNA amplicon pyrosequencing. *Agriculture, Food and Analytical Bacteriology*, 4, 195–211.
- Min, B. R., Pinchak, W. E., Anderson, R. C., Puchala, R. 2015. Bloat mitigation potential of plant tannins and yucca extracts based on in vitro ruminal fermentation and methane gas production from wheat forage. *International Journal of Agricultural Science and Research*, 1, 1-13.
- Min, B. R., Solaiman, S. 2018. Comparative aspects of plant tannins on digestive physiology, nutrition and microbial community changes in sheep and goats: A review. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 102, 1181-1193. DOI: 10.1111/jpn.12938
- Mingshu, L., Kai, Y., Qiang, H., Dongying, J. 2006. Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. *Journal of Basic Microbiology*, 46, 68–84. DOI:10.1002/jobm.200510600
- Minson, D. J., Milford, R. 1968. The nutritional value of four tropical grasses when fed as chaff and pellets to sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 8, 270–276.
- Misrak, K. 2001. Isolation and characterization of bacteria from free ranging sheep and goats that are tolerant to toxic compound(s) in *Acacia angustissima* leaves. M.Sc. Thesis, AAU, Addis Ababa, 90pp. <http://localhost:80/xmlui/handle/123456789/8671>
- Mokoboki, H. K., Ndlovu, L. R., Ngambi, J. W., Malatje, M. M., Nikolova, R. V. 2005. Nutritive value of *Acacia* tree foliages growing in the Limpopo Province of South Africa. *South African Journal of Animal Science*, 35, 221-228.

- Molan, A. L., Waghorn, G. C., Mac Nabb, W. C. 2002. Effect of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis* in vitro. *Veterinary Record*, 150, 65-69. DOI: 10.1136/vr.150.3.65
- Molano, G., Clark, H. 2008. The effect of level of intake and forage quality on methane production by sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48, 219-222. <https://doi.org/10.1071/EA07253>
- Molina-Botero, I. C., Arroyave-Jaramillo, J., Valencia-Salazar, S., Barahona-Rosales, R., Aguilar-Pérez, C. F., Burgos, A. A., Arango, J., Ku-Vera, J. C. 2019. Effects of tannins and saponins contained in foliage of *Gliricidia sepium* and pods of *Enterolobium cyclocarpum* on fermentation, methane emissions and rumen microbial population in crossbred heifers. *Animal Feed Science and Technology*, 251, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.01.011>
- Monforte-Briceño, G. E., Sandoval-Castro, C. A., Ramírez-Avilés, L., Leal, C. M. C. 2005. Defaunating capacity of tropical fodder trees: Effects of polyethylene glycol and its relationship to in vitro gas production. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 313-327. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2005.04.016
- Morand-Fehr, P., Doreau, M. 2001. Alimentation des ruminants soumis à un stress de chaleur. *INRA Production Animale*, 14, 15-27.
- Morgavi, D., Forano, E., Martin, C., Newbold, C. J. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 4, 1024-1036. <https://doi.org/10.1017/S1751731110000546>
- Mueller-Harvey, I., Hartley, R. D., Reed, J. D. 1987. Characterisation of phenolic compounds, including flavonoids and tannins, of ten Ethiopian browse species by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 39, 1-14. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740390102>
- Mueller-Harvey, I., McAllan, A. B. 1992. Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *Advances in Plant Cell Biochemistry and Biotechnology*, 1, 151-217.
- Mueller-Harvey, I. 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 3-20. [https://DOI.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00227-9](https://DOI.org/10.1016/S0377-8401(01)00227-9)
- Mueller-Harvey, I. 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2010-2037. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2577>
- Mueller-Harvey, I., Bee, G., Dohme-Meier, F., Hoste, H., Karonen, M., Kölliker, R., Lüscher, A., Niderkorn, V., Pellikaan, W. F., Salminen, J. P., Skøt, L., Smith, L. M. J., Thamsborg, S. M., Totterdell, P., Wilkinson, I., Williams, A. R., Azuhwi, B. N., Baert, N., Grosse Brinkhaus, A., Copani, G., Desrues, O., Drake, C., Engström, M., Fryganas, C., Girard, M., Huyen, N. T., Kempf, K., Malisch, C., Mora-Ortiz, M., Quijada, J., Ramsay, A., Ropiak, H. M., Waghorn, G. C. 2018. Benefits of condensed tannins in forage legumes fed to ruminants: importance of structure, concentration and diet composition. Invited review. *Crop Science*, 59, 861-885. DOI: 10.2135/cropsci2017.06.0369
- Münger, A., Kreuzer, M. 2008. Absence of persistent methane emission differences in three breeds of dairy cows. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48, 77-82.
- Mupangwa, J. F., Acamovic, T., Topps, J. H., Ngongoni, N. T., Hamudikuwanda, H. 2000. Content of soluble and bound condensed tannins of three tropical herbaceous forage legumes. *Animal Feed Science and Technology*, 83, 139-144. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(99\)00117-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00117-0)
- Murdiati, T. B., McSweeney, C. S., Campbell, R. S., Stoltz, D. S. 1990. Prevention of hydrolysable tannin toxicity in goats fed *Clidemia hirta* by calcium hydroxide supplementation. *Journal of Applied Toxicology*, 10, 325-331. DOI:10.1002/jat.2550100504

- Murdiati, T. B., McSweeney, C. S., Lowry, J. B. 1992. Metabolism in sheep of gallic acid, tannic acid and hydrolysable tannin from *Terminalia oblongata*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 43, 1307-1319. <https://doi.org/10.1071/AR9921307>
- Narjisse, H., Elhonsali, M. A., Olsen, J. D. 1995. Effects of oak (*Quercus ilex*) tannins on digestion and nitrogen balance in sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 18, 201-206. [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(95\)00700-0](https://doi.org/10.1016/0921-4488(95)00700-0)
- Naumann, H. D., Muir, J. P., Lambert, B. D., Tedeschi, L. O., Kothmann, M. M. 2013a. Condensed tannins in the ruminant environment: A perspective on biological activity. *Journal of Agricultural Sciences*, 1, 8-20.
