



**Université des Antilles
Institut National de la Recherche Agronomique**

THESE

**Présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université des Antilles
Spécialité : Sciences agronomiques, biotechnologies agroalimentaires**

Par Nathalie MINATCHY

**Evaluation d'une stratégie de valorisation de biomasse en
aliments anthelminthiques pour les petits ruminants
dans les systèmes polyculture élevage**

Soutenue publiquement le 23 janvier 2020

Membres du jury :

M. Jean-Louis PEYRAUD, Directeur de Recherches INRA Rennes, Rapporteur
M. René BAUMONT, Directeur de Recherches INRA Clermont Ferrand, Rapporteur
Mme Marie-Noëlle SYLVESTRE, Maître de conférences Université des Antilles, Examineur
Mme Marie-Laure LASTEL, Dr Université de Nancy, Ingénieur à Institut Technique Tropical, Examineur
M. Henry JOSEPH, Docteur, pharmacien, chercheur et entrepreneur, Examineur
M. Harry ARCHIMEDE, Directeur de Recherches INRA Antilles Guyane, Directeur de thèse

Invitée :

Mme Carine MARIE-MAGDELEINE, Dr Université des Antilles, chercheur INRA, Co-encadrante de thèse



**Université des Antilles
Institut National de la Recherche Agronomique**

THESE
Présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université des Antilles
Spécialité : Sciences agronomiques, biotechnologies agroalimentaires

Par Nathalie MINATCHY

**Evaluation d'une stratégie de valorisation de biomasse en
aliments anthelminthiques pour les petits ruminants
dans les systèmes polyculture élevage**

Soutenue publiquement le 23 janvier 2020

Membres du jury :

M. Jean-Louis PEYRAUD, Directeur de Recherches INRA Rennes, Rapporteur
M. René BAUMONT, Directeur de Recherches INRA Clermont Ferrand, Rapporteur
Mme Marie-Noëlle SYLVESTRE, Maître de conférences Université des Antilles, Examineur
Mme Marie-Laure LASTEL, Dr Université de Nancy, Ingénieur à Institut Technique Tropical, Examineur
M. Henry JOSEPH, Docteur, pharmacien, chercheur et entrepreneur, Examineur
M. Harry ARCHIMEDE, Directeur de Recherches INRA Antilles Guyane, Directeur de thèse

Invitée :

Mme Carine MARIE-MAGDELEINE, Dr Université des Antilles, chercheur INRA, Co-encadrante de thèse

*Nou ké bityé, brilé, bouré pou simé, planté, wouzé...
é si nou pa ni tan vwè rékòt, pitit an nou ké sòti an nwèsè*

Sonny Rupaire

A Aubert PARFAIT et Paul BOURGEOIS
Dé mètamannyòk ki wouvè chimen

A Harry ARCHIMEDE et Carine MARIE-MAGDELEINE
Dé zouti filé ki kléré chimen

A Eva,
Pou i trasé chimen

A Suzy et Roland, mes parents,
*Qui, à force d'amour, ont réussi à nous donner l'illusion que nous étions invincibles,
et qui nous ont ainsi permis de nous déterminer en êtres agissants,
en toute liberté et avec dignité.*
Mèsi !

A la mémoire de Magali BES,
*Mon isomère de Pech-Rouge,
la complice des premiers pas professionnels....étoile, parmi les étoiles.*

Remerciements

En tout premier lieu, je tiens à remercier M. Jean-Louis PEYRAUD, Directeur de Recherches à l'INRA de Rennes, et M. René BAUMONT, Directeur de Recherches à l'INRA de Clermont-Ferrand d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Des remerciements très sincères à Mme Marie-Noëlle SYLVESTRE, à Mme Marie-Laure LASTEL et à M. Henry JOSEPH, pour avoir bien voulu faire partie de mon jury de thèse. Merci à Sarra GASPARD, Victor VAILLANT et Jean-Luc GOURDINE, membres bienveillants de mon comité de suivi de thèse.

Terminer la rédaction d'une thèse de doctorat à l'aube de la cinquantaine n'est en l'occurrence pas un tremplin pour embrasser une longue carrière ou mettre un pied à l'étrier. Il s'agit plutôt de l'aboutissement d'une aventure humaine particulièrement belle. La rédaction de ces remerciements est donc une magnifique occasion de se retourner sur ce temps passé et d'avoir une pensée affective, amicale voire admirative pour tous ceux et celles qui ont fait partie de l'aventure et sans qui, elle n'aurait tout simplement pas été possible, ou n'aurait pas eu la même saveur.

Après avoir passé six années en tant que Maître de conférences associée à l'Institut universitaire et technologique de Kourou, il m'a été proposé de m'inscrire en thèse. Tout en ayant une activité professionnelle principale, j'ai pu être accueillie à l'Unité de Recherches en Zootechnie avec une équipe que j'appréciais et une question de recherche dans le droit fil de mes sujets de prédilection. Autant dire que ces nombreuses années ont été riches de sciences, de recherches mais aussi d'échanges, de discussions et de découvertes..

Aussi, merci !

Merci à Nathalie MANDONNET d'avoir tenue grande ouverte la porte de l'URZ et de m'y avoir toujours accueillie avec chaleur et compréhension.

Merci à Harry OZIER-LAFONTAINE et à Patrick LABBE de m'avoir acceptée au sein du Centre INRA Antilles-Guyane et d'avoir fait leur affaire des questions administratives.

Un énorme merci à Harry ARCHIMEDE et à Carine MARIE-MAGDELEINE, respectivement directeur et co-encadrant de thèse, pour leur investissement, leurs conseils et leurs encouragements.

Ce travail de thèse couvre de nombreux champs disciplinaires (technologie, phytochimie, techniques analytiques, nutrition, parasitologie..) et a été réalisé alors même que j'ai une autre activité professionnelle. Sans l'appui technique, logistique, administratif de l'URZ et de PTEA, il n'aurait pas été possible. Merci donc à tous pour vos encouragements, vos regards emplis de compassion, et aussi parfois pour vos impatiences ! Marie-Josée, Maryse, Yohann, Lucien, Suzitte, Dalila, Louis, Madly, Audrey, Michel, Gisèle, Bernard, Luber, Nadia, Lucina, Jean-Luc, Jean-Christophe, Maurice, Mathieu, et Nausicaa.

A l'élevage, Mario, Ferdy, Frédéric, Claude, Christian, Fred, Max, Xavier, Dimitri, Cindy, Rémy, Jérôme. Particulièrement à ceux qui m'ont accompagnée dans les expérimentations Jesse, Liza, Manuela et un clin d'œil particulier à mes anciens étudiants, devenus grands, en particulier Miguel, Steve, Maïly et Yohann.

Merci aux agriculteurs qui ont mis à notre disposition la matière première nécessaire à nos essais, messieurs François SIZAM-BASTARAUD, Pascal BEAUGENDRE, Jacky FOLBERT, Gérard ELSO, Freddy GRANDISSON, Luc ARDISSON, Guy LAMBERT, Roger SAINT-ETIENNE, Nazaire ROBIN, Jean-Louis KELEMEN. Merci également à Pierrot LEPOIGNEUR pour la mise à disposition d'un pilote de séchage.

Enfin, merci à ceux qui ont joué un rôle particulier à un moment ou à un autre dans cette aventure. Notamment au tout début, je souhaite témoigner de ma reconnaissance à Corinne MENCE-CASTER, Eustase JANKY et Elie CALIFER. Je souhaite dire ma sincère affection à mes amis Marcelle BALAGNE, Patrick KELLAOU, Francky ROUYARD, Marc BLANC. Merci au personnel, aux étudiants de l'IUT promotions 2010 - 2012 et Marigwadeloup pour leur soutien sans faille. A Danielle CELESTINE-MYRTIL-MARLIN, merci pour ton soutien tout au long de ces années.

Merci à Alain GAYADINE de m'avoir entraînée vers la défense de l'agriculture paysanne et des systèmes polycultures élevage. Merci au staff de Kap Gwadeloup en particulier Delile DIMAN, Madly MOUTOUSSAMY et Janlik pour avoir répondu à mes sollicitations tardives avec tant de tendresse.

Merci aussi à ceux, trop nombreux pour être cités, qui m'ont plus d'une fois manifesté leur affection, lors de divers coups de main et « *démélé* », avec l'incontournable : « *Natali, sé pou'w an ka fè sa !* »

Je tiens également à dire un mot de cet institut, l'INRA, que j'ai fréquenté sans relâche tout au long de ma vie professionnelle. Dès le début ici même, à Petit-Bourg - à la Station expérimentale de technologie des produits végétaux - avec M. Aubert PARFAIT, Marie-Jo GANOU-PARFAIT, Marie-Laure SAINT-MARC, Colette GALAS, Louis FAHRASMANE. Puis outre-mer, à l'INRA de Pech-Rouge, où l'aventure du jus de banane a commencé avec Jean-Louis ESCUDIER, Michel MIKOLAJCZAK, Magali BES et Jean-Luc CARQUET. Aussi, je ne pouvais trouver meilleur centre de recherche pour réaliser cette thèse, ni meilleure invitation que celle d'Harry ARCHIMEDE. Cela nous a permis de rattraper notre rendez-vous manqué autour des graines d'*Abelmoschus moschatus*. Harry, *mil fwa mès*. Merci pour ta confiance, tes engagements, ta ténacité, ta foi inébranlable, et tes *ti-blag!*

Sur un plan plus personnel, merci à ma sacrée famille de Bidou, Suzy, Roland, Eva, Annick, Tony, Eike, Joël, Naëmi, Johan, Régine, Paul et Adrien.

Et pour finir des remerciements *fonnkyè* très spéciaux, *sa ki sav sav...*

A l'homme du terroir et sa demie D,

Au pêcheur de perles..... avec y

Au double E..... épi love.

Natali

Table des matières

Remerciements	1
Liste des encadrés	4
Liste des figures	5
Liste des tableaux	6
Abréviations	7
Résumé	8
Abstract	9
1. Contexte général et problématique de l'étude	10
2. Etat de l'art et approche méthodologique	19
2.1. Effet des conditions agro-pédo-climatiques et de l'espèce végétale sur la composition chimique des biomasses.....	19
2.2. Effet de la granulation sur les teneurs en protéines et en tannins condensés.....	19
2.3. Évaluation de la valeur nutritionnelle et alimentaire des granulés	20
2.4. Évaluation de la valeur anthelminthique des granulés.....	21
3. Expérimentations et résultats obtenus	26
3.1. Influence des conditions agro-pédo-climatiques et de l'espèce végétale sur la composition des biomasses (annexe 1).	26
3.2. Évaluation de l'impact de l'itinéraire de granulation sur la composition des biomasses (annexe 2)	28
3.3. Évaluation de la valeur nutritionnelle et alimentaire des granulés fabriqués à partir des biomasses expérimentales (annexes 2 et 3)	30
3.4. Évaluation de la valeur anthelminthique des granulés fabriqués à partir des biomasses expérimentales (annexe 4)	35
3.5. Compromis entre valeur alimentaire et propriétés anthelminthiques pour les alicaments (annexe 5)	40
4. Discussion générale	44
4.1. Acquis du travail et limites de la stratégie mise en œuvre.....	44
4.2. Enjeux à l'échelle du système polyculture élevage.....	46
4.3. Perspectives.....	48
Conclusion	50

Références bibliographiques	51
Annexe 1: Minatchy, N., Archimède, H., Barde Dingamgoto, Jesse J., Dahome, L., Labirin, F., Calif, B., Marie-Magdeleine, C. Effect of two agro-pedo-climatic zones, drying methods and pelleting processes on chemical composition of <i>Manihot esculenta</i> (sp.), <i>Leucaena leucocephala</i> and <i>Cajanus cajan</i> . https://doi.org/10.5897/AJB2019.16871 Publié par African Journal of Biotechnology (Janvier 2020).....	57
Annexe 2. Minatchy, N., Marie Magdeleine, C., Calif V., Periacarpin, F., Godard, X., and Archimède H., Impact of peletting on the rumen degradation of <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Manihot esculenta</i> and <i>Cajanus cajan</i> foliage (Soumis).....	66
Annexe 3. Minatchy, N., Marie-Magdeleine, C., Calif, V., Félicité, Y., Periacarpin, F., Deloumeau, C., Pommier, F., Archimède, H. (2019). <i>Dichanthium</i> hay combined with green cassava foliage or pelleted cassava foliage as fed for Black Belly rams. https://doi.org/10.1007/s11250-019-02045-3 Publié dans Tropical Animal Health and Production (Août 2019).....	83
Annexe 4. Minatchy, N., Archimède, H., Philibert, L., Silou, T., Mounoussamy, F., Felicite, Y., Marie-magdeleine, C. Effect of CT diversity, synergy and pelleting treatment on <i>in vitro</i> anthelmintic activity against <i>Haemonchus contortus</i> . Présenté au Caribbean Science and Innovation Meeting (Octobre 2019) - (Soumis).....	91
Annexe 5. Minatchy, N., Marie Magdeleine, C., Garin, M., Nimirf, F., Romil-Granville, D., Calif, V., Bambou, J.C. and Archimede, H. Nutraceutical properties of <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Cajanus cajan</i> in goat kids infected with <i>Haemonchus contortus</i> . (Soumis).....	114

Liste des encadrés

Encadré 1. Caractéristiques des Systèmes Polyculture Elevage.....	11
Encadré 2. Digestion microbienne dans le rumen.....	12
Encadré 3. Gestion intégrée du parasitisme gastro-intestinal.....	13
Encadré 4. Qu'est-ce qu'un alicament ?.....	13
Encadré 5. Présentation des ressources végétales expérimentales.....	16
Encadré 6. Tannins – Structures biochimiques et propriétés.....	17
Encadré 7. Procyanidines et Prodelphinidines : relations entre structure et activité.....	24

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique du système de contrôle intégré des NGI, d'après Mahieu <i>et al.</i> (2009).....	13
Figure 2. Proposition d'un modèle pour les composés répondant au concept d'alicament contre les parasites gastro-intestinaux du bétail adapté à partir de Hoste <i>et al.</i> (2015).....	14
Figure 3. Complexation et dissociation des protéines by-pass et des tannins condensés selon Butter <i>et al.</i> (1999).....	21
Figure 4. Cycle biologique général des strongles gastro-intestinaux.....	22
Figure 5. Caillette d'un caprin infecté par <i>Haemonchus contortus</i>	22
Figure 6. Structure chimique des monomères de tannins condensés : flavan-3-ols et gallates de flavan-3-ol (Brunet and Hoste, 2006).....	24
Figure 7. Évaluation de la stratégie de fabrication d'alicaments anthelminthiques à partir de biomasses riches en protéines et tannins condensés.....	25
Figure 8. Vertisol en Grande-Terre.....	26
Figure 9. Ferralsol en Basse-Terre.....	26
Figure 10. Pourcentage du développement larvaire de <i>Haemonchus contortus</i> en fonction de la dose de tannins condensés (mg/ml).....	36
Figure 11. Concentration effective médiane des extraits de tannins condensés pour le développement larvaire de <i>Haemonchus contortus</i>	37
Figure 12. Pourcentage du dégagement larvaire de <i>Haemonchus contortus</i> en fonction de la dose de tannins condensés (mg/ml).....	37
Figure 13. Concentration effective médiane des extraits de tannins condensés pour le dégagement larvaire de <i>Haemonchus contortus</i>	38
Figure 14. Composition des extraits de tannins condensés de <i>C. cajan</i> , <i>L. leucocephala</i> , <i>M. esculenta</i> et du mélange.....	39
Figure 15. Proportion de monomères de Procyanidines et de Prodelphinidines dans les extraits de tannins condensés.....	40
Figure 16. Excrétion d'oeufs de <i>Haemonchus contortus</i> dans les fèces de chevreaux nourris avec une ration mixte de foin de <i>Dichanthium</i> et de granulés.....	44
Figure 17. Représentation schématique d'un système polyculture élevage intégrant la valorisation des biomasses anthelminthiques.....	47

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition chimique de feuillage de <i>Manihot esculenta</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> et <i>Cajanus cajan</i> récoltés sur deux zones agro-pédo-climatiques en Guadeloupe.....	27
Tableau 2. Effet de la technologie de séchage sur la teneur en tannins condensés des feuilles de <i>Manihot esculenta</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> et <i>Cajanus cajan</i>	28
Tableau 3. Effet du procédé de granulation sur les teneurs en azote et en tannins condensés dans les feuilles de <i>Manihot esculenta</i> sp., <i>Leucaena leucocephala</i> et <i>Cajanus cajan</i>	29
Tableau 4. Composition chimique du foin de <i>Dichanthium</i> , des granulés de luzerne, et des feuilles et granulés de manioc.....	33
Tableau 5. Ingestion, digestibilité, taux de renouvellement, excrétion d'azote fécal et d'azote urinaire, azote retenu et GMQ de béliers Black Belly nourris avec des rations mixtes composées de foin de <i>Dichanthium</i> mélangé à des feuilles de manioc ou des granulés de manioc ou des granulés de luzerne.....	34
Tableau 6. Composition chimique des granulés de foin de <i>Dichanthium</i> , de luzerne, de leucène, de manioc et de pois d'Angole (exprimée en % de matière sèche).....	41
Tableau 7. Ingestion, digestibilité, GMQ, indice de consommation, excrétion d'azote fécal et d'azote urinaire de chevreaux nourris avec des rations mixtes de granulés composés de <i>Dichanthium</i> , de luzerne, de manioc, de leucène, et de pois d'Angole.....	42

Abréviations

ADF	: Acid Detergent Fibre
ADL	: Acid detergent Lignin (fibres lignifiées, résistant à l'hydrolyse acide, constituants indigestibles des parois végétales)
EC ₅₀	: Concentration efficace médiane
GMQ	: Gain Moyen Quotidien
HC	: <i>Haemonchus contortus</i>
L1; L2	: Larves de nématodes gastrointestinaux de stade 1 et 2
L3	: Larve de nématodes gastrointestinaux de 3ème stade ou larve infestante
LDIA	: Larval development inhibition assay
LEIA	: Larval exsheathment inhibition assay
MAT	: Matières azotées totales
MO	: Matière organique
MS	: Matière sèche
NDF	: Neutral detergent fibre
NGI	: Nématodes gastrointestinaux
OPG	: Œufs (de NGI) par gramme de fèces
PC	: Procyanidines
PD	: Prodelphinidines
SPE	: Système polyculture élevage
TC	: Tannins condensés

Résumé

Dans les pays tropicaux et subtropicaux, l'élevage des petits ruminants peut être entravé par la disponibilité en ressources alimentaires et la forte prévalence des nématodes gastro-intestinaux. L'utilisation d'anthelminthiques de synthèse a entraîné l'apparition de souches parasitaires résistantes à la plupart des molécules. Dans les systèmes polyculture élevage, la présence de biomasse végétale aux propriétés alicamentaires permet de proposer une alternative aux anthelminthiques chimiques. Ce travail de thèse a consisté à évaluer une stratégie de valorisation de biomasse en alicaments anthelminthiques en utilisant la granulation. La Guadeloupe a été choisie comme modèle d'étude et trois biomasses, riches en protéines et en tannins condensés ont été étudiées : *Manihot esculenta*, *Cajanus cajan* et *Leucaena leucocephala*. L'évaluation a consisté tout d'abord à étudier l'influence des conditions agro-pédo-climatiques, de l'espèce de la plante et de la granulation sur la composition chimique des granulés. Puis nous avons étudié la valeur protéique, les propriétés anthelminthiques et alicamentaires des granulés en combinant des approches *in vitro* et *in vivo*.

Les résultats ont montré que la composition des plantes en métabolites primaires et en tannins condensés dépendait essentiellement de l'espèce et non des conditions agro-pédo-climatiques. Un séchage solaire sous abri à température modérée (25 à 35°C) permet de préserver des concentrations en tannins condensés compatibles avec des propriétés anthelminthiques du granulé. La valeur nutritionnelle et alimentaire a été approchée par l'étude de la dégradabilité des protéines contenues dans les ressources, grâce à la méthode d'Ørskov. Globalement, les résultats montrent qu'il existe une grande variabilité dans la dégradabilité effective des protéines. La granulation est neutre ou a un effet favorable sur cette valeur protéique.

Les propriétés anthelminthiques d'extraits de tannins condensés provenant des granulés des trois plantes et de leur mélange ont été étudiées *in vitro*. Les résultats ont montré que les effets étaient variables en fonction des espèces. L'analyse HPLC des extraits montre que cette variabilité peut s'expliquer par des différences de composition en tannins condensés entre les espèces de plante. Les propriétés alicamentaires ont été étudiées en comparant les réponses animales (ingestion, digestion, croissance) et les indicateurs de santé (excrétion fécale d'œufs, taux d'hématocrite, nombre d'éosinophiles) de chevreaux nourris par des rations mixtes composées de foin et des biomasses expérimentales. Les gains moyens quotidiens élevés des animaux et la réduction significative du nombre d'œufs par g de fèces confirment l'activité alicamentaire des granulés. L'ensemble de nos résultats montre que le séchage solaire sous serre, suivi de la granulation des biomasses expérimentales permet de produire des granulés de bonne valeur alicamentaire et que cette dernière dépend essentiellement de l'espèce de plante choisie.

Mots clés: Petits ruminants, Ressources non conventionnelles, Alicaments, Tannins Condensés.

Abstract

In tropical and subtropical countries, breeding of small ruminants can be hampered by the unavailability of feed resources and the high prevalence of gastrointestinal nematodes. The use of anthelmintic drugs has led to the emergence of parasitic strains resistant to most of the drugs. In mixed crops-livestock systems, biomass with nutraceutical properties is a way to propose an alternative to anthelmintic drugs. This work consisted in evaluating a strategy for the valorisation of biomass into anthelmintic nutraceuticals using pelleting. Guadeloupe was chosen as a model and three biomasses, rich in protein and condensed tannins, were studied: *Manihot esculenta*, *Cajanus cajan* and *Leucaena leucocephala*. The assessment first examined the influence of agro-pedo-climatic conditions, plant species and pelleting process on the chemical composition of the pellets. Then we studied the protein value, anthelmintic and nutraceutical properties of the pellets combining *in vitro* and *in vivo* approaches.

The results showed that the composition in primary metabolites and condensed tannins of plants depended mainly on the species and not on agro-pedo-climatic conditions. A sun-drying under shelter at moderate temperature (25 to 35°C) allows preserving concentrations of condensed tannins compatible with the anthelmintic properties of the pellets. The nutritional and dietary value was approached by studying the degradability of the proteins contained in the resources, using Ørskov's method. Overall, the results showed that there is a high variability in the effective degradability of proteins. The pelleting process is neutral or has a favourable effect on this protein value. The anthelmintic properties of condensed tannin extracted from the pellets of the three plants and their mixture were studied *in vitro*. The results showed that the effects were variable depending on the species. The HPLC analysis of the extracts showed that this variability can be explained by differences in condensed tannin composition between plant species. The nutraceutical properties were studied comparing animal responses (ingestion, digestion, growth) and health indicators (faecal egg excretion, pack cell volume levels, number of eosinophils) of kids fed mixed rations of hay and experimental biomasses. The high average daily gain of the animals and the significant reduction in the number of eggs per g of faeces confirm the nutraceutical activity of the pellets. All our results showed that sun-drying under shelter, followed by pelleting of the experimental biomasses, produces pellets of good nutraceutical value and that the latter depends essentially on the plant species.

Key words: Small ruminants, Non conventional resources, Nutraceuticals, Condensed tannins

1. Contexte général et problématique de l'étude

Les politiques de développement agricole et les thématiques de recherche sont de plus en plus orientées vers une logique de développement durable et d'agro-écologie car l'agriculture chimique développée à partir des années 1950 a conduit à une impasse. En effet, même si les pratiques de l'agriculture intensive ont permis d'accroître considérablement la productivité, dans le monde, plus de 820 millions de personnes souffrent de la faim, en particulier en Afrique, en Amérique latine et en Asie de l'ouest et deux milliards de personnes sont dans une situation d'insécurité alimentaire, c'est-à-dire qu'elles n'ont pas accès régulièrement à des aliments nutritifs en quantité suffisante (FAO *et al.*, 2019). D'autre part, ces pratiques ont des effets désastreux sur l'environnement parmi lesquels la déforestation, l'épuisement des sols, la pénurie d'eau, la pollution des écosystèmes, l'érosion de la biodiversité et des émissions importantes de gaz à effet de serre. Or, en 2050, la population mondiale atteindra 9,8 milliards avec une demande alimentaire qui devrait augmenter de plus de 50% voire de plus de 70 % pour les produits animaux (Searchinger *et al.*, 2018). Afin de répondre à cette demande et réduire les conséquences néfastes sur l'environnement, une alternative consisterait à développer les exploitations agricoles qui intègrent les principes de l'agro-écologie et de l'économie circulaire, principes qui sont déjà mis en œuvre dans certaines exploitations qui utilisent des systèmes polyculture élevage (SPE).

L'économie circulaire est un concept visant notamment à améliorer l'efficacité des systèmes socio-économiques en optimisant la gestion des ressources, notamment en assurant le recyclage de la matière.

En ce qui concerne l'agriculture, les systèmes agricoles ont fonctionné durant des millénaires en respectant les cycles naturels. Ils se sont en partie linéarisés et déterritorialisés au cours des XIX^{ème} et XX^{ème} siècles en limitant le retour au sol de la matière organique issue des villes et en allongeant les circuits d'approvisionnement, augmentant ainsi l'empreinte carbone. Appliquée aux systèmes agricoles et agroalimentaires, l'économie circulaire vise une production alimentaire et non alimentaire de qualité, et en quantité suffisante, tout en préservant et régénérant les écosystèmes (biodiversité, eau, air, sols - fertilité et foncier) (INEC, 2018).

Elle est ainsi appliquée à l'échelle d'un territoire mais elle peut aussi l'être à l'échelle de l'exploitation agricole même si des apports extérieurs ne sont pas exclus. La biomasse produite sur une exploitation, en tant que matière et source d'énergie doit pouvoir être utilisée pour répondre aux besoins de l'exploitation afin de développer son autonomie.

Les systèmes polyculture élevage (encadré 1), du fait même de la co-existence de cultures et d'élevage et de leur plus ou moins grande intégration, peuvent fonctionner dans le cadre d'une économie circulaire à l'échelle de l'exploitation. L'intégration agriculture-élevage, c'est-à-dire l'échange de flux de matière et de services entre système technique de culture et système technique d'élevage, est un des leviers les plus étudiés et les plus prometteurs pour améliorer le fonctionnement des SPE. Cette intégration permet en effet d'augmenter la production tout en diminuant la dépendance aux intrants, coûteux et polluants, et confère ainsi aux SPE plus d'autonomie.

Encadré 1: Caractéristiques des systèmes polyculture élevage (SPE)

Il y a une grande diversité de pratiques se réclamant des SPE dans le monde ce qui rend difficile l'élaboration d'une définition générale. Van Keulen et Schiere (2004) ont donné une définition agronomique qui souligne que le terme polyculture élevage désigne l'association de cultures et d'élevage dans un cadre coordonné, le plus souvent à l'échelle de l'exploitation agricole. Cette définition est très large et ne permet pas de couvrir l'ensemble des caractéristiques des SPE. Les SPE sont différenciés par leur finalité (nourrir l'homme et/ou l'animal), par la diversité des ressources cultivées et leur niveau d'intégration, c'est-à-dire l'échange de flux de matière et de services intra et inter système technique de culture et système technique d'élevage. Ces systèmes, historiquement très présents dans le monde, ont reculé avec l'intensification et la spécialisation des exploitations agricoles.

Aujourd'hui, dans les pays du nord, les SPE ont généralement pour finalité l'amélioration du bilan environnemental des systèmes de production animale et notamment la réduction de leur empreinte carbone. Les cultures permettent de nourrir les animaux en limitant l'érosion des sols, les lessivages d'azote et les achats d'aliments concentrés (réduction des intrants) (Huygue, 2009).

Dans les pays du sud non engagés dans la révolution verte, la finalité des SPE est de nourrir l'homme en intensifiant la production agricole à l'unité de surface en associant de façon synergique une diversité de ressources, en utilisant des cultures duales (le produit principal est généralement un aliment pour l'homme et le coproduit est consommé par l'animal ou rend d'autres services - énergie, mulch, litière...) en recherchant l'autonomie pour tous les compartiments (utilisation de fumures pour limiter l'achat d'intrants, diversification des productions pour sécuriser le revenu de l'agro-éleveur).

Malgré leur marginalisation dans les pays du nord à cause d'une volonté politique de spécialisation et de concentration de l'agriculture, les SPE sont les systèmes agricoles les plus représentés dans le monde (Steinfeld *et al.*, 2006 ; Udo *et al.*, 2011) et en particulier en milieu tropical (Altieri *et al.*, 2012). Ils regroupent près de la moitié de la production agricole mondiale avec 50 % des céréales produites, 75 % du lait et 60 % de la viande (Herrero *et al.*, 2010). Les SPE sont considérés comme une réponse possible au contexte de crise écologique car ils contribuent à préserver les ressources naturelles, à améliorer les complémentarités entre élevage et cultures, à minimiser les excès d'effluents d'élevage (Ryschawy *et al.*, 2014).

En permettant la production d'aliments adaptés aux habitudes alimentaires, la complémentarité des productions pour une meilleure allocation de main d'œuvre et l'exploitation de foncier peu valorisable, les SPE rendent de nombreux services économiques, sociaux, culturels et environnementaux particulièrement pour les agriculteurs les plus pauvres des zones tropicales (Stark, 2016).

Dans les SPE, les ruminants présentent l'avantage de pouvoir digérer les biomasses lignocellulosiques contrairement aux monogastriques. Cette faculté est liée à la présence d'une flore microbienne très active dans le rumen (encadré 2).

Encadré 2 : Digestion microbienne dans le rumen

La dégradation des aliments dans le rumen des ruminants est assurée par l'activité de différents microorganismes (procaryotes et eucaryotes) appartenant à 3 groupes taxonomiques principaux : les bactéries, les champignons et les protozoaires. Ces groupes sont complétés par des archées qui ne dégradent pas les aliments mais utilisent l'hydrogène issu de la digestion par les microorganismes. Les bactéries selon leur activité et le substrat qu'elles dégradent peuvent être classées en bactéries cellulolytiques, hémicellulolytiques, protéolytiques, amylolytiques... Cependant les bactéries ne sont pas toujours strictement spécialisées dans l'une de ces activités ou ressources (cellulose, amidon...) mais peuvent associer plusieurs fonctions. Les champignons, comme les bactéries, digèrent les aliments en sécrétant des enzymes fibrolytiques (cellulases, xylanases...). Ils sont aussi capables de solubiliser les lignines. Le rôle des protozoaires du rumen dans la digestion des aliments est souvent sous-estimé comparativement à celui des bactéries et des champignons malgré la synthèse d'enzymes communs. Les protozoaires digèrent des particules alimentaires de grande taille ainsi que des bactéries et des champignons.

Le bilan global de la digestion dans le rumen est la production : 1) d'acides gras volatils, absorbés via la paroi du rumen, qui contribuent pour plus de 60 % des nutriments énergétiques chez les ruminants ; 2) de protéines alimentaires by pass (non digérées dans le rumen) dont la digestibilité intestinale est très variable (50 à 80 %) ; 3) de protéines microbiennes digérées à plus de 85 % dans l'intestin et contribuant à plus de 50 % des acides aminés disponibles pour l'animal ; 4) de gaz, dont le méthane, qui représentent une perte énergétique (5 à 10 %) et contribuent aux gaz à effet de serre.

En plus de la gestion de la biomasse pour l'alimentation, la santé de l'animal est une forte préoccupation en raison d'une importante prévalence des pathologies. Une contrainte majeure de l'élevage des petits ruminants est le parasitisme gastro-intestinal qui peut créer près de 50 % de pertes dans les troupeaux (Mahieu, 2014). Trois espèces de nématodes gastro-intestinaux (NGI) sont généralement retrouvées : *Haemonchus contortus* (HC) qui est un hématophage de la caillette, *Trichostrongylus colubriformis* dans l'intestin grêle et *Oesophagostomum columbianum* dans le côlon. Les deux premières sont dominantes dans toute la ceinture tropicale et subtropicale, mais HC a une aire de répartition plus large, allant jusqu'en zone tempérée, et qui devrait encore s'étendre vers le nord et en altitude, à cause de l'évolution des conditions liées au réchauffement climatique (Mahieu, 2014).

L'usage des anthelminthiques de synthèse qui s'est généralisé depuis une cinquantaine d'années est de moins en moins efficace à cause du développement de résistances (Torres-Acosta *et al.*, 2012). Les voies qui visent à développer la gestion intégrée du parasitisme constituent l'une des réponses à ce problème (encadré 3, figure 1).

Encadré 3 : Gestion intégrée du parasitisme gastro-intestinal

La gestion intégrée du parasitisme intestinal repose sur trois axes :

- 1) Renforcer les défenses de l'hôte (alimentation riche en protéines et énergie / utilisation de plantes à tannins et autres métabolites secondaires.)
- 2) Limiter le risque d'infestation (en réduisant la charge parasitaire des champs)
- 3) Gérer les populations parasitaires pour prolonger l'efficacité des anthelminthiques (utilisation non systématique).

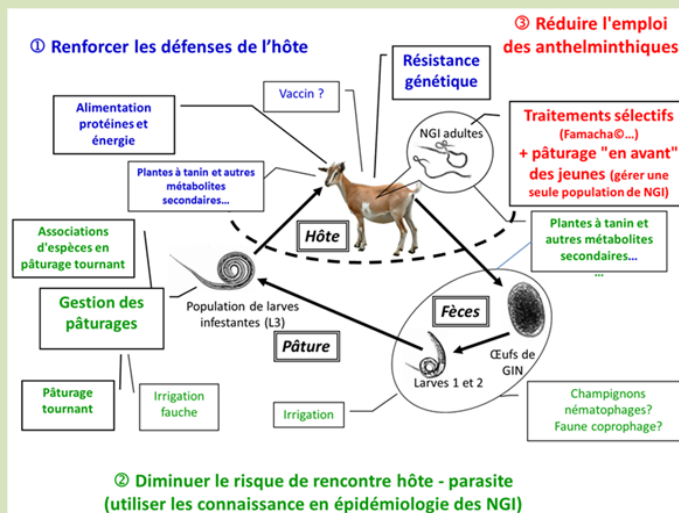


Figure 1. Représentation schématique du système de contrôle intégré des NGI, d'après Mahieu *et al.* (2009).

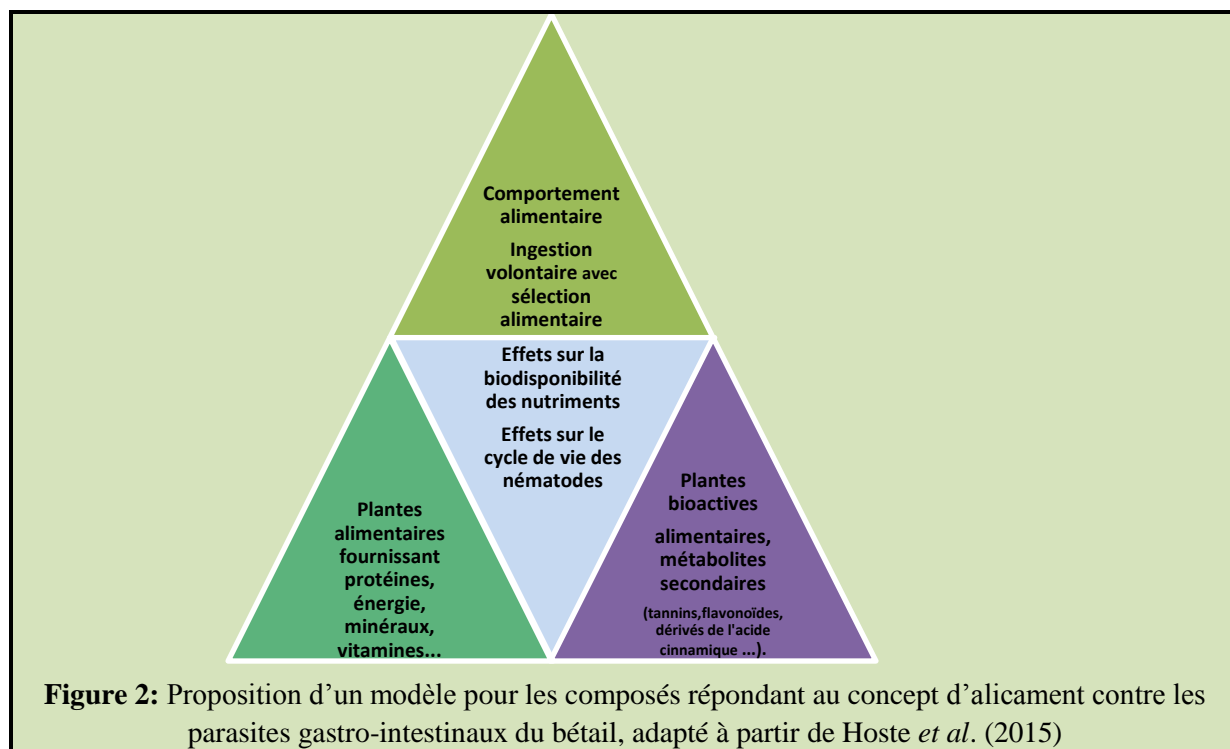
Dans cette approche, les biomasses qui ont des propriétés nutritionnelles et anthelminthiques sont de potentiels alicaments (Hoste *et al.*, 2015) qui pourraient être utilisables à la ferme dans une logique d'économie circulaire si elles sont correctement choisies et transformées (encadré 4, figure 2).