- Naumann, H. D., Tedeschi, L. O., Hagerman, A. E., Lambert B. D., Muir, J. P. 2013b. Methane emission and protein precipitating ability of condensed tannins from warm-season perennial legumes. 491-492. In: *Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production*, book series (EAAP, volume 134). DOI: 10.3920/978-90-8686-781-3181
- Naumann, H. D., Lambert, B. D., Armstrong, S. A., Fonseca, M. A., Tedeschi, L. O., Muir, J. P., Ellersieck, M. R. 2015. Effect of replacing alfalfa with panicked-tick clover or sericea lespedeza in corn-alfalfa-based substrates on in vitro ruminal methane production. *Journal of Dairy Science*, 98, 3980-3987. DOI: 10.3168/jds.2014-8836
- Naumann, H. D., Tedeschi, L. O., Zeller, W. E., Huntley, N. F. 2017. The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46, 929-949. DOI: 10.1590/S1806-92902017001200009
- Naumann, H., Sepela, R., Rezaire, A., Masih, S., Zeller, W., Reinhardt, L., Robe, J. T., Sullivan, L. M., Hagerman, A. 2018. Relationships between structures of condensed tannins from Texas legumes and methane production during in vitro rumen digestion. *Molecules*, 23, 2123. DOI:10.3390/molecules23092123
- Nelson, K. E., Pell, A. N., Schofield, P., Zinder, S. 1995. Isolation and characterization of anaerobic ruminal bacterium capable of degrading tannins. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3293-3298.
- Nelson, K. E., Thonney, M. L., Woolston, T. K., Zinder, S. H., Pell, A. N. 1998. Phenotypic and phylogenetic characterization of ruminal tannin-tolerant bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3824-3830.
- Ng, F., Kittelmann, S., Patchett, M. L., Attwood, G. T., Janssen, P. H., Rakonjac, J., Gagic, D. 2016. An adhesin from hydrogenutilizing rumen methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* M1 binds a broad range of hydrogen-producing microorganisms. *Environmental Microbiology*, 18, 3010-3021. DOI: 10.1111/1462-2920.13155
- Nguyen, T. T. H., van der Werf, H. M. G., Eugène, M., Veysset, P., Devun, J., Chesneau, G., Doreau M. 2012. Effect of type of ration and allocation methods on the environmental impacts of beef-production systems. *Livestock Science*, 145, 239-251.
- Niderkorn, V., Baumont, R., Le Morvan, A., Macheboeuf, D. 2011. Occurrence of associative effects between grasses and legumes in binary mixtures on in vitro rumen fermentation characteristics. *Journal of Animal Science*, 89, 1138-1145. DOI: 10.2527/jas.2010-2819
- Norrapoke, T., Wanapat, M., Wanapat, S. 2012. Effects of protein level and mangosteen peel pellets (Mago-pel) in concentrate diets on rumen fermentation and milk production in lactating dairy crossbreds. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 25, 971-979. DOI: 10.5713/ajas.2012.12053
- Nsahlai, I. V., Fon, F. N., Basha, N. A. D. 2011. The effect of tannin with and without polyethylene glycol on in vitro gas production and microbial enzyme activity. *South African Journal of Animal Science*, 41, 337-344.

- O'Donovan L., Brooker J. D. 2001. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (S. caprinus) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology*, 147, 1025-1033. DOI:10.1099/00221287-147-4-1025
- Odenyo, A. A., Osuji, P. O. 1998. Tannin tolerant ruminal bacteria from East African ruminants. *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 905-909. <https://hdl.handle.net/10568/28409>
- Odenyo, A. A., Bishop, R., Genet, A., Jamnadass, R., Odongo, D., Osuji, P. 2001. Characterization of tannintolerant bacterial isolates from East African ruminants. *Anaerobe*, 7, 5-15. <https://DOI.org/10.1006/anae.2000.0367>
- Okuda, T., Ito, H. 2011. Tannins of constant structure in medicinal and food plants—hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Molecules*, 16, 2191-2217. DOI: 10.3390/molecules16032191
- Opio, C., Gerber, P., Mottet, A., Falcucci, A., Tempio, G., MacLeod, M., Vellinga, T., Henderson, B., Steinfeld, H. 2013. Greenhouse gas emissions from ruminant supply chains – A global life cycle assessment. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome. E-ISBN 978-92-5-107945-4.
- Osawa, R. O. 1990. Formation of a clear zone on tannin-treated brain heart infusion agar by a *Streptococcus* sp. isolated from faeces of koalas. *Applied and Environmental Microbiology*. 56, 829–831.
- Osawa, R., Rainey, F., Fujisawa, T., Lang, E, Busse, H. J., Walsh, T. P., Stackebrandt, E. 1995. *Lonepinella koalarum* gen. nov., sp. nov., a new tannin-protein complex degrading bacterium. *Systematic and Applied Microbiology*, 18, 368–373. [https://DOI.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80430-3](https://DOI.org/10.1016/S0723-2020(11)80430-3)
- Osawa, R., Kuroiso, K., Goto, S., Shimizu, A. 2000. Isolation of tannin-degrading lactobacilli from humans and fermented foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3093-3097. DOI:10.1128/aem.66.7.3093-3097.2000
- Pal, K., Patra, A. K., Sahoo, A., Kumawat, P. K. 2015. Evaluation of several tropical tree leaves for methane production potential, degradability and rumen fermentation in vitro. *Livestock Science*, 180, 98-105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2015.07.011>
- Patra, A. K., Kamra, D. N., Agarwal, N. 2006. Effect of plant extracts on in vitro methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology*, 128, 276-291. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.11.001>
- Patra, A. K., Saxena, J. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96, 363-375. DOI:10.1007/s10482-009-9364-1
- Patra, A. K., Saxena, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71, 1198-1222.
- Patra, A. K., Saxena, J. 2011. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 24-37. DOI: 10.1002/jsfa.4152
- Patra, A. K., Min, B. R., Saxena, J. 2012. Dietary tannins on microbial ecology of the gastrointestinal tract in ruminants. In *Dietary phytochemicals and microbes* (pp. 237-262). Springer, Dordrecht.
- Paul, S. S., Kamra, D. N., Sastry, V. R., Sahu, N. P. 2006. Effect of adding an anaerobic fungal culture isolated from a wild blue bull (*Boselophus tragocamelus*) to rumen fluid from buffaloes on in vitro fibrolytic enzyme activity, fermentation and degradation of tannins and tannin-containing Kachnar tree (*Bauhinia variegata*) leaves and wheat straw. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 258-270. DOI: 10.1002/jsfa.2303
- Pellikaan, W. F., Stringano, E., Leenaars, J., Bongers, D. J., van Laar-van Schuppen, S., Plant, J., Mueller-Harvey, I. 2011. Evaluating effects of tannins on extent and rate of in vitro gas and CH₄ production using an

- automated pressure evaluation system (APES). *Animal Feed Science and Technology*, 166, 377-390. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2011.04.072
- Pérez, V., Doce, R. R., García-Pariente, C., Hervás, G., Ferreras, M. C., Mantecón, Á. R., Frutos, P. 2011. Oak leaf (*Quercus pyrenaica*) poisoning in cattle. *Research in Veterinary Science*, 91, 269-277. DOI:10.1016/j.rvsc.2010.12.015
- Perez-Jimenez, J., Torres, J. L. 2011. Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: the current state of the art. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12713-24. DOI: 10.1021/jf203372w
- Perez-Maldonado, R. A., Norton, B.W. 1996a. The effects of condensed tannins from *Desmodium intortum* and *Calliandra calothyrsus* on protein and carbohydrate digestion in sheep and goats. *British Journal of Nutrition*, 76, 515-533. <https://doi.org/10.1079/BJN19960060>
- Perez-Maldonado, R. A., Norton, B. W. 1996b. Digestion of 14 C-labelled condensed tannins from *Desmodium intortum* in sheep and goats. *British Journal of Nutrition*, 76, 501-513. <https://DOI.org/10.1079/BJN19960059>
- Phale, O., Madibela, O. R. 2006. Concentration of soluble condensed tannins and neutral detergent fibre-bound tannins in fodder trees and forage crops in Botswana. *Journal Biological Sciences*, 6, 320-323.
- Pilajun, R., Wanapat, M. 2013. Microbial population in the rumen of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) as influenced by coconut oil and mangosteen peel supplementation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97, 439-445. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2012.01279
- Piluzza, G., Sulas, L., Bullitta, S. 2014. Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. *Grass and Forage Science*, 69, 32-48. <https://doi.org/10.1111/gfs.12053>
- Pinares-Patiño, C. S., Baumont, R., Martin, C. 2003. Methane emissions by Charolais cows grazing a monospecific pasture of timothy at four stages of maturity. *Canadian Journal of Animal Science*, 83,769-777. <https://doi.org/10.4141/A03-034>
- Piñero-Vázquez, A. T., Canul-Solis, J. R., Jiménez-Ferrer, G. O., Alayón-Gamboa, J. A., Chay-Canul, A. J., Ayala-Burgos, A. J., Aguilar-Pérez, C. F., Ku-Vera, J. C. 2018. Effect of condensed tannins from *Leucaena leucocephala* on rumen fermentation, methane production and population of rumen protozoa in heifers fed low-quality forage. *Asian-Australasian journal of Animal Sciences*, 31, 1738-1746. DOI:10.5713/ajas.17.0192
- Pires Pereira, T. P., Modesto, E. C., Nepomuceno, D. D. D., Oliveira, O. F. D., Freitas, R. S. X. D., Muir, J. P., Dubeux, J. C. B. J., Almeida, J. C. D. C. 2018. Characterization and biological activity of condensed tannins from tropical forage legumes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 53, 1070-1077. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2018000900011>
- Pitta, D. W., Pinchak, W. E., Dowd, S. E., Osterstock, J., Gontcharova, V., Youn, E., Dorton, K., Yoon, I., Min, B. R., Fulford, J. D., Wickersham, T. A. 2010. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. *Microbial Ecology*, 59, 511-522. DOI 10.1007/s00248-009-9609-6
- Popova, M., Morgavi, D. P., Doreau, M., Martin, C. 2011. Production de méthane et interactions microbiennes dans le rumen. *Productions Animales*, 24, 447-460.