Encadré 4 : Qu'est-ce qu'un alicament ?

Un alicament est une ressource alimentaire combinant une valeur nutritionnelle et une valeur sanitaire (Andlauer and Fürst, 2002). Du point de vue des sciences vétérinaires, un alicament est défini comme un aliment du bétail qui combine une valeur nutritionnelle et des effets bénéfiques sur la santé animale (Hoste *et al.*, 2015). Cette double action repose sur la présence de métabolites secondaires des plantes et/ou de composés bioactifs. L'aliment peut être utilisé soit directement, soit sous forme concentrée dans la ration donnée à l'animal. Il présente des différences «clés» avec des anthelminthiques de synthèse ou des molécules phytothérapeutiques.

Selon Hoste *et al.* (2015), les critères d'évaluation d'un alicament pour le bétail reposent sur trois axes :

- Le critère nutritionnel : un alicament ne doit pas être imposé (comme le sont les anthelminthiques de synthèse ou les molécules de phytothérapie) mais proposé à l'animal sur une période suffisamment longue (plusieurs jours, mois, année). Aussi, l'efficacité des alicaments dépendra donc de l'ingestion volontaire de l'animal.
- La concentration des composés bioactifs dans l'aliment : ces composés sont généralement des métabolites secondaires des plantes dont la concentration peut être variable en fonction des conditions environnementales, des espèces, cultivars ou chémotypes. Ensuite, les procédés de récolte et de transformation peuvent aussi influencer la concentration en composés actifs.
- Le dernier critère est l'effet sur la santé de l'animal : les effets des alicaments et de leurs composés bioactifs contre les NGI diffèrent des modes d'action des composés chimiques. Il faut donc développer des méthodologies spécifiques pour mesurer les effets anthelminthiques.



Notre question de recherche est donc la suivante : « **Dans quelles mesures les biomasses végétales peuvent-elles entrer dans une stratégie de valorisation en aliment anthelminthique pour les petits ruminants dans le cadre des systèmes polyculture élevage ?** »

Pour y répondre, nous avons choisi un contexte géographique et socio-économique (la Guadeloupe), les biomasses (*Manihot esculenta*, *Cajanus cajan*, et *Leucaena leucocephala*) et la granulation comme technologie de conservation.

La Guadeloupe est un archipel de 1 628 km² dans les Caraïbes, situé en milieu tropical humide, avec des contextes climatiques allant de régions sèches à régions humides et une diversité de sols représentatifs de plus de 50 % des sols tropicaux (Sierra et Desfontaines, 2018). Par ailleurs l'agriculture familiale y est majoritaire avec des SPE de taille moyenne de 4,4 ha en 2013 (Stark, 2016).

L'élevage de petits ruminants est constitué presque exclusivement de caprins. Le cheptel moyen par exploitation agricole ayant un élevage caprin en 2018 est de 14 têtes (DAAF – service de l'information statistique et économique, 2018).

La mise en place de cultures sur le modèle productiviste (banane et canne à sucre) a entraîné, entre autres conséquences néfastes, la pollution des écosystèmes et une fragilité concernant l'auto-alimentation en nourriture. Des travaux scientifiques s'intéressent donc aux exploitations installées en polyculture élevage comme l'une des voies possibles de mutation

de l'agriculture conventionnelle vers un système plus vertueux écologiquement et capable de satisfaire les besoins alimentaires (Ozier-Lafontaine *et al.*, 2011).

Les biomasses que nous avons choisies sont notamment les co-produits de culture (feuillages) de deux plantes duales éligibles dans le cadre d'un système alimentaire pour l'homme (énergie et protéine) et une plante de service utilisée en système vivrier (encadré 5). Ces trois ressources sont par ailleurs résistantes à la sécheresse. Il s'agit de :

- pois d'Angole (*Cajanus cajan*) : ressource protéique
- manioc (*Manihot esculenta*) : ressource énergétique
- leucène (*Leucaena leucocephala*) : utilisée comme plante fourragère et barrière naturelle.

Ces biomasses sont riches en protéines – teneur supérieure à 20% de la matière sèche - mais aussi en tannins condensés (TC) - teneur supérieure à 3% de la matière sèche- (Heuzé et Tran, 2015; Heuzé et Tran, 2016; Heuzé *et al.*, 2017). Ces deux familles de molécules sont valorisables dans la gestion intégrée du parasitisme gastro-intestinal. La sur-nutrition protéique permet d'améliorer la résistance/résilience de l'hôte notamment en stimulant son système immunitaire (Bambou *et al.*, 2011). Les tannins condensés ont des propriétés anthelminthiques bien connues (Mueller-Harvey *et al.*, 2019) et dans certaines conditions peuvent améliorer la biodisponibilité des protéines pour l'animal (encadré 6). Des auteurs ont montré le potentiel anthelminthique des trois plantes : Marie-Magdeleine *et al.* (2010) pour le manioc, Alonso-Diaz *et al.* (2008) et de Oliveira *et al.* (2011) pour le leucène et Singh *et al.* (2010) pour le pois d'Angole.

Dans le cadre des SPE de type vivrier, les ressources générant les co-produits à valeur fourragère ont des cycles de production qui ne sont pas basés sur l'alimentation quotidienne des animaux. Aussi, l'utilisation optimale de ces co-produits nécessite la mise en œuvre de stratégies de stockage (Beigh *et al.*, 2017), comme l'ensilage (Sudarman *et al.*, 2016), le foin (Wanapat, 2001) ou la granulation. La solution de l'ensilage a été rejetée car la technologie est hasardeuse avec les ressources riches en protéines, de plus, en région tropicale, le maintien de la qualité de l'aliment est difficile après l'ouverture du silo. Le foin n'est pas adapté aux ressources de type arbustif. La granulation est donc la technique la mieux adaptée à nos conditions et à nos ressources. Par ailleurs, le granulé est une forme de présentation bien connue des éleveurs. Elle est pratique et permet de disposer de la ressource toute l'année, ce qui rend possible une utilisation différée par rapport au temps de récolte. Une optimisation de l'utilisation des biomasses produites est ainsi possible dans une logique d'économie circulaire.

Encadré 5: Présentation des ressources végétales expérimentales

Manioc (*Manihot esculenta* Crantz)

Le manioc est une espèce de plantes dicotylédones de la famille des *Euphorbiaceae*, originaire d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud. C'est un arbuste vivace qui est largement cultivé comme plante annuelle dans les régions tropicales et subtropicales pour sa racine tubérisée riche en amidon. Le manioc est résistant à la sécheresse et sa productivité énergétique par hectare est élevée. La teneur en matières azotées totales (MAT) des feuilles est en moyenne de 21 %, mais elle varie fortement en fonction des variétés et de l'âge (de 15 à 40 %). Elles sont riches en lysine mais pauvres en méthionine. Les feuilles de manioc sont riches en minéraux en particulier calcium, magnésium, fer, manganèse et zinc. Leur concentration en acide cyanhydrique libre, potentiellement toxique, est très variable en fonction des variétés, de l'âge des feuilles et de la qualité du sol. L'acide cyanhydrique est détruit lors du séchage et de l'ensilage. Les feuilles peuvent être consommées, fraîches, fanées ou ensilées par les ruminants. Le fanage et l'ensilage sont recommandés pour les variétés les plus riches en acide cyanhydrique (Heuzé et Tran, 2016).



Manioc (*Manihot esculenta* Crantz)

Leucène (*Leucaena leucocephala*)

Le leucène est une espèce de plantes dicotylédones de la famille des *Fabaceae* originaire du Mexique et d'Amérique centrale. C'est un petit arbre tropical à croissance rapide, qui supporte tout type de sol, apprécie le soleil et est parfaitement adapté à la sécheresse. Ses feuilles sont appréciées des petits ruminants. Il est utilisé pour diverses applications : légume, bois de chauffage, fibres, fourrage pour le bétail, barrière naturelle. Cette espèce envahissante s'est naturalisée dans toutes les régions tropicales du monde. Le leucène présente un intérêt pour la production de biomasse car son rendement de feuillage correspond à une masse sèche de 2 000 à 20 000 kg / ha / an, et 30-40 m³ / ha / an de bois. Il est également particulièrement efficace dans la fixation de l'azote, avec plus de 500 kg / ha / an. Il est ainsi utile comme engrais vert mais aussi pour ombrager les plantations et lutter contre l'érosion (Heuzé et Tran, 2015).



Leucène (*Leucaena leucocephala*)

Pois d'Angole (*Cajanus cajan*)

Le pois d'Angole est une espèce de plante vivace de la famille des *Fabaceae*. Il est originaire d'Inde, mais de nos jours, il est cultivé dans l'ensemble des régions tropicales, notamment le sous-continent indien et en Afrique de l'Est. Il est adapté à une grande diversité de sol (pH de 4,5 à 8,4). C'est à la fois une culture vivrière (pois secs, farine, pois frais ou légumes verts) et une culture fourragère de couverture. Les pois contiennent des niveaux élevés de protéines et d'importants acides aminés (méthionine, lysine et tryptophane). C'est une ressource qui entre dans un système alimentaire pour l'homme en tant que source de protéines (Heuzé et al., 2017).



Pois d'Angole (*Cajanus cajan*)

Photos: © INRA/ Madly Moutoussamy

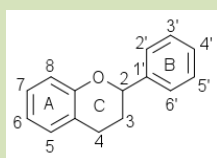
Encadré 6: Tannins – Structures biochimiques et propriétés

Structure biochimique des tannins – Tannins hydrolysables et tannins condensés.

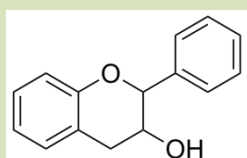
Les tannins sont des métabolites secondaires des plantes et constituent une famille de molécules très diverses. En fonction de leur structure, ils peuvent être classés en deux grands groupes: les tannins hydrolysables et les tannins condensés.

Les tannins hydrolysables sont des esters d'acide ellagique ou gallique avec un sucre (le plus souvent le glucose) comme noyau central. Ces tannins peuvent être dégradés en acide ellagique ou gallique et absorbés au niveau du tractus digestif des ruminants et entraîner des effets toxiques.

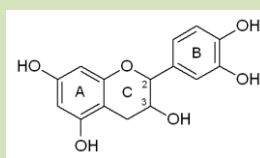
Les tannins condensés sont des polyphénols de poids moléculaire élevé. Ce sont des polymères de catéchine (flavan-3-ols) de structure très variée. Deux groupes sont majoritairement représentés les procyanidines (PC) et les prodelphinidines (PD). Ces derniers diffèrent des PC par la présence d'un OH supplémentaire sur le cycle B du squelette des flavonoïdes.



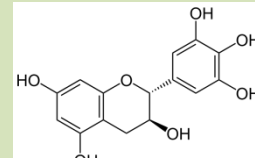
Squelette de base des flavonoïdes



Flavan-3-ol



Catéchine
(Procyanidine)



Gallocatéchol
(Prodelphinidine)

Propriétés des TC dans la nutrition des ruminants (Piluzza *et al.*, 2014)

Contrairement aux tannins hydrolysables, les tannins condensés sont faiblement absorbés par le tractus digestif des herbivores. Leur propriété chimique la plus remarquable est leur capacité à former des complexes, grâce à des liaisons hydrogènes et hydrophobes, avec les macromolécules comme les protéines, les fibres et l'amidon présentes dans les ressources végétales. Cependant la liaison entre les tannins condensés et les protéines est généralement réversible en fonction des conditions physico-chimiques notamment du pH. Les protéines constituant ces complexes sont protégées de la dégradation ruminale et peuvent ainsi arriver au niveau de la caillette ou de l'intestin. A ce niveau, en raison des conditions de pH, les protéines sont libérées des TC et peuvent ainsi être soumises à la digestion intestinale. Ces protéines, non dégradées dans le rumen, appelées protéines by-pass ont un effet bénéfique pour la nutrition des ruminants. La dégradation des protéines dans le rumen entraîne la perte de matières azotées sous forme d'ammoniac alors que dans l'intestin, les acides aminés seront absorbés et métabolisés améliorant ainsi les performances nutritionnelles de la ration.

Propriétés anthelminthiques des TC (Hoste *et al.*, 2015)

Trois effets ont été liés à la consommation de plantes à tannins par les ruminants

- Un établissement réduit des larves infestantes (stade 3) dans l'hôte
- Une plus faible excrétion des œufs par les vers adultes, lié à la diminution du nombre de vers ou une plus faible fertilité des vers femelles
- Une altération du développement des œufs en larves infestantes.

Concentration en tannins condensés et effets sur l'animal

La consommation de fortes concentrations de tannins condensés (supérieure à 7% de la matière sèche) a été associée à des effets néfastes chez les ruminants comme la diminution de l'ingestion, l'inhibition de la croissance et une interaction avec la morphologie et l'activité protéolytique des microbes dans le rumen (Min *et al.*, 2003 ; Waghorn and McNabb, 2003). Quand la teneur en tannins est inférieure à 5% de la matière sèche, des effets positifs ont été trouvés comme une augmentation de la croissance, de la production de lait, une meilleure pousse de la laine et une amélioration des performances reproductives (Piluzza *et al.*, 2014).

Du point de vue nutritionnel, la granulation présente au moins deux avantages. Elle permet une ingestion plus importante grâce à la réduction de taille des particules du fourrage liée au broyage. Par ailleurs, le temps de séjour des particules dans le rumen est diminué du fait de la réduction de leur taille. Le deuxième avantage est une meilleure accessibilité des enzymes microbiennes du rumen aux protéines permettant ainsi une meilleure dégradabilité. Cependant, l'accélération du transit peut entraîner une réduction de la digestibilité en raison du temps de séjour insuffisant pour une action complète des microorganismes.

Concernant l'activité anthelminthique, le procédé de granulation dans son ensemble (séchage, broyage et mise en forme) peut avoir un effet sur les TC, notamment à cause de l'augmentation de la température lors du traitement, qui peut entraîner une dégradation au-dessus de 40°C (Hoste *et al.*, 2015) ou une plus grande liaison de ces derniers avec les protéines et les fibres (Terrill *et al.*, 1992) réduisant ainsi leur activité biologique. D'autres auteurs ont cependant montré que dans certaines conditions, la granulation pouvait augmenter l'activité anthelminthique de *Lespedeza cuneata*, plante riche en TC, contre *Haemonchus contortus* chez les caprins (Terrill *et al.*, 2007).

L'objectif principal de ce travail est donc d'évaluer la stratégie de valorisation des biomasses végétales en alicament anthelminthique grâce à la granulation.

2. Etat de l'art et approche méthodologique

L'évaluation de l'itinéraire technique de production d'un granulé aux propriétés alicamentaires à partir de biomasses devra porter sur trois grands axes :

- 1) Vérifier que les biomasses peuvent remplir les conditions pour être un candidat alicament, c'est à dire déterminer leur composition chimique et les facteurs de variabilité de cette dernière
- 2) Évaluer l'impact de la technologie de granulation choisie sur la composition chimique des biomasses
- 3) Évaluer l'efficacité du granulé en tant qu'aliment.

2.1. Effet des conditions agro-pédo-climatiques et de l'espèce végétale sur la composition chimique des biomasses.

D'une façon générale, les compositions chimiques des plantes varient en fonction des espèces (Archimede *et al.*, 2011; Archimede *et al.*, 2018). De même, les conditions agro-pédo-climatiques ont une influence sur les constituants des biomasses végétales, mais de façon différenciée en fonction de la nature des composés. Les teneurs en glucides pariétaux, en lignine et en matières azotées sont généralement peu sensibles aux conditions de sol et de climat, quand celles-ci ne sont pas extrêmes (Minson, 1990). La composition minérale des plantes est influencée par les caractéristiques du sol (Minson, 1990). Les métabolites secondaires des plantes sont souvent des molécules qui les protègent contre les pathogènes et les stress environnementaux et dont la concentration va donc naturellement être sensible aux conditions agro-pédo-climatiques. Ainsi, concernant les TC, un sol faiblement fertile ou acide peut entraîner une augmentation de la concentration comme observé par Kelman and Tanner (1990) pour le Lotus. La concentration en TC est également dépendante du taux d'humidité et de la température (Lees *et al.*, 1994; Frutos *et al.*, 2002). Enfin, les teneurs en tannins condensés dépendent de l'espèce (Mueller-Harvey, 1999), du stade de croissance de la plante (Muir *et al.*, 2014), et de l'organe considérés.

2.2. Effet de la granulation sur les teneurs en protéines et tannins condensés

La granulation est précédée de deux opérations: une opération de séchage et une opération de broyage. Lors de ces étapes, les biomasses sont soumises à une augmentation de leur température. Le séchage a un effet significatif sur la composition chimique des fourrages, mais l'effet varie en fonction de la température, de la durée et de la nature du produit séché

(Deinum and Maassen, 1994). Le séchage à basse température est plus long, ce qui occasionne des pertes de constituants chimiques à cause de la respiration du végétal. Un séchage rapide à haute température (supérieure à 70°C) provoque une dénaturation des protéines sous forme de produits de la réaction de Maillard. Ces derniers sont des complexes protéines glucides indigestibles. Dans certains cas, le séchage occasionne une dénaturation des protéines mais elles demeurent digestibles (Deinum and Maassen, 1994).

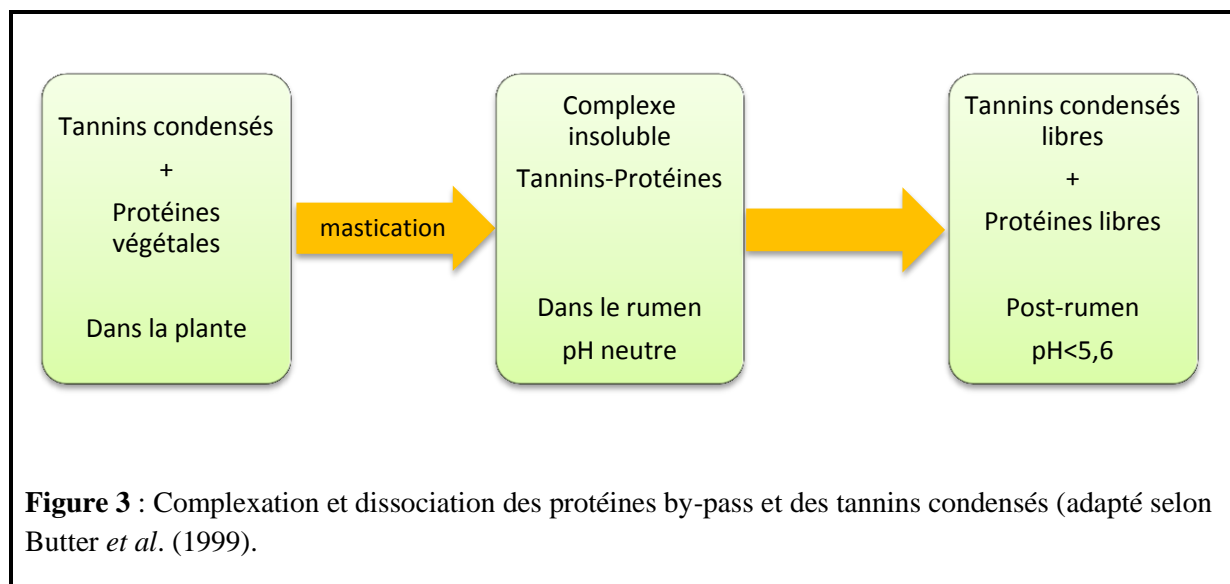
Les tannins condensés sont également sensibles à la température. Des effets dépressifs de la température ont été trouvés pour des températures supérieures à 55°C et pour des durées de séchage de 48 h (Dzowela *et al.*, 1995; Hove *et al.*, 2003). Certains auteurs ont également spécifié que l'effet de la température pourrait varier en fonction de la plante (Muetzel and Becker, 2006). L'étape de séchage est donc une étape critique pour la conservation des propriétés de ces ressources.

2.3. Evaluation de la valeur nutritionnelle et alimentaire des granulés

La valeur alimentaire d'un aliment traduit sa capacité à être ingéré, digéré et converti en produits (viande, lait...) par les animaux d'élevage. Cette capacité se traduit par des flux de nutriments (énergie, protéines et autres matériaux) mobilisables pour les fonctions d'entretien, de production, de reproduction, de résistance aux maladies....

Le flux de nutriments protéiques (acides aminés absorbés au niveau de l'intestin) a deux origines. Une fraction des protéines alimentaires non fermentées dans le rumen est partiellement digérée dans l'intestin. L'autre fraction est constituée par des protéines d'origine microbienne synthétisées dans le rumen à partir de squelettes carbonés et d'azote non protéique (dégradation des protéines alimentaires et recyclage de l'azote uréique dans le rumen). Une première estimation du flux de nutriments protéiques peut être obtenue à partir de la dégradabilité théorique de la fraction azotée qui, dans le cas particulier de certaines biomasses, dépend des caractéristiques du complexe protéines, tannins et fibres.

En effet, dans les biomasses, une fraction des TC et des fibres est souvent liée aux protéines et conditionne l'accessibilité de ces dernières aux enzymes protéolytiques ruminales (d'origine microbienne) et intestinales, ce qui rend certains aliments résistants à la digestion. Pour que les protéines soient accessibles, les fibres doivent être fermentées par les microbes du rumen (Lindberg, 1985; Nocek, 1985).



Une partie des TC libres va former, lors de la mastication, des complexes insolubles avec les protéines et va les protéger de la digestion dans le rumen. Cette fraction de protéines est appelée protéines by-pass. Après le rumen, il y a une dissociation du complexe tannins/protéines du fait des modifications de pH dans l'abomasum et dans l'intestin (figure 3), les protéines by pass sont alors accessibles à la digestion intestinale. Cependant, la solubilité des TC peut être faible, ce qui rend ainsi les protéines peu accessibles à la digestion enzymatique (Patra and Saxena, 2011; Piluzza *et al.*, 2014).

Le broyage contribue à augmenter la surface spécifique des particules alimentaires et les rend plus accessibles à l'activité enzymatique dans le rumen. Cependant, cette diminution de taille des particules accélère leur transit, ce qui diminue la durée d'hydrolyse enzymatique.

La valeur alimentaire des ressources choisies pour cette expérimentation, doit aussi être approchée en tant que complément à des fourrages de base à faible valeur nutritive dans des rations mixtes. En effet, la supplémentation des fourrages de base avec des feuillages fibreux riches en protéines peut être utilisée, en substitution aux concentrés classiques à base de céréales et de pois, pour améliorer la valeur nutritive de la ration consommée par les ruminants (Patra, 2010a, b). Cela présuppose que ces feuillages puissent être dégradés dans le rumen.

2.4. Evaluation de la valeur anthelminthique des granulés

Le cycle parasitaire des strongles gastro-intestinaux est présenté en figure 4. Il comprend une phase extra-hôte dans les pâturages, où les œufs se trouvant dans les fèces des animaux contaminés se développent en passant par plusieurs stades: L1 puis L2 jusqu'au stade L3 qui est la forme infestante. Cette larve L3 est engainée et sera ingérée par les animaux. Elle

commencera la phase de vie parasitaire en sortant de la gaine et en migrant vers les organes cibles. Les formes immatures L4 et L5 apparaîtront puis les larves adultes qui, après maturité sexuelle, s'accoupleront pour commencer la ponte. Les œufs seront excrétés dans les fèces entre 14 et 21 jours après ingestion des larves L3.

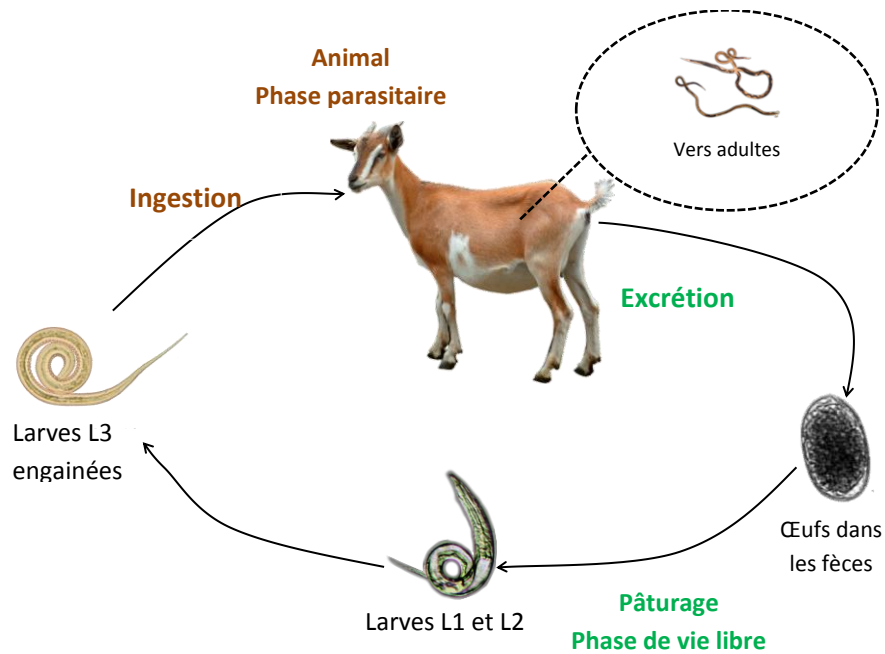


Figure 4. Cycle biologique général des strongles gastro-intestinaux

Haemonchus contortus est un hématoophage de la caillette (figure 5) des petits ruminants (ovins et caprins) dès le stade L4. Il entraîne une dégradation de l'état général des animaux, des troubles digestifs avec diarrhée et perte de poids, altération des capacités de reproduction (Poppi *et al.*, 1990), mais également une mortalité par anémie, notamment chez les agneaux au pâturage.



Figure 5: Caillette d'un caprin infecté par *Haemonchus contortus*
© INRA/ Madly Moutoussamy

L'activité anthelminthique des plantes riches en TC s'effectue à trois stades du cycle parasitaire : (i) une diminution de l'établissement des larves L3 dans l'hôte, (ii) une diminution du nombre de vers adultes et de la fertilité des femelles, (iii) une inhibition du développement des œufs en larves L3.

Ces effets permettent à la fois i) de diminuer l'infestation intra-hôte et ii) de diminuer la contamination de l'environnement et ainsi de réduire les risques d'infection des animaux. Dans un alicament, la combinaison de ces effets permet de limiter les conséquences de l'infection à des niveaux compatibles avec une productivité acceptable (Hoste *et al.*, 2015).

Ces différentes activités seraient dues à la diversité de structure des tannins et à leur concentration dans les plantes. Concernant la structure, quatre paramètres doivent être considérés (Naumann *et al.*, 2014; Williams *et al.*, 2014 ; Mueller-Harvey *et al.*, 2019):

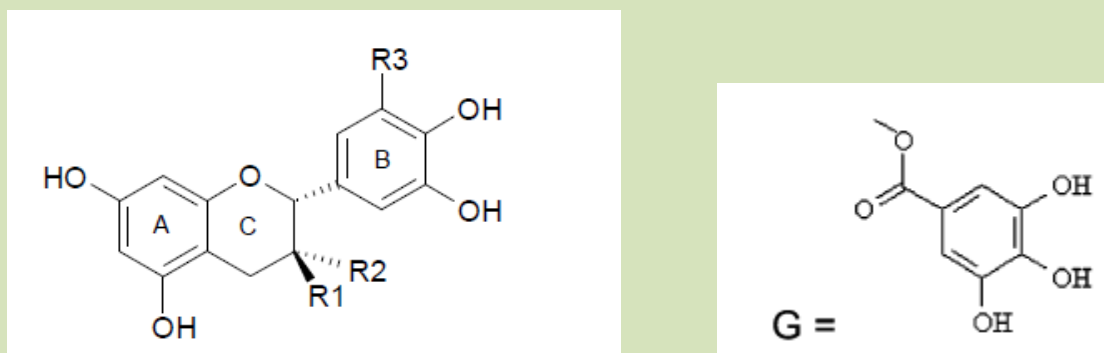
- le type de sous unité flavan-3-ols, donnant naissance aux deux classes principales de TC, à avoir les Procyanidines et les Prodelphinidines (encadré 7)
- la taille des tannins matérialisée par leur degré moyen de polymérisation
- la stéréochimie du cycle C du noyau flavan-3-ol
- la présence de groupes galloylés

Il a également été montré une activité anthelminthique des monomères de flavan-3-ols (figure 6), aussi bien contre le développement larvaire (Molan *et al.*, 2003) que contre le dégainement larvaire (Brunet and Hoste, 2006). Certains auteurs ont mentionné l'existence de synergie entre ces derniers et les tannins condensés dans l'inhibition du dégainement de HC *in vitro* (Klongsiriwet *et al.*, 2015).

Les divers modes d'action des tannins en fonction de leur nature nous ont conduits à étudier l'intérêt des mélanges de plantes qui pourraient avoir un effet synergique. De plus, l'association de modes d'action différents compliquerait l'apparition de résistance chez les parasites.

Encadré 7. Procyanidines et Prodelphinidines : relations entre structure et activité

Les tannins condensés, regroupés sous le nom de Proanthocyanidines sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols et peuvent être classés en différents types en fonction de la nature des monomères qui les constituent. On distingue deux grands types de tannins condensés: les procyanidines et les prodelphinidines qui sont différenciés par la présence d'un hydroxyle supplémentaire sur le cycle B du noyau flavan-3-ol. Cet hydroxyle supplémentaire formerait davantage de liaisons hydrogènes avec les protéines de la larve et améliorerait les propriétés anthelminthiques (Brunet and Hoste, 2006; Williams *et al.*, 2014; Quijada *et al.*, 2015). La présence d'un ou plusieurs acides galliques estérifiés sur R1 ou R2 modifie également les propriétés biologiques des TC (Schofield *et al.*, 2001).



Structure de base des monomères de flavan-3-ols

Acide gallique

	R1	R2	R3	PC ou PD
Catéchine	OH	H	H	PC
Epicatéchine	H	OH	H	PC
Gallocatéchine	OH	H	OH	PD
Epigallocatéchine	H	OH	OH	PD
Gallate de Catéchine	G	H	H	PC
Gallate d'épicatéchine	H	G	H	PC
Gallate de gallocatéchine	G	H	OH	PD
Gallate d'epigallocatéchine	H	G	OH	PD

Figure 6. Structure chimique des monomères de tannins condensés : flavan-3-ols et gallates de flavan-3-ols (Brunet and Hoste, 2006)

Afin d'évaluer la stratégie de valorisation identifiée, nous avons conduit des expérimentations (figure 7) afin de répondre à cinq questions:

- 1) Les conditions agro-pédo-climatiques et l'espèce végétale influencent-elles la composition des biomasses expérimentales?
- 2) Quel est l'effet de l'itinéraire de granulation choisi sur la teneur en protéines et en TC des biomasses expérimentales?
- 3) Quelle est la valeur nutritionnelle et alimentaire des granulés?
- 4) Quelle est la valeur anthelminthique des granulés?
- 5) Quel est le compromis entre valeur alimentaire et propriétés anthelminthiques pour les alicaments ?

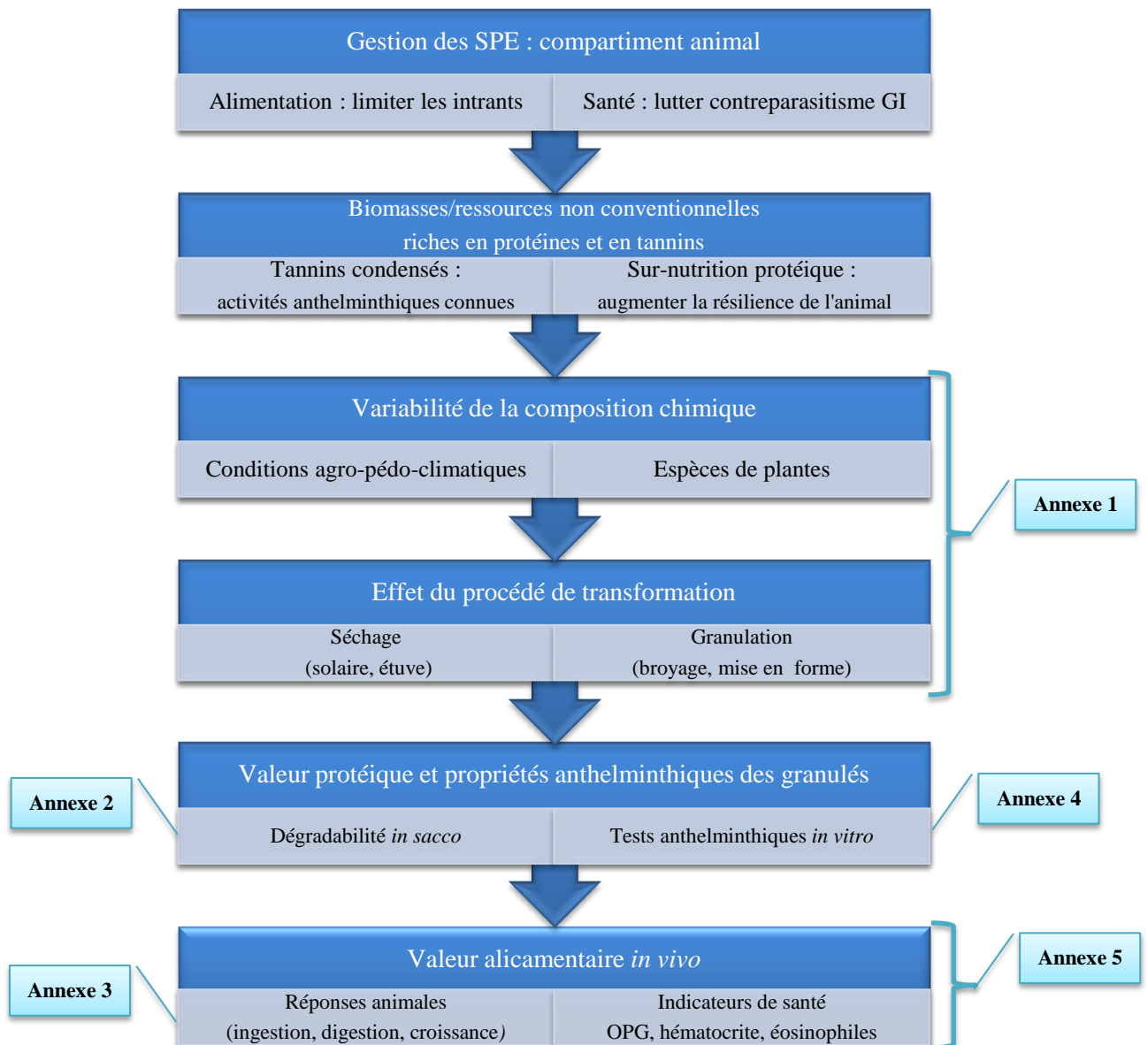


Figure 7. Évaluation de la stratégie de fabrication d’aliments anthelminthiques à partir de biomasses riches en protéines et tannins condensés

3. Expérimentations et résultats obtenus

Les biomasses nécessaires aux expérimentations ont été récoltées en plusieurs fois. Trois lots de biomasses ont été utilisés : le premier lot pour les expérimentations présentées dans les annexes 1, 2 et 4, le deuxième lot pour l'annexe 3 et le dernier lot pour l'annexe 5.

3.1. Influence des conditions agro-pédo-climatiques et de l'espèce végétale sur la composition des biomasses (annexe 1).

Les conditions agro-pédo-climatiques ont-elles une influence sur la composition chimique des biomasses choisies ? Cette influence dépend-elle de l'espèce de plante considérée ?

Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé une expérimentation sur nos biomasses modèles en considérant deux zones agro-pédo-climatiques représentatives de contextes humide et sec (annexe 1).

Quatre types distincts de plantes ont été retenus, le pois d'Angole et le leucène et deux variétés de manioc: le manioc amer et le kamannyòk, ce dernier ayant une teneur en acide cyanhydrique dans les feuilles et tubercules plus faible que le manioc amer. Les organes qui nous intéressent sont les jeunes rameaux car ils seront utilisés pour la fabrication des granulés.

Les deux zones agro-pédo-climatiques, la Grande-Terre et la Basse-Terre, sont différenciées par les facteurs climat et sol. La Grande-Terre est caractérisée par un vertisol (figure 8) et un climat tropical humide avec une longue saison sèche (3 à 5 mois), une humidité de 83 % et une moyenne de température autour de 25°C. La Basse-Terre est caractérisée par un sol ferrallitique (figure 9) et un climat tropical humide avec une courte saison sèche (moins de deux mois), 88 % d'humidité et une température moyenne de 25°C.

Pour chaque zone, les échantillons ont été récoltés sur trois sites différents, entre le milieu et la fin de la saison sèche. Le choix de trois sites par zone permet de mesurer la variabilité liée à l'exploitation agricole. Trois prélèvements ont été effectués sur chacun des sites.



Figure 8. Vertisol en Grande-Terre
Crédit : Y.M. Cabidoche



Figure 9. Ferralsol en Basse-Terre
Crédit : J.Sierra

Ces échantillons ont ensuite été lyophilisés avant analyse de leur composition chimique.

Les analyses réalisées et les méthodes utilisées sont citées ci-dessous :

- La teneur en matière sèche (chauffage à 60 °C jusqu'à poids constant)
- La teneur en matière organique (AOAC, 1990)
- La teneur en azote (AOAC, 1990)
- La teneur en matières azotées totales (MAT) a été estimée avec la formule: $N \times 6,25$
- La teneur en fibres (NDF, ADF, ADL) a été mesurée selon la méthode décrite par Van Soest (1991)
- La teneur en tannins condensés par la méthode vanilline - H₂SO₄ décrite par Laurent (1975).

La composition des feuillages obtenue sur les échantillons lyophilisés est présentée dans le tableau 1 (moyennes ajustées).

Tableau 1. Composition chimique de feuillage de *Manihot esculenta*, *Leucaena leucocephala* et *Cajanus cajan* récoltés sur deux zones agro-pédo-climatiques en Guadeloupe.

Composés	Espèces de plantes				Erreur type	p-value	
	<i>Manihot esculenta</i> sp.1	<i>Manihot esculenta</i> sp.2	<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>Cajanus cajan</i>		Zones Agro-pédo-climatiques ¹	Zone × species
MO (g/kg MS)	894 ^a	904 ^b	910 ^{bc}	922 ^c	0.92	0.4991	0.0001
NDF (g/kg MS)	445 ^a	422 ^{ab}	378 ^b	511 ^c	2.51	0.4597	0.1157
ADF (g/kg MS)	247 ^a	263 ^b	189 ^c	356 ^d	1.21	0.4043	0.0001
ADL (g/kg MS)	109 ^a	116 ^a	91 ^c	189 ^d	0.73	0.4335	0.0003
MAT (g/kg MS)	189 ^a	189 ^a	262 ^b	217 ^c	1.33	0.4337	0.0001
Cendres (g/kg MS)	106 ^a	96 ^b	90 ^{bc}	78 ^c	0.92	0.4991	0.0001
TC (g/kg MS)	73 ^a	60 ^b	157 ^c	170 ^c	1.08	0.9546	0.0001

Manihot esculenta var. 1 : Manioc variété 1 avec une faible teneur en acide cyanhydrique.

Manihot. esculenta var. 2 : Manioc variété 2 avec une forte teneur en acide cyanhydrique.

¹) Vertisol et longue saison sèche vs. ferralsol et courte saison sèche

MO: matières organiques; NDF: neutral detergent fibre; ADF: acid detergent fibre; ADL: acid detergent lignin; MAT : matière azotée totale ; TC : tannins condensés, MS: matières sèches

^{a-d} ; Les valeurs présentant une lettre différente pour un même composant sont significativement différentes ($p < 0.05$).

La composition chimique des plantes confirme leur potentiel alimentaire en tant que ressources riches en MAT et en TC. Les teneurs exprimées en pourcentage de matière sèche varient de 18,9 % à 26,2 % pour les MAT et de 6,6 % à 15 % pour les TC. Le pois d'Angole est le plus riche en composés pariétaux et le leucène plus riche en matières azotées totales.

Les conditions agro-pédo-climatiques observées sur les deux zones d'étude n'ont pas d'influence significative sur la composition en métabolites primaires (parois et protéines) et secondaires (TC). Ce résultat était attendu car les conditions ne sont différenciées que pour les précipitations et le sol. Un effet significatif est cependant observé selon l'espèce de la plante. Concernant les TC, les sols de la Basse-Terre sont plus acides que les sols de la Grande-Terre, mais la Grande-Terre connaît des saisons sèches plus longues. Il se pourrait donc que les effets négatifs des sols acides en Basse Terre soient compensés par l'absence ou la faiblesse du stress hydrique.

Les résultats obtenus montrent que la composition chimique des biomasses choisies dépend de l'espèce de la plante et non pas de la zone agro-pédo-climatique où est effectuée la cueillette. Aussi, nous pouvons avoir des pratiques non sélectives de récolte qui aboutiront à un produit de composition compatible avec nos objectifs.

3.2. Évaluation de l'impact de l'itinéraire de granulation sur la composition des biomasses (annexe 1)

La technologie de granulation a été définie en fonction de critères d'efficacité et de simplicité. Nous souhaitons en effet que ce soit une technologie appropriable par le fermier afin qu'il puisse fabriquer les granulés à la ferme. Les choix technologiques à cette échelle sont limités, nous avons privilégié une technologie rustique. Nous avons évalué l'impact de la granulation sur les deux familles de molécules qui nous intéressent: les protéines et les TC (annexe 1).

Afin d'évaluer l'effet de la température sur les ressources, nous avons comparé deux méthodes de séchage: (i) un séchage solaire sous abri à la température de 25°C à 35°C dit «naturel», (ii) un séchage artificiel en étuve ventilée à 45 °C. Le témoin étant la plante séchée par lyophilisation. L'intérêt d'un séchage artificiel à plus forte température est de voir s'il permettrait de gagner du temps sans trop de risque sur la composition en TC. Les résultats de cet essai sont présentés dans le tableau 2.

Les résultats montrent que les séchages solaire et artificiel entraînent une perte de TC quand les valeurs sont comparées à celles obtenues pour les plantes lyophilisées.

Le taux de destruction pour les deux variétés de manioc, est supérieur à 40 % pour les deux modalités de séchage. Pour le leucène et le pois d'Angole, ce taux de destruction est de 12% pour le séchage solaire alors qu'il est de plus de 60 % pour le séchage artificiel. Les TC du manioc semblent donc être plus sensibles à la température que les TC du leucène et du pois d'Angole. Mais globalement, pour les trois ressources, le séchage artificiel entraîne une perte trop importante de TC, ce qui nous a conduits à éliminer cette modalité de conservation.

Tableau 2. Effet de la technologie de séchage sur la teneur en tannins condensés des feuilles de *Manihot esculenta*, *Leucaena leucocephala* et *Cajanus cajan*.

Espèces de plantes	Teneur en TC (g/kg MS)			Erreur type
	Lyophilisation	Séchage solaire	Séchage en étuve	
<i>Manihot esculenta</i> var.1	68,3 ^a	40,8 ^b	37,5 ^b	0,871
<i>Manihot esculenta</i> var.2	64,6 ^a	26,4 ^b	33,8 ^b	0,858
<i>Leucaena leucocephala</i>	154,8 ^a	135,6 ^b	58,7 ^c	0,831
<i>Cajanus cajan</i>	172,9 ^a	152,8 ^b	51,4 ^c	0,926

MS: matière sèche ;

Manihot esculenta var. 1 : Manioc variété 1 avec une faible teneur en acide cyanhydrique.

Manihot. esculenta var. 2 : Manioc variété 2 avec une forte teneur en acide cyanhydrique.

^{a-d} : Les valeurs présentant une lettre différente pour un même composant sont significativement différentes ($p < 0.05$).

Nous avons ensuite étudié l'impact de la granulation sur la teneur en MAT et en TC. Nous avons choisi de réaliser une granulation sans additif dans un GR 150 E de la firme Oliotechnology. Avant la granulation, le broyage des feuilles séchées a été réalisé sur un tamis de 2 mm. Le produit broyé doit contenir entre 10 et 15 % d'eau pour permettre une bonne granulation. Des mesures de température montrent que cette dernière atteint 70°C lors de l'opération de granulation. Des dosages de tannins ont été effectués sur des granulés obtenus à partir de feuilles lyophilisées et de feuilles séchées au soleil. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.

Les résultats montrent que la granulation n'affecte que très peu les tannins condensés (diminution de l'ordre de 9 % en moyenne). En effet, même si la température atteinte dans l'appareil est élevée, le temps de séjour des particules n'est pas suffisant pour endommager les tannins condensés. Le granulateur a une capacité de 500 kg/ heure, on estime que lors de la fabrication, une particule de plante séchée reste dans le granulateur moins d'une minute. Les résultats sur les granulés obtenus après séchage solaire confirment bien que c'est l'étape de séchage qui est critique pour la teneur en TC. La diminution de la concentration est de 30 % en moyenne. Le couple temps et température de séchage est donc un facteur important à contrôler si on souhaite conserver une teneur en TC compatible avec nos objectifs. Concernant la teneur en MAT, autre critère important de la valeur alimentaire, le séchage et la granulation n'ont pas eu d'effets sur les concentrations mesurées.

Le séchage solaire permet bien de conserver des teneurs en TC et MAT intéressantes en vue d'une stratégie alicamentaire. Les résultats obtenus nous permettent de valider les procédés de

récolte et de granulation retenus. Il convient donc maintenant d'évaluer les propriétés alicamentaires des granulés.

Tableau 3. Effet du procédé de granulation sur les teneurs en azote et en tannins condensés dans les feuilles de *Manihot esculenta* sp., *Leucaena leucocephala* et *Cajanus cajan*.

Espèces	Traitement			Erreur type
	Lyophilisation	Lyophilisation puis granulation	Séchage solaire puis granulation	
MAT (g/kg MS)				
<i>Manihot esculenta</i> var.1	196,2	185,5	187,2	1,019
<i>Manihot esculenta</i> var.2	194,8	176,2	187,2	0,974
<i>Leucaena leucocephala</i>	268,4	275,5	270,9	1,019
<i>Cajanus cajan</i>	228,2	221,5	225,5	1,096
TC (g/kg MS)				
<i>Manihot esculenta</i> var.1	66,3	59,9	57,5	0,7381
<i>Manihot esculenta</i> var.2	93,1 ^a	79,7 ^a	19,2 ^b	0,705
<i>Leucaena leucocephala</i>	138,8	156,9	137,9	0,7381
<i>Cajanus cajan</i>	172,4 ^a	148,8 ^b	129,1 ^b	0,7934

MS: Matières sèches

Manihot esculenta var. 1 : Manioc variété 1 avec une faible teneur en acide cyanhydrique.

Manihot. esculenta var. 2 : Manioc variété 2 avec une forte teneur en acide cyanhydrique.

^{a-d} : Les valeurs présentant une lettre différente pour un même composant sont significativement différentes ($p < 0.05$).

3.3. Évaluation de la valeur nutritionnelle et alimentaire des granulés fabriqués à partir des biomasses expérimentales (annexes 2 et 3)

Nous avons évalué la valeur nutritionnelle et alimentaire en réalisant deux études.

Dans la première étude, nous nous sommes intéressés à la dégradabilité des protéines contenues dans les trois ressources modèles. Cette dégradabilité est un critère important pour mesurer la valeur protéique de la ressource (annexe 2).

La deuxième étude a mis en évidence la réponse globale de l'animal (ingestion, digestion, croissance) afin d'évaluer la valeur alimentaire de la ressource consommée. Nous avons retenu, le manioc pour cette étude car c'était la matière première dont la dégradabilité était la plus élevée (annexe 3).

Dégradabilité théorique des protéines des ressources après granulation (annexe 2)

Nous avons évalué la dégradabilité théorique des ressources en utilisant la méthode de dégradabilité in sacco décrite par Ørskov (Ørskov and Mac Donald, 1979). Elle consiste à piéger des aliments dans des sachets en nylon et à les mettre à incuber dans le rumen

d'animaux porteurs de canules. La dégradabilité est mesurée par la disparition de l'aliment dans le sachet.

Deux essais ont été conduits pour évaluer l'impact de la granulation sur dégradabilité théorique des protéines des feuilles de *Cajanus cajan*, *Manihot esculenta* et *Leucaena leucocephala*. Le premier essai avait pour objectif de déterminer la composition d'un régime alimentaire de base nécessaire à l'évaluation de la dégradabilité dans le rumen des fourrages fibreux riches en protéines. En effet, l'activité microbienne dans le rumen varie en fonction de l'alimentation des animaux. Cette dernière oriente le profil de la population microbienne (proportion de bactéries cellulolytiques, amylolytiques, protéolytiques...). Cet essai a donc été mené pour déterminer quel régime alimentaire permettrait de maximiser la digestion des protéines. Le deuxième essai a permis d'étudier la dégradation des trois biomasses chez les moutons nourris avec le régime de base sélectionné à partir des données de l'essai 1.

Lors du premier essai, nous avons étudié 4 rations avec une teneur en protéines qui suivait un gradient croissant : A) 1 500 g de foin *Digitaria decumbens* de 21 jours de repousse + 0 g de granulés de luzerne ; B) 1 300 g de foin *Digitaria decumbens* de 21 jours de repousse + 200 g de granulés luzerne ; C) 900 g de foin *Digitaria decumbens* de 21 jours de repousse + 600 g de granulés luzerne ; D) 700 g de foin *Digitaria decumbens* de 21 jours de repousse + 800 g granulés luzerne. La luzerne, plutôt qu'un tourteau ou un pois, a été choisie comme source d'apport de protéines car sa composition est plus proche de celle de nos aliments expérimentaux. Le *Glyricidia sepium* a été retenu comme aliment expérimental - mis à incuber dans les sachets - car il contient des tannins comme les biomasses choisies.

Les résultats ont montré que le régime alimentaire de base a une influence sur les niveaux de dégradation de la matière sèche, des fibres (NDF) et des matières azotées totales. La dégradabilité des protéines a augmenté de façon curvilinéaire avec l'augmentation des quantités de luzerne dans la ration. Un optimum à environ 200 g de luzerne dans la ration est obtenu, ce qui correspond à environ 130 g de MAT/kg de matière sèche dans la ration de base. Ce régime de base a donc été sélectionné pour conduire le deuxième essai.

Ce deuxième essai avait pour objectif d'évaluer la dégradabilité des biomasses dans le rumen dans des conditions optimales pour la dégradation des protéines. Les feuilles de manioc, de leucène et de pois d'Angole ont été récoltées sur des arbustes de 12, 6 et 8 mois respectivement. Ces biomasses ont été étudiées sous forme de feuillages verts (feuilles lyophilisées) et sous forme de granulés. Les résultats obtenus ont montré qu'il y avait une différence significative dans les cinétiques de dégradation des différentes composantes en fonction du feuillage considéré et de sa forme de présentation (vert ou granulés). Les valeurs

moyennes de dégradabilité théorique des matières azotées en vert vs. granulé du leucène, manioc et du pois d'Angole ont été 44,0 vs. 64,5; 72,8 vs. 65,0 et 49,1 vs. 48,0 %.

L'effet variable de la granulation pourrait être lié à un biais méthodologique. En effet, la taille des particules des échantillons verts introduits dans les sachets a été en moyenne plus grossière pour le leucène, ce qui pourrait expliquer une faible dégradabilité.

L'absence d'effet de la granulation sur le pois peut s'expliquer par les liaisons protéines-fibres plus fortes en raison d'une plus grande concentration en fibres (tableau 1). De même, les teneurs plus élevées en tannins et, éventuellement leur nature, peuvent entraîner avec les fibres, la formation de barrières suffisamment solides pour contrecarrer l'effet positif de l'augmentation de la surface spécifique des particules pour l'activité enzymatique. Nous n'avons pas d'explication pour la diminution de la dégradabilité effective des protéines avec le manioc en granulés, d'autant plus que ce résultat semble contradictoire avec celui enregistré pour la matière sèche.

Globalement, les résultats montrent qu'il existe une grande variabilité dans la dégradabilité effective des protéines à partir des biomasses expérimentales. La granulation est neutre ou a un effet favorable sur cette valeur protéique. Ces valeurs de dégradabilité permettent de considérer le manioc et le leucène comme de bonnes ressources protéiques alors que le pois d'Angole a une valeur moyenne voire faible.

Nous avons complété cette approche de dégradabilité ruminale par des bilans globaux de digestion sur l'animal. Dans un premier temps, nous avons choisi le manioc qui avait la valeur de dégradabilité la plus élevée, puis nous avons élargi cette approche aux autres ressources dans le cadre de l'étude de leurs propriétés alicamentaires (§3.5.).

Valeur alimentaire du manioc (annexe 3)

Nous avons évalué l'impact de la granulation sur la valeur alimentaire d'une ration composée de feuilles de manioc. Pour ce faire, nous avons comparé différentes réponses animales (ingestion, digestion, croissance) à des rations mixtes contenant du foin de *Dichanthium spp.* associé à des feuilles de manioc fraîches, des granulés de feuilles de manioc et des granulés de luzerne. Les granulés de luzerne ont été introduits dans le dispositif expérimental comme témoin d'une ressource de bonne valeur alimentaire. La composition des ingrédients est présentée dans le tableau 4. Les quantités de granulés et de feuilles ont été fixées à 500 g/jour en équivalent matière sèche. Le foin *Dichanthium spp.* était distribué à volonté. Les feuilles fraîches de manioc et celles qui ont servi à fabriquer les granulés provenaient de la même parcelle. L'ingestion, la digestion et la rétention d'azote ont été mesurées sur quinze béliers Black Belly âgés d'un an. Ces animaux étaient placés en cages à bilan digestif afin de réaliser

les prélèvements et mesures (quantités d'aliments proposés et refusés, quantités de fèces et urines excrétées, variations de poids vifs des animaux) suivant des procédures standards décrites dans l'annexe 3. L'expérience s'est déroulée selon un plan carré latin de 3×3 permettant à tous les animaux de consommer chacune des rations pendant une durée moyenne de 4 semaines décomposée en 3 semaines d'adaptation au régime et 1 semaine de mesures.

Tableau 4. Composition chimique du foin de *Dichanthium*, des granulés de luzerne, et des feuilles et granulés de manioc

	Composition chimique (g/100gMS)						
	MS	MO	MAT	NDF	ADF	ADL	TC
Granulés de luzerne	91,0	85,2	21,5	63,4	35,2	8,9	0
Granulés de manioc	91,6	86,7	22,5	56,1	39,3	11,9	6,0
Feuilles de manioc	32,7	90,1	22,2	51,7	35,5	12,1	6,2
Foin de <i>Dichanthium</i>	87,3	89,9	7,5	74,9	39,7	7,2	0

MS : Matières sèches – MO : Matières organiques – MAT : Matières azotées totales – NDF : Neutral detergent fibre – ADF : Acid detergent fibre – ADL : Acid detergent lignin - TC : Tannins condensés

La comparaison des résultats de croissance et d'azote retenu obtenus avec les deux rations à base de manioc traduisent la réponse globale des animaux à l'alimentation (tableau 5). Elle indique que la granulation ne pénalise pas la valeur alimentaire des feuilles de manioc. La granulation permet d'augmenter la consommation de foin en lien probablement avec un moindre encombrement ruminal et une réduction du temps de consommation du granulé relativement au feuillage. Il apparaît aussi que le manioc a une valeur alimentaire plus faible que la luzerne probablement à cause d'une plus faible digestibilité des protéines. La teneur élevée du manioc en TC pénalise la digestion totale de l'azote et réduirait la disponibilité intestinale des protéines et en conséquence la croissance des animaux. Les granulés de manioc permettent une croissance moyenne, identique à celle observée avec les feuillages frais. La granulation n'entraîne pas une augmentation d'émissions d'azote via les excréments fécaux et urinaires. Au regard des performances de croissance obtenues avec le manioc qui a une composition chimique proche de celle de la luzerne, le critère de teneur en protéines ne semble pas être, à lui seul, un bon critère pour prédire la valeur alimentaire des feuillages comme supplément. La consommation des rations à base de granulés de manioc tend à être plus élevée ($P < 0,12$) que celle mesurée avec les rations à base de feuilles vertes de manioc. L'ingestion de matière sèche est plus faible ($P < 0,05$) avec le régime à base de feuilles vertes de manioc qu'avec le régime à base de granulés de luzerne.

Tableau 5. Ingestion, digestibilité, taux de renouvellement, excrétion d'azote fécal et d'azote urinaire, azote retenu et GMQ de béliers Black Belly nourris avec des rations mixtes composées de foin de *Dichanthium* mélangé à des feuilles de manioc ou des granulés de manioc ou des granulés de luzerne.

	Foin/ granulés luzerne	Foin/ Feuilles manioc	Foin/ granulés manioc	Error Type	P value
Ingestion					
Ingestion totale MS (g/LW ^{0,75})	79,5 ^a	67,6 ^b	73,7 ^{ab}	3,10	0,013
Ingestion MS foin (g/LW ^{0,75})	41,1 ^a	33,2 ^b	39,4 ^a	2,31	0,050
Ingestion MS granulé (g/LW ^{0,75})	38,2	34,4	34,3	1,68	0,109
MO (g/j)	992,6 ^a	872,0 ^b	961,1 ^a	34,36	0,054
MAT (g/j)	167,7	159,6	165,6	5,39	0,485
NDF (g/j)	795,5 ^a	600,1 ^b	734,7 ^a	26,51	0,000
ADF (g/j)	423,9 ^a	346,9 ^b	431,7 ^a	26,0	0,001
Digestibilité					
MO (%)	0,591 ^a	0,550 ^{ab}	0,539 ^b	0,0183	0,077
MAT (%)	0,674 ^a	0,520 ^b	0,539 ^b	0,0246	0,000
NDF (%)	0,657 ^a	0,569 ^b	0,611 ^c	0,0164	0,001
ADF (%)	0,592 ^a	0,471 ^b	0,544 ^c	0,0194	0,000
Taux renouvellement ADL rumen (%/h)	0,037	0,039	0,037	0,0029	0,519
Excrétion fécale N (g/j)	8,7 ^b	11,6 ^a	12,2 ^a	0,80	0,001
Excrétion urinaire N (g/j)	8,7	8,0	8,3	0,49	0,440
N retenu (g/j)	9,4 ^a	5,9 ^b	6,0 ^b	0,93	0,018
GMQ (g/j)	159,0 ^a	86,0 ^b	82,0 ^b	21,1	0,010

MS: Matières sèches – MO: Matières organiques – MAT: Matières azotées totales – NDF: Neutral detergent fibre – ADF: Acid detergent fibre – GMQ: Gain moyen quotidien

^{a, b, c}, Les valeurs présentant une lettre différente pour un même composant sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Il n'y a pas de différences significatives entre les régimes contenant les granulés. La digestion totale de la matière organique, des matières azotées totales et des parois (NDF, ADF) des régimes alimentaires à base de feuilles vertes et de granulés de manioc est significativement plus faible que dans le régime à base de granulés de luzerne. La digestion totale des MAT est similaire pour le feuillage vert et les granulés de feuilles de manioc, tandis que la digestion des fibres est plus faible avec les régimes à base de feuilles vertes de manioc. La croissance est similaire pour les animaux consommant les rations à base de manioc, mais plus faible que celle relevée avec la luzerne. En conclusion, la granulation ne diminue pas la valeur fourragère du feuillage du manioc, mais cette valeur est néanmoins inférieure à celle de la luzerne.

3.4. Évaluation de la valeur anthelminthique des granulés fabriqués à partir des biomasses expérimentales (annexe 4)

La mise au point d'un granulé avec des propriétés alicamentaires suppose que les propriétés anthelminthiques des biomasses soient préservées de façon suffisante, après leur transformation, pour avoir l'effet escompté sur les parasites. Afin d'évaluer cette activité dans les granulés, nous avons vérifié l'existence de propriétés anthelminthiques des extraits de TC provenant des granulés des trois biomasses et de leur mélange. Ces essais ont été menés *in vitro* sur deux phases de vie du parasite (intra et extra-hôte):

- Le test d'inhibition du développement larvaire (LDIA) permet de mesurer l'impact des TC sur l'inhibition du développement de la larve d'*Haemonchus contortus* du stade L1 au stade L3 (phase de vie libre).
- Le test d'inhibition du dégainement larvaire (LEIA) permet de mesurer l'efficacité des TC sur l'inhibition du dégainement de la larve d'*Haemonchus contortus*. Cette phase est indispensable au début de la vie parasitaire du nématode.

Compte-tenu des relations existant entre la structure et les activités des TC (encadré 6) nous avons caractérisé les extraits en déterminant leur profil HPLC et leur teneur en monomères de flavan-3-ols.

Mise en évidence des propriétés anthelminthiques

L'expérimentation a été menée avec des extraits acétone/eau (70/30) de TC provenant des granulés obtenus après séchage solaire des trois feuillages. Le témoin était constitué des extraits acétone/eau des feuilles après lyophilisation. Un échantillon mélange a été constitué (mélange de 1 tiers de chacun des extraits).

Nous avons souhaité travailler sur des extraits de tannins condensés pour évaluer l'activité spécifique de ce type de molécules et éviter les biais liés à la présence d'autres composés pouvant également avoir des effets anthelminthiques.

Pour le test LDIA, les larves L1 ont été soumises à des doses croissantes de TC (0, 0,1, 0,5, 1,25, 2,5 and 5 mg/ml) de chaque extrait et du mélange. Après incubation, le pourcentage de développement larvaire a été calculé avec le ratio:

$$\% \text{ développement} = \frac{\text{Nombre de L3 par puits}}{\text{Nombre total de larves par puits}}$$

Pour le test LEIA, les larves L3 engainées ont été soumises à des doses croissantes de TC (0,05, 0,25, 0,5, 1,25, 2,5 mg/ml) de chaque extrait et du mélange et ensuite soumises au processus de dégainement. Le pourcentage de dégainement larvaire est calculé de la façon suivante :

$$\% \text{ dégagement} = \frac{\text{Nombre de L3 dégainées par puits}}{\text{Nombre total de larves par puits}}$$

Les résultats des tests anthelminthiques sont présentés en figures 10 et 11 (effets dose/réponse).

Pour chacun des extraits, les concentrations efficaces médianes (EC₅₀), c'est-à-dire les concentrations pour lesquelles l'effet observé est à 50 % de son maximum ont été calculées grâce à un traitement statistique, Les résultats sont représentés en figures 12 et 13.

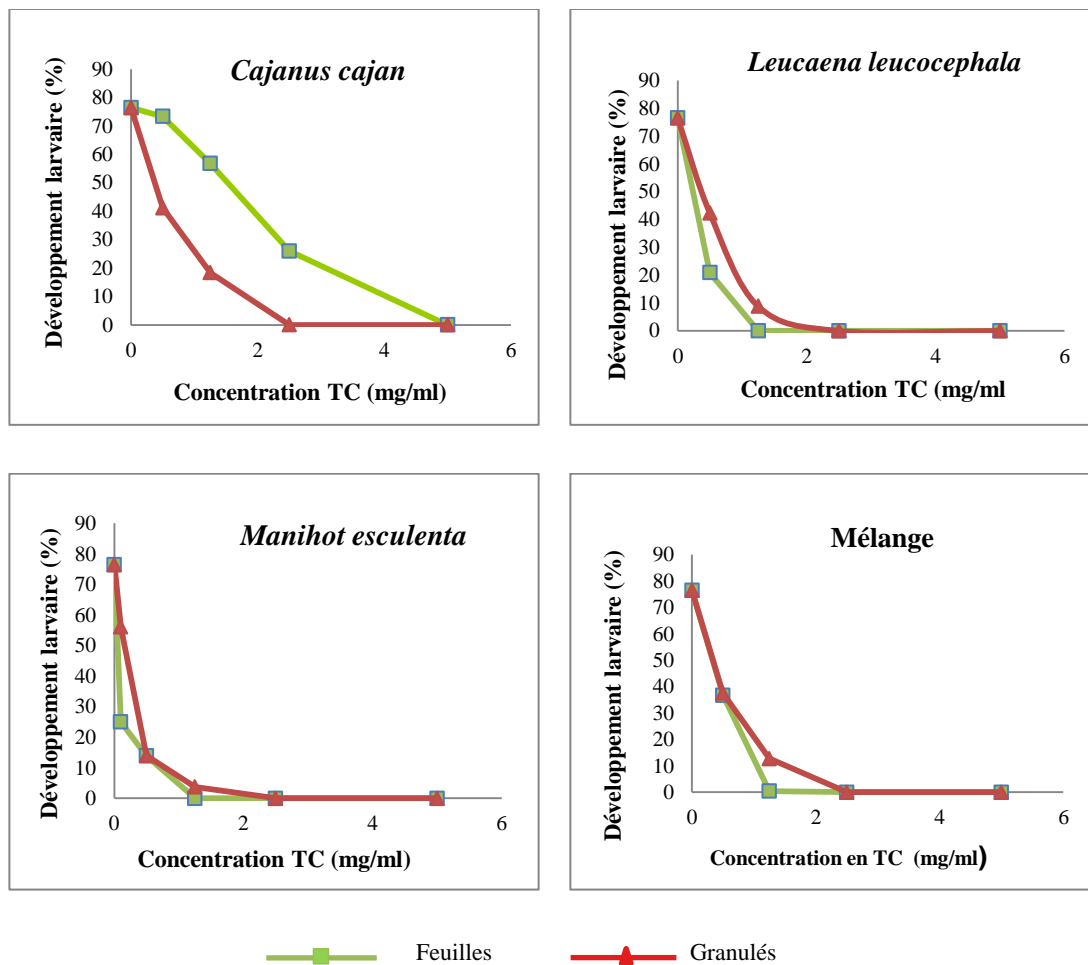


Figure 10. Pourcentage du développement larvaire de *Haemonchus contortus* en fonction de la concentration en tannins condensés (mg/ml)

L'inhibition du développement et du dégagement larvaires sont dose-dépendants (figures 10 et 11). Cependant, des différences d'activités ont tout de même été relevées. Le manioc est plus efficace pour inhiber le développement larvaire que le leucène et le pois (figures 10 et 12). En revanche, le leucène et le pois d'Angole sont plus efficaces que le manioc pour inhiber le dégagement larvaire (figures 11 et 13).

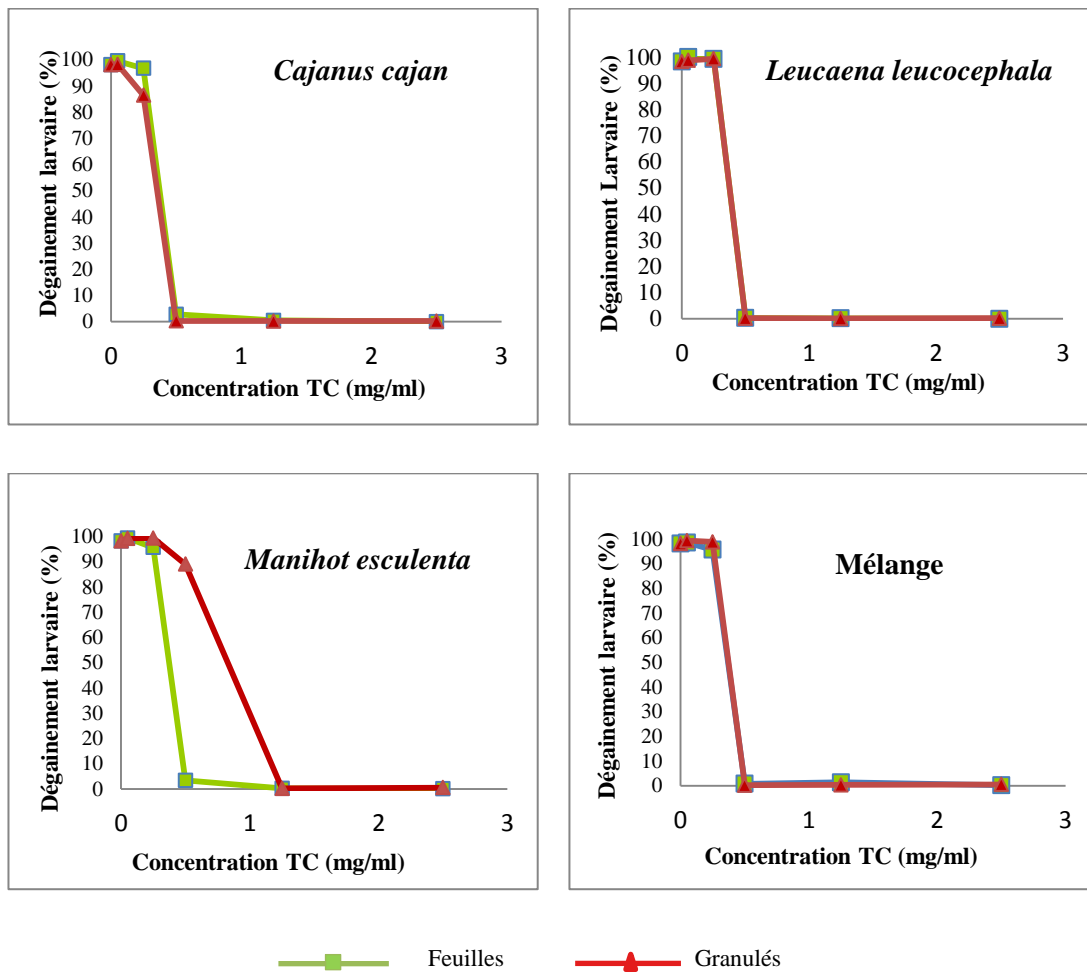


Figure 11. Pourcentage du dégainement larvaire de *Haemonchus contortus* en fonction de la concentration en tannins condensés (mg/ml)

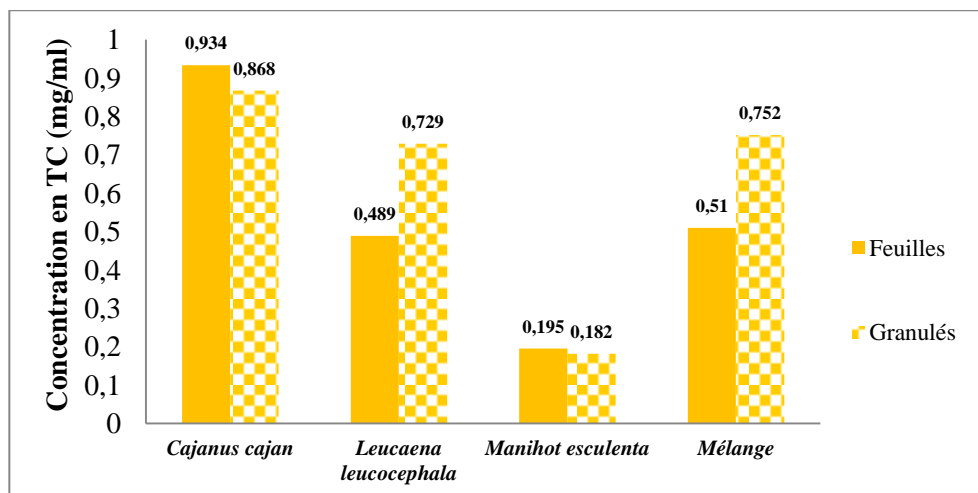


Figure 12. Concentration effective médiane des extraits de tannins condensés pour le développement larvaire de *Haemonchus contortus*

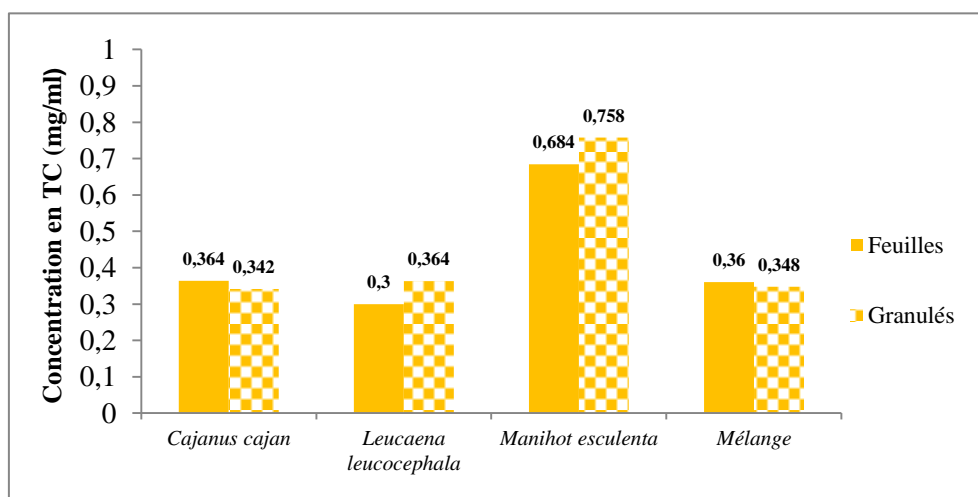


Figure 13. Concentration effective médiane des extraits de tannins condensés pour le dégagement larvaire de *Haemonchus contortus*

La comparaison des EC_{50} entre feuilles et granulés montre que la granulation diminue légèrement l'efficacité des tannins condensés (sauf pour le pois d'Angole), mais elle n'annule pas l'effet anthelminthique (figures 12 et 13).