- Porter, L. J., Hrstich, L. N., Chan, B. G. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25, 223-230. [https://DOI.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94533-3](https://DOI.org/10.1016/S0031-9422(00)94533-3).

- 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 of Animal Science*, 78, 810-816. DOI:10.2527/2000.784810x
- Provenza, F. D. 1996. Acquired aversions as the basis for varied diets of ruminants foraging on rangelands. *Journal of Animal Science*, 74, 2010–2020. DOI:10.2527/1996.7482010x
- Puchala, R., Min, B. R., Goetsch, A. L., Sahl, T. 2005. The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. *Journal of Animal Science*, 83, 182-186. <https://doi.org/10.2527/2005.831182x>
- Puchala, R., Animut, G., Patra, A. K., Detweiler, G. D., Wells, J. E., Varel, V. H., Sahl, T., Goetsch, A. L. 2012. Methane emissions by goats consuming *Sericea lespedeza* at different feeding frequencies. *Animal Feed Science and Technology*, 175, 76-84. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2012.03.015
- Quideau, S. 2009. *Chemistry and Biology of Ellagitannins, An Underestimated Class of Bioactive Plant Polyphenols*; World Scientific Publishing.
- Reed, J. D. 2001. Effects of proanthocyanidins on digestion of fiber in forages. *Rangeland Ecology and Management/Journal of Range Management Archives*, 54, 466-473. DOI:10.2458/azu_jrm_v54i4_reed
- Reed, J. D., 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science* 73, 1516-1528. DOI:10.2527/1995.7351516x
- Renard, C. M., Watrelot, A. A., Le Bourvellec, C. 2017. Interactions between polyphenols and polysaccharides: Mechanisms and consequences in food processing and digestion. *Trends in Food Science and Technology*, 60, 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.022>
- Ridwan, R., Rusmana, I., Widyastuti, Y., Wiryawan, K. G., Prasetya, B., Sakamoto, M., Ohkuma, M. 2019. Bacteria and methanogen community in the rumen fed different levels of grass-legume silages. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 20, 1055-1062. DOI: 10.13057/biodiv/d200417
- Rittner, U., Reed, J. D. 1992. Phenolics and in-vitro degradability of protein and fibre in West African browse. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58, 21-28. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740580105>
- Robbins, C. T., Mole, S., Hagerman, A. E., Hanley, T. A. 1987. Role of tannins in defending plants against ruminants: reduction in dry matter digestion?. *Ecology*, 68, 1606-1615.
- Robbins, C.T., Hagerman, A. E., Austin, P. J. McArthur, C., Hanley, T. A. 1991. Variation in mammalian physiological responses to a condensed tannin and its ecological implications. *Journal of Mammalogy*, 72, 480-486. <https://www.jstor.org/stable/1382130>
- Romero-Pérez, G. A., Ominski, K. H., McAllister, T. A., Krause, D.O. 2011. Effect of environmental factors and influence of rumen and hindgut biogeography on bacterial communities in steers. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 258-268. DOI: 10.1128/AEM.01289-09
- Rooke, J. A., Wallace, R. J., Duthie, C. A., McKain, N., de Souza, S. M., Hyslop, J. J., Ross, D.W., Waterhouse, T., Roehe, R. 2014. Hydrogen and methane emissions from beef cattle and their rumen microbial community vary with diet, time after feeding and genotype. *British Journal of Nutrition*, 112, 398-407. <https://doi.org/10.1017/S0007114514000932>
- Roothaert, R. L., Paterson, R. T. 1997. Recent work on the production and utilization of tree fodder in East Africa. *Animal Feed Science and Technology*, 69, 39-51. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)81621-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)81621-5)
- Rubanza, C. D. K., Shem, M. N., Otsyina, R., Bakengesa, S. S., Ichinohe, T., Fujihara, T. 2005. Polyphenolics and tannins effect on in vitro digestibility of selected *Acacia* species leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 119, 129-142. doi:10.1016/j.anifeedsci.2004.12.004

- Rubanza, C. D. K., Shem, M. N., Bakengesa, S. S., Ichinohe, T., Fujihara, T. 2007. Effects of *Acacia nilotica*, *A. polyacantha* and *Leucaena leucocephala* leaf meal supplementation on performance of Small East African goats fed native pasture hay basal forages. *Small Ruminant Research*, 70, 165-173. DOI:10.1016/j.smallrumres.2006.02.008
- Salem, H. B., Nefzaoui, A., Salem, L. B., Ferchichi, H., Tisserand, J. L. 1997. Intake and digestion in sheep given fresh or air-dried *Acacia cyanophylla* Lindl foliage. *Annales de Zootechnie*, 46, 361-374.
- Sallam, S. M. A. H., da Silva Bueno, I. C., de Godoy P. B., Nozella E. F., Vitti, D. M. S. S., Abdalla, A. L. 2010. Ruminant fermentation and tannins bioactivity of some browses using a semi-automated gas production technique. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12, 1-10.