La comparaison des EC_{50} entre les trois espèces et le mélange, dans le cas du dégagement larvaire, montre que la concentration efficace du mélange est proche de celle du leucène et du pois d'Angole, alors même que le manioc est moins efficace. Ceci permet de montrer une action synergique contre le dégagement larvaire des tannins condensés et/ou d'autres molécules présentes dans l'extrait. Ce résultat est retrouvé pour les granulés.

En revanche, nous n'avons pas mis en évidence d'effets synergiques contre le développement larvaire, car la concentration efficace médiane du mélange est la moyenne arithmétique de celles des trois espèces.

Composition des extraits – profil HPLC et teneur en flavan-3-ols,

Nous avons réalisé les profils HPLC des extraits (figure 14) et déterminé les teneurs et la nature (PC ou PD) des flavan-3-ols libres (figure 15) pour savoir si des différences de composition pourraient expliquer les différences d'activité relevées.

Les pics obtenus sur le chromatogramme ont été comparés sur la base de leur absorbance maximale (λ_{max}) et de la différence de temps de rétention (ΔRT) par rapport au standard interne (acide benzoïque). Les composés présentant le même λ_{max} et le même ΔRT ont été considérés comme potentiellement identiques.

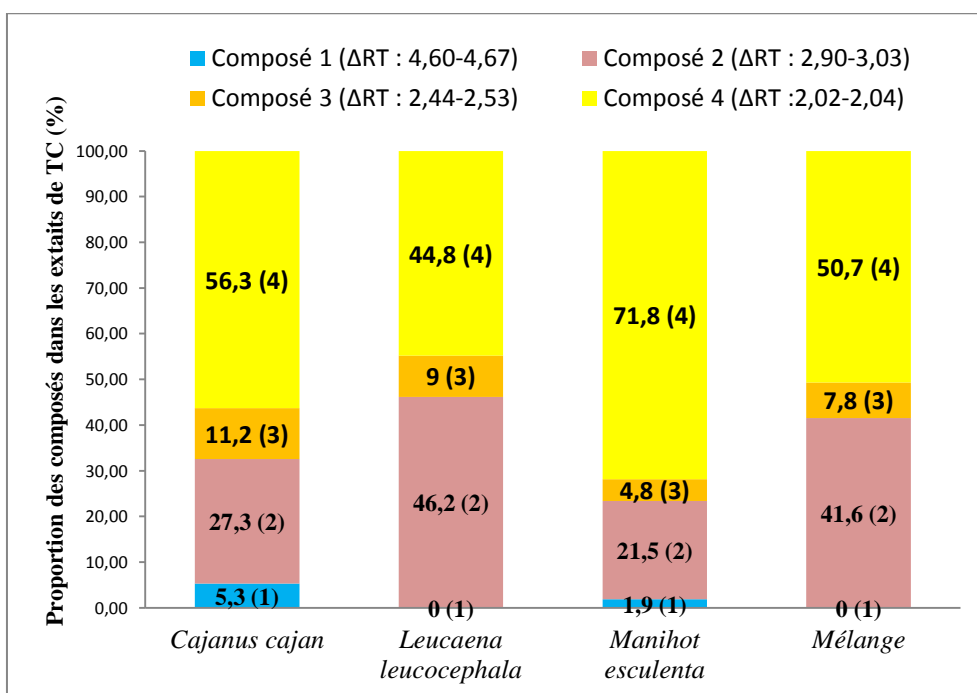


Figure 14. Composition des extraits de tannins condensés de de *C. cajan*, *L. leucocephala*, *M. esculenta* et du mélange

Le manioc a une composition différente de celle des trois autres extraits, à cause de la présence d'une plus large proportion du composé 4 (71,8% contre 50 % en moyenne). Les différences d'activité que nous avons relevées pourraient donc être expliquées par la différence de composition des TC dans les espèces de plantes choisies.

Les teneurs totales en monomères de flavan-3-ols dans les extraits ont été mesurées et l'identification en PC ou PD de ces derniers a également été réalisée. Les résultats sont présentés en figure 15. La granulation a augmenté le pourcentage en flavan-3-ols libres de tous les extraits. Les prodelphinidines sont plus abondantes chez le pois d'Angole, le leucène et le mélange. Ces deux paramètres pourraient expliquer le maintien d'une activité anthelminthique non négligeable dans les granulés malgré une diminution de la concentration en TC lié au procédé de granulation (tableau 2).

L'étude des effets anthelminthiques *in vitro* nous permet de conclure que le développement de granulés à propriétés alicamentaires va dépendre du choix des plantes qui contiennent les composés actifs, car la granulation agit peu sur les propriétés anthelminthiques. Le mélange de plantes peut avoir un intérêt à cause de l'existence d'effets synergiques. Les propriétés anthelminthiques *in vitro* des granulés étant vérifiées, l'étude suivante a permis de mesurer les réponses physiologiques de l'animal infecté après consommation de granulés.

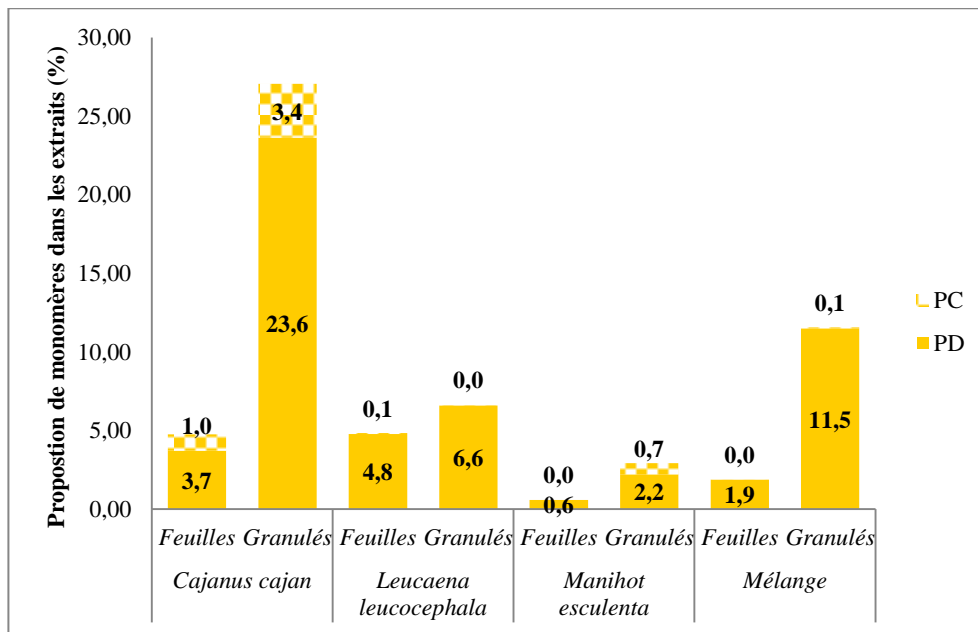


Figure 15. Proportion de monomères de Procyanidines et de Prodelphinidines dans les extraits de TC

3.5. Compromis entre valeur alimentaire et propriétés anthelminthiques pour les alicaments (annexe 5)

Nous avons évalué la valeur alimentaire et anthelminthique de feuillages riches en protéines et tannins condensés. Pour ce faire, nous avons comparé différentes réponses animales (ingestion, digestion, croissance) et indicateurs de santé (excrétion fécale d'œufs, taux d'hématocrite, nombre d'éosinophiles) de chevreaux ingérant l'une des 6 rations suivantes : du foin de *Dichanthium spp.* et 5 rations mixtes composées d'un foin *Dichanthium spp.* associé à un granulé des quatre biomasses suivantes: luzerne, leucène, manioc et pois d'Angole, ainsi qu'à un mélange de ces 3 derniers granulés. La luzerne a été introduite dans le dispositif expérimental comme témoin d'un aliment riche en protéines mais ne contenant pas de tannins. Six groupes de 7 à 10 chevreaux ont été constitués. Ils ont été conduits hors parasite pendant 6 semaines afin de mesurer les paramètres strictement liés à la réponse de l'animal à la ration proposée. Puis cinq groupes ont été infestés avec une dose orale de 10 000 larves L3 (le groupe *Dichanthium spp.* n'a pas été infecté) et ont été conduits pendant 6 semaines pour mesurer les indicateurs de santé.

La composition des ingrédients composant les rations est présentée dans le tableau 6.

Les granulés des biomasses sont différenciés par : i) leur concentration en TC (plus élevée avec le pois d'Angole et plus faible avec le manioc ; ii) leur teneur en NDF (plus élevées avec le pois d'Angole et le manioc, plus faible avec le leucène); iii) leur teneur en MAT (plus

faible avec le pois d'Angole alors que le leucène et le manioc ont des teneurs similaires). Le leucène a une composition proche de la luzerne hormis la présence des tannins condensés.

Tableau 6. Composition chimique des granulés de foin de *Dichanthium*, de luzerne, de leucène, de manioc et de pois d'Angole (exprimée en % de matière sèche)

	MAT	NDF	ADF	ADL	TC
Foin de <i>Dichanthium spp</i>	7,2	73,5	39,0	6,2	0
Granulé de luzerne	17,9	31,3	21,9	5,6	0
Granulé de leucène	21,8	28,8	18,6	10,3	12,3
Granulé de manioc	20,5	46,3	32,7	16,6	7,7
Granulé de pois d'Angole	15,9	47,4	34,1	16,6	21,3

MAT : Matières azotées totales – NDF : Neutral detergent fibre – ADF : Acid detergent fibre – ADL : Acid detergent lignin - TC : Tannins condensés

La consommation de matières sèches augmente avec l'introduction de granulés dans la ration, (tableau 7) mais l'ingestion du fourrage pauvre diminue, comme il est classiquement observé dans les rations mixtes, quand l'apport de supplément est important (Patra, 2010a, b). Il n'y a pas de différences d'ingestion de MS entre les rations à base de luzerne, de leucène et de manioc alors que l'ingestion est plus faible avec le pois d'Angole. Les différences d'ingestion des rations vont dans le même sens que celles de la digestibilité du NDF des rations, ce qui indiquerait que l'encombrement des rations a été plus élevé avec le pois d'Angole. Au regard de l'absence de différences significatives de l'excrétion urinaire d'azote, on peut faire l'hypothèse d'une absence de différences significatives dans la fermentescibilité ruminale de l'azote des différents granulés, bien que les données sur les cinétiques de dégradabilité *in sacco* de ces ressources indiquaient une plus faible solubilité des protéines du manioc (Minatchy annexe n° 2, soumis).

Les GMQ des animaux témoignent d'une bonne valeur alimentaire du leucène qui entraîne des croissances similaires à celles observées avec la luzerne. A l'opposé, le pois d'Angole aurait une valeur plus faible bien qu'il contribue à augmenter fortement la croissance enregistrée avec le foin seul. Il n'y a pas eu de différences significatives dans les indices de consommation. Quelle que soit la ration considérée, ces indices étaient moyens à bons.

Tableau 7. Ingestion, digestibilité, GMQ, indice de consommation, excrétion d'azote fécal et d'azote urinaire de chevreaux nourris avec des rations mixtes de granulés composés de *Dichanthium*, de luzerne, de manioc, de leucène, et de pois d'Angole.

	Pois d'Angole	Leucène	Manioc	Mélange	<i>Dichanthium</i> spp	Luzerne	Erreur type	P
Ingestion								
MSt ingéré (g/j)	414,2b	455,1a	447,5a	404,0b	312,4c	444,5a	14,5	0,001
MSt ingéré (g/PV ^{0.75} /j)	57,4b	62,6a	61,4a	56,3b	41,2c	62,6a	1,81	0,001
Foin ingéré (g/PV ^{0.75} /j)	32,1b	36,4a	36,4a	31,2b	41,2c	38a	1,69	0,001
MSD ingérée (g/PV ^{0.75})	31,8c	38,1a	35,5b	30,5c	27,3d	41,2a	0,90	0,001
MAT (g/j)	45,8d	60,1a	56,3b	50,3c	22,6e	50,8f	0,79	0,001
NDF (g/j)	256,7a	252,8a	279,0b	236,6ad	229,5d	253,3a	8,23	0,001
TC (g/j)	38,8d	22,6a	14,0b	24,4c	0,0e	0,0e	0,07	0,001
Digestibilité								
MS (%)	53,9b	60,4a	55,9b	53,5b	61,9a	63,6d	1,78	0,001
MAT (%)	44,8c	53,2a	48,9b	45,1b	41,6c	58,5d	1,77	0,0001
NDF (%)	60,5b	64,3a	62,9a	59,2b	71,5c	67,9d	1,52	0,0001
GMQ (g/j)	59,1a	70,7a	66,9a	60,6a	26,4b	70,3a	1,78	0,0262
Indice de consommation, kg aliment/ kg GMQ	9,8	8,1	9,0	12,1	13,2	9,0	2,23	0,3327
Excrétion N fécal (g/j) ⁽¹⁾	4,4b	3,6a	4,1b	4,4b	4,7b	3,3a	0,228	0,0001
Excrétion N urinaire (g/j) ⁽¹⁾	1,2	1,0	0,8	1,0		1,2	0,193	0,4807

PV : Poids vif - MSt : Matières sèches totales – MSD : Matières sèches digestibles – MAT : Matières azotées totales – NDF : Neutral detergent fibre – MS : Matières sèches - TC : Tannins condensés – GMQ : Gain moyen quotidien

^{a, b, c}, Les valeurs présentant une lettre différente pour un même composant sont significativement différentes ($p < 0,05$).

⁽¹⁾: les moyennes sont comparées pour une même quantité d'azote ingérée

La réduction significative du nombre d'œufs par kg de fèces (OPG) (figure 16), avec les fourrages riches en TC, confirme l'activité anthelminthique de ces molécules. Nos résultats indiquent que cette activité varie avec la ressource et qu'elle n'est pas proportionnelle à la concentration en TC. La variabilité de l'activité anthelminthique des TC en lien avec leur composition et structure est mentionnée dans la littérature (Mueller-Harvey *et al.*, 2019). Dans l'expérimentation, l'interprétation des données obtenues avec le manioc est compliquée du fait d'une très forte contamination observée dès le 14^{ème} jour sur 2 chevreaux, ce qui pourrait indiquer qu'ils n'étaient pas indemnes de parasites au début de l'expérimentation. Dans notre expérimentation, la réduction de l'excrétion d'œufs a été expliquée par une réduction de la fécondité des vers femelles installés dans la caillette dont le nombre n'a pas varié avec la ration. L'activité des TC sur la réduction de la fécondité des vers femelles en lien avec l'association des TC avec les protéines impliquées dans leur métabolisme est aussi

retrouvée dans la littérature (Mueller-Harvey *et al.*, 2019). L'hématocrite a logiquement régulièrement diminué à partir du 14^{ème} jour d'infestation du fait de l'activité hématophage d'*Haemonchus contortus*. Les granulés se sont aussi différenciés sur ce critère. La baisse d'hématocrite a été globalement plus faible avec le leucène et plus forte avec le manioc. Ces différences traduisent des capacités différentes qu'ont les animaux à compenser les pertes occasionnées par le parasite hématophage. Ces différences pourraient être liées aux quantités et profils d'acides aminés absorbés par les caprins (Houdijk *et al.*, 2005). Aucune différence significative n'a été relevée dans l'évolution post infestation de l'éosinophilie bien que les valeurs aient été en moyenne plus élevées avec les granulés contenant des TC comparativement à la luzerne.

Dans nos conditions expérimentales, avec le leucène, nous n'avons pas observé d'opposition entre la valeur anthelminthique et alimentaire, en lien avec la concentration en tannins. Les résultats obtenus avec le pois d'Angole, qui est la ressource la plus riche en TC, pourraient indiquer un effet dépressif de ces derniers sur la digestion des protéines mais en contrepartie l'activité anthelminthique est plus faible que celle observée avec le leucène. Ces résultats interpellent sur l'optimum des concentrations pour obtenir le bon compromis entre l'activité anthelminthique et la valeur nutritionnelle des aliments. La tendance générale dans la littérature est d'indiquer la valeur de 4-5 % comme teneur maximale au-delà de laquelle la valeur protéique de la ressource serait pénalisée (Mueller-Harvey, 2006). La littérature indique aussi une augmentation de l'activité anthelminthique avec la concentration de TC dans les fourrages (Cherry *et al.*, 2014). La gestion des concentrations en tannins pour optimiser la fonction alicamentaire semble plus complexe car il faut aussi considérer la composition et la structure des tannins. Il faut par ailleurs prendre en compte le taux d'incorporation du supplément dans la ration mixte. Dans une méta-analyse, Patra (2008) montre que le taux d'incorporation des suppléments permettant d'optimiser la digestion du fourrage pauvre se situe autour de 20 % alors que la valeur de 40 % est utile pour maximiser la croissance de moutons. Dans un essai visant à évaluer l'effet dose de l'apport de leucène sur l'activité anthelminthique, Marie Magdeleine *et al* (non publié) montraient qu'une incorporation de 25 % de leucène dans la ration ne permettait pas d'observer une activité anthelminthique. Cette dernière apparaissait autour de 50 % de supplément dans la ration. L'ensemble de ces résultats semblent indiquer que des taux élevés de supplément dans la ration seraient nécessaires pour maximiser les performances animales.

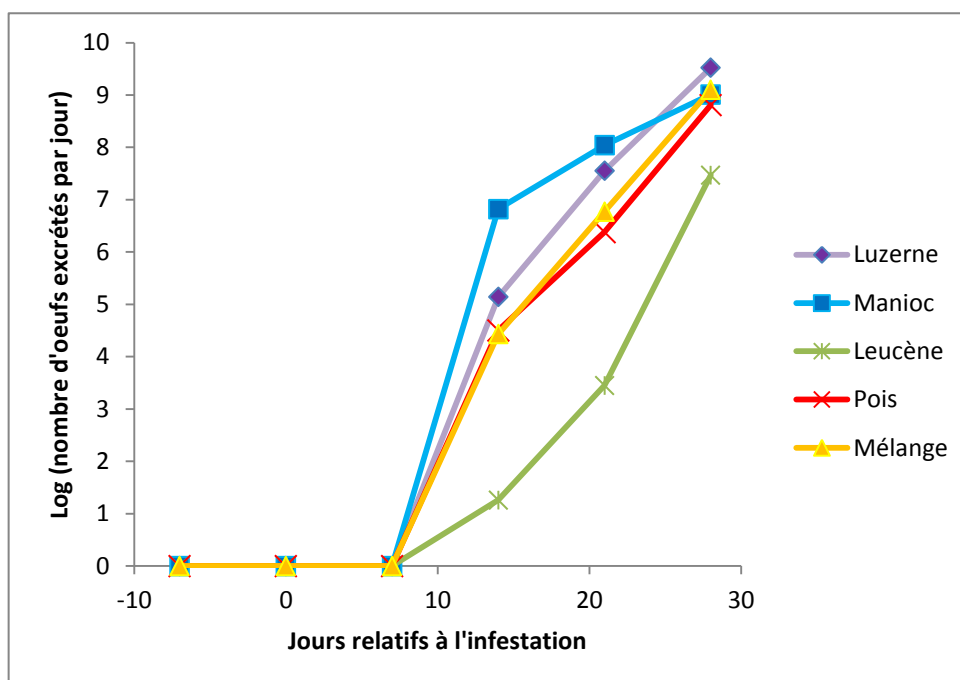


Figure 16. Excrétion d'œufs de *Haemonchus contortus* dans les fèces de chevreaux nourris avec une ration mixte de foin de *Dichanthium* et de granulés.

4. Discussion générale et perspectives

4.1. Acquis du travail et limites de la stratégie mise en œuvre.

L'objectif de cette thèse était « l'évaluation d'une stratégie de valorisation de biomasse végétale en alicaments anthelminthiques pour les petits ruminants dans les systèmes polyculture élevage ». Ce travail, qui a été abordé sous un angle strictement biotechnique, permet de conclure qu'il est possible, à l'échelle de l'exploitation agricole, de produire des granulés de bonne valeur alimentaire et anthelminthique avec des coproduits de culture. Les valeurs alimentaires et anthelminthiques s'expliquent par la composition chimique des biomasses qui restent riches en protéines et en tannins condensés après la transformation (faible impact des conditions agro-pédo-climatiques, impact modéré du séchage solaire sur les teneurs en tannins condensés et absence d'effet de la granulation sur la composition chimique). Nous n'avons pas observé d'effet synergique ou antagoniste du mélange de plantes sur les propriétés alimentaires et anthelminthiques.

Nos résultats expérimentaux sont globalement en cohérence avec la littérature. Il est connu que les caractéristiques du sol affectent principalement la teneur minérale des plantes. L'élévation des températures entraîne une faible augmentation de la teneur en fibres, une réduction des glucides solubles. La teneur en TC peut augmenter avec les températures et le stress hydrique, mais dans le contexte guadeloupéen, les températures varient peu et les

biomasses expérimentales choisies sont des plantes adaptées au stress hydrique (ce dernier n'ayant pas été important lors des expérimentations).

Les propriétés anthelminthiques des ressources, en lien avec leur teneur en tannins condensés, ont été confirmées et les animaux infectés ont tous eu une bonne croissance quand ils étaient alimentés avec les granulés. Ainsi, la stratégie que nous avons étudiée peut donner des résultats probants à condition de choisir judicieusement les co-produits à utiliser (riches en protéines et en tannins) et d'utiliser un séchage solaire à basse température (25 à 35 °C).

Cependant, au niveau alicamentaire, nous avons observé une importante variabilité dans les réponses (croissance, santé) des animaux nourris avec des biomasses dont les teneurs en métabolites primaires et secondaires étaient relativement proches. Cette variabilité soulève certaines questions:

- 1) Comment prédire la valeur protéique des ressources riches en TC ?
- 2) Quel doit être le taux d'incorporation des ressources riches en TC dans les rations mixtes afin d'optimiser le compromis valeur alimentaire/valeur anthelminthique?

Nos résultats relatifs à la prédiction de la valeur protéique en utilisant la dégradabilité *in sacco* sont en décalage par rapport aux croissances observées *in vivo* chez les chevreaux consommant les différentes rations mixtes. Les valeurs absolues et relatives des GMQ et des indices de consommation montrent que toutes les biomasses expérimentales étudiées sont de bons aliments alors même que la dégradabilité théorique et la digestibilité de l'azote présentent des différences significatives pour ce qui est de la valeur protéique. Par ailleurs, les résultats relatifs à la digestibilité pourraient sous-estimer la valeur protéique des biomasses expérimentales. L'ensemble de ces résultats incite à lancer un travail méthodologique en vue de prédire la valeur protéique des biomasses riches en tannins.

Le taux d'incorporation des biomasses expérimentales dans les rations des deux essais conduits sur animaux était relativement élevé (supérieur à 40 %). Ce taux d'incorporation est potentiellement un outil de pilotage de la valeur alicamentaire de la ration. Il est connu que dans les rations mixtes associant un fourrage pauvre et un aliment riche en protéines, des interactions digestives positives sont maximales autour de 25 % d'incorporation du supplément dans la ration (Patra, 2008; Niderkorn and Baumont, 2019) avec une réponse de type curvilinéaire. Par contre, les croissances maximales sont observées au-delà de 40 % (Patra, 2008) ce que confirment nos résultats. Nous n'avons pas d'effet toxique des biomasses expérimentales. Cependant ce dernier aspect devrait constituer un point de vigilance au regard des résultats de la littérature relatifs à la toxicité des tannins (Frutos et *al.*, 2004), et

d'observations récentes réalisées (chute de poils) à l'INRA_URZ qui indiqueraient une toxicité liée à un excès d'azote fermentescible dans le rumen. Les taux élevés d'incorporation de biomasses riches en tannins dans les rations seraient par contre nécessaires pour garantir le potentiel anthelminthique.

La stratégie que nous avons proposée fournit des indications sur les trois critères qui permettent d'évaluer un alicament : le critère nutritionnel, la concentration en composés bioactifs et les effets sur la santé (encadré 4). D'autres investigations doivent cependant être menées pour mieux définir les modalités d'utilisation de l'aliment.

4.2. Enjeux à l'échelle du système polyculture élevage

En plus de la valorisation de ressources non conventionnelles pour l'alimentation et la santé des animaux, les interactions entre cultures et élevage dans les SPE permettent (i) de limiter la dégradation du bilan carbone du sol et de mieux gérer l'azote par l'incorporation des déjections animales, (ii) de réduire l'achat d'intrants à la ferme comme les aliments et fertilisants (figure 17).

Le bilan carbone à l'échelle de l'exploitation agricole

Un des rôles importants des SPE est de préserver le stock de carbone via le recyclage de la matière organique (MO) soit directement sous forme d'engrais verts, soit via le recyclage des déchets animaux. Pour optimiser le fonctionnement des SPE, les exportations de MO devraient être limitées aux denrées alimentaires (ex: lait et viande).

Dans les SPE où la base de l'alimentation des animaux est constituée par les coproduits de culture, l'un des défis est le maintien, voire l'augmentation, du stock de MO au niveau de l'horizon de sol travaillé. Ce stock contribue aux bonnes propriétés physiques du sol: stabilité structurale, résistance à la battance et à l'érosion, facilité de travail, vitesse de ressuyage, qualité de l'enracinement... Il garantit aussi les qualités biologiques et la fertilité chimique du sol: fourniture d'azote, disponibilité du phosphore et du potassium, des oligo-éléments... Le sol est aussi un puits de stockage de carbone.

Si nous faisons l'hypothèse d'une alimentation des ruminants d'élevage basée uniquement sur des coproduits de culture, et sur la base d'un indice de consommation de 12 kg de matière organique/kg de croît (résultat de la thèse), l'exportation de MO est d'environ 24 tonnes par tonne de viande commercialisée (soit 12 tonnes de MO provenant des feuillages avec une ration mixte 50/50). Ce calcul fait l'hypothèse que la viande représente la moitié du croît. Afin de préserver sa fertilité, il convient que la totalité des fèces et de l'urine soit restituée au sol.

Dans notre scénario, nous utilisons des biomasses qui peuvent être essentiellement recyclées sous forme d'engrais verts sur l'exploitation agricole. Ce n'est pas l'usage qui en est fait aujourd'hui, car les agriculteurs gèrent les biomasses sans forcément les enfouir. La solution permettant de compenser l'exportation des biomasses est de recycler les déjections animales sur l'exploitation agricole, soit selon nos résultats de bilan digestif une moyenne de 250 g de MO et 20,5 g d'azote pour un kg de feuilles (base matière sèche) consommé.

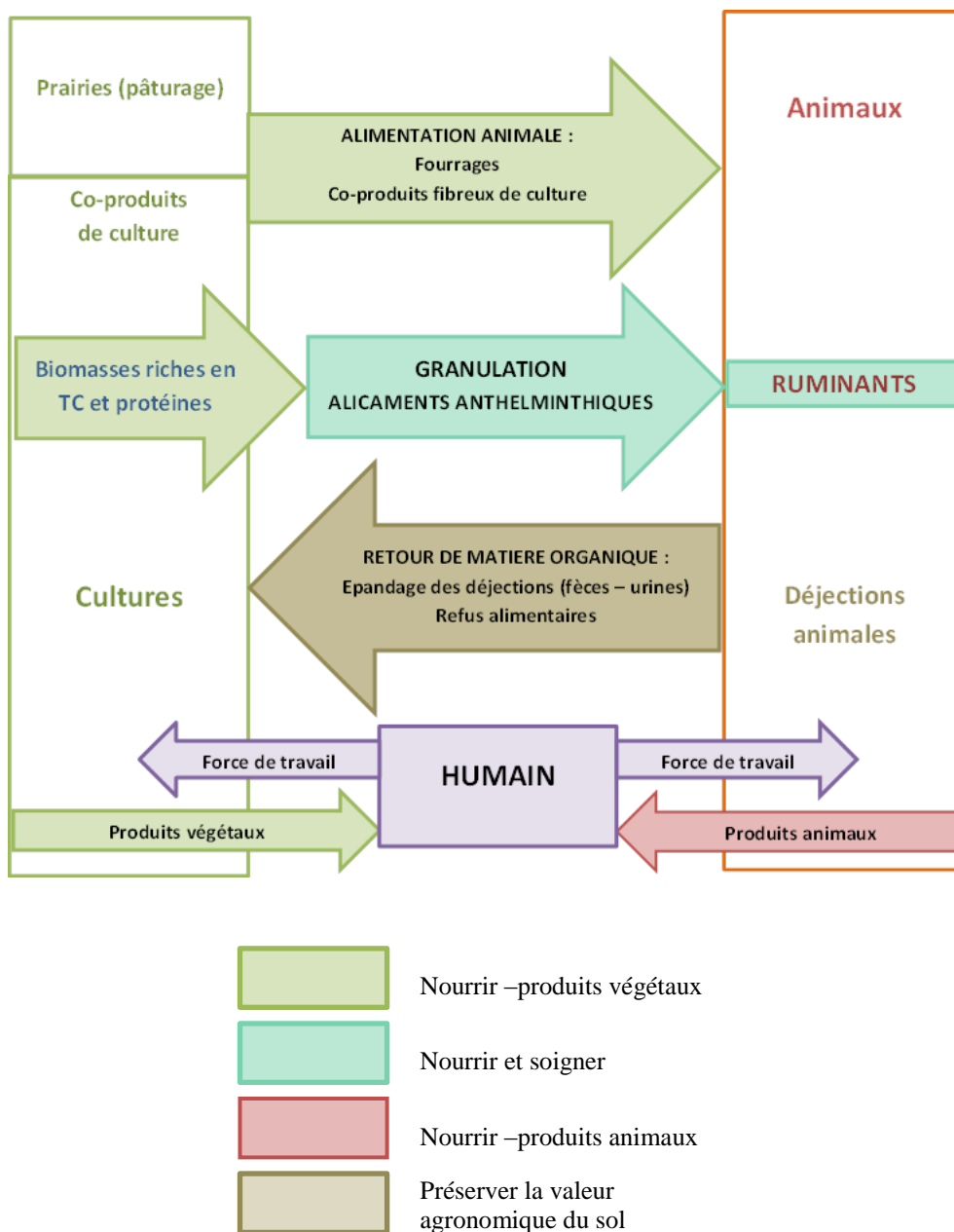


Figure 17. Représentation schématique d'un système polyculture élevage intégrant la valorisation des biomasses anthelminthiques

Amélioration de la performance économique des SPE

L'utilisation des co-produits permet de réduire l'achat d'aliment commercial et d'augmenter ainsi l'autonomie de l'exploitation. Dans le cadre de notre étude, la réduction est de 4,3 kg de granulé par kg de croît. Ce résultat a été estimé sur la base des indices de consommation observés en tenant compte de la proportion des feuillages constituant la ration soit 48 % de la matière ingérée (Tableau 7).

Cependant, cette étude a été abordée sous un angle strictement biotechnique alors que des considérations économiques et de temps de travail pourraient limiter l'intérêt de l'innovation. Ainsi le calcul des temps de travail nécessaires à la fabrication des granulés permet de déterminer un coût de production du granulé de 0,80 €/kg alors que le prix de vente des aliments commerciaux similaires est de 0,52 €/kg. Cette approche grossière doit être affinée car le temps de travail considéré inclut un temps de récolte qui rentre partiellement dans la gestion de la culture par l'agriculteur et les estimations sont basées sur du travail entièrement manuel sans recherche d'optimisation du temps (avec un outillage adapté par exemple).

Autres enjeux environnementaux

L'utilisation des co-produits de culture en tant qu'aliment permet également un maintien de la biodiversité cultivée sur l'exploitation, ainsi qu'une diminution de la présence d'anthelminthiques de synthèse dans l'environnement.

4.3. Perspectives

La réalisation de ce projet a révélé des lacunes de connaissances, notamment pour les méthodes analytiques susceptibles de caractériser les alicaments et permet également d'envisager des scénarii d'optimisation des systèmes alimentaires retrouvés dans les SPE.

Méthodologie pour évaluer la valeur protéique, estimer la teneur en TC et le potentiel anthelminthique des biomasses riches en tannins condensés

- Évaluation de la valeur protéique des biomasses riches en TC

L'impact des TC sur la dégradation des protéines et des fibres des biomasses riches en tannins nécessiterait une étude spécifique de la méthode d'évaluation de la valeur protéique de ces ressources. La valeur protéique des aliments est pilotée par deux variables majeures que sont la dégradation des protéines alimentaires dans le rumen qui conditionne le flux de protéines alimentaires dans l'intestin, et la digestibilité intestinale des acides aminés. La dégradation ruminale des protéines alimentaires est classiquement estimée à partir de leur dégradabilité théorique dans le rumen et mesurée par la méthode des sachets mis à incuber dans ce compartiment. La digestibilité réelle des acides aminés d'origine alimentaire dans l'intestin

grêle est estimée par la méthode des sachets mobiles dans l'intestin. Les résultats de ces méthodes prédictives sont ensuite précisés avec des mesures directes sur des animaux équipés de canules. Aujourd'hui, les bases de données qui permettraient de réaliser cet ajustement sont encore insuffisamment documentées. Par ailleurs, il conviendrait aussi de s'interroger sur le flux de protéines microbiennes, théoriquement proportionnel à la quantité de MO dégradée dans le rumen, mais il n'est pas exclu que l'efficacité des synthèses microbiennes soit modulée par la présence des TC qui pourraient avoir une influence sur l'activité enzymatique des microbes (Bayourthe and Ali-Haimoud-Lekhal, 2014). La caractérisation de la valeur protéique des biomasses riches en TC pourrait donc constituer une question de recherche.