- Salminen, J. P., Karonen, M. 2011. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Functional Ecology*, 25, 325-338. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2010.01826.x
- Saminathan, M., Tan, H. Y., Sieo, C. C., Abdullah, N., Wong, C. M. V. L., Abdulmalek, E., Ho, Y. W. 2014. Polymerization degrees, molecular weights and protein-binding affinities of condensed tannin fractions from a *leucaena leucocephala* hybrid. *Molecules*, 19, 7990-8010. <https://DOI.org/10.3390/molecules19067990>
- Saminathan, M., Sieo, C. C., Gan, H. M., Abdullah, N., Wong, C. M. V. L., Ho, Y. W. 2016. Effects of condensed tannin fractions of different molecular weights on population and diversity of bovine rumen methanogenic archaea in vitro, as determined by high-throughput sequencing. *Animal Feed Science and Technology*, 216, 146-160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.04.005>
- Sarnoski, P. J., Johnson, J. V., Reed, K. A., Tanko, J. M., O'keefe, S. F. 2012: Separation and characterisation of proanthocyanidins in Virginia type peanut skins by LC-MSn. *Food Chemistry*, 131, 927-939. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.09.081
- Saro, C., Hohenester, U. M., Bernard, M., Lagrée, M., Martin, C., Doreau, M., Boudra, H., Popova, M., Morgavi, D. P. 2018. Effectiveness of interventions to modulate the rumen microbiota composition and function in pre-ruminant and ruminant lambs. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1273. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01273>
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Serment, A., Broudiscou, L. 2011. Influences des régimes et de leur fermentation dans le rumen sur la production de méthane par les ruminants. *Productions animales*, 24, 433-446.
- Scalbert A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, 3875-3883. [https://DOI.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://DOI.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L)
- Schofield, P., Mbugua, D. M., Pell, A. N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 21-40. [https://DOI.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://DOI.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0)
- Scholtz, M. M., McManus, G., Leeuw, K. C., Louvandini, H., Seixas, L., Demelo, C. B., Theunissen, A., Naser, F. W. C. 2013. The effect of global warming on beef production in developing countries of the southern hemisphere. *Natural Science*, 5, 106-119. <http://dx.DOI.org/10.4236/ns.2013.51A01>
- Schwab, C.G. 1995. Protected proteins and amino acids for ruminants. In: *Biotechnology in animal feeds and animal feeding* (Wallace R.J., and Chesson A., eds.). V.C.H. Press, Weinheim (Germany), 115-141.
- Schweitzer, J. A., Madritch, M. D., Bailey, J. K., LeRoy, C. J., Fischer, D. G., Rehill, B. J., Lindroth R. L., Hagerman A. E., Wooley S. C., Hart S. C., Whitham, T. G. 2008. From genes to ecosystems: the genetic basis of condensed tannins and their role in nutrient regulation in a *Populus* model system. *Ecosystems*, 11, 1005-1020. <https://DOI.org/10.1007/s10021-008-9173-9>
- Seedorf, H., Kittelmann, S., Henderson, G., Janssen, P. H. 2014. RIM-DB: a taxonomic framework for community structure analysis of methanogenic archaea from the rumen and other intestinal environments. *PeerJ*, 2, e494.

- Seresinhe, T., Perera, A. N. F., Lal, P. K. 2014. In vitro screening of some tropical goat feeds for low methane and high ammonia generating potential in the rumen. *Livestock Research for Rural Development*, 26, 52.
- Sharifi, A., Chaji, M., Vakili, A. 2019. Effect of treating recycled poultry bedding with tannin extracted from pomegranate peel on rumen fermentation parameters and cellulolytic bacterial population in Arabian fattening lambs. In *Veterinary Research Forum*, 10, 145-152. [10.30466/vrf.2019.75050.2007](https://doi.org/10.30466/vrf.2019.75050.2007)
- Shay, P. E., Trofymow, J. A., Constabel, C. P. 2017. An improved butanol-HCl assay for quantification of water-soluble, acetone: methanol-soluble, and insoluble proanthocyanidins (condensed tannins). *Plant methods*, 13, 63. DOI: [10.1186/s13007-017-0213-3](https://doi.org/10.1186/s13007-017-0213-3)
- Silva Pinto, M., Lajolo, F. M., Genovese, M. I. 2008. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). *Food Chemistry*, 107, 1629-1635. [https://DOI.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.038](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.038)
- Singh, B., Chaudhary, L. C., Agarwal, N., Kamra, D. N. 2011. Effect of feeding *Ficus infectoria* leaves on rumen microbial profile and nutrient utilization in goats. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 24, 810–817. [https://DOI.org/10.5713/ajas.2011.10199](https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10199)
- Singh, B., Bhat, T. K., Sharma, O. P., Kanwar, S. S., Rahi, P., Gulati, A. 2012. Isolation of tannase-producing *Enterobacter ludwigii* GRT-1 from the rumen of migratory goats. *Small Ruminant Research*, 102, 172-176. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.06.013>
- Sinz, S., Marquardt, S., Soliva, C. R., Braun, U., Liesegang, A., Kreuzer, M. 2019. Phenolic plant extracts are additive in their effects against in vitro ruminal methane and ammonia formation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 7, 966-976. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0665>
- Sivakumaran, S., Rumball, W., Lane, G. A., Fraser, K., Foo, L. Y., Yu M., Meagher, L. P. 2006. Variation of proanthocyanidins in *Lotus* species. *Journal of Chemical Ecology*, 32, 1797-1816. DOI:[10.1007/s10886-006-9110-3](https://doi.org/10.1007/s10886-006-9110-3).