- *Estimation et comparaison de la teneur en tannins des biomasses*

Malgré les nombreux progrès accomplis, des déterminations précises et répétables des concentrations de tannins condensés dans les biomasses sont perfectibles. Les concentrations en TC supérieures à 10 %, pour des métabolites dits secondaires, interpellent. Au-delà, la comparaison des biomasses sur la base de leur teneur en TC est biaisée car aucun des témoins utilisés (TC des biomasses dosées, quebracho...) n'est satisfaisant. Le profil des TC des différentes espèces de plantes est «spécifique». Un témoin composé d'une large gamme de TC pourrait améliorer la comparaison entre biomasses riches en tannins. Des méthodes alternatives, tel le NIRS, pourraient aussi être utilisées d'autant plus que les récents développements font état d'une précision satisfaisante (Lehmann et al., 2015). Ces méthodologies et adaptations pourraient aussi faire l'objet de travaux de recherche.

- *Prédiction de l'activité anthelminthique et définition des modalités d'utilisation des biomasses riches en tannins condensés.*

L'évaluation du potentiel anthelminthique des biomasses riches en TC est à préciser car la seule concentration en TC ne rend pas entièrement compte de leur bioactivité. Il y a un effet spécifique de la ressource qui est probablement à relier au profil des TC. Les plantes contenant une majorité de TC de type procyanidine seraient beaucoup plus répandues que les plantes contenant des TC de type prodelphinidine, mais ces derniers ont de meilleures propriétés anthelminthiques. De plus, beaucoup de plantes contiennent des mélanges PC/PD (Mueller-Harvey et al., 2019).

Par ailleurs, les tannins hydrolysables (tanins galliques ou ellagiques) auraient de fortes activités antiparasitaires, nématocides et antimicrobiennes alors que leurs effets sur la nutrition et la santé sont peu étudiés (Mueller-Harvey et al., 2019).

Les propriétés anthelminthiques des feuillages ont été mises en évidence avec de forts taux d'incorporation et une consommation régulière. Quelles seraient les conséquences d'une consommation discontinue des granulés? La réponse à cette question peut orienter la gestion des biomasses alicamentaires dont la disponibilité peut être saisonnière.

Optimisation du système alimentaire

Dans le cadre de l'étude, le fourrage de base était le *Dichanthium* produit sur du pâturage. Afin d'optimiser l'utilisation des surfaces cultivées, il peut être opportun d'étudier la substitution de tout ou partie du fourrage de base classique par des co-produits de valeur nutritionnelle équivalente. Cette approche nécessiterait un travail de modélisation du système alimentaire pour l'homme qui prendrait en considération la valorisation de co-produits fibreux et/ou énergétiques issus des productions vivrières et/ou industrielles.

Conclusion

Le séchage solaire sous serre, suivi de la granulation des biomasses expérimentales riches en protéines et TC, permet de produire des granulés de bonne valeur alimentaire et anthelminthique. L'optimisation de ces propriétés alicamentaires est obtenue quand le taux d'incorporation des granulés dans les rations est élevé. L'espèce de plante est le principal facteur de variation de leur valeur alicamentaire. Afin d'aller plus loin dans la stratégie d'évaluation, des recherches complémentaires doivent être effectuées pour produire des indicateurs de valeur protéique et de valeur anthelminthique en se référant à l'analyse de la composition chimique des biomasses (teneurs en tannins et structure biochimique de ces derniers, mais aussi autres molécules pouvant avoir un effet anthelminthique). Les modalités de consommation par l'animal (fréquence, taux d'incorporation dans la ration) sont également à étudier en vue d'optimiser l'effet de l'aliment.

Bibliographie

- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta J.F.J., Sandoval-Castro C.A., Aguilar-Caballero A.J., Hoste H., 2008. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology* 153, 313-319. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.042>.
- Altieri, M.A., Funes-Monzote, F.R., Petersen, P., 2012. Agroecologically efficient agricultural systems for smallholder farmers: contributions to food sovereignty. *Agronomy Sustainable Development* 32, 1-13.
- Andlauer, W., Fürst, P., 2002. Nutraceuticals : a piece of history, present status and outlook. *Food Research* 35, 171-176.
- AOAC, 1990. Official Methods of analysis. Association Official Analysis Chemical, Arlington, VA 15th edition.
- Archimede, H., Bastianelli, D., Boval, M., Tran, G., Sauvant, D., 2011. Tropical resources: availability and feed value. *Inra Productions Animales* 24, 23-39.
- Archimede, H., Bastianelli, D., Fanchone, A., Gourdine, J.L., Fährasmane, L., 2018. Protein feeds in integrated mixed crop-livestock farming systems in tropical areas. *Inra Productions Animales* 31, 221-235.
- Bambou, J.C., Archimede, H., Arquet, R., Mahieu, M., Alexandre, G., Gonzalez-Garcia, E., Mandonnet, N., 2011. Effect of dietary supplementation on resistance to experimental infection with *Haemonchus contortus* in Creole kids. *Veterinary Parasitology* 178, 279-285.
- Bayourthe, C., Ali-Haimoud-Lekhal, D., 2014. Les extraits de plantes chez le ruminant : effets sur les fermentations dans le rumen et la qualité lipidique des produits animaux. *INRA Productions Animales* 27 (4), 317-328.
- Beigh, Y. A., Ganai, A. M., & Ahmad, H. A., 2017. Prospects of complete feed system in ruminant feeding: A review. *Veterinary world* 10 (4), 424–437. doi:10.14202/vetworld.2017.424-437.
- Brunet, S., Hoste, H., 2006. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7481-7487.
- Butter, N.L., Dawson, J.M., Buttery, P.J., 1999. Effects of dietary tannins on ruminants. In: Nottingham-University-Press (Ed.), *Secondary Plant Products*, Nottingham, pp. 51-70.
- Cherry, N.M., M. Bullinger, B.D. Lambert, J.P. Muir, T.W. Whitney, J.E. Miller, and J.T. Sawyer. 2014. Feeding panicked tickclover to growing goats reduces *Haemonchus contortus* infection without negative effects on growth. *Journal of Applied Animal Nutrition* 2 e15, 1-7. doi:10.1017/jan.2014.9.

- DAAF (Direction de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt de Guadeloupe), 2018. Résultats de l'enquête cheptel 2018. Url: <http://daaf.guadeloupe.agriculture.gouv.fr/Resultats-de-l-enquete-cheptel,829>.
- Deinum, B., Maassen, A., 1994. Effects of drying temperature on chemical-composition and in-vitro digestibility of forages. *Animal Feed Science and Technology* 46, 75-86.
- Dzowela, B.H., Hove, L., Mafongoya, P.L., 1995. Effect of drying method on chemical composition and in vitro digestibility of multi-purpose tree and shrub fodders. *Tropical Grasslands* 29, 263-269.
- FAO, FIDA, OMS, PAM, UNICEF, 2019. L'État de la sécurité alimentaire et de la nutrition dans le monde 2019. Se prémunir contre les ralentissements et les fléchissements économiques. FAO, Rome.
- Frutos, P., Hervas, G., Ramos, G., Giraldez, F.J., Mantecon, A.R., 2002. Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. *Animal Feed Science and Technology* 95, 215-226.
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F.J., R., M.A., 2004. Review. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2, 191-202.
- Herrero, M., Thornton, P.K., Notenbaert, A.M., Wood, S., Msangi, S., Freeman, H.A., Bossio, D., Dixon, J., Peters, M., van de Steeg, J., Lynam, J., Rao, P.P., Macmillan, S., Gerard, B., McDermott, J., Sere, C., Rosegrant, M., 2010. Smart Investments in Sustainable Food Production: Revisiting Mixed Crop-Livestock Systems. *Science* 327, 822-825.
- Heuzé V., Tran G., 2015. *Leucaena (Leucaena leucocephala)*. Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. <https://feedipedia.org/node/282> Last updated on September 9, 2015, 10:46
- Heuzé V., Tran G., 2016. *Cassava leaves and foliage*. Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. <https://www.feedipedia.org/node/528> Last updated on April 11, 2016, 13:28
- Heuzé V., Thiollet H., Tran G., Delagarde R., Bastianelli D., Lebas F., 2017. *Pigeon pea (Cajanus cajan)* forage. Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. <https://feedipedia.org/node/22444> Last updated on March 8, 2017, 11:10
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Mueller-Harvey, I., Sotirakie, S., Louvandini, H., Thamsborg, S.M., Terrill, T.H., 2015. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology* 212, 5-17.
- Hove, L., Ndlovu, L.R., Sibanda, S., 2003. The effects of drying temperature on chemical composition and nutritive value of some tropical fodder shrubs. *Agroforestry Systems* 59, 231-241.
- Houdijk, J.G.M., Kyriazakis, I., Jackson, F., Huntley, J.F., Coop, R.L., 2005. Effects of protein supply and reproductive status on local and systemic immune responses to *Teladorsagia circumcincta* in sheep. *Veterinary Parasitology* 129, 105-117.

- Huygue, C., 2009. La multifonctionnalité des prairies en France. Conciliation des fonctions de production et de préservation de l'environnement. Cahier agricultures 18, 7-16.
- INEC, 2018. Livre blanc "Systèmes agricoles et agroalimentaires circulaires". INEC.
- Kelman, W.M., Tanner, G.J., 1990. Foliar condensed tannin levels in lotus species growing on limed and unlimed soils in South-Eastern Australia. . Proceedings of the New Zealand Grassland Association 52, 51-54.
- Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, A.R., Mueller-Harvey, I., Williamson, E.M., Hoste, H., 2015. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. International Journal for Parasitology-Drugs and Drug Resistance 5, 127-134.
- Laurent, S., 1975. Etude comparative de différentes méthodes d'extraction et de dosage des tannins chez quelques ptéridophytes. Archives of Physiology and Biochemistry 83, 735-752.
- Lees, G.L., Hinks, C.F., Suttill, N.H., 1994. Effect of high-temperature on condensed tannin accumulation in leaf tissues of big trefoil (lotus-uliginosus schkuhr). Journal of the Science of Food and Agriculture 65, 415-421.
- Lehmann, J.R.K., Grosse-Stoltenberg, A., Romer, M., Oldeland, J., 2015. Field Spectroscopy in the VNIR-SWIR Region to Discriminate between Mediterranean Native Plants and Exotic-Invasive Shrubs Based on Leaf Tannin Content. Remote Sensing 7, 1225-1241.
- Lindberg, J.E., 1985. Estimation of rumen degradability of feed proteins with the *in sacco* technique and various *in vitro* methods - a review. Acta Agriculturae Scandinavica, 64-97.
- Mahieu, M., 2014. Gestion du parasitisme gastro-intestinal des petits ruminants en zone tropicale humide., Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries alimentaires.(UR AFPA). Université de Lorraine.
- Mahieu, M., Arquet, R., Fleury, J., Coppry, O., Marie-Magdeleine, C., Boval, M., Archimède, H., Alexandre, G., Bambou, J.C., Mandonnet, N., 2009. Contrôle intégré du parasitisme gastro-intestinal des petits ruminants au pâturage en zone tropicale humide. 16èmes Rencontres Recherches, Ruminants. INRA - Institut de l'Elevage, Paris (France), pp. 265-268.
- Marie-Magdeleine, C., Udino, L., Philibert, L., Bocage, B., Archimede, H., 2010. *In vitro* effects of Cassava (*Manihot esculenta*) leaf extracts on four development stages of *Haemonchus contortus*. Veterinary Parasitology, Volume 173, 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.017>.
- 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.
- Minson, D.J., 1990. Preface. Forage in Ruminant Nutrition. Academic Press, pp. xi-xii.

- Molan, A.L., Meagher, L.P., Spencer, P.A., Sivakumaran, S., 2003. Effect of flavan-3-ols on *in vitro* egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology* 33, 1691-1698.
- Mueller-Harvey, I., 1999. Tannins: their nature and biological significance. In: Press, N.U. (Ed.), *Secondary plants products. Antinutritional and beneficial actions in animal feeding* Nottingham Univ Press, Nottingham, pp. 17-70.
- Mueller-Harvey I., 2006. Review. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 2010–2037.
- Mueller-Harvey, I., Bee, G., Dohme-Meier, F., Hoste, H., Karonen, M., Kölliker, R., et al., 2019. Benefits of Condensed Tannins in Forage Legumes Fed to Ruminants: Importance of Structure, Concentration, and Diet Composition. *Crop Science* 59, 1-25.
- Muetzel, S., Becker, K., 2006. Extractability and biological activity of tannins from various tree leaves determined by chemical and biological assays as affected by drying procedure. *Animal Feed Science and Technology* 125, 139-149.
- Muir, J.P., Terrill, T.H., Kamisetti, N.R., Bow, J.R., 2014. Environment, Harvest Regimen, and Ontogeny Change *Lespedeza cuneata* Condensed Tannin and Nitrogen. *Crop Science* 54, 2903-2909.
- Naumann, H.D., Armstrong, S.A., Lambert, B.D., Muir, J.P., Tedeschi, L.O., Kothmann, M.M., 2014. Effect of molecular weight and concentration of legume condensed tannins on *in vitro* larval migration inhibition of *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 199, 93-98.
- Niderkorn, V., Baumont, R., 2019. Associative effects between forages on feed intake and digestion in ruminants. *Animal* 3 3, 951-960.
- Nocek, J.E., 1985. Evaluation of specific variables affecting *in situ* estimates of ruminal dry-matter and protein digestion. *Journal of Animal Science* 60, 1347-1358.
- Oliveira, L. M. B. de, Bevilaqua, C. M. L., Macedo, I. T. F., Morais, S. M. de, Monteiro, M. V. B., Campello, C. C., Ribeiro, W. L. C., & Batista, E. K. F., 2011. Effect of six tropical tanniferous plant extracts on larval exsheathment of *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 20(2), 155-160. <https://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612011000200011>
- Ørskov, E.R., Mac Donald, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of the Agricultural Science. Cambridge*, 92, 499-503. doi:10.1017/S0021859600063048.
- Ozier-Lafontaine, H., Boval, M., Alexandre, G., Chave, M., Grandisson, M., 2011. Vers l'émergence de nouveaux systèmes agricoles durables pour la satisfaction des besoins alimentaires aux Antilles-Guyane. *Innovations agronomiques* 16, 135-152.

- Patra, A.K., 2008. A meta-analysis on effects of supplementing low-quality roughages with foliages from browses and tree fodders on intake and growth in sheep. *Livestock Science* 121, 239-249.
- Patra, A.K., 2009. Effects of supplementing low-quality roughages with tree foliages on digestibility, nitrogen utilization and rumen characteristics in sheep: a meta-analysis. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 94, 338-353.
- Patra, A.K., 2010a. Aspects of nitrogen metabolism in sheep-fed mixed diets containing tree and schrub foliages. *Bristish Journal of Nutrition* 103, 1319-1330.
- Patra, A.K., 2010b. Effects of supplementing low-quality roughages with tree foliages on digestibility, nitrogen utilization and rumen characteristics in sheep: a meta-analysis. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94, 338- 353.
- 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.
- 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.
- Poppi, D.P., Sykes, A.R., Dynes, R.A., 1990. The effect of endoparasitism on host nutrition - the implications for nutrient manipulation. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 50, 237-244.
- Quijada, J., Fryganas, C., Ropiak, H.M., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I., Hoste, H., 2015. Anthelmintic Activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from Small Ruminants Are Influenced by Structural Features of Condensed Tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 6346-6354.
- Ryschawy, J., Joannon, A., Gibon, A., 2014. L'exploitation de polyculture élevage: définitions et questions de recherche. Une revue. *Cahier Agriculture* 23, 346-356.
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology* 91, 21-40.
- Searchinger, T., Waite, R., Hanson, C., Ranganathan, J., 2018. Creating a Sustainable Food Future: A Menu of Solutions to Feed Nearly 10 Billion People by 2050. In: WRI (Ed.).
- Sierra, J., Desfontaines, L., 2018. Les sols de Guadeloupe - Génèse, distribution & propriétés. INRA Sciences et Impacts, Petit-Bourg.
- Singh, S., Mehta, A., John, J., Mehta, P., 2010. Anthelmintic potential of *Andrographis paniculata*, *Cajanus cajan* and *Silybum marianum*. *Pharmacognosy Journal*, 2, 71-73. doi: 10.4135/9788132104940.n3.
- Stark, F., 2016. Evaluation agro-écologique des pratiques d'intégration agriculture-élevage : Application de l'analyse de réseau écologique à des exploitations agricoles en milieu tropical humide. Agro Paris Tech, Montpellier.

- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., De Haan, C., 2006. Livestock's long shadow. FAO, Rome.
- Sudarman, A., Hayashida, M., Puspitaning, I.R., Jayanegara, A., Shiwachi, H., 2016. The use of cassava leaf silage as a substitute for concentrate feed in sheep. *Tropical Animal Health and Production* 48, 1509-1512.
- Terrill, T.H., Rowan, A.M., G.B., D., T.N., B., 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals, and cereal grains. *Journal of The Science Food and Agriculture* 58, 321-329.
- Terrill, T.H., Mosjidis, J.A., Moore, D.A., Shaik, S.A., Miller, J.E., Burke, J.M., Muir, J.P., Wolfe, R., 2007. Effect of pelleting on efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats. *Veterinary Parasitology* 146, 117-122.
- Torres-Acosta, J.F.J., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Caballero, A.J., Cuellar-Ordaz, J.A., 2012. Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. *Veterinary Parasitology* 189, 89-96.
- Udo, H.M.J., Aklilu, H.A., Phong, L.T., Bosma, R.H., Budisatria, I.G.S., Patil, B.R., Samdup, T., Bebe, B.O., 2011. Impact of intensification of different types of livestock production in smallholder crop-livestock systems. *Livestock Science* 139, 22-29.
- van Keulen, H., Schiere, H., 2004. Crop-livestock systems: Old wine in new bottles? 4th International Crop Science Congress, Brisbane (Australia).
- 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.C., McNabb, W.C., 2003. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society* 62, 383-392.
- Wanapat, M., 2001. Role of cassava hay as animal feed in the tropics. In: Proc. international workshop on current research and development of cassava as animal feeds, organized by Khon Kaen University and Swedish International Development Agency (SIDA) and Swedish Agency for Research and Cooperation with Developing Countries (SAREC), July 23–24, Kosa Hotel, Thailand.
- Williams, A.R., Fryganas, C., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I., Thamsborg, S.M., 2014. Direct Anthelmintic Effects of Condensed Tannins from Diverse Plant Sources against *Ascaris suum*. *PLoS ONE* 9(5): e97053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097053>

Annexe 1. Minatchy N., Archimède H., Barde Dingamgoto Jesse J., Dahomé, L., Labirin F., Calif B., Marie-Magdeleine C. Effect of two agro-pedo-climatic zones, drying methods and pelleting processes on chemical composition of *Manihot esculenta* (sp.), *Leucaena leucocephala* and *Cajanus cajan*.

(Publié par African Journal of Biotechnology – Janvier 2020)

Full Length Research Paper

Effect of two agro-pedo-climatic zones, drying methods and pelleting processes on chemical composition of *Manihot esculenta* (sp.), *Leucaena leucocephala* and *Cajanus cajan*

Nathalie MINATCHY¹, Harry ARCHIMÈDE¹, Dingamgoto Jesse BARDE¹, Liza DAHOMÉ¹, Fernand LABIRIN², Brigitte CALIF¹ and Carine MARIE-MAGDELEINE^{1*}

¹INRA, URZ Recherches Zootechniques, INRA, 97170, Petit-Bourg (Guadeloupe), France.

²INRA UE PTEA, Plateforme Tropicale d'Expérimentation sur l'Animal, INRA, 97170, Petit-Bourg (Guadeloupe), France.

Received 23 May 2019; Accepted 18 October 2019

In tropical and subtropical countries, livestock productivity may be affected by the availability of food resources and the high prevalence of gastrointestinal pathogenic nematodes. The classical method of control using anthelmintic drugs is becoming decreasingly efficient because of a generalised resistance of the gastrointestinal nematodes suppress (GIN) to most of the drugs. In small farms, protein-rich biomasses with significant amounts of condensed tannins (CT), which are known to have anthelmintic properties, might be good candidates to produce nutraceuticals. This experiment was conducted to determine the feasibility of producing nutraceutical pellets from *Manihot esculenta* sp., *Cajanus cajan* and *Leucaena leucocephala*, considering the influence of agro-pedo-climatic conditions plant species and technological factors, such as drying and pelleting. The samples were harvested in two different agro-pedo-climatic zones and sundried under shelter (at 25 to 35°C) or in a ventilated oven (45°C) before pelleting. Chemical analysis on crude protein and condensed tannins were conducted. The chemical composition of the plants did not vary significantly with agro-pedo-climatic conditions. Sun-drying and oven-drying decreased the CT content of the plants. No effect of pelleting was recorded on crude protein and CT contents, except for *C. cajan*, for which a small decrease in CT content was observed. Protein-rich foliage types with CT contents above 50 g/kg of dry matter are potentially good candidates to produce nutraceutical pellets if they are dried using mild drying conditions, like sun-drying under shelter.

Key words: Condensed tannins, nutraceuticals, drying, pelleting processes.

INTRODUCTION

Livestock productivity can be affected by gastrointestinal-induced pathologies that cause almost 45% mortality in

sheep and goats before weaning. The classical method of control using anthelmintic drugs is becoming

*Corresponding author. E-mail: carine.marie-magdeleine-chevry@inra.fr. Tel : +590 25 59 32. Fax: +590 25 59 36.

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

decreasingly efficient because of a generalised resistance of the gastrointestinal nematodes (GIN) to most of the drugs, especially in tropical areas (Mahieu, 2014). Many plants from tropical areas could be used as sources of nutraceuticals due to their composition of primary and secondary metabolites, and thus constitute part of an alternative to the use of anthelmintic drugs within integrated pest management systems against GIN (Cei et al., 2018; Santos et al., 2019).

Condensed tannins (CT) are of particular interest because they exert direct and indirect actions on pathogens (Hoste et al., 2012). These polyphenolic compounds could reduce the worm burden by impacting different steps of the development cycle of the nematode, as they have well-known actions on egg hatching rate, larval exsheathment and female fecundity (Hoste et al., 2012; Waghorn, 2008). Condensed tannins could also impact on the nutritional balance for the animals, given their influence on the quantity and the profile of available amino acids. By aiding to increase the bypass of dietary proteins in the intestine, condensed tannins protect proteins from degradation in the rumen (ruminal escape), causing increased lactation, wool growth and live weight gain, without changing voluntary feed intake (Piluzza et al., 2014).

Condensed tannin activities are known to depend on their concentration and nature (size, structure and profile) in the plant (Mueller-Harvey et al., 2019; Waghorn, 2008). Previous analysis shows that CT concentrations between 20 and 50 g/kg of the dry matter (DM) of the plant generate nutraceutical properties in the plant (Piluzza et al., 2014).

The CT composition depends on the plant species (Mueller-Harvey et al., 2019), plant growth stage and organs (Piluzza et al., 2014), as well as on the harvesting area, soil composition (Barry and Forss, 1983), humidity rate and weather conditions (Lees et al., 1994; Frutos et al., 2002). Moreover, the availability of a simple technology, like pelleting, suitable for the farmers and respectful of plant properties can improve the use of CT to manage GIN infections (Gaudin et al., 2016).

However, in order to produce plant pellets with an effective CT content against GIN infection, the sensitivity of CT to temperature has to be considered, as well as the variability of CT concentration in plants.

The global aim of this study was to assess the feasibility of pelleting condensed tannins-rich plants for their use as nutraceuticals at the farm level. For this purpose, experiments were undertaken to investigate the impact of natural conditions (soil, temperature and humidity) on the chemical composition, as well the influence of practices for preservation (drying and pelleting processes), on the CT content of four tropical plants.

MATERIALS AND METHODS

Foliage sampling: Collection and preparation

Four distinct types of plant foliage containing CT were chosen: *M.*

esculenta sp.1; *M. esculenta* sp.2; *C. cajan* and *L. leucocephala*. *M. esculenta* sp.1 has lower levels of cyanhydric acid in its leaves and tubers compared to *M. esculenta* sp.2. The samples were harvested from two zones: (i) Grande-Terre that is characterised by a vertisol soil and humid tropical climate with a long dry season (3 to 5 months), 83% humidity and a mean temperature of 25°C; (ii) Basse-Terre that is characterised by a ferralitic soil and humid tropical climate with a short dry season (less than 2 months), 88% humidity and a mean temperature of 25°C. For each zone, the sampling was done from three sites, during the middle and the end of the dry season. Thirty to forty kilograms of stems of *L. leucocephala*, *C. cajan* and *M. esculenta*, aged 6, 8 and 12 months, respectively, were harvested.

These samples were mixed by site and then divided into three sub-samples that were dried under different conditions: Freeze-dried; sun-dried under shelter (at 25 to 35 °C); dried at 45°C for 2 days in a ventilated oven. These three sub-samples were used for chemical analysis, in triplicate. The freeze-dried and the sun-dried samples were pelleted without additives in a GR 150 E system (Oligotechnologie, Wissembourg, France).

Chemical analysis and analytical procedures

The DM content was determined using a forced-air oven at 60°C until constant weight is achieved.

Foliage samples were milled through a 1 mm screen (Reich hammer mill, Haan, Germany) prior to analysis. Organic matter (OM) and nitrogen (N) were analysed according to the AOAC methods 923.3 and 992.15, respectively (AOAC, 1990). Crude protein (CP) content was estimated as $N \times 6.25$. Cell wall components (neutral detergent fibre [NDF], acid detergent fibre [ADF] and acid detergent lignin [ADL]) were determined as described by Van Soest et al., (1991). CT content was determined on freeze-dried, sun-dried under shelter and 45°C ventilated-oven samples, respectively, using the vanillin-H₂SO₄ method reported by Laurent (1975). For improved accuracy, the CT concentration of the plant was determined using the CT extract of each plant as a standard for the individual calibration curves. The CT were extracted using a 70% (v/v) aqueous acetone solution (Giner-Chavez et al., 1997) and then isolated with Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Only N and CT were measured in the pellets. Each analysis was done in triplicate, and the means were calculated.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the mixed general linear model procedure in SAS 9.2 (2008). The global model used to analyse the soil, the foliage and the drying process effects was:

$$Y_{ijkl} = m + F_i + Z_j + D_k + (F \times Z)_{ij} + (F \times D)_{ik} + S_l + e_{ijkl},$$

where m is the mean, F_i is the foliage fixed effect ($i=1,2,3,4$), Z_j is the zone fixed effect ($j=1,2$), D_k is the drying fixed effect ($k=1,2,3$), $(F \times Z)_{ij}$ is the interaction between the foliage and the zone effects, $(F \times D)_{ik}$ is the interaction between the foliage and the drying effects, S is a random effect associated with harvesting site and e_{ijkl} is the residual term.

The global model to analyse the pelleting process effect was:

$$Y_{ijk} = m + F_i + P_j + (F \times P)_{ij} + S_k + e_{ijk},$$

where m is the mean, F_i is the foliage fixed effect ($i=1, 2, 3, 4$), P_j is the processing fixed effect ($j=1, 2, 3$), $(F \times P)_{ij}$ is the interaction between the foliage and the processing effects, S is a random effect associated with harvesting site, and e_{ijk} is the residual term.

Table 1. Chemical composition of *Manihot esculenta*, *Leucaena leucocephala* and *Cajanus cajan* foliage harvested from two different agro-pedoclimatic zones in Guadeloupe, France.

Item	Plant species				SEM	p-value	
	<i>M. esculenta</i> sp.1	<i>M. esculenta</i> sp.2	<i>L.</i> <i>leucocephala</i>	<i>C.</i> <i>cajan</i>		Agro-pedo- climatic zone ¹⁾	Zone × species
OM (g/kg DM)	894 ^a	904 ^b	910 ^{bc}	922 ^c	0.92	0.4991	0.0001
NDF (g/kg DM)	445 ^a	422 ^{ab}	378 ^b	511 ^c	2.51	0.4597	0.1157
ADF (g/kg DM)	247 ^a	263 ^b	189 ^c	356 ^d	1.21	0.4043	0.0001
ADL (g/kg DM)	109 ^a	116 ^a	91 ^c	189 ^d	0.73	0.4335	0.0003
CP (g/kg DM)	189 ^a	189 ^a	262 ^b	217 ^c	1.33	0.4337	0.0001
Ash (g/kg DM)	106 ^a	96 ^b	90 ^{bc}	78 ^c	0.92	0.4991	0.0001
CT (g/kg DM)	73 ^a	60 ^b	157 ^c	170 ^c	1.08	0.9546	0.0001

M. esculenta sp.1 with low cyanhydric acid content. *M. esculenta* sp.2 with high cyanhydric acid content.¹⁾ Vertisol and long dry season vs. ferrallitic soil and short dry season. SEM, standard error of the mean; OM, organic matter; NDF, neutral detergent fibre; ADF, acid detergent fibre; ADL, acid detergent lignin; CP, crude protein; CT, condensed tannins. ^{a-d} Means within a row with different superscript letters differ significantly ($p < 0.05$).

The values were expressed as least square means and standard error of the mean. Statistical differences were declared significant at $p < 0.05$.

RESULTS

The harvested *C. cajan* and *L. leucocephala* seemed relatively homogeneous. Conversely, *M. esculenta* sp.1 and sp.2 constituted a more heterogeneous population, based on the size, the colour and the shape of the leaves, and the length and the colour of the petioles.

The chemical composition of the samples collected in this study is presented in Table 1. The comparisons of CP contents indicated significant differences between the plants ($p < 0.05$), except for the two *Manihot* sp. ($p = 0.9502$). For all foliage types, the CP content varied from 189 to 262 g/kg DM. Plants were also different based on the different components in the plant cell walls (NDF, ADF and ADL), excluding the two *Manihot* sp, for which the concentrations of NDF and ADL were similar. Regarding ash, no significant differences were observed between *L. leucocephala* and *M. esculenta* sp.2, and between *L. leucocephala* and *C. cajan*. *Manihot esculenta* sp.1 was significantly different from the other plants. CT concentrations were significantly different between the foliage types, except for *L. leucocephala* and *C. cajan*, which had similar concentrations with each other.

No significant effect of harvesting zone was registered on plant composition. However, interactions were observed between plants and harvesting zones. Although the differences were not significant, the plants harvested from Basse-Terre had NDF contents higher than those harvested from Grande-Terre. Similar observations were made for ADF, but the difference tended to be significant only for *C. cajan* ($p = 0.08$). CP differences were not significant between harvesting zones for *L. leucocephala*

and *C. cajan*, whereas, CP was significantly higher in *M. esculenta* sp.2 harvested from Basse-Terre ($p = 0.008$), and higher, but not significantly, in *M. esculenta* sp.1 harvested from Basse-Terre ($p = 0.18$). Although the differences were not significant, CT content was higher for the two *Manihot* sp. and *L. leucocephala* from Basse-Terre. In contrast, *C. cajan* CT levels were significantly higher in the plants harvested from Grande-Terre than Basse-Terre ($p = 0.0377$).

The drying process significantly impacted on the CT content of the plants (Table 2). Sun-drying and oven-drying reduced the CT concentrations in plants. The most significant losses were observed with oven-drying at 45°C.

There was no significant influence of the pelleting operation on the N contents irrespective of the foliage and drying process considered (Table 3).

Pelleting noticeably affected the CT contents of *C. cajan*, only. The entire process (sun-drying then pelleting) significantly altered the CT contents of *M. esculenta* sp.2 and *C. cajan*. Comparing the sun-dried and pelleted plant to the freeze-dried plant, abnormally high CT contents were reported for *M. esculenta* sp.2, leading to a significant effect of the sun-drying and pelleting process.

DISCUSSION

General considerations

In this study, soil and rainfall were the parameters that had the most variation between the two areas. Temperature and humidity were quite the same. Globally, the chemical composition of leaves concurs with values reported in the literature (Table 4). The CP and CT values reported in literature vary in the ranges 168 to 377 and 4 to 92 g/kg DM for *M. esculenta*; 153 to 403 and 9 to 181 g/kg DM for *L. leucocephala*; and 185.6 to

Table 2. Effect of drying technology on condensed tannin content in *M. esculenta*, *L. leucocephala* and *C. cajan* foliage.

Plant species	Condensed tannin content (g/kg DM)			SEM
	Freeze-dried	Sun-dried	Oven-dried	
<i>Manihot esculenta</i> sp.1	68.3 ^a	40.8 ^b	37.5 ^b	0.871
<i>Manihot esculenta</i> sp.2	64.6 ^a	26.4 ^b	33.8 ^b	0.858
<i>Leucaena leucocephala</i>	154.8 ^a	135.6 ^b	58.7 ^c	0.831
<i>Cajanus cajan</i>	172.9 ^a	152.8 ^b	51.4 ^c	0.926

DM, Dry matter; SEM, standard error of the mean. *M. esculenta* sp.1 with low cyanhydric acid content. *M. esculenta* sp.2 with high cyanhydric acid content. ^{a-c} Means within a row with different superscript letters differ significantly ($p < 0.05$).

Table 3. Effect of pelleting technology on nitrogen and condensed tannins contents in *M. esculenta* sp., *L. leucocephala* and *C. cajan* foliage.

Species	Treatment			SEM
	Freeze-dried	Freeze-dried and pelleted	Sun-dried and pelleted	
Nitrogen (g/kg DM)				
<i>Manihot esculenta</i> sp.1	196.2	185.5	187.2	1.019
<i>Manihot esculenta</i> sp.2	194.8	176.2	187.2	0.974
<i>Leucaena leucocephala</i>	268.4	275.5	270.9	1.019
<i>Cajanus cajan</i>	228.2	221.5	225.5	1.096
Condensed tannins (g/kg DM)				
<i>Manihot esculenta</i> sp.1	66.3	59.9	57.5	0.7381
<i>Manihot esculenta</i> sp.2	93.1 ^a	79.7 ^a	19.2 ^b	0.705
<i>Leucaena leucocephala</i>	138.8	156.9	137.9	0.7381
<i>Cajanus cajan</i>	172.4 ^a	148.8 ^b	129.1 ^b	0.7934

M. esculenta sp.1 with low cyanhydric acid content. *M. esculenta* sp.2 with high cyanhydric acid content. ^{a-c} Means within a row with different superscript letters differ significantly ($p < 0.05$).

236 and 47 to 77.1 g/kg DM for *C. cajan*, respectively. Considering the accuracy of the method for CP determination, it can be hypothesised that the results reported for these components are mainly due to natural variations in the plants. On the contrary, because of variations in methods, procedures and standards used for the analysis of CT (Frutos et al., 2002), it can be surmised that a large part of the variation reported in the literature is linked to those factors.

The high CP contents in the three distinct types of foliage evaluated, confirm their potential as feed resources. However, the digestibility and the amino acid profiles have to be taken into account to determine their nutritive value. The CP content of *L. leucocephala*, being the highest one, favours it as a good potential candidate in the development of a nutraceutical. *C. cajan* had the highest lignin content, which depresses digestibility. This plant cell wall component must be kept in mind when discussing the quality of foliage as a nutraceutical. Both *Manihot* sp. were similar in chemical composition, and so

their method use can be the same for both species.

Effect of agro-pedo-climatic conditions on chemical composition

In the present study, significant effect of the agro-pedo-climatic conditions on the primary compounds (CP, cell wall) was not observed. This result can be explained by the low temperature and humidity variations and the absence of nutrient deficiencies in the soil of the two harvesting zones. This outcome is a classic result because, to the researchers' knowledge, no author has reported any significant effect under similar conditions. Even under adverse conditions, effects on primary components were low (Minson, 1990). Similarly, the effect of temperature only appears for large ranges of variation (Minson, 1990).

A variable effect of the agro-pedo-climatic conditions on the CT content, depending on the plant; hence, the

Table 4. Crude protein and condensed tannin contents in *C. cajan*, *L. leucocephala* and *M. esculenta* reported in the literature.

Species	CP (g/kg DM)	CT (g/kg DM)	Method for CT analysis	Reference
<i>C. cajan</i>	236.0	-		Journal of Agricultural Science Research. 2016, 5(2):035-9.
	206.1	77.1	Vanillin-HCl-methanol; Price et al. (1978)	Journal of Biology, Agriculture and Healthcare. 2016, 6
	199.8	-		Journal of Animal Science. 2012, 41(3):717-25
	199.8	-		Journal of Animal Science. 2000, 29(3):871-9.
	193.8	-		Tropical Grasslands. 1995, 29(4):263-9.
	185.6	-		Journal of Animal Feed Science and Technology. 1994;46:343.
	-	47.0	Butanol-HCl; Bate-Smith (1975) and Porter et al. (1986)	Journal of Range Management. 1994, 47(5):398-404.
Mean	203.5	62.1		
<i>L. leucocephala</i>	403.0	181.0	Vanillin-HCl; Butler (1982)	Agroforestry Systems. 2003, 59(3):231-41
	306.0	18.0	Butanol-HCl-iron; Makkar (2003)	Animal Feed Science and Technology. 2011, 163(2-4):231-43.
	268.0	16.0	Butanol-HCl-ferric ammonium sulphate; Porter et al. (1986)	Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 2012, 25(10):1404-10.
	266.0	75.0	Vanillin-H ₂ SO ₄ ; Laurent (1975)	Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 2016, 100(6):1149-58.
	254.5	-		Brazilian Journal of Animal Science. 2012, 41(3):717-25.
	250.0	-		Journal of Animal Feed Science and Technology. 1994;46:343-8.
	222.0	18.1	Vanillin-HCl-methanol; Price et al. (1978)	Animal Feed Science and Technology. 1998, 70(4):305-14.
	193.8	-		Global Journal of Animal Scientific Research. 2015;3(2):419-22.
	193.0	9.0	Butanol-HCl; Porter et al. (1986)	Tropical Grasslands. 1995, 29(4):263-9.
	153.0	12.7	Butanol-HCl; Makkar (2003)	Livestock research for rural development. 2008, 20 (11)
	-	134.0	Butanol-HCl; Makkar (1995)	Animal Feed Science and Technology. 2005, 119(3-4):345-61.
-	129.5	Butanol-HCl; Terrill et al. (1992)	Animal Feed Science and Technology. 2001, 91(1-2):95-106.	
Mean	251.1	65.9		Journal of the Science of Food and Agriculture. 2004, 84(4):291-4
<i>Manihot esculenta</i>	377.0	4.0	Butanol-HCl-iron; Makkar (2003)	Animal Feed Science and Technology. 2011, 163(2-4):231-43
	376.3	-		Brazilian Journal of Animal Science. 2012, 41(3):717-25.
	300.0	-		Animal Feed Science and Technology. 2013, 180(1-4):44-54.
	224.0	40.0	Vanillin-HCl; Nakamura et al. (2003)	Small Ruminant Research. 2010 Sep;93(1):10-8.
	208.0	92.0	Vanillin-H ₂ SO ₄ ; Laurent (1975)	Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 2016, 100(6):1149-58.
	208.0	21.6	Butanol-HCl; Porter et al. (1986)	Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 2016, 100(6):1149-58.
	200-300	43.0	-	Livestock Science. 2010, 129(1-3):24-30.
	198.0	-		Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 2003, 16(3):463-72.
	197.0	-		Animal Nutrition. 2016, 2(4):253-61.
	168.0	-		Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 2012, 25(12):1691-700.
	-	145.4	Butanol-HCl; Giner-Chavez et al. (1997)	Livestock Science. 2010, 128(1-3):166-72.
-	81.6	Butanol-HCl; Terrill et al. (1992)	Journal of the Science of Food and Agriculture. 1997, 74:359-68.	
			Journal of the Science of Food and Agriculture. 2004, 84(4):291-4.	

Table 4. Contd.

	-	33.4	-	Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1989, 37(3):712-6.
Mean	250.6	45.1		

DM, Dry matter; CP, Crude protein; CT, Condensed tannins.

absence of an overall effect was shown. The presence of a plant-dependent agro-pedo-climatic effect can be postulated. Some authors have shown a significant soil effect based on fertility and acidity. Low soil fertility or acid soil may lead to an increase in the rate of CT found in *Lotus* (Barry and Duncan, 1984; Kelman and Tanner, 1990). For some authors who have worked on contrasting agro-pedo-climatic conditions, the differences between CT concentrations varied from 70 to 400 g/kg DM, depending on the age of the plant (Muir et al., 2014), and from 50 to 20 g/kg DM, depending on the variety (Kelman and Tanner, 1990).

CT content may also vary with temperature and drought conditions. Lees et al. (1994) found an overall increase of 24% for big trefoil grown at 20 or 30°C. However, the effect of temperature could be age-dependent, as indicated in this same study. Indeed, the difference in temperature-related concentration decreased steadily from 36 to 9% for regrowth ages from 14 to 81 days.

When investigating *Lotus* grown on slightly acidic soils with a low-to-medium phosphorus content, Acuña et al. (2008) reported variations in CT due to water stress and temperature rather than to soil conditions. Similar results were found by Malisch et al. (2016) for sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.).

In this study, the effects of soil acidity and rainfall were mixed. Drought is more pronounced in basic soils than acid soils. It is not excluded that in addition to the problem of acidity, the issue of drought arises. The specific response of *C. cajan*

on CT, compared with the two *Manihots* and *L. leucocephala* may be explained by its higher sensitivity to drought and not to acidity.

Effect of the plant species on the variation of chemical composition

In this study, the species was the main factor of variation for primary and secondary metabolites. According to the results, *C. cajan* and *L. leucocephala*, which are leguminous, are logically richer in N than the two *M. esculenta*. The NDF levels were relatively low compared with grasses because leaves analysed (Minson, 1990; Archimede et al., 2018).

As mentioned by Malisch et al. (2016), although the CT content of the plant is sensitive to external factors, the main factors of variation are of genetic and physiological origin.

In addition, the chemical characteristics of the plants are consistent with those found in the literature (Table 4). Moreover, intra-plant variations was not observed because the biomasses were harvested at similar ages and following the same procedures. The intra-plant variations reported were related to different varieties, or different ontogenetic stages (Malisch et al., 2016).

Effect of the drying and pelleting process on pellet composition

The process to produce the pellets was constituted

by two operations: Drying and pelleting. CT are the components most sensitive to drying. The effect of different drying methods on CT: freeze-drying, sun-drying and oven-drying were first evaluated. In a second step, the type of process on the levels of CP and CT, which are important components from a nutraceutical perspective, was evaluated. In regards to drying, the results showed that oven-drying severely depreciated the CT content of the plants, whereas sun-drying had a more moderate effect when compared with the freeze-dried samples (control). This is a classical result. Indeed, depressive effects are reported only for temperatures above 55°C and for durations longer than 48 h.

Dzowela et al. (1995) and Hove et al., (2003), working on some tropical fodder shrubs, reported depressive effects for drying at 55 and 65 °C, respectively, for 48 h. Muetzel and Becker (2006) dried temperate plants at 60 °C for 2 h and specified that the effect of temperature could be plant-dependent.

Except for *C. cajan*, wherein the decrease was significant but relatively low (13%), pelleting did not have a depressive effect on the CP and CT contents compared with the corresponding values of freeze-dried non-pelleted samples and pellets obtained from freeze-dried plants. This behaviour can be explained by the technical parameters of the pelleting process used. During the pelleting, the temperature reaches 70 °C but the residence time of the plant particles in the apparatus is not sufficient to damage CP and CT. Indeed, since the pelleter has a capacity of 500 kg of forage per

hour, it was estimated that a plant particle stays in the pelleter for less than 1 min.

Conclusion

This study did not show any major effects of agro-pedoclimatic conditions on the variation of the chemical composition of the targeted plants for pelleting. This result can be explained by the absence of major stress to the plant. The main factor of variation was drying. Consequently, under a mild drying condition, like sun-drying under shelter, the main recommendation would be to select forages with CT content above 50 g/kg DM, to ensure post processing nutraceutical properties.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have not declared any conflict of interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was completed with the financial support of INTERREG Caraïbes IV (IEPAC project); FEDER (Agroecotrop project); INRA metaprogramme (GISA Strep project); and other Region Guadeloupe and European funding: FSE, FEADER. The authors thank Tatiana Silou Etienne, Pierre Mulciba and Angebert Nepos for their technical assistance.

REFERENCES

- Acuña H, Concha A, Figueroa M (2008). Condensed tannin concentrations of three *Lotus* species grown in different environments. Chilean Journal of Agricultural Research 68:31-41. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392008000100004>.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1990). Official Methods of Analysis 15th edition. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists.
- Archimede H, Marie-Magdeleine C, Boval M, Sauviant D (2018). Specificities of feeding ruminant livestock in warm areas. INRA feeding system for ruminants. NLD: Wageningen Academic Publishers pp. 375-400.
- Barry TN, Duncan SJ (1984). The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 1. Voluntary intake. British Journal of Nutrition 51:485-91. <http://dx.doi.org/10.1079/bjn19840054>.
- Barry TN, Forss DA (1983). The condensed tannin content of vegetative *Lotus pedunculatus*, its regulation by fertiliser application, and effect upon protein solubility. Journal of the Science of Food and Agriculture 34:1047-56. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2740341004>.
- Bate-Smith EC (1975). Phytochemistry of proanthocyanidins. Phytochemistry 14(4):1107-1113.
- Butler LG, Price ML, Brotherton JE (1982). Vanillin assay for proanthocyanidins (condensed tannins): Modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization. Journal of Agriculture and Food Chemistry 30(6):1087-1089.
- Cei W, Salah N, Alexandre G, Bambou JC, Archimede H (2018). Impact of energy and protein on the gastro-intestinal parasitism of small ruminants: A meta-analysis. Livestock Science 212:34-44.
- Dzowela BH, Hove L, Mafongoya PL (1995). Effect of drying method on chemical composition and *in vitro* digestibility of multi-purpose tree and shrub fodders. Tropical Grasslands 29(4):263-269.
- Frutos P, Hervás G, Ramos G, Giráldez FJ, Mantecón AR (2002). Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. Animal Feed Science and Technology 95(3-4):215-226. [http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00323-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00323-6).
- Gaudin E, Simon M, Quijada J, Schelcher F, Sutrac JF, Lespine A, Hoste H (2016). Efficacy of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) pellets against multi resistant *Haemonchus contortus* and interaction with oral ivermectin: Implications for on-farm control. Veterinary Parasitology 227:122-129.
- Giner-Chavez BI, Van Soest PJ, Robertson JB, Lascano C, Reed JD, Pell AN (1997). A method for isolating condensed tannins from crude plant extracts with trivalent ytterbium. Journal of the Science of Food and Agriculture 74(3):359-68. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199707\)74:3<359:AID-JSFA811>3.0.CO;2-C](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199707)74:3<359:AID-JSFA811>3.0.CO;2-C).
- Hoste H, Martinez-Ortiz-De-Montellano C, Manolaraki F, Brunet S, Ojeda-Robertos N, Fourquaux I, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA (2012). Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. Veterinary Parasitology 186(1-2):18-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.042>.
- Hove L, Ndlovu LR, Sibanda S (2003). The effects of drying temperature on chemical composition and nutritive value of some tropical fodder shrubs. Agroforestry Systems 59(3):231-41.
- Kelman WM, Tanner GJ (1990). Foliar condensed tannin levels in lotus species growing on limed and unlimed soils in South-Eastern Australia. Proceedings of the New Zealand Grassland Association 52:51-4.
- Laurent S (1975). Étude comparative de différentes méthodes d'extraction et de dosage des tannins chez quelques ptéridophytes. Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie 83(4):735-52.
- Lees GL, Hinks CF, Suttill NH (1994). Effect of high temperature on condensed tannin accumulation in leaf tissues of big trefoil (*Lotus uliginosus* Schkuhr). Journal of the Science of Food and Agriculture 65(4):415-21. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2740650408>.
- Mahieu M (2014). Gestion du parasitisme gastro-intestinal des petits ruminants en zone tropicale humide. PhD thesis. France: Université de Lorraine. <https://prodinra.inra.fr/?locale=fr#!ConsultNotice:309333>
- Makkar HPS (1995). Quantification of tannins: a laboratory manual in pasture forage and livestock program. International Centre for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria.
- Makkar HPS (2003). Quantification of tannins in tree foliage. A laboratory manual. FAO/IAEA
- Malisch CS, Salminen JP, Kölliker R, Engström MT, Suter D, Studer B, Lüscher A (2016). Drought effects on proanthocyanidins in sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) are dependent on the plant's ontogenetic stage. Journal of Agricultural and Food Chemistry 64(49):9307-9316. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02342>.
- Minson DJ (1990). 1 - Ruminant production and forage nutrients. In: Forage in Ruminant Nutrition. San Diego, SA: Academic Press; pp. 1-8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-498310-6.50007-9>.
- Mueller-Harvey I, Bee G, Dohme-Meier F, Hoste H, Karonen M, Kölliker R et al (2019). Benefits of condensed tannins in forage legumes fed to ruminants: importance of structure, concentration, and diet composition. Crop Science 59(3):1-25. doi:10.2135/cropsci2017.06.0369
- Muetzel S, Becker K (2006). Extractability and biological activity of tannins from various tree leaves determined by chemical and biological assays as affected by drying procedure. Animal Feed Science and Technology 125(1-2):139-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.05.018>.
- Muir JP, Terrill TH, Kamisetti NR, Bow JR (2014). Environment, harvest regimen, and ontogeny change *Lespedeza cuneata* condensed tannin and nitrogen. Crop Science 54(6):2903-9. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2014.02.0143>.
- Nakamura Y, Tsuji S, Tonogai Y (2003). Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. Journal of Health Science 49(1):45-54
- 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.

- <http://dx.doi.org/10.1111/gfs.12053>.
- Price ML, Van Scovoc L, Bulter LG (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26(5):1214-1218. doi: 10.1021/jf60219a031.
- Porter LJ, Hrstich NI, Chan BG (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25(1):223-230. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94533-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94533-3)
- SAS (2008). *Statistical Analysis System Release 8.01*. SAS Institute INC, Cary, NC.
- Santos FO, Cerqueira APM, Branco A, Batatinha MJM, Botura MB (2019). Anthelmintic activity of plants against gastrointestinal nematodes of goats: a review. *Parasitology* 146(10):1233-1246.
- Terrill TH, Rowan AM, Douglas GB, Barry TN (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(3):321-329.
- Terrill TH, Mosjidis JA, Moore DA, Shaik SA, Miller JE, Burke JM, Muir JP, Wolfe R (2007). Effect of pelleting on efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats. *Veterinary Parasitology* 146(1-2):117-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.005>.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74(10):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(1-3):116-39.

Annexe 2. Minatchy N., Marie Magdeleine C., Calif V., Periacarpin F., Godard X., and Archimède H. Impact of pelleting on degradation of *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* and *Cajanus cajan* foliage.

(Soumis)

Impact of pelleting on rumen degradation of *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* and *Cajanus cajan* foliage.

Nathalie. Minatchy¹, Carine. Marie Magdeleine¹, Valerius. Calif¹, Fred. Periacarpin², Xavier. Godard²
Harry. Archimède^{1*}

¹INRA, UR143 Unité de Recherches Zootechniques, Domaine Duclos Prise d'eau, F-97170 Petit-Bourg, Guadeloupe

²INRA, UE1294 Plateforme Tropicale de recherche sur l'Animal, Domaine Duclos Prise d'eau, F-97170 Petit-Bourg, Guadeloupe

* Corresponding author. Tel.: +590-255933; fax: +590-255936.

E-mail address: Harry.Archimede@inra.fr

Abstract

Supplementation of low- or medium-quality forage (e.g. late regrowth grass or crop residue), characterised by low nitrogen concentrations and high levels of lignified fibre, with a protein-rich plant (e.g. legumes, protein-rich foliage) is a cost-effective way to improve the feed value of ruminant diets. The protein value of these supplements is influenced by their content and type of condensed tannins as well as their technological treatment. The objective of this study was to evaluate the effective degradability of crude protein (CP) in *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* and *Cajanus cajan* foliage in green and pelleted form.

The degradability kinetics *in sacco* of the Dry Matter (DM), Neutral Detergent Fibre (NDF) and CP components of green foliage vary according to the basal diet consumed by the ewes. Our results show there was a high variability in the effective degradability of proteins from foliages regardless of their protein content. The effective DM degradability in green vs. pelleted *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* and *Cajanus cajan* foliage were 43.6 vs. 56.0%, 65.1 vs. 66.6% and 38.7 vs. 47.1%. the corresponding values for the CPs were respectively: 44.0 vs. 64.5%, 72.8 vs. 65.0% and 49.1 vs. 48.0%, respectively. The effective CP degradability increased ($P < 0.05$) along the hierarchy *Leucaena leucocephala*, *Cajanus cajan* and *Manihot esculenta*. The effective CP degradability increased ($P < 0.05$) with pelleting for *Leucaena leucocephala*, no difference was observed with *Cajanus cajan* and a decrease ($P > 0.05$) was seen for *Manihot esculenta*.

Our results show there is a high variability in the effective degradability of proteins from protein-rich foliage. Pelleting is neutral or has a favourable effect on this protein value. Further work is needed to assess the intestinal digestibility of these proteins, which could be affected by the presence of the condensed tannins that are found at high levels in these resources.

Keywords: Non-Conventional Resources; Protein value, Nylon bag degradation; Pelleting

1. Introduction

Supplementation of low- or medium-quality forage (e.g. late regrowth grass or crop residue), characterised by low nitrogen concentrations and high levels of lignified fibre, with a protein-rich plant (e.g. legumes, protein-rich foliage) is a cost-effective way to improve the feed value of ruminant diets. The protein-rich plant provides the nutrients (fermentable nitrogen, minerals and vitamins) required for the growth and fibrolytic activity of rumen microorganisms. The benefits associated with the amount of fermentable nitrogen are due to the reduced delay in the digestion of fibre (Niderkorn and Baumont, 2009).

Because of the increasing resistance of parasites to anthelmintic drugs, ongoing integrated control strategies are being implemented, combining the genetic selection of resistant and resilient animals with pasture management, adapted nutrition and anthelmintic plants (Charlier *et al.*, 2018). There is a wide diversity of Non-Conventional Resources rich in protein (NCR) that can be used for feeding ruminants (Naumann *et al.*, 2017), some of which are nutraceutical plants that have positive effects on both animal nutrition and health. The nutraceutical value of these NCR varies with their primary (e.g. carbohydrates and amino acids) and secondary metabolite (e.g. tannins) content.

As for classical forages, farmers must provide these nutraceuticals year-round, and they can be preserved along with hay, silage, or pellets. The high buffering capacity and low concentration of fermentable carbohydrates in protein-rich foliage limit their suitability for preservation as silage, as their quality is not guaranteed. Technological innovations, like pelleting, could allow a greater degree of appropriation of the nutraceuticals at the scale of the farm (Terrill *et al.*, 2007). Pelleting is also a method of conservation for certain seasonally available crop co-products. However, pelleting could have a depressive effect on the nutraceutical value of foliage by destroying those secondary metabolites known for their anthelmintic activity and by modifying proteins that have an indirect effect on helminth resistance and resilience and contribute to animal nutrition.

In the literature, to our knowledge, there are no data on the impact of pelleting on the degradation kinetics of proteins of foliages rich in condensed tannins. The main objective of this study was to evaluate the effect of pelleting on protein effective degradability of 3 Non-Conventional Resources rich in protein using their fresh form as control.

2. Material and methods

2.1. Location

The research was carried out at the animal experimental station of the National Agricultural Research Institute of the French West Indies, Guadeloupe (latitude 16°16'N, longitude 61°30'). Average temperatures range from 21 °C to 31 °C, and rainfall on the experimental site is 3000 mm a year. The foliage was collected in the dry and humid area of Guadeloupe.

2.2. Animal and experimental design

Nylon bag degradation of feed experiments in sheep were conducted in two steps. Trial 1 was conducted to determine the basal diet of the sheep to maximise the digestion of protein-rich foliage. In Trial 2, the degradation of the three protein-rich foliage types was studied using sheep fed with the basal diet selected using the data from Trial 1.

Trial 1

Four ewes, weighing an average of 50 kg, were randomly assigned to four basal diets during two experimental periods: A) 1500 g of 21-days regrowth *Digitaria decumbens* hay + 0 g alfalfa pellets; B) 1300 g of 21-days regrowth *Digitaria decumbens* hay + 200 g alfalfa pellets; C) 900 g of 21-days regrowth *Digitaria decumbens* hay + 600 g alfalfa pellets; D) 700 g of 21-days regrowth *Digitaria decumbens* hay + 800 g alfalfa pellets. The ewes' basal diet was changed at each period. There was a 21-day adaptation to the diets before the introduction of the nylon bags into the rumen. Two weeks of transition were included between the two experimental periods. Nylon bags containing *Glyricidia sepium* leaves were incubated in the rumen at the following times: 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hours. *Glyricidia sepium* was used as a model plant on which we had information (Archimède *et al.* 2001). Twenty-four nylon bags, three per incubation time, were prepared for each of the four sheep. The nylon bags were 10 x 5 cm, with a pore size of 50 x 50 mm and were filled with 15 g of fresh material, the equivalent of about 3 g of dry product. *Glyricidia sepium* leaves were previously cut with scissors to a particle size of 1.5–2 mm. After removal from the rumen, bags were washed under a cold water tap and stored at 4 °C. At the end of each period, the bags were washed in a machine, 4 cycles for 5 minutes,

and the water was changed after each cycle. The bags were then washed in an ultrasonic bath to remove the bacteria attached to the feed particles. After washing, the bags were dried in an oven at 45 °C for 2 days, then at 60 °C for 4 days.

Trial 2

Foliage (leaves and young stem) of *Cajanus cajan*, *Manihot esculenta* and *Leucaena leucocephala*, aged 12, 6 and 8 months, respectively, were harvested. For each plant, we harvested 30 to 40 kg of foliage. A fraction of the foliage, about 3 kg, was kept green, chopped manually with scissors to a size of 1.5 to 2 mm and frozen (-20 °C) awaiting use. The other part of the foliage was sun-dried under shelter (at 25 to 35 °C) for 3 to 4 days. The dry product was sieved through a 3-mm screen and then 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 pellets were then manually crushed in a mortar. For each of the three foliage types and the two treatments (green *versus* pellet), 72 nylon bags were prepared. These bags were filled with 15 g of fresh material or 3 g of dry product. During three consecutive weeks, one week per foliage, the nylon bags were incubated in the rumen of three ewes for the following times: 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hours. Green and dry foliage were included each time. On their removal from the rumen, the nylon bags were treated as in Trial 1. The bags were weighed, then opened and the foliage residues grouped (into three 3 bags) according to animal and incubation time for chemical analyses.

2.3. Chemical analysis

Chemical analyses were performed on feeds and nylon bag foliage residue after grinding to 1 mm. Organic matter (OM) and N analyses were performed according to AOAC (Methods 923.3 and 992.15, respectively) (AOAC, 1990) by ashing at 550 °C for 6 h for OM and by the Dumas method for N. Crude protein (CP) was calculated as $N \times 6.25$. Cell wall components [neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF) and acid detergent lignin (ADL)] in diet and faeces were determined using a sequential procedure (Methods 200.04 and 973.18, respectively, for NDF and ADF + ADL) (AOAC, 2006). Condensed tannins (CTs) were extracted in an ultrasonic bath with 70% (vol/vol) aqueous acetone solution (Giner-Chavez *et al*, 1997) and isolated with Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). CT content was determined using the vanillin-H₂SO₄ method. A 70% (vol/vol) H₂SO₄ solution containing 1% vanillin (wt/vol) was added to the methanolic extract of the plant, and the absorbance was measured at 500 nm. Concentrations were determined using the CT of the plants studied as the standard.

2.4. Calculations and statistical analyses

The kinetics of DM, CP, NDF and ADF degradations in the rumen were determined as described by Ørskov and McDonald²³. All data were fitted to the exponential equation $D = a + b(1 - e^{-ct})$, where D is degradation after t hours; a is the rapidly degradable fraction; b is the slowly degradable fraction and c the fractional degradation rate. Values of a, b and c were calculated for each feed using the nonlinear procedure of the Statistical Analysis Systems Institute (SAS, 2004). The effective degradabilities (ED) of DM and CP in the rumen were calculated as $ED = a + bc/(c + k)$, assuming that the rate of particulate outflow k from the rumen was 3 % h⁻¹. The undegradable fraction U was calculated as $U = 100 - (a + b)$,

Statistical analyses were performed using the mixed procedure of SAS (24). Regarding degradability of DM, CP and NDF of *Glyricidia sp* in Trial 1, the model included basal diet (n = 4) and period (n = 2) as fixed effects and the animal as a random effect. Differences between basal diets were analysed using lsmeans. Regarding the parameters a, b, c, U and ED in Trial 2, the model included feed (n = 3) and period (n = 3) as fixed effects and the animal as a random effect. Differences between diets were analysed using lsmeans.

3. Results

3.1. Trial 1

The OM, CP, NDF, ADF and ADL content of the *Digitaria decumbens* hay were 910, 120, 740, 470 and 70 g/kg DM. The equivalent values for alfalfa were 900, 185, 430, 300 and 80 g/kg DM. All the feed supplied was consumed by the animals. Consequently, the amounts of CP in the basal diet were 120, 129, 146 and 155 g/kg for the diets A, B, C and D respectively. The chemical composition of the experimental feeds is presented in Table 1.

The results in Table 2 indicate that the basal diet affected the levels of DM, NDF and CP degradation of *Glyricidia*. Concerning the DM component, the effect of the basal diet appears from 6 hours. For a given time, the response to increasing amounts of alfalfa was curvilinear, with an optimum of around 200 g of alfalfa in the diet, corresponding to approximately 130 g CP/kg DM in the basal diet. The basal diet had a similar effect on the degradation of the CP and NDF components. Nevertheless, the differences appeared at 12 hours for CP and 24 hours for NDF. The correlation between CP and NDF degradation is strong: $r = 0.973$ ($P < 0.001$).

Table 1. Chemical composition of *Glyricidia sepium* leaves and *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* and *Cajanus cajan* foliage (DM basis).

Item	Plant species			
	<i>Manihot esculenta</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>Cajanus cajan</i>	<i>Glyricidia sepium</i>
OM (g/kg DM)	899	910	922	914
NDF (g/kg DM)	433	378	511	456
ADF (g/kg DM)	255	189	356	299
ADL(g/kg DM)	112	91	189	147
CP (g/kg DM)	189	262	217	224
Ash (g/kg DM)	101	90	78	86
CT (g/kg DM)	66	157	170	39

OM, organic matter; NDF, neutral detergent fibre; ADF, acid detergent fibre; ADL, acid detergent lignin; CP, crude protein; CT, condensed tannins.

Table 2. Effect of level of Alfalfa pellet in the basal diet on nylon bag rumen degradation of *Glyricidia sepium* leaves (Trial 1)

Alfalfa in diet (g/d)	Incubation time (h)							
	1	3	6	12	24	48	72	96
Dry Matter								
0	34.0a	35.5a	39.3ab	46.5a	62.8a	71.2a	73.1a	73.8a
200	33.8a	36.3a	40.3a	49.6b	64.4a	72.5a	74.3a	74.8a
600	33.3a	35.5a	38.0b	44.9c	62.3a	69.8b	71.8b	72.3b
800	32.8a	35.0a	37.5b	43.7c	58.1c	68.2b	68.7c	69.2c
SEM	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85
<i>P</i>	0.4058	0.2585	0.0201	<0.0001	<0.0001	0.0005	0.0022	<0.0001
Neutral Detergent Fibre								
0	3.3	3.8	10.3	19.2ac	37.6ac	50.1	53.4	54.7
200	2.8	2.3	8.7	24.0ab	42.7a	53.4	56.7	57.9
600	5.2	7.3	7.9	18.4ac	40.0ac	51.2	54.5	55.8
800	3.4	4.7	8.5	16.4c	35.3c	52.5	55.7	54.2
SEM	2.51	2.51	2.51	2.51	2.51	2.51	2.51	2.51
<i>P</i>	0.4998	0.1625	0.5038	0.0347	0.0378	0.3538	0.3552	0.2962
Crude Protein								
0	13.6a	19.6a	24.5a	35.6a	59.4a	74.3a	76.5a	78.4a
200	16.7a	20.4a	26.6a	39.9b	62.9b	75.7a	79.0a	80.2a
600	15.1a	19.7a	21.7b	32.4a	57.8a	70.3b	74.5c	77.3b
800	14.0a	19.0a	22.3b	29.6c	50.4c	67.3c	68.7c	72.0c
SEM	1.87	1.87	1.87	1.87	1.87	1.87	1.87	1.87
<i>P</i>	0.1638	0.4082	0.0047	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

3.2. Trial 2

There were significant differences in the DM degradation kinetics of the three green foliages (Figure 1). The highest values were observed with *Manihot esculenta* and the lowest with *Cajanus cajan*. The trend was different for the CP component, which remained higher for *Manihot esculenta* and lower for *Leucaena leucocephala* (Figure 2). The CP degradation kinetics of *Leucaena leucocephala* and *Cajanus cajan* were quite different: relatively slow during the first 6 hours and then accelerated for *Cajanus cajan*, while the opposite dynamic was observed for *Leucaena leucocephala*.

Table 3 summarises the foliage degradation kinetic parameters. Considering the DM component, the soluble fraction of the green foliage was lower for *Cajanus cajan* ($P < 0.05$), whereas the differences between *Manihot esculenta* and *Leucaena leucocephala* were not significant. The potential digestible DM fraction was higher ($P < 0.05$) for *Manihot esculenta*, whereas the differences between *Cajanus cajan* and *Leucaena leucocephala* were not significant. The potentially indigestible DM fraction increased ($P < 0.05$) in the following order: *Manihot esculenta*, *Leucaena leucocephala* and *Cajanus cajan*. The highest rate of DM degradation was observed for *Manihot esculenta* ($P < 0.05$) and the lowest for *Leucaena leucocephala* ($P < 0.05$). The effective DM degradability increased ($P < 0.05$) with the hierarchy *Cajanus cajan*, *Leucaena leucocephala* and *Manihot esculenta*. Concerning the CP fraction of green foliage, the tendencies observed were different than those of dry matter (Table 3). The amount of rapidly degradable CP fraction between *Leucaena leucocephala* and *Manihot esculenta* was similar, whereas a lower value ($P < 0.05$) was observed for *Cajanus cajan*. The CP slow degradation rate was similar between the foliage types. The fractional CP degradation rate increased ($P < 0.05$) following the hierarchy *Leucaena leucocephala*, *Cajanus cajan* and *Manihot esculenta*. The effective CP degradability increased ($P < 0.05$) following the hierarchy *Leucaena leucocephala*, *Cajanus cajan* and *Manihot esculenta*.

The effect of pelleting was heterogeneous between the three foliages (Figure 1 and 2). With regard to DM, pelleting had a low impact on *Manihot esculenta* degradation, unlike for *Cajanus cajan* and *Leucaena leucocephala*. Except for *Leucaena leucocephala*, in which no significant effect was observed, the soluble DM fraction increased ($P < 0.05$) with pelleting. Conversely, the slowly degradable DM fraction decreased ($P < 0.05$) with pelleting, except for *Leucaena leucocephala*. Pelleting had no significant effect on the foliage ($P < 0.05$), except for *Leucaena leucocephala*, for which the fractional DM degradation rate increased ($P < 0.05$). The effective DM degradability increased ($P < 0.05$) with pelleting, except for *Manihot esculenta*, for which no significant difference was observed.

Figure 1. Rumen Dry matter degradation kinetics of green or pelleted *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* and *Cajanus cajan* foliage

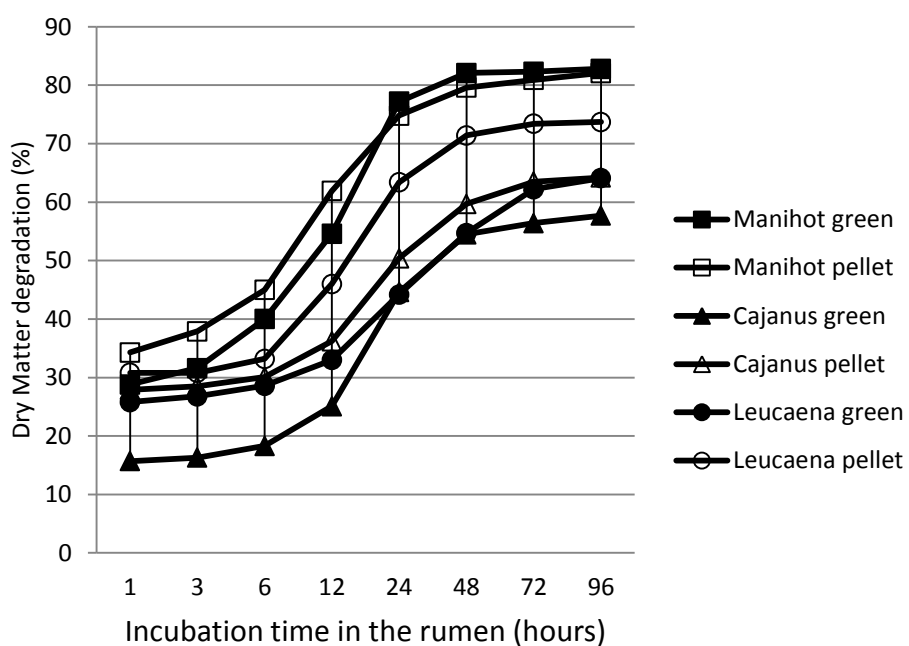


Figure 2. Rumen Crude Protein degradation kinetics of green and pelleted *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* and *Cajanus cajan* foliage

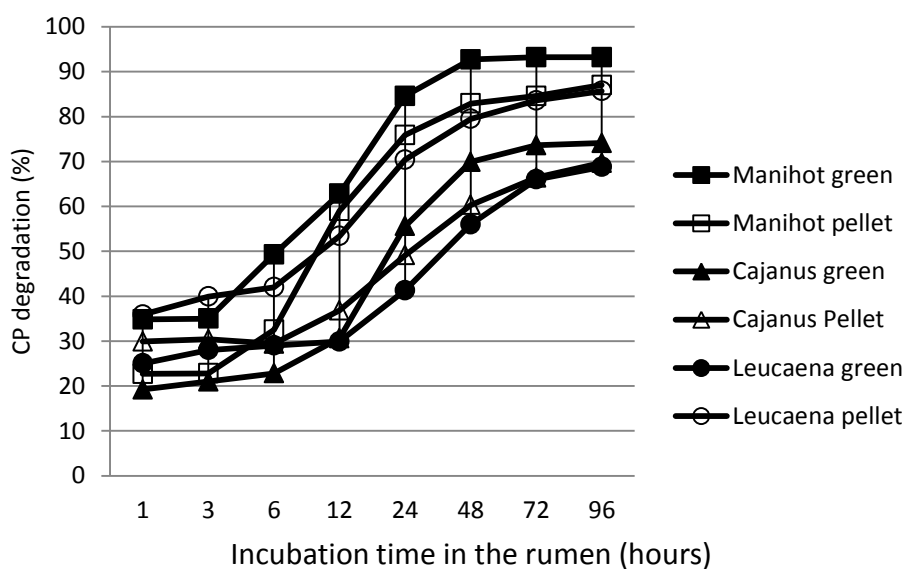


Table 3. Main parameters of the rumen degradation kinetics of Dry matter (DM) and Crude protein (CP) of *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* and *Cajanus cajan* (Trial 2).