- Skene, I. K., Brooker, J. D. 1995. Characterization of tannin acylhydrolase activity in the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Anaerobe*, 1, 321–327. DOI:[10.1006/anae.1995.1034](https://doi.org/10.1006/anae.1995.1034)
- Śliwiński, B. J., Soliva, C. R., Machmüller, A., Kreuzer, M. 2002. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 101, 101-114. [https://DOI.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00139-6](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00139-6)
- Smeriglio A., Barreca D., Bellocco E., Trombetta D. 2017. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *British Journal of Pharmacology*, 174, 1244-1262. DOI: [10.1111/bph.13630](https://doi.org/10.1111/bph.13630)
- Smith, A. H., Zoetendal, E., Mackie, R. I. 2005. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial Ecology*, 50, 197-205. <https://www.jstor.org/stable/25153241>
- Soares, S., Mateus, N., De Freitas, V. 2012. Carbohydrates inhibit salivary proteins precipitation by condensed tannins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60, 3966-3972. [https://DOI.org/10.1021/jf3002747](https://doi.org/10.1021/jf3002747)
- Soliva, C. R., Zeleke, A. B., Clement, C., Hess, H. D., Fievez, V., Kreuzer, M. 2008. In vitro screening of various tropical foliage, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 53-71. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.009>
- Solomon-Wisdom, G. O., Shittu, G. A. 2010. In vitro antimicrobial and phytochemical activities of *Acacia nilotica* leaf extract. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 1232-1234.

- Soltan, Y. A., Morsy, A. S., Sallam, S. M., Lucas, R. C., Louvandini, H., Kreuzer, M., Abdalla, A. L. 2013. Contribution of condensed tannins and mimosine to the methane mitigation caused by feeding *Leucaena leucocephala*. *Archives of Animal Nutrition*, 67, 169-184. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2013.801139>
- Spier, S. J., Smith, B. P., Seawright, A. A., Norman, B. B., Ostrowski, S. R., Oliver, M. N. 1987. Oak toxicosis in cattle in northern California: clinical and pathologic findings. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 191, 958-964.
- Sun, B. S., Ricardo-da-Silva, J. M., Spranger, I. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4267-4274. <https://DOI.org/10.1021/jf980366j>
- Supriyadi, M., Mullik, M. L., Sutaryono, Y. A., Varela, C. D. C, Coimbra, L., Deus, P. D., Dahlanuddin. 2014. Tree Legume – Maize - Cassava Integration to Improve Bali Cattle Productivity in Timor-Leste. *Australian Society of Animal Production*, 30, 146
- Swain, T., Hillis, W. E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of Science in Food and Agriculture*, 10, 63-68. <https://DOI.org/10.1002/jsfa.2740100110>
- Tajima, K., Nonaka, I., Higuchi, K., Takusari, N., Kurihara, M., Takenaka, A., Mitsumori, M., Kajikawa, H., Aminov, R. I. 2007. Influence of high temperature and humidity on rumen bacterial diversity in Holstein heifers. *Anaerobe*, 13, 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2006.12.001>
- Tan, H. Y., Sieo, C. C., Abdullah, N., Liang, J. B., Huang, X. D., Ho, Y. W. 2011a. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 169, 185-193. <https://DOI.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.07.004>
- Tan, H. Y., Sieo, C. C., Lee, C. M., Abdullah, N., Liang, J. B., Ho, Y. W. 2011b. Diversity of bovine rumen methanogens in vitro in the presence of condensed tannins, as determined by sequence analysis of 16S rRNA gene library. *The Journal of Microbiology*, 49, 492-498. DOI 10.1007/s12275-011-0319-7
- Tan, N. D., Wanapat, M., Uriyapongson, S., Cherdthong, A., Pilajun, R. 2012. Enhancing mulberry leaf meal with urea by pelleting to improve rumen fermentation in cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25, 452-461. DOI: 10.5713/ajas.2011.11270
- Tarascou, I., Souquet, J. M., Mazauric, J. P., Carrillo, S., Coq, S., Canon, F., Fulcrand, H., Cheynier, V. 2010. The hidden face of food phenolic composition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 50, 16-22.