	<i>Leucaena leucocephala</i>		<i>Manihot esculenta</i>		<i>Cajanus cajan</i>		SE	P-value		
	green	pellet	green	pellet	green	pellet		specie	treatment	Species* treatment
DM Rapidly degradable fraction (a)	23.4a	24.2a	21.2 a	28.1b	10.5c	24.0a	1.08	<0.0001	<0.0001	<0.0001
DM Slowly degradable fraction (b)	48.6a	50.8ac	62.7b	53.6c	49.4a	42.4d	1.39	<0.0001	0.0021	0.0048
DM Fractional degradation rate (c)	2.3a	5.3b	7.0c	7.7c	4.0d	3.6d	0.47	<0.0001	0.0192	0.0147
Effective DM degradability (ED)	43.6a	56.0b	65.1c	66.6c	38.7d	47.1e	1.08	<0.0001	<0.0001	0.0017
DM undegradable fraction (U)	28.0a	25.1a	16.1b	16.0b	40.0c	33.6d	1.31	<0.0001	0.0513	0.0237
CP Rapidly degradable fraction (a)	23.4a	31.9b	25.5a	14.6c	13.2a	27.4b	2.32	0.0126	0.0614	0.0008
CP Slowly degradable fraction (b)	68.0 a	54.5 b	68.0 a	71.6a	65.0a	48.6 b	4.28	0.0351	0.0303	0.0837
CP Fractional degradation rate (c)	1.5a	4.6 b	6.9 c	7.1 c	3.7 d	2.2 a	0.35	<0.0001	0.0509	0.0002
Effective CP degradability (ED)	44.0a	64.5b	72.8c	65.0b	49.1d	48.0d	1.07	<0.0001	0.0013	<0.0001
CP undegradable fraction (U)	8.6a	13.6ab	6.5a	13.5b	21.8bc	24.0c	3.64	0.0097	0.1369	0.7905

The model $ED = a + bc/(c + k)$ of Ørskov and McDonald (1979) was used with $k = 3\%/hour$

The trends for the different CP components differed; the rapidly degradable fraction increased ($P < 0.05$) with pelleting of *Leucaena leucocephala* and *Cajanus cajan* but decreased ($P < 0.05$) for *Manihot esculenta*. The slowly degradable CP fraction decreased ($P < 0.05$) with pelleting of *Leucaena leucocephala* and *Cajanus cajan*, whereas no significant difference was observed for *Manihot esculenta*. Pelleting increased ($P < 0.05$) the fractional degradation rate of *Leucaena leucocephala*, whereas no difference was reported with *Manihot esculenta*, and a decrease was observed for *Cajanus cajan*. The effective CP degradability increased with pelleting for *Leucaena leucocephala*, whereas no difference was observed with *Cajanus cajan*, and a decrease was reported for *Manihot esculenta*.

Independent of the foliage and treatment type, there was a very strong correlation between dry matter and crude protein degradation ($r < 0.97$; $P < 0.0001$).

4. Discussion

General consideration

The main objective of this study was to evaluate the effects of pelleting on the protein value (assessed by the CP effective degradation) of three Non-Conventional Resources rich in protein (*Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* and *Cajanus cajan* foliage). These resources represent three types of forage found in polyculture livestock systems (energy food crop, protein food crop and forage resources used elsewhere, such as fencing plant). Initially, it was necessary to determine the basic ration for the optimal evaluation of the protein value of these foliage types. For the comparison of green resources versus pellets, we wanted to be as close as possible to the characteristics of the feed ingested by ruminants, hence, we chose to finely cut the green product (rather than grind it after freeze-drying for example); whereas, the pellets were crushed before being introduced into nylon bags. Therefore, this comparison of green foliage versus granulated includes a comparison of finely chopped green feed versus dried and ground feed. The results of Trial 1 confirmed that the basal diet had a significant effect on the data obtained by the *in sacco* degradability method. Trial 2 confirmed there was variability in the protein values of protein-rich foliage depending on the resource and the variable effect of pelleting.

Effect of basal diet on nylon bag kinetics of foliage degradation

The main objective of Trial 1 was to select the optimum diet to evaluate our NCR rich in protein and fibre. Notably, large differences in CP degradability among feeds are reported in the literature due to the basal diet of the cannulated animal (Madsen and Hvelplund, 1985), tested feed, processing methods and particle size (Batajoo and Shaver, 1998). Dietary CP differs based on criteria such as solubility in the rumen, and structural differences, such as cross linkages between proteins and carbohydrates

(Kirkpatrick and Kennely, 1987). These characteristics influence the accessibility of protein to proteolytic enzymes, making some feeds resistant to ruminal microbial degradation. Part of the nitrogen fraction of roughage is protected from degradation by fibre. The latter must be fermented by rumen microbes for the protein to be accessible (Lindberg, 1985; Nocek, 1985). The degradation of CP in feed is affected by its chemical and physical properties, its residence time in the digestive compartment and the composition and activity of microbes (i.e. proteolytic bacteria and protozoa) (Van Soest and Demeyer, 1985). Our results show a curvilinear increase in nitrogen degradation for *Glyricidia* sp, with the amount of alfalfa in the basal diet having an effect on nylon degradation of the feed. In *Glyricidia* sp, like in all roughage, the larger CP fraction is associated with fibre. The variation in CP degradation is probably related to rumen fibrolytic activity, considering the very strong correlation between the degradation of CP and NDF fractions of *Glyricidia*. However, the originality of this trial lies in the nature of the basal diet, which is rich in nitrogen but low in soluble carbohydrate. The increase in the latter leads to increased rumen acidity, which, consequently, reduces the fibrolytic activity and causes changes in CP solubility (Loerch et al, 1983). It is likely that the variation in acidity in this trial was low because supplementation of grass with legume-rich roughage has a minimal effect on rumen acidity. As an example, Archimède et al. (2001) reported a rumen pH range of 7.0 to 6.3, independent of the sampling time, with a mixed diet of *Digitaria decumbens*/*Gliricidia sepium* and with *Gliricidia* contributing to 0 to 75% of the ingested diet. In this range, the fibrolytic activity can be affected, while the optimal pH of rumen proteolytic enzymes ranges from 5.5 to 7.0 (Kopency and Wallace, 1982). The depressed degradation of fibre can be explained by increased competition between rumen bacteria for essential nutrients, which is unfavourable for cellulolytic microorganisms unable to metabolise and reproduce at a sufficient rate (Mould and Ørskov, 1983).

Comparison of protein values of *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* and *Cajanus cajan*

Although the CP content of *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* and *Cajanus cajan* are relatively similar, our results show large differences in CP degradation between the foliage types. Effective CP degradation was higher for *Manihot esculenta* and lower for *Leucaena leucocephala*. The higher ED of *Manihot esculenta* compared to the other 2 foliage is related to a potentially higher digestible fraction and a faster rate of degradation of the latter. On the other hand, the lower degradation of *Cajanus cajan* compared to the other 2 foliage is explained by a potentially lower digestible fraction and a lower degradation rate of the latter. CP effective degradability hierarchy is an indicator of the protein value of the resources if there are no differences or even inversions in the intestinal digestibility of the proteins. As previously mentioned, fibre, significantly higher in *Cajanus cajan*, is a barrier to protein degradation. For all foliage, the slow degradation of CP during the first 12 hours is an illustration of the link between

the CP and fibre. This link is also suggested by the strong statistical correlation between the degradation of dry matter and protein. Fibre insoluble protein complex requires a longer time for degradation than the intracellular nitrogen, which is readily available (Aufrère et al, 2000). The CP degradation is also closely related to the level of protection condensed tannins (CTs) provide to the proteins. CP effective degradability of foliage is related to the proportion of soluble and insoluble degradable fractions and the presence of CTs (Naumann et al, 2017). The general tendency in the literature was to propose the 5% CT limit value to avoid negative impacts on protein degradation, but the CT and protein profiles must be taken into account (Naumann et al, 2017). Indeed, a binding is formed between proteins and condensed tannins (protein-CT), the efficiency of which depends on the structure of both the CT and the protein. Unpublished results from Minatchy *et al* (2019) show differences in the CT types of *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* and *Cajanus cajan*. The protein-CT binding is highly specific and would be a function of the polarity of the CT as well as the protein (Naumann et al, 2017). Consequently, the prediction of CP digestion from CT-protein interactions is difficult because protein types and subsequent amino acid composition, as well as in structural chemistry and types of CT may be highly variable with feeds (Naumann *et al*, 2017). Our results could partly illustrate this variability of the CT of protein profile of the foliages. CTs, which are relatively scarcer in *Manihot esculenta* but similar for *Leucaena leucocephala* and *Cajanus cajan*, could explain the differences in effective degradation between the experimental foliages. CP degradability values found in this trial for *Manihot esculenta* are similar to those published by other authors (Miranda *et al.* 2012; Oni *et al*, 2010). However, Oni *et al.* (2010) found significant differences between the *Manihot esculenta* varieties, and our data on *Leucaena leucocephala* are lower than those reported by Miranda *et al.* (2012). To our knowledge, there are no published data on the *in sacco* degradation of *Cajanus cajan* CP. However, the degradability of DM in our study is a little higher than that reported by Buthelezi *et al.* (2019). *Cajanus cajan* is distinguished by the lower solubility of its protein as well as the higher indigestible fraction. The relatively low solubility of *Cajanus cajan* protein could be a handicap to its use as a source of fermentable nitrogen to supplement protein-deficient forages, unlike the other foliage types.

Effect of pelleting on protein value of *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* and *Cajanus cajan*

Generally, pelleting of conventional feed increases the rumen degradability of the protein. Oyaniran *et al.* (2018) found a positive effect for pelleting on DM degradability of tropical legume foliage, but no data were published on the CP component. The differences we observed in the CP component of the foliage types may be partly related to the nylon bag method and partly to the pelleting technology, which

involves drying, grinding and warming. Unpublished results (Minatchy *et al.* 2019) on the impact of the same pelleting process on the chemical composition of these same foliage indicate that only CT would be affected with an average reduction of 30% in CT content. As a result, the presence of the latter was high enough to partially protect the CP from microbial digestion. Concerning the nylon bag method, on average, particle size was larger with the green feed compared to the pelleted feed. However, in this experiment, the grinding prior to pelleting resulted in an average particle size that was coarse enough to limit material loss through the pores of the nylon bags. It is likely the finer particle size of the crushed pellet introduced into the bags increased the specific surface area of the feed and, consequently, promoted both cellulolytic and proteolytic enzymatic digestion. This could explain the higher effective degradability observed with *Leucaena leucocephala* pellets compared to fresh foliage. The absence of a pelleting effect on *Cajanus cajan* can be explained by the stronger protein-fibre bonds with a higher fibre concentration. Similarly, the higher levels of tannin, and, possibly, their nature, constitute, together with the fibre, a strong enough barrier to counteract the positive effect of increasing the specific surface area of the particles for enzymatic activity. We have no explanation for the decrease in CP effective degradability with pelleted *Manihot esculenta*, especially as this result seems contradictory to that recorded for dry matter.

Conclusions

Our results show there is a high variability in the effective degradability of proteins from non-conventional resources. Pelleting is neutral or has a favourable effect on this protein value. Further work is needed to assess the intestinal digestibility of these proteins, which could be affected by the presence of the condensed tannins that are found at high levels in these resources.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest

Acknowledgements

The authors would like to thank Tatiana Silou Etienne, Yoan Felicité, Christian Deloumeau, Claude Barbier and Frederic Pommier for their technical assistance.

References

- AOAC. Official Methods for Analysis. Association of Official Analysis Chemists, Gaithersburg, MD, USA. 1990.
- AOAC. Official Methods for Analysis. Association of Official Analysis Chemists, Gaithersburg, MD, USA. (2006).
- Archimède H, Dulorme M, Tournebize R, Saminadin G, Periacarpin F, Xandé A. The effects of Gliricidia supplementation on intake and digestion of a *Digitaria decumbens* hay by black belly sheep. J Agric Sci Camb 2001; 137: 105-112.
- Aufrère J, Graviou D, Baumont R, Detour A, Demarquilly C. Degradation in the rumen of proteins from fresh Lucerne forage in various stages of growth and conserved as silage or hay. Ann Zootech 2000; 49: 462-474.
- Batajoo KK, Shaver RD. In situ dry matter, crude protein, and starch degradability's of selected grains and by-product feeds. Anim Feed Sci Technol 1998: 71; 165-176.
- Buthelezi LS, Mupangwa JF, Muchenje V, Nherera-Chokuda FV. Influence of drying technique on chemical composition and ruminal degradability of subtropical *Cajanus cajan* L. Animal Nutrition. 2019: 5: 95-100.
- Charlier J, Thamsborg SM, Bartley D, Skuce PJ, Kenyon F, Geurden T, et al. Mind the gaps in research on the control of gastrointestinal nematodes of farmed ruminants and pigs. Transbound Emerg Dis 2018; 65(1): 217–234.
- Giner-Chavez BI, Van Soest PJ, Robertson JB, Lascano C, Reed JD, Pell AN. A method for isolating condensed tannins from crude plant extracts with trivalent ytterbium. J Sci Food Agric 1997; 74(3): 359-368.
- Kirkpatrick BK, Kennely JJ. In situ degradability of protein and dry matter from single protein sources and from a total diet. J Anim Sci 1987; 65: 567-576.
- Kopency J, Wallace RJ. Cellular location and some properties of proteolytic enzymes of rumen bacteria. Appl Environ Microbiol 1982 : 43 ; 1026-1033.
- Lindberg JE. Estimation of rumen degradability of feed proteins with the in sacco technique and various in vitro methods: a review. Acta Agric Scand 1985: 25 (Suppl.); 64-97.

Loerch SC, Berger LL, Gianola D, Fahey GC Jr. Effects of dietary protein source and energy level on in situ nitrogen disappearance of various protein sources. *J Anim Sci* 1983; 56: 206-216.

Miranda LF, Rodriguez NM, Pereira ES, de Queiroz AC, Sainz RD, Pimentel PG, Neto MMG. Chemical composition and ruminal degradation kinetics of crude protein and amino acids, and intestinal digestibility of amino acids from tropical forages. *R Bras Zootec* 2012 ; 41 (3) : 717-725.

Mould FL, Ørskov ER. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen micro flora of sheep offered either hay or concentrate. *Anim Feed Sci Technol* 1983; 10: 1-14.

Madsen J, Hvelplund T. Protein degradation in the rumen. A comparison between in vivo, nylon bag, in vitro and buffer measurements. *Acta Agric Scand* 1985; 25 (Supl.):103-124.

Naumann HD, Tedeschi LO, Zelle WE, Huntley NF. The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future *directions*. *R Bras Zootec* 2017; 46(12) : 929-949.

Niderkorn V, Baumont R. Associative effects between forages on feed intake and digestion in ruminants. *Animal* 2009; 3 (7): 951–960.

Nocek JE. Evaluation of specific variables affecting in situ estimates of ruminal dry matter and protein digestion. *J Anim Sci* 1985; 60: 1347-1358.

Oni AO, Onwuka CFI, Arigbede OM, Oni OO, Anele UY, Yusuf KO, Oduguwa BO, Onifade OS.. Chemical composition and in sacco degradability of four varieties of cassava leaves grown in Southwestern Nigeria in the rumen of sheep. *Trop Anim Health Prod* 2010; 42: 1385–1393.

Ørskov ER, Mc Donald I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J Agric Sci Camb* 1979; 92: 499-503.

Oyaniran DK, Ojo VOA, Aderinboye RY, Bakare BA, Olanite JA. Effect of pelleting on nutritive quality of forage legumes. *Livest Res Rural. Dev* 2018; 30 (4).

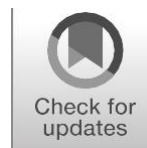
SAS. SAS Language Guide for Personal Computers, Version 9.1. SAS Institute, Cary, NC, USA. 2004.

Terrill TH, Mosjidis JA, Moore DA, Shaik SA, Miller JE, Burke JM et al. Effect of pelleting on efficacy of *sericea lespedeza* hay as a natural dewormer in goats. *Vet Par* 2007; 146: 117-122.


Van Nevel CJ, Demeyer DI. Manipulation of rumen fermentation. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Ed. Hobson, P.N. Elsevier Science Publishers, London and New York. pp 387-443 (1988)

Annexe 3 : Minatchy, N. Marie-Magdeleine, C., Calif, V., Félicité, Y., Periacarpin, F., Deloumeau, C., Pommier. F., Archimède, H. (2019). *Dichanthium* hay combined with green cassava foliage or pelleted cassava foliage as fed for Black Belly rams. Tropical Animal Health and Production. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02045-3>

Publié par Tropical Animal Health and Production – Août 2019



Dichanthium hay combined with green cassava foliage or pelleted cassava foliage as fed for Black Belly rams

Nathalie Minatchy¹ & Carine Marie-Magdeleine¹ & Valériuse Calif¹ & Yoan Félicité¹ & Fred Periacarpin² & Christian Deloumeau² & Frederic Pommier² & Harry Archimède¹ 

Received: 21 March 2019 / Accepted: 19 August 2019

Springer Nature B.V. 2019

Abstract

Intake, digestion and nitrogen retention were measured in fifteen 1-year-old Black Belly rams that had an average weight of 35.3 (± 1.59) kg and that consumed mixed diets. Diets consisted of old *Dichanthium* spp. hay distributed ad libitum, combined with 500 g (dry matter basis) of green or pelleted cassava foliage. Alfalfa pellets were used as a control for foliage supplement. The experiment was run in a 3 \times 3 Latin square design. Total dry matter intake was lower ($P < 0.05$) with the green foliage cassava diet compared with the alfalfa pellet diet. Differences were not significant ($P < 0.12$) with the green cassava foliage diet compared with the cassava foliage pellet diet. Total tract digestion of organic matter, crude protein and cell wall components in cassava green foliage and cassava foliage pellet diets were significantly lower than in the alfalfa diet. Crude protein total tract digestion was similar for cassava green foliage and cassava foliage pellet diets, while fibre digestion was lower with cassava green foliage diets. Retained nitrogen was significantly higher with the alfalfa diet compared with cassava diets—between which there were no differences. Urinary nitrogen excretion was similar between all diets. In conclusion, pelleting does not decrease the feed value of cassava foliage, but this value is nevertheless lower than the feed value of alfalfa.

Keywords Cassava foliage · Non-conventional resources · Ruminant · Tannin · Tropical

Abbreviations

ADF	Acid detergent fibre
ADG	Average daily gain
DM	Dry matter
CP	Crude protein
CT	Condensed tannins
HA	<i>Dichanthium</i> hay + alfalfa pellet
HC _p	<i>Dichanthium</i> hay + cassava foliage pellet
HC ₁	<i>Dichanthium</i> hay + green cassava foliage
N-NH ₃	Ammonia in rumen liquid
NDF	Neutral detergent fibre
OM	Organic matter

Introduction

Supplementation of low nutritional value roughage with protein-rich foliage improves the feed value of ruminant diets (Patra 2010a, b). There are many examples of protein-rich foliages within and beyond the legume plant family. Some of these foliages contain tannins that can positively or negatively affect their digestibility by ruminants (Piluzza et al. 2013; Patra and Saxena 2011), with the impact of tannins depending on their concentration and composition (Waghorn 2008). Some protein-rich foliages are also co-products of crops and are thus strategic resources in mixed farming systems (Herrero et al. 2010; Hernández-Castellano et al. 2019). In particular, there is increasing interest in the utility of cassava (*Manihot esculenta*) foliage, as it is a drought-tolerant food crop that is grown in the tropics and subtropics. Cassava has very-high-energy productivity per hectare and is an important crop for food security in some developing countries (Montagnac et al. 2009).

Two main questions have been raised regarding the intake of protein-rich foliages, namely, (i) the risk of bloat and (ii) the high fermentability of proteins that can lead to a significant

✉ Harry Archimède
Harry.Archimede@inra.fr

¹ Unité de Recherches Zootechnique, INRA, UR143, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, France

² Plateforme Tropicale d'Expérimentation sur l'Animal, INRA UE1284, Petit-Bourg, Guadeloupe, France

production of ammonia, high urinary nitrogen excretion and, consequently, a low efficiency of feed protein utilisation. However, as cassava foliage is a rich source of tannin, this could lower its ruminal digestibility and total digestibility and thus diminish its metabolisable protein value. Notably, feeding ruminants with tannin-protein-rich foliages could be an efficient means to reduce the excretion of nitrogen in urine and the nitrogen emission potential of manure that contributes to greenhouse gases (Wang et al. 2018).

The optimal use of cassava foliage in a mixed farming system requires the implementation of storage strategies (Beigh et al. 2017), such as silage (Sudarman et al. 2016; Wanapat et al. 2018), hay (Wanapat 2001) or pelleting. Pelleting, which requires the source material to be ground, can increase the fermentability of proteins by making them more accessible to microbial enzymes. Pelleting increases the intake of feed, but reduces its total tract digestibility (Greenhalgh and Reid 1973). The objective of this study was to evaluate the impact of pelleting on the feed value of a cassava foliage diets.

Materials and methods

Experimental site and diets

This research was carried out 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). Experimental diets consisted of a tropical natural grassland hay, based on *Dichanthium* spp., which was fed either alone or in association with three protein-rich foliages. Foliages were either given fresh (*Manihot esculenta*) or as pellets (*Manihot esculenta* and alfalfa) and on average formed 50% of the daily diet. Hay came from a single harvest of a 75-day regrowth of natural grassland grown with irrigation and mineral fertilisation (100 kg of N/ha/year) in Grande-Terre, northeast Guadeloupe. *Manihot esculenta* was collected from a 12-month-old plantation. Unchopped whole foliage composed of leaves, petioles and very young stems are usually consumed by animals. Consequently, this foliage was harvested from plots planted gradually every 15 days, so that the foliage taken daily would always be close to 12 months old. Pellets were made from a single harvest. Foliage with petioles and very young stems was sun-dried under shade for 2 to 3 days depending on the weather to reach about 85% dry matter. It was then ground (3-mm screen) and pelleted using a GR150E system (Oliotechnologie, Burgun, Wissembourg, France). No heating was applied during pelletising but it is accompanied by an increase in the temperature of the pellets to 45 °C. The average size of the pellets was 12 mm long and 3 mm in diameter. Three diets were compared:

Dichanthium hay distributed ad libitum and 500-g dry alfalfa pellet (HA)

Dichanthium hay distributed ad libitum and 500-g dry cassava foliage pellet (HC_p)

Dichanthium hay distributed ad libitum and 500-g dry matter equivalent fresh cassava foliage (HC_i)

Animals and design

This study used fifteen Black Belly rams in a 3 × 3 Latin square design. The rams were 1 year old and were reared following European Union recommendations for animal welfare, in accordance with the regulations of the Animal Care Committee of INRA. The mean body weight of the rams was 35.3 (±1.59) kg, and they were fitted with a rumen cannula. The experimental period lasted 28 days. This comprised 21 days of diet adaptation followed by 5 days of feed intake and total tract digestibility measurement, 2 days of rumen fluid sampling and 1 day of total emptying of the rumen. Rams had free access to water and salt blocks. Salt block composition was as follows (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). Rams were fed with hay ad libitum twice a day, at 10-h intervals (07.00 and 17.00 h). Foliage and pellets were offered at 07.00 h. The amount of fresh foliage was adjusted by rapid determination of dry matter in a microwave oven.

Measurements and calculations

Rams were individually weighed at the beginning and end of each experimental period. Intake and apparent digestibility were determined by daily weighing of the amounts of diet offered and refused, and of faeces over five consecutive days. Cotton bags were glued to the hindquarters of the animals during the measurement period to collect faeces unsoiled by urine. Daily samples were taken of the offered feeds and refusals, and faecal samples, and these constituted the representative samples for chemical analysis. Daily urinary output was also recorded. Urine was collected in 10-L drums containing sulphuric acid (2.5 mL of 10% H₂SO₄ per 100 mL urine); daily samples of urine were pooled before N determination. Rumen fluid was collected from rams via a rumen cannula. Samples (100 mL) were collected over two consecutive days, twice a day, immediately before and 3 h after the morning feeding. These samples were immediately filtered (250-µm nylon filter) and rumen liquid pH was measured. A sample of rumen fluid (50 mL) was then mixed with 1 mL sulphuric acid and stored at 4 °C for use in ammonia-nitrogen (N-NH₃) determination.

Emptying of the rumen was carried out manually on each animal, 8 h after the morning meal. Total content was

weighed, thoroughly mixed by hand, and then three sub-samples were taken. Two samples were used for dry matter (DM) determination and the third was preserved by freeze-drying for chemical determination.

Rumen turnover rate was estimated by the following ratio: ((daily excretion of ADL in faeces)/24 (g))/(amount of ADL in rumen 8 h post-feeding (g)) (Archimède et al. 2000).

The average daily gain (ADG, g/day) was estimated on the basis of nitrogen retained, using the equation established by Salah et al. (2014):

$$\text{ADG} = ((\text{Nret}_{\text{MLW}}^{0.75} - 0.19)/0.028) \times \text{LW}^{0.75}$$

where $\text{Nret}_{\text{MLW}}^{0.75}$ is the amount of N retained per kg of metabolic weight.

Chemical analyses and analytical procedures

The dry matter contents of forage, refusals and faeces were determined by drying in a forced-draught oven at 60 °C until constant weight was attained. Samples for chemical analyses were dried under the same conditions. Diet and faecal 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. Lyophilised faecal samples were analysed for ash and N, and N was analysed in fresh samples of urine using the same methods as used for diets. Crude protein (CP) was estimated as $\text{N} \times 6.25$. 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 (NDF) and 973.18 (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 tannin content was determined using the vanillin- H_2SO_4 method according to Laurent (1975). A 70% (vol/vol) H_2SO_4 solution containing 1% vanillin (wt/vol) was added to the methanolic extract of *Manihot esculenta*, and absorbance was measured at 500 nm. The N- NH_3 concentration was estimated in the rumen liquor by distillation and titration.

Statistical analysis

Means were calculated over 5 days of measurement for intake, total tract digestibility and N balance and over 2 days of measurement for rumen fluid. Statistical analyses were performed using the MIXED procedure of SAS 9.2 release (SAS 2008). Diet and period were designated as fixed effects; animal was a random effect.

The global model used was:

$$Y_{ijk} = m + D_i + P_j + (D \times P)_{ij} + A_k + e_{ijk}$$

where:

- m is the mean
- D_i is the diet fixed effect ($i = 1-3$)
- P_j is the period fixed effect ($j = 1-3$)
- $(D \times P)_{ij}$ is the interaction between the diet effect and the period effect
- A_k is a random effect associated with animal ($k = 1-15$)
- e_{ijk} is the residual term.

Results

The chemical composition of each ingredient in the experimental diets is shown in Table 1. The hay was of medium to low quality. Cassava foliage had a similar CP content to alfalfa, while its fibre content was lower.

Rams consumed the pellets in less than an hour, compared with taking four to 5 h to consume the green cassava foliage. The intake of green cassava foliage, cassava pellets and alfalfa pellets was similar, in accordance with experimental design (Table 2). Total DM intake of the green foliage cassava diet (HCl) was lower than the alfalfa pellet diet (HA) ($P < 0.05$). Total DM intake tended to be lower ($P < 0.12$) with the green cassava foliage diet compared with the cassava pellet diet (HCp). Differences in the total DM intake observed between diets were related to those observed for hay intake. Hay intake was significantly higher with the HA and HCp diets compared with HCl (Table 2). Total intake of CP was similar across the three diets while fibre intake (NDF, ADF) was lower with the HCl diet (Table 2).

Total tract digestion values of OM, CP, NDF and ADF in the HC₁ and HC_p diets were significantly lower than in the HA diet (Table 2). Except for OM and CP for which the differences were not significant, total tract digestions of NDF and ADF were lower for HC_p diet compared with HC₁ diet.

Previously, the dry matter digestibility of similar experimental

Table 1 Dry matter (DM), organic matter (OM), crude protein (CP), neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF) and condensed tannin (CT) content (g/100 g dry matter) of *Dichanthium* hay, alfalfa and *Manihot esculenta* (cassava) pellets and foliage

Chemical content							
	DM	OM	CP	NDF	ADF	ADL	CT
Alfalfa pellets	91.0	85.2	21.5	63.4	35.2	8.9	0
Cassava pellets	91.6	86.7	22.5	56.1	39.3	11.9	6.0
Cassava foliage	32.7	90.1	22.2	51.7	35.5	12.1	6.2
<i>Dichanthium</i> hay	87.3	89.9	7.5	74.9	39.7	7.2	0

Table 2 Mean values of dry matter (DM), organic matter (OM), crude protein (CP), neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF) intake (I) and total tract digestibility (td) of mixed diets from

Dichanthium hay and *Manihot esculenta* (cassava) foliage (HC_i) and pellet (HC_p) or alfalfa (HA) fed by Black Belly rams

	HA	HC _i	HC _p	SEM	<i>P</i>
Intake					
Total DMI, g/LW ^{0.75}	79.5a	67.6b	73.7ab	3.10	0.013
Hay DMI, g/LW ^{0.75}	41.1a	33.2b	39.4a	2.31	0.050
Supplement DMI, g/LW ^{0.75}	38.2	34.4	34.3	1.68	0.109
OMI, g/day	992.6a	872.0b	961.1a	34.36	0.054
CPI, g/day	167.7	159.6	165.6	5.39	0.485
NDFI	795.5a	600.1b	734.7a	26.51	0.000
ADFI	423.9a	346.9b	431.7a	26.0	0.001
Total tract digestibility					
OMtd	0.591a	0.550ab	0.539b	0.0183	0.077
CPtd	0.674a	0.520b	0.539b	0.0246	0.000
NDFtd	0.657a	0.569b	0.611c	0.0164	0.001
ADFtd	0.592a	0.471b	0.544c	0.0194	0.000
ADL rumen turnover %/h	0.037	0.039	0.037	0.0029	0.519

DMI total dry matter intake; hay dry matter intake; supplement (alfalfa, cassava) dry matter intake

a, b, c Lacking a common superscript letter differ ($P < 0.05$)

hay (same grassland and same plot) was estimated as 0.56 (Archimède et al. 2018). On this basis, and discounting digestive interactions in the diets, DM digestibilities of 0.62, 0.52 and 0.49 were estimated for alfalfa pellets, cassava foliage and cassava pellets, respectively.

No differences in ADL rumen turnover (%/h) were observed between diets (Table 2). No symptoms of bloat were observed during rumen emptying, irrespective of diet consumed. Moreover, the rumens of the animals were never seen to be abnormally inflated.

Very slight differences in rumen acidity (pH) were observed in animals fed the different diets, irrespective of sampling time (Table 3), though the acidity was never very high. Ammonia concentrations are reported in Table 3. The concentration of ammonia 3 h after a meal was higher with the HC_i diet compared with the other two diets—for which the differences were not significant.

Urinary nitrogen excretion did not vary significantly between diets (Table 4), while faecal nitrogen excretion was higher in rams fed the HC_i and HC_p diets compared with the HA diet. This is consistent with the higher nitrogen digestibility observed for the HA diet. Retained nitrogen, an indicator of ram growth, was significantly higher with the HA diet compared with the HC_i and HC_p diets—between which no differences were registered.

Discussion

Fresh cassava foliage contains variable quantities of toxic hydrogen cyanide, 1–100 mg/100 g fresh basis, depending on

variety, stage of maturity, soil fertility and climate (Promkot et al. 2007). In this study, we have tested a sweet cassava variety that is supposed to be much lower in hydrogen cyanide content than the bitter varieties (Promkot et al. 2007) but hydrogen cyanide has not been assayed. Similarly, hydrolysable tannins have not been assayed because of their very low concentration in cassava leaves (Rira et al. 2018). Ruminant toxicity is reported mainly with hydrolysable tannins related to low molecular weight of their components and consequently their absorption through the rumen cell wall (Makkar 2003). The main characteristics of intoxications by hydrolysable tannins are as follows: anorexia, depression, ruminal atony, hepatic and renal failure, ulcers along the digestive tract, and severe gastroenteritis. During this experiment, no external signs of intoxication were observed. For the other components, the chemical composition of the cassava foliage used in this study was within previously reported ranges (Wanapat 2003; Ravindran 1993). CP, NDF and CT content of foliages can vary with the proportion of leaves to young stems, the age and variety of the foliage, and crop management. The CP levels of foliages in this trial are average, with the highest values in the literature having been recorded for very young forage (Wanapat 2003). The NDF and ADF values of the cassava foliage in this study are at the high-end of published data, relative to the late harvest age (1 year), and CT values are high relatively to published data on cassava. Although it is imprudent to generalise, Wanapat (2003) indicates that CT concentrations could be lower in young leaves. However, CT concentrations can also increase with different environmental stresses (Piluzza et al. 2013). The level and

Table 3 Acidity and ammonia content of rumen liquid of Black Belly rams fed with mixed diet containing *Dichanthium* hay and *Manihot esculenta* (cassava) foliage (HC₁) and pellet (HC_p) or alfalfa (HA)

HA		HC ₁	HC _p	SEM	P
Rumen pH, 0 h post-feeding	6.6a	6.5a	6.7b	0.04	0.017
Rumen pH, 3 h post-feeding	6.3a	6.4ab	6.5b	0.05	0.034
Rumen ammonia (mg l ⁻¹), 0 h post-feeding	300.2a	295.7ab	269.7b	12.91	0.097
Rumen ammonia (mg l ⁻¹), 3 h post-feeding	321.2a	399.4b	317.8a	18.00	0.001

^{a, b, c} Lacking a common superscript letter differ ($P < 0.05$)

composition of CTs affects the nutritional value of feeds. A limit of 4–5% TC in feed is often reported in the literature as the limit beyond which inconveniences outweigh the benefits (Wanapat 2001). This value is probably variable depending on the nature of the condensed tannins. The presence of less than 4–5% CT can have a beneficial effect in feeds, by partially protecting CP from ruminal fermentation. However, it is important that this protection does not limit the intestinal digestion of feed proteins. Low intake is generally reported with tannin-rich foliage because of their astringent taste (Makkar 2003). In this study, where cassava represented on average 70% of the intake, we did not observe any rejection of this feed. Moreover, high rumen fill and low digestion are also reported with tannin-rich foliage resulting in a reduction in intake (Makkar 2003). The latter conditions were probably met in this experiment. Certainly, CP and NDF total digestion were low with cassava diets. The comparison of HA and HC₁ diets is informative because alfalfa and cassava pellets have similar chemical composition except for CT. Consequently, differences in intake between rations HA and HC₁ could be explained by the presence of CT. The fill value of cassava pellets would be higher than that of alfalfa if we compare their digestibility although this is not confirmed by the rumen turnover values. The differences in intake between HC₁ and HC_p are due to the relatively long leaves intake time which limits hay consumption. In addition, the fill rumen of the biomass consumed is higher with HC_p. The relatively low digestibility

Table 4 Nitrogen balance and average daily gain (ADG) of Black Belly rams fed with mixed diet containing *Dichanthium* hay and *Manihot esculenta* (cassava) foliage (HC₁) and pellet (HC_p) or alfalfa (HA)

	HA	HC ₁	HC _p	SEM	P
N intake, g/day	26.8	25.5	26.5	0.86	0.485
N faecal excretion, g/day	8.7b	11.6a	12.2a	0.80	0.001
N urinary excretion, g/day	8.7	8.0	8.3	0.49	0.440
N retained, g/day	9.4a	5.9b	6.0b	0.93	0.018
ADG ⁽¹⁾ , g/day	237.0a	116.0b	109.0b	33.4	0.017
ADG ⁽²⁾ , g/day	159.0a	86.0b	82.0b	21.1	0.010

^{a, b, c} Lacking a common superscript letter differ ($P < 0.05$)

ADG⁽¹⁾ and ADG⁽²⁾ estimates were based on nitrogen balances and animal weights, respectively

of CP observed with cassava diets compared with alfalfa diets would demonstrate the protective effect of TCs against microbial enzymatic digestion in the rumen and intestinal enzymatic digestion. This same protection explains the low digestion observed for NDF and ADF.

Although the hay consumed in this study was of medium to low quality, the HC_p total intake was high on the basis of the intake capacity of Black Belly sheep consuming a young tropical grass (about 75 g LW^{0.75}) (Archimède et al. 2000, 2018). This is a standard result when high-protein foliage is combined with low-protein forage in a diet (Patra 2010b; Sath et al. 2012). Differences in intake between the diets in this study were not due to differences in rumen content turnover rates, as they were identical for all three diets. As cassava pellets were compared with alfalfa pellets, differences in diet intake could be explained by the better digestibility of alfalfa. As cassava pellets were compared with cassava foliage, differences in diet intake could be explained by the differences in cassava intake times according to its treatment. The lower fibre intake with the HC₁ diet is explained by a lower total dry matter intake and a lower NDF content of the latter due to the lower hay consumption.