- Tavendale, M. H., Meagher, L. P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G. T., Sivakumaran, 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, 403-419. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.037>
- Tedeschi, L.O., Ramírez-Restrepo, C. A., Muir, J. P. 2014. Developing a conceptual model of possible benefits of condensed tannins for ruminant production. *Animal*, 8, 1095–1105. DOI:10.1017/S1751731114000974
- Terrill, T. H., Rowan, A. M., Douglas, G. B., Barry, T. N. 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58, 321-329. <https://DOI.org/10.1002/jsfa.2740580306>
- Terrill, T. H., Windham, W. R., Evans, J. J., Hoveland, C. S. 1994. Effect of drying method and condensed tannin on detergent fiber analysis of *Sericea lespedeza*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66, 337-343. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740660311>

- Tharayil, N., Suseela, V., Triebwasser, D. J., Preston, C. M., Gerard, P. D., Dukes, J. S. 2011. Changes in the structural composition and reactivity of *Acer rubrum* leaf litter tannins exposed to warming and altered precipitation: climatic stress-induced tannins are more reactive. *New Phytologist*, 191, 132–145. DOI:10.1111/j.1469-8137.2011.03667.x
- Thornton, P. K. 2010. Livestock production: recent trends, future prospects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365, 2853-2867. DOI:10.1098/rstb.2010.0134
- Thorpe, A. 2009. Enteric fermentation and ruminant eructation: the role (and control?) of methane in the climate change debate. *Climatic Change*, 93, 407-431. DOI 10.1007/s10584-008-9506-x
- Tiemann T.T., Lascano, C. E. Wettstein, H. R., Mayer, A. C., Kreuzer, M., Hess H. D. 2008a. Effect of the tropical tannin-rich shrub legumes *Calliandra calothyrsus* and *Flemingia macrophylla* on methane emission and nitrogen and energy balance in growing lambs. *Animal*, 2, 790-799. DOI:10.1017/S1751731108001791
- Tiemann, T. T., Avila, P., Ramírez, G., Lascano, C. E., Kreuzer, M., Hess, H. D. 2008b. In vitro ruminal fermentation of tanniniferous tropical plants: plant-specific tannin effects and counteracting efficiency of PEG. *Animal Feed Science and Technology*, 146, 222-241. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2007.12.009
- Tshabalala, T., Sikosana, J. L. N., Chivandi, E. 2013. Nutrient intake, digestibility and nitrogen retention in indigenous goats fed on *Acacia nilotica* fruits treated for condensed tannins. *South African Journal of Animal Science*, 43, 457-463. <http://dx.doi.org/10.4314/sajas.v43i4.2>
- Tsuchiya, H. 1999. Effects of green tea catechins on membrane fluidity. *Pharmacology*, 59, 34-44. DOI:10.1159/000028303
- Tuwei, P. K., Kang'Ara, J. N. N., Mueller-Harvey, I., Poole, J., Ngugi, F. K., Stewart, J. L. 2003. Factors affecting biomass production and nutritive value of *Calliandra calothyrsus* leaf as fodder for ruminants. *The Journal of Agricultural Science*, 141, 113-127. <https://doi.org/10.1017/S002185960300340X>
- Ugbogu, E. A., Elghandour, M. M., Ikpeazu, V. O., Buendía, G. R., Molina, O. M., Arunsi, U. O., Okezie E., Salem, A. A. Z. 2019. The potential impacts of dietary plant natural products on the sustainable mitigation of methane emission from livestock farming. *Journal of Cleaner Production*, 213, 915-925. <https://DOI.org/10.1016/j.jclepro.2018.12.233>
- Ulyatt, M. J., Lassey, K. R., Shelton, I. D., Walker, C. F. 2002. Methane emission from dairy cows and wether sheep fed subtropical grass-dominant pastures in midsummer in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 45, 227-234. <https://doi.org/10.1080/00288233.2002.9513513>
- Vasta, V., Daghigho, M., Cappucci, A., Buccioni, A., Serra, A., Viti, C., Mele, M. 2019. Invited review: Plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: Experimental evidence and methodological approaches. *Journal of dairy science*, 102, 3781-3804. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14985>
- Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., Waters, E. J. 2003. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 564–573. <https://DOI.org/10.1002/jsfa.1394>
- Waghorn, G. C., Ulyatt, M. J., John, A., Fisher, M. T. 1987. The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus* L. *British journal of nutrition*, 57, 115-126. <https://doi.org/10.1079/BJN19870015>
- Waghorn, G. C., Shelton, I. D., McNabb, W. C. 1994. Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. 1. Non-nitrogenous aspects. *The Journal of Agricultural Science*, 123, 99-107.
- Waghorn, G. C., Tavendale, M. H., Woodfield, D. R. 2002. Methanogenesis from forages fed to sheep. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 64, 167–171.

- Waghorn, G. C. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 116-139. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.013>
- Wang, Y., Waghorn, G. C., Douglas, G. B., Barry, T. N., Wilson, G. F. 1994. The effects of the condensed tannin in *Lotus corniculatus* upon nutrient metabolism and upon body and wool growth in grazing sheep. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 54, 219-222.
- Wang, Y., Berg, B. P., Barbieri, L. R., Veira, D. M., McAllister, T. A. 2006. Comparison of alfalfa and mixed alfalfa-sainfoin pastures for grazing cattle: Effects on incidence of bloat, ruminal fermentation, and feed intake. *Canadian Journal of Animal Science*, 86, 383–392. DOI:10.4141/A06-009
- Wang, Y., Xu, Z., Bach, S. J., McAllister, T. A. 2008: Effects of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on in vitro ruminal digestion of mixed forage or barley grain. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 375–395. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2007.03.013
- Wang, Y., Alexander, T. W., McAllister T. A. 2009. In vitro effects of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on rumen bacterial populations and fermentation. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 89, 2252-2260. DOI: 10.1002/jsfa.3717
- Wang, Y., W. Majak, T. A., McAllister, T. A. 2012. Forthly bloat in ruminants: Cause, occurrence, and mitigation strategies. *Animal Feed Science and Technology*. 172, 103–114. DOI :10.1016/j.anifeedsci.2011.12.012
- Wann, C., Wanapat, M., Mapato, C., Ampapon, T., Huang, B. Z. 2019. Effect of bamboo grass (*Tiliacora triandra*, Diels) pellet supplementation on rumen fermentation characteristics and methane production in Thai native beef cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 32, 1153-1160. DOI: 10.5713/ajas.18.0703
- Waterman, P. G., Mole, S. 1994. *Methods in Ecology - Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Oxford : Blackwell Scientific Publications, 238pp.
- Wilkes, M. J., Hynd, P. I., Pitchford, W. S. 2012. Damara sheep have higher digestible energy intake than Merino sheep when fed low-quality or high-quality feed. *Animal Production Science*, 52, 30-34. <https://doi.org/10.1071/AN11033>
- Williams, C. M., Eun, J. S., MacAdam, J. W., Young, A. J., Fellner, V., Min, B. R. 2011. Effects of forage legumes containing condensed tannins on methane and ammonia production in continuous cultures of mixed ruminal microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 364-372. <http://dx.DOI.org/10.1016>
- Willis, R. B., Allen, P. R., 1998. Improved Method for Measuring Hydrolyzable Tannins Using Potassium Iodate. *Analyst*, 123, 435-439. <https://DOI.org/10.1021/jf0111155>
- Wilson, J. R. 1994. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. *The Journal of Agricultural Science*, 122, 173-182. <https://doi.org/10.1017/S0021859600087347>
- Wina, E., Tangendjaja, B., Palmer, B. 2000. Analysis of free, soluble and insoluble bound gallic acid in *Calliandra calothyrsus*. In: Ed. J.D. Brooker, editor/s. *Tannins in Livestock and Human Nutrition: Proceedings of an International Workshop, Adelaide, 31 May-2 June, 1999*; Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 1999. 86-89. <http://hdl.handle.net/102.100.100/211510?index=1>
- Wiryawan, K. G., Tangendjaja, B., Suryahadi, I. 2000. Tannin degrading bacteria from Indonesian ruminants. In: Brooker JD (ed) *Tannins in animal and human nutrition, proceedings of an international workshop, Adelaide, Australia, May 31 to June 2, 1999*. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), Canberra.

- Wischer, G., Boguhn, J., Steingas, H., Schollenberger, M., Rodehutschord, M. 2013. Effects of different tannin-rich extracts and rapeseed tannin monomers on methane formation and microbial protein synthesis in vitro. *Animal*, 7, 1796-1805. DOI: 10.1017/S1751731113001481
- Wisdom, C. S., Gonzalez-Coloma, A., Rundel, P. W. 1987. Ecological tannin assays. *Oecologia*, 72, 395-401.
- Witzig, M., Zeder, M., Rodehutschord, M. 2018. Effect of the ionophore monensin and tannin extracts supplemented to grass silage on populations of ruminal cellulolytics and methanogens in vitro. *Anaerobe*, 50, 44-54. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.01.012>
- Wolfe, R. M., Terrill, T. H., Muir, J. P. 2008. Drying method and origin of standard affect condensed tannin (CT) concentrations in perennial herbaceous legumes using simplified butanol-HCl CT analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1060-1067. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3188>
- Woodward, S. L., Waghorn, G. C., Ulyatt, M. J., Lassey, K. R. 2001. Early indications that feeding Lotus will reduce methane emission from ruminants. In *Proceedings-New Zealand Society of Animal Production*, 61, 23-26
- Woodward, S. L., Waghorn, G. C., Lassey, K. R., Laboyrie, P. G. 2002. Does feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) reduce methane emission from dairy cows? In *Proceedings-New Zealand Society of Animal Production*, 62, 227-230.
- Xu, S. F., Zou, B., Yang, J., Yao, P., Li, C. M. 2012. Characterization of a highly polymeric proanthocyanidin fraction from persimmon pulp with strong Chinese cobra PLA(2) inhibition effects. *Fitoterapia*. 83, 153-160. DOI: 10.1016/j.fitote.2011.10.005
- Yang, K., Wei, C., Zhao, G. Y., Xu, Z. W., Lin, S. X. 2017. Effects of dietary supplementing tannic acid in the ration of beef cattle on rumen fermentation, methane emission, microbial flora and nutrient digestibility. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101, 302-310. DOI: 10.1111/jpn.12531
- Yu, Z., Dahlgren, R. A. 2000. Evaluation of methods for measuring polyphenols in conifer foliage. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 2119-40. DOI: 10.1023/A:1005568416040
- Yu, Z., Morrison, M. 2004. Improved extraction of PCR quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* 36, 808-813.
- Yusiati, L. M., Kurniawati, A., Hanim, C., Anas, M. A. 2018. Protein binding capacity of different forages tannin. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 119, 012007. DOI :10.1088/1755-1315/119/1/012007
- Zabré, G., Kaboré, A., Bayala, B., Patricia Spoto, C., Leandro, N. L., Niderkorn, V., Tamboura H. H., Hoste, H., Louvandini H., Abdalla A. L. 2018. In vitro rumen fermentation characteristics, methane production and rumen microbial community of two major Acacia species used in Sahelian region of Burkina Faso. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 21, 357-366.
- Zeller, W. E. 2019. Activity, purification, and analysis of condensed tannins: Current state of affairs and future endeavors. *Crop Science*, 59, 886-904. DOI: 10.2135/cropsci2018.05.0323
- Zhou, M., Chung, Y. H., Beauchemin, K.A., Holtshausen, L., Oba, M., McAllister, T.A., Guan, L. L. 2011. Relationship between rumen methanogens and methane production in dairy cows fed diets supplemented with a feed enzyme additive. *Applied and Environmental Microbiology*, 111, 1148-1158. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05126.x>
- Zhu, J., Filippich, L. J., Alsalami, M. T. 1992. Tannic acid intoxication in sheep and mice. *Research in Veterinary Science*, 53, 280-292. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(92\)90128-O](https://doi.org/10.1016/0034-5288(92)90128-O)
- Zimmer, N., Cordesse, R. 1996. Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *Productions Animales*, 3, 167-179.