Mixed diets containing cassava foliage can support significant growth, although this growth is less than that allowed by alfalfa. However, it is important that growth data are compared in relative rather than absolute terms, because of the limitations in the methods used to assess growth. Specifically, the retained nitrogen method tends to overestimate growth. In this study, the recorded growth values of 230 g/day in Black Belly sheep that are already 1 year old are relatively high, as the maximum growth rates recorded with intensive feeding in this species were around 210 g/day (Archimède et al. 2008). The growth obtained by the traditional weighing method confirms the hierarchy obtained from nitrogen balances. These estimates of ADG, while plausible, must also be analysed with caution because the measurement period includes the phases of adaptation to the diets. This adaptation was relatively long (10 to 15 days) with high variability between rams.

The feed value of cassava is lower than that of alfalfa because of its lower OM, CP and fibre digestibility. Pelleting did not allow cassava foliage to reach the same performance as

obtained with alfalfa. However, the pelleting of cassava foliage resulted in (i) increased forage intake; (ii) reduced fermentability of cassava proteins in the rumen; and (iii) increased digestibility of cassava fibre. Generally, grinding and pelleting increases intake and reduces digestibility of low-quality roughage (Greenhalgh and Reid 1973). However, pelleting has less effect on high-quality roughage (Greenhalgh and Reid 1973). The effect of pelleting on intake can be explained by the lower resistance of pelleted roughage to mechanical comminution. Accordingly, the average intake time of green cassava foliage was five times longer than that of cassava pellets. As such, the time available for *Dichanthium* hay intake was potentially lower with the cassava HC₁ diet compared with the HC_p diet, especially as the maximum intake time in small ruminants cannot exceed 10 h. In contrary to published hypotheses (Greenhalgh and Reid 1973), in this study, pelleting caused an increase in total tract digestion of fibre.

Conclusion

Compared with alfalfa, cassava fresh foliages and cassava pellets have a medium diet values. The high level of CT of cassava impairs total tract digestion of the feed and consequently the performance of the animals. Cassava pellets supports medium growth, identical to that observed with the fresh foliages. Pelleting reduces the intake time of cassava and consequently increases total diet intake. Pelleting does not result in higher nitrogen emissions.

Pelleting does not improve animal performance, while the economic cost and carbon footprint of its production are higher compared with using fresh leaves. The main interest of this technology would be its ability to be a storage method and to provide practicality for the use of a by-product. New studies should evaluate the percentage of maximum cassava pellet in the ruminants' diet for tannin not to act negatively on animals.

Acknowledgements The authors thank Tatiana Silou Etienne and Pierre Justin Dumoulin for their technical assistance.

Funding information This study was completed with the financial support of the Region Guadeloupe, European funding (FEDER, AgroEcoDiv project) and RITA TRANS'BOV.

Compliance with ethical standards

The rams were 1 year old and were reared following European Union recommendations for animal welfare, in accordance with the regulations of the Animal Care Committee of INRA.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

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, A., Poncet, C., 2000. Effect of regrowth age on intake and digestion of *Digitaria decumbens* consumed by Black-belly sheep. *Animal Feed Science and Technology* 87, 153–162.
- Archimède, H., Pellonde, P., Despois, P., Etienne, T. and Alexandre, G., 2008. Growth performances and carcass traits of Ovin Martinik lambs fed various ratios of tropical forage to concentrate under intensive conditions. *Small Ruminant Research*, 75, 162–170.
- Archimède, H., Rira, M., Eugène, M., Fleury, J., Lastel, M.L., Periacarpin, F., Silou-Etienne, T., Morgavi, D.P. and Doreau, M., 2018. 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. *Journal of Cleaner Production*, 185, 455–463.
- Beigh, Y.A., Ganai, A.M. and Ahmad, H.A., 2017. Prospects of complete feed system in ruminant feeding: a review. *Veterinary World*, 10 (4), 424–437.
- Giner-Chavez, B.I., Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lascano, C, Reed, J.D. and 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.
- Greenhalgh, J.F.D. and Reid, G.W., 1973. The effects of pelleting on intake and digestibility in sheep and cattle. *Animal Production*, 16, 223–233
- Hernández-Castellano L.R., Nally, J.E., Lindahl, J., Wanapat, M., Alhidary, I.A., Fangueiro, D., Grace, D., Ratto, M., Christophe Bambou, J.C., de Almeida, A.M., 2019. Dairy science and health in the tropics: challenges and opportunities for the next decades. *Tropical Animal Health and Production*, 51, 1009–1017.
- Herrero, M., Thornton, P.K., Notenbaert, A.M., Wood, S., Msangi, S., Freeman, H.A., Bossio, D., Dixon, J., Peters, M., van de Steeg, J., Lynam, J., Parthasarathy Rao P., Macmillan, S., Gerard, B., McDermott, J., Seré, C. and Rosegran M., 2010. Smart investments in sustainable food production: revisiting mixed crop-livestock systems. *Science*, 327, 822–825.
- 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.
- Makkar, HPS., 2003. Review 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.
- Montagnac, J.A., Davis, C.R. and Tanumihardjo, S.A., 2009. Nutritional value of cassava for use as a staple food and recent advances for improvement. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 181–194.
- Patra, A.K., 2010a. Effects of supplementing low-quality roughages with tree foliages on digestibility, nitrogen utilization and rumen characteristics in sheep: a meta-analysis. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94, 338–353.
- Patra, A.K., 2010b. Aspects of nitrogen metabolism in sheep-fed mixed diets containing tree and shrub foliages. *British Journal of Nutrition*, 103, 1319–1330.
- Patra, A.K. and 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.

- Piluzza, G., Sulas, L. and Bullitta, S., 2013. Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. *Grass and Forage Science*, 69, 32–48.
- Promkot, C., Wanapat, M., Wachirapakorn, C. and Navanukraw C., 2007. Influence of Sulfur on Fresh Cassava Foliage and Cassava Hay Incubated in Rumen Fluid of Beef Cattle. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 20(9), 1424–1432.
- Ravindran, V., 1993. Cassava leaves as animal Feed: potential and limitations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61, 141–150.
- 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. In : 10th. International Symposium on the Nutrition of Herbivores (ISNH10). Cambridge (GBR) : Cambridge University Press (Advances in Animal Biosciences, 9 (3)), 2018.
- Salah, N., Sauvant, D. and Archimède, H., 2014. Nutritional requirements of sheep, goats and cattle in warm climates: a meta-analysis. *Animal*, 8 (9), 1439–1447.
- SAS., 2008: Statistical Analysis System Release 8.01. SAS Institute, Cary, NC.
- Sath, K., Sokun, K., Pauly, T. and Holtenius, K., 2012. Feed intake, digestibility, and N retention in cattle fed rice straw and para grass combined with different levels of protein derived from cassava foliage. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 25, 956–961
- Sudarman, A., Hayashid, M., Puspitaning, I.R., Jayanegara, A. and Shiwachi, H., 2016. The use of cassava leaf silage as a substitute for concentrate feed in sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 48, 1509–1512.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch 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.
- Wanapat, M., 2001. Role of cassava hay as animal feed in the tropics. In: Proc. international workshop on current research and development of cassava as animal feeds, organized by Khon Kaen University and Swedish International Development Agency (SIDA) and Swedish Agency for Research and Cooperation with Developing Countries (SAREC), July 23–24, Kosa Hotel, Thailand.
- Wanapat, M., 2003. Manipulation of cassava cultivation and utilization to improve protein to energy biomass for livestock feeding in the tropics. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 16 (3), 463–472.
- Wanapat, M., Phesatcha, K., Viennasay, B., Phesatcha, B., Ampapon, T., Kang, S., 2018. Strategic supplementation of cassava top silage to enhance rumenfermentation and milk production in lactating dairy cows in the tropics. *Tropical Animal Health and Production*, 50, 1539–1546.
- Wang, S., Terranova, M., Kreuzer, M., Marquardt, S., Eggerschwiler, L. and Schwarm, A., 2018. Supplementation of pelleted hazel (*Corylus avellana*) leaves decreases methane and urinary nitrogen emissions by sheep at unchanged forage intake. *Scientific Reports*, 8, 5427.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Annexe 4. Minatchy, N., Archimède, H., Philibert, L., Silou, T., Mounoussamy, F., Felicite, Y., Marie-magdeleine, C. Effect of CT diversity, synergy and pelleting treatment on *in vitro* anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*.

(soumis)

Effect of CT diversity, synergy and pelleting treatment on *in vitro* anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*

Nathalie MINATCHY¹, Harry ARCHIMÈDE¹, Lucien PHILIBERT¹, Tatiana SILOU¹, Fritz MOUNOUSSAMY², Yoann FELICITE ¹, Carine MARIE-MAGDELEINE^{1,*}

¹*INRA, URZ Recherches Zootechniques, INRA, 97170, Petit-Bourg (Guadeloupe), France*

²*INRA UE PTEA, Plateforme Tropicale d'Expérimentation sur l'Animal, INRA, 97170, Petit-Bourg (Guadeloupe), France*

* Corresponding author:

Tel.: +33-0590-25-59-00. E-mail: carine.marie-magdeleine-chevry@inra.fr (C. Marie-Magdeleine)

ABSTRACT

Condensed tannins are known to have anthelmintic properties and can be used in an integrated approach to control gastrointestinal induced pathologies of small ruminants.

Pelleting condensed tannins-rich plants allows their availability during the whole year and facilitates their use by farmers. Several authors have shown that condensed tannin profiles differ between plant species and anthelmintic activity can be influenced by the chemical structure of the condensed tannins. To evaluate the effect of condensed tannin diversity, the pelleting process and the combination on anthelmintic properties, this study was conducted on three tropical condensed tannins-rich plants with different tannin profiles using two *in vitro* assays : the larval development inhibition assay and the larval exsheathment inhibition assay. HPLC profiles and free flavan-3-ol determination were performed on extracts of condensed tannins from plants and pellets.

Results showed that anthelmintic properties were dose-dependent and varied according to condensed tannin profiles. A synergistic effect was found only for larval exsheathment. Different compositions of condensed tannins and free flavan-3-ols in the extracts could explain those effects. Pelleting decreased the efficacy of the extracts but did not cancel the anthelmintic activity.

Keywords : Condensed tannins, larval development, larval exsheathment, pelleting process, synergistic effect, *Haemonchus contortus*.

HIGHLIGHTS

Diversity of condensed tannins influences *in vitro* anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*

Presence of synergistic effect of condensed tannins from different plant sources used in this study on *Haemonchus contortus* larval exsheathment

Pelleting slightly reduces anthelmintic activity of condensed tannins-rich plants

Pelleting condensed tannins-rich plants increases free flavan-3-ols concentration in the pellets

Abbreviations

CT: Condensed tannins

FDL : Freeze-dried leaves

GIN: Gastrointestinal nematodes

LDIA: Larval development inhibition assay

LEIA: Larval exsheathment inhibition assay

L1: First stage larvae

L2: Second stage larvae

L3: Third stage larvae

EC₅₀: Half maximum effective concentration

RT: Retention time

PD: Prodelphinidins

PC: Procyanidins

INTRODUCTION

Livestock productivity can be affected by gastrointestinal-induced pathologies that cause approximately 45% mortality in young small ruminants (sheep and goats) before weaning (Aumont *et al.*, 1997). The classical control method based on the use of anthelmintic drugs is less and less effective because of a generalised resistance of gastrointestinal nematodes (GIN) to most of the classes of molecules used to combat these pathogens (Wolstenholme *et al.*, 2004 ; Papadopoulos, 2008).

The worldwide spread of resistance (Wolstenholme *et al.*, 2004 ; Kaplan, 2004 ; Sutherland and Leathwick, 2010), and the increasing concern about environmental considerations (Kaplan and Vidyashankar, 2012 ; Hoste *et al.*, 2015), have led to the consideration of non-chemical strategies to fight GIN infections (Hoste *et al.*, 2012). One innovative alternative is the use of nutraceuticals as a part of integrated pest management (Hoste *et al.*, 2015).

Many plants in tropical areas have nutraceutical value due to their composition in primary and secondary metabolites. Condensed tannins (CT) are secondary metabolites that are known to have anthelmintic activities (Hoste *et al.*, 2012). Three main impacts have been associated with infected ruminants consuming tanniferous plants: i) a reduced establishment of the infective third-stage larvae in the host; ii) reduced excretion of nematode eggs by the adult worms; iii) reduced development of eggs to third-stage larvae (Hoste *et al.*, 2012).

Thus, consumption of tanniferous plants has an effect on the healthiness of the animal, but also contributes to reducing environmental contamination with infective parasitic elements, which is important for a global strategy to fight GIN infection (Hoste *et al.*, 2015).

Pelleting nutraceutical plants allows year-round access to these plants and facilitates their use by farmers. CT are sensitive to temperature (Hove *et al.*, 2003 ; Dzewela *et al.*, 1995), and the pelleting process involves a drying operation that can have detrimental effects on CT anthelmintic properties.

Moreover, several authors have shown that CT profiles can differ between plant species. We hypothesised that combining plant species could be beneficial compared to single species. To assess the effect of the pelleting process on anthelmintic properties of three tropical CT-rich plants and their mix, this study was conducted using two *in vitro* assays. The larval development inhibition assay (LDIA) and the larval exsheathment inhibition assay (LEIA) were performed to measure the activity of CT extracted from pellets obtained using plant leaves.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of CT extracts from freeze-dried leaves (FDL) and pellets

Manihot esculenta, *Cajanus cajan* and *Leucaena leucocephala* were selected for their protein and CT contents. They were also selected because they represent the diversity observed in farms, and they are easier for use in an integrated approach to fight GIN.

Leaf samples were harvested from two zones in Guadeloupe French West Indies, Grande-Terre and Basse-Terre, and for each zone, the sampling was performed on three sites during the middle and the end of the dry-season. The samples were sun-dried under shelter, and then equal amounts of the same species from each zone were mixed together to constitute a single sample per species. The sample was pelleted without additives in a GR 150 E system (Oligotechnologie, Burgun, Wissembourg, France). FDL from each species were used as positive controls. All samples (three FDL, three pellets) were used for CT extraction.

FDL or pellets (60 g) were reduced to powder. The pellet mix sample was prepared using 10 g of each plant powder. Diatomaceous earth (6.5 g) was added to each ground FDL and pellet material (25 g) before extraction with 40 ml of 70% aqueous acetone containing 0.1% ascorbic acid to prevent polyphenol oxidation, using an Automated Solvent Extractor (ASE, Dionex).

Chlorophyll and lipids were removed from the acetonic extract (40 ml) with diethyl ether (two to three times, 30 ml each). Solvents were evaporated in vacuo at 35 °C.

Non-tannin phenolic compounds were removed from the aqueous portion, washed with 20 to 30 ml of 50% aqueous methanol onto Sephadex LH20. The proanthocyanidins adsorbed onto the Sephadex LH-20 were eluted with 70% aqueous acetone. Solvents were evaporated in vacuo at 35 °C, and then extracts were freeze-dried and stored at -20 °C before analysis. The mix sample from FDL was prepared by mixing the three FDL extracts of each species.

The following eight extracts were obtained:

- Four positive controls: FDL of *C. cajan*, *M. esculenta*, *L. leucocephala*, mix of the FDL.
- Four assays: pellets of *C. cajan*, *M. esculenta*, *L. leucocephala*, mix of the pellets.

Condensed tannins high-performance liquid chromatography profiles and free flavan-3-ol determination

A high-performance liquid chromatography (HPLC) system connected to a reverse phase C18 Microsorb 100 column (5 µm particle size; 250 mm length; 4.6 mm internal diameter) was used. The column oven temperature was 27 °C.

The Varian Prostar HPLC system consisted of a 20 µl manual injection loop, two Prostar 210, 0.025–25 ml/min rate of flow pumps, a Degassit 0–3 ml/min degasser, a Croco-cil 30–90°C column oven, a 190–950 nm Prostar 335 diode array detector and a personal computer with Galaxie 1.10.1.2006 version software.

CT extracts (1 mg/mL) and the internal standard, benzoic acid (1 mg/mL), were dissolved in methanol and then mixed in an 8: 2 ratio, respectively. Samples (20 µl) were injected into the HPLC chain with 70% water, 28% acetonitrile and 2% acetic acid as mobile phase. Peak areas were observed at 280 nm. The profiles obtained were compared according to two parameters: their maximum absorbance (λ_{max}) and the difference of retention time (ΔRT) compared to the internal standard, calculated for each selected compound, according to the

formula: $\Delta RT = RT_{\text{benzoic acid}} - RT_{\text{compound}}$. Compounds with the same λ_{max} and the same ΔRT were considered potentially identical.

For the determination of free flavan-3-ols, CT extracts (4 mg/mL) and the internal standard, dihydroquercetin (0.047 mg/mL), were dissolved in methanol and then mixed in an 8:2 ratio, respectively.

External standard solutions in methanol, for identification and quantification of flavan-3-ols, were prepared as follows: catechin (0.05 mg/mL), epicatechin (0.10 mg/mL), epigallocatechin (0.22 mg/mL) and dihydroquercetin (0.047 mg/mL) were dissolved in methanol, and then equal volumes from each standard were combined for the standard solution.

The flow rate was 0.75 ml/min using 1% acetic acid in water (solvent A) and HPLC-grade methanol (solvent B). The following gradient program was employed: 0–5 min, 20% B; 5–40 min, 20–70% B linear; 40–45 min, 70–90% B linear; 45–50 min, 90% B; 50–55 min, 90–20% B linear; 55–60 min, 20% B. Flavan-3-ols were identified and quantified using peak areas at 280 nm and molar response factors relative to dihydroquercetin.

Bioassays

Two *in vitro* experiments, LDIA and LEIA, were conducted to determine the pelleting effect on the anthelmintic properties of CT from three plant species and their mix.

Eggs were collected from the fresh faeces of lambs, in which each lamb was experimentally infected with 1000 third stage larvae (L3) of a *Haemonchus contortus* strain sensitive to anthelmintic drugs. Faeces were recovered after 21 days of infection and divided into two groups: one group was treated to recover the eggs for LDIA, the other was cultivated to obtain the L3 larvae for LEIA.

LDIA was used to evaluate the effect of CT extracted from FDL and pellets on inhibiting the development from the first stage (L1) to the infective L3 stage.

The technique used was a modification (Assis *et al.*, 2003) of the technique described by Hubert and Kerboeuf (1992). The eggs were incubated at room temperature for 48 h in 24-multiwell plates (0.5 ml per well with a concentration of 400 eggs/ml). After hatching, 70 μ l of culture medium (for one plate: 10 μ g of autolytic yeast extract, 1.5 ml of distilled water and 170 μ l of Earle's balanced solution, stabilised to pH = 7.2 with a NaHCO₃ solution at 50 g/l) was added to each one of the wells, followed by either each concentration of extracts (0, 0.1, 0.5, 1.25, 2.5 and 5 mg/ml), albendazole positive control (5, 2.5 and 1.25 mg/ml), all diluted in phosphate buffer solution (PBS), and PBS negative control (0.5 ml per well and five replicates for each dose). All dilutions were made in PBS. The larvae were incubated for eight days at room temperature (25 °C) to allow larval development from the first stage to the third infective stage. Thereafter, several drops of a Lugol's iodine solution were added, and the number of larvae was counted using an inverted microscope (at 40x magnification) by separating L3 infective larvae from L1 and second stage larvae (L2). The percentage of development was calculated as the following ratio: (number of L3/number of larvae per well) \times 100.

LEIA was performed to evaluate the effect of CT on the early process of infection. L3 larvae need to be exsheathed in order to invade the host mucosal tissue. The LEIA test was used to investigate the effectiveness of CT to reduce the host infection by the parasite. The method used was described by Bahuaud *et al.* (2006). Two thousand ensheathed L3 were incubated for three hours at room temperature (25 °C), with each extract having a CT concentration of 0.05, 0.25, 0.5, 1.25, 2.5 mg/ml in PBS (phosphate 0.1 M, NaCl 0.05 M).

Then, the L3 larvae were washed and centrifuged three times in PBS. They were submitted to the exsheathment process by incubation in a solution of 16.6% sodium chloride and sodium hypochlorite (2.6% of active chlorine). The composition of this solution has been determined, before the test, to allow 100% larval exsheathment after 50/60 minutes of incubation.

The kinetics of larval exsheathment were measured by microscopic observation at a magnification of 40× by regular examination 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70 min after contact with the solution for artificial exsheathment. The identification and count of ensheathed and exsheathed larvae were realised after the addition of 20 µl of Lugol in an aliquot of 200 µl of solution withdrawn in an Eppendorf.

Negative controls were run (L3 in PBS) in parallel in the assay. Five replicates were performed for each CT extract and the control.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Mixed General Linear Model (GLM) procedure of SAS Software 9.4. The global model to analyse LDIA and LEAI data was:

$$Y_{ijkl} = m + F_i + P_j + D_k + (F \times D)_{ik} + (P \times D)_{jk} + (F \times P \times D)_{ijk} + R_l + e_{ijk}$$

where m is the mean, F_i is the foliage fixed effect ($i = 1-5$), P_j is the processing fixed effect ($j = 1-3$), D_k is the dose fixed effect ($k = 1-6$), $(F \times D)_{ik}$ is the interaction between foliage and dose effect, $(P \times D)_{jk}$ is the interaction between process and dose effect, $(F \times P \times D)_{ijk}$ is the interaction between foliage, process and dose effect, R is the replicate random effect ($l = 1-5$) taken inside of the interaction $(F \times P \times D)$ and e_{ijkl} is the residual term.

A Probit analysis was conducted to find out the half maximal effective concentration that causes 50% inhibition (EC_{50}) of larval development (EC_{50LDIA}) and larval exsheathment (EC_{50LEIA}) using SAS Software 9.4.

The values were expressed as least square means and standard error of the mean (SEM). Statistical differences were declared significant at a P -value ≤ 0.05 .

RESULTS

Chemical analysis

Qualitative HPLC analysis of the pellets (Table 1) shows that the compounds had a maximum absorbance in the range of wavelength from 216 to 354 nm (λ_{max}). The internal standard

(benzoic acid) had an average retention time (RT) of 9.71 min and a maximum absorbance at a wavelength of 271 nm.

Table 1. Maximum wavelength (λ_{max}) and retention time (ΔRT) of CT in *Cajanus cajan*, *Leucena leucocephala*, *Manihot esculenta* and mix samples

	Compounds	ΔRT (min)	λ max (nm)
<i>C. cajan</i>	Compound 1	4,60	235/275
	Compound 2	2,90	234/270/333
	Compound 3	2,44	216/269/339
	Compound 4	2,02	234/269/338
<i>L. leucocephala</i>	Compound 2	3,03	235/274
	Compound 3	2,53	216/271
	Compound 4	2,04	235/258/348
<i>M. esculenta</i>	Compound 1	4,67	236
	Compound 2	2,91	234/255/347
	Compound 3	2,49	217/255/351
	Compound 4	2,04	255/350/354
Mix	Compound 2	2,95	234/271
	Compound 3	2,53	216/267/337
	Compound 4	2,04	234/263/344

Three compounds (compounds 2, 3 and 4) were common to all three plants. Compound 1 was not found in *L. leucocephala*. Figure 1 shows that compound 4 was very abundant in *M. esculenta* (more than 50% of the sample) and compound 2 was more abundant in *L. leucocephala*. The mix had a composition similar to that of *L. leucocephala*.

All CT extracts contained free flavan-3-ols (Figure 2). CT amounts were lower in FDL extracts (from 0.59% in *M. esculenta* to 4.84% in *L. leucocephala*). After pelleting, the amounts increased for all samples (from 2.93% for *M. esculenta* to 27.07 % for *C. cajan*).

Figure 1. Condensed Tannin profiles in *Cajanus cajan*, *Leucena leucocephala*, *Manihot esculenta* and mix pellet samples.

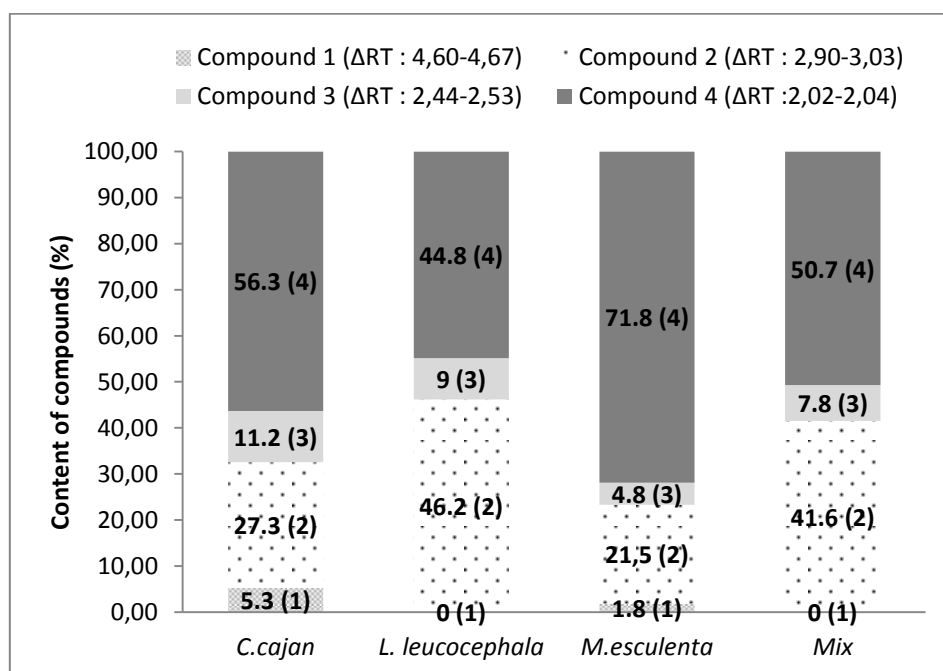
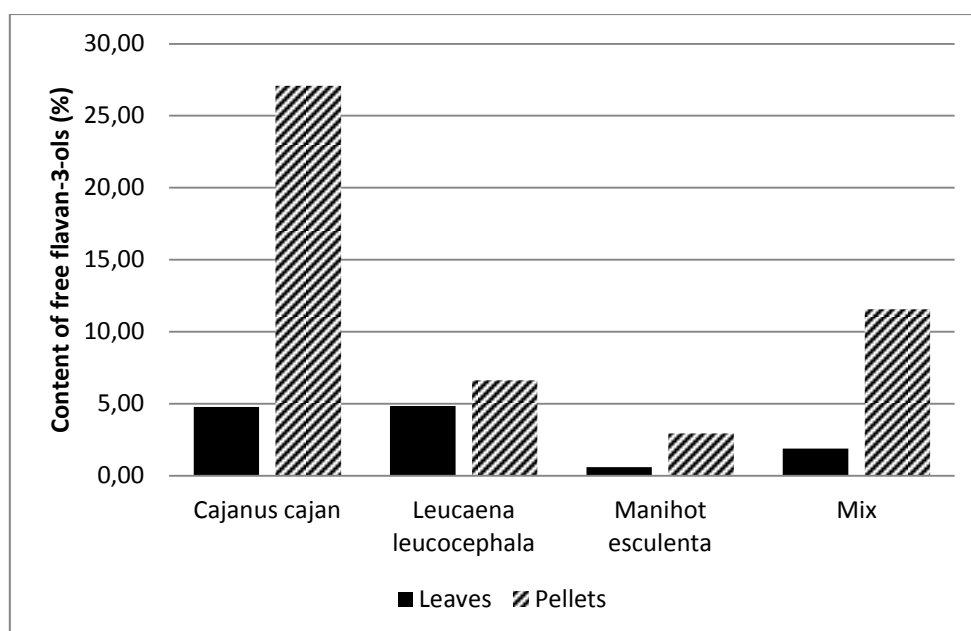
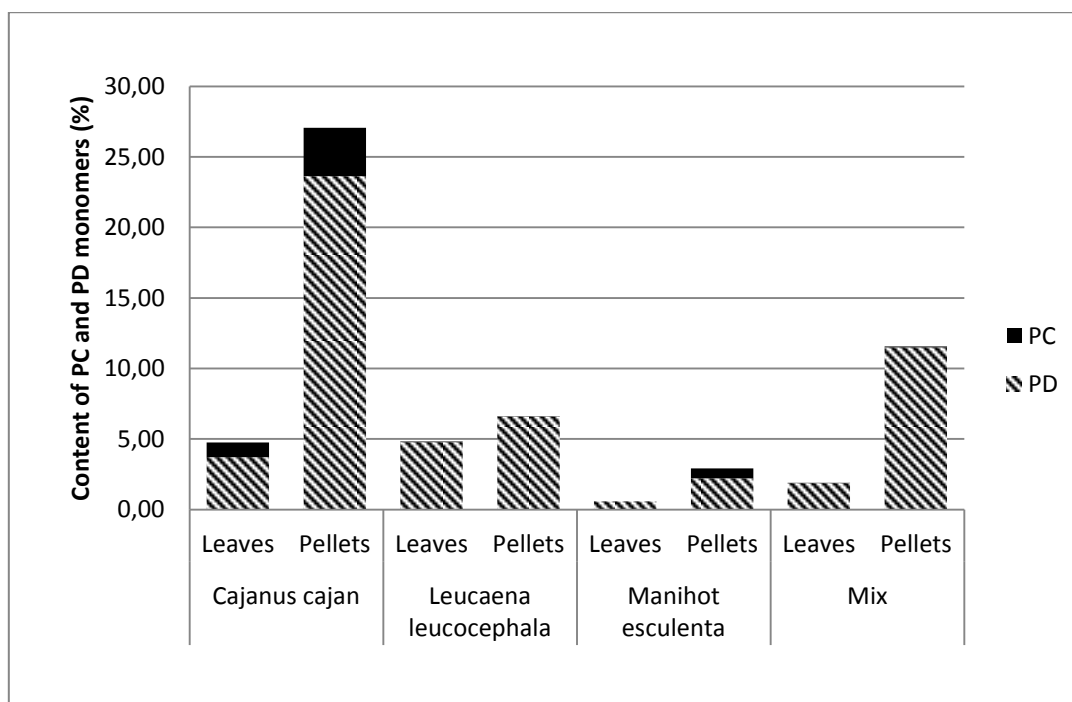


Figure 2. Percentage of free flavan-3-ols in *Cajanus cajan*, *Leucena leucocephala*, *Manihot esculenta* and mix condensed tannin extracts from freeze-dried leaves and pellets.



Prodelphinidin (PD) monomers were mainly represented in the extracts (Figure 3). The PD monomer amounts in pellets were important for *C. cajan* (23.64 %), the mix (11.50 %) and *L. Leucocephala* (6.60%).

Figure 3. Percentage of Procyanidins (PC) and Prodelphinidins (PD) monomers in *Cajanus cajan*, *Leucaena Leucocephala*, *Manihot esculenta* and mix condensed tannin extracts from freeze-dried leaves and pellets.



Anthelmintic effects

The LDIA results are shown in Table 2. Inhibition of larval development was dose-dependent, varied significantly between species ($P < 0.0001$) and was abnormally low with *C. cajan* as shown by the very high EC_{50} . *M. esculenta* was more effective than other plants, as illustrated by the lowest EC_{50} value (0.195 mg/ml) that is observed. Species*pelleting interaction ($P < 0.0001$) was certainly due to the fact that for *C. cajan*, the pellet extract seemed to have better anthelmintic activity than the FDL extract, contrary to the other species. Species*dose interaction ($P < 0.0001$) could also be related to the results obtained with *C. cajan* FDL extract.

Table 2. Larval development inhibition of *Haemonchus contortus* caused by condensed tannins extracts of freeze-dried leaves and pellets of *Cajanus cajan*, *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* and their mix.

Plant	Species	Larval development (%)							
		<i>C cajan</i>		<i>L. leucocephala</i>		<i>M. esculenta</i>		Mix	
		Leaves	Pellets	Leaves	Pellets	Leaves	Pellets	Leaves	Pellets
	0	76,5	76,5	76,5	76,5	76,5	76,5	76,5	76,5
	0,1	72,1a	56,5b	25,1d	58,8b	25,0d	56,1b	nd	51,6c
	0,5	73,4a	41,2b	20,9d	42,3b	13,9e	14,0e	36,7c	37,5c
CT Dosis (mg/ml)	1,25	56,8a	18,4b	0,0	8,8d	0,0	3,7e	0,4f	12,7c
	2,5	26,0a	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b
	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	SEM	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,32	1,04
EC 50 (mg/ml)		0,934	0,868	0,489	0,729	0,195	0,182	0,51	0,752

Pelleting*dose interaction ($P < 0.0001$) was explained by the fact that the differences between treatments were dose-dependent. Comparison of EC_{50} values between FDL and pellets showed that pelleting reduces the anthelmintic activity. However, the pellets are still effective in reducing larval development. *M. esculenta* remains the least affected by pelleting and the most efficient (EC_{50} of FDL similar to EC_{50} of pellet).

The depressive effect due to pelleting was greater with *L. leucocephala* (48.5% increase of EC_{50}), then the mix (47.5% increase of EC_{50}), while the EC_{50} for *M. esculenta* remained stable (0% increase of EC_{50}).

No synergistic effect of the mix was found because the EC_{50} of the mix corresponded to the arithmetic mean of the EC_{50} of the three FDL.

The results of the LEIA are displayed in Table 3. In the negative PBS control, on average, 98% of *H. contortus* larvae were exsheathed after 70 minutes of contact with the solution for

exsheathment. Table 3 shows the percentages of exsheathed larvae after 70 min in order to compare FDL and pellet extracts.

Table 3. Larval exsheathment inhibition of *Haemonchus contortus* caused by condensed tannins extracts of freeze-dried leaves and pellets of *Cajanus cajan*, *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* and their mix.

Plant	Species	Larval exsheathment (%)							
		<i>C cajan</i>		<i>L. leucocephala</i>		<i>M. esculenta</i>		Mix	
		Leaves	Pellets	Leaves	Pellets	Leaves	Pellets	Leaves	Pellets
	0	98,2	98,2	98,2	98,2	98,2	98,2	98,2	98,2
	0,05	99,6a	98,3ab	100a	98,7ab	99,4ab	99,3a	98,6b	99,4a
	0,25	96,8a	86,5b	99,2a	99,3a	95,7a	99,4a	95,7a	98,9a
CT Dosis (mg/ml)	0,5	2,8a	0,3b	0,3b	0,26b	3,4a	89,1c	0,8b	0,2b
	1,25	0,5a	0,2a	0,15a	0,13a	0,2a	0,2a	1,4a	0,3a
	2,5	0a	0,2a	0a	0,2a	0a	0,5a	0,2a	0,5a
	SEM	0,72	0,74	0,72	0,7	0,74	0,7	0,7	0,7
	EC 50 (mg/ml)		0,364	0,342	0,3	0,364	0,684	0,758	0,36

The effect is similar for *L. leucocephala*, *C. cajan* and the mix, as shown by their EC₅₀ values, which are very similar. The EC₅₀ value of *M. esculenta* was double that of the other species, reflecting a lower efficacy ($P < 0.0001$).

Globally, pelleting has little effect on the ability of CT to inhibit larval exsheathment. The EC₅₀ increased by 21.3% for *L. leucocephala*, 10.8% for *M. esculenta*, and the EC₅₀ did not increase for *C. cajan* and the mix.

M. esculenta was the resource that was least effective for inhibiting larval exsheathment, as shown by its EC₅₀ value for both the leaf and pellet forms, which was the highest of the three species examined.

The EC₅₀ of the mix was close to that of *L. leucocephala* and *C. cajan*. Therefore, there may be a synergistic effect between the three plant species on inhibiting exsheathment. This trend was maintained for the pellets.

DISCUSSION

In this study, we wanted to assess: (i) the effect of pelleting on the anthelmintic activity of the CT contained in the selected species; (ii) the existence of synergy between different CT structures. According to the literature, CT are involved in both phases of the parasite cycle, the extra-host phase and the intra-host phase.

We therefore selected two tests for the two key stages of infestation: the L1 to L3 stage (extra-host) and the L3 infesting stage (intra-host).

In the extra-host phase, CT are not completely digested by the animal and can be recovered in the faeces where they could therefore prevent the first and second-stage larvae (L1, L2) to evolve towards the infection stage (third-stage L3) (Terrill *et al.*, 1994).

In the intra-host phase, the decrease in infestation is due in particular to larval exsheathment inhibition, as has been shown in many studies (Alonso-Diaz *et al.*, 2008; Azando *et al.*, 2011; Bahuaud *et al.*, 2006; Brunet *et al.*, 2007; Brunet and Hoste, 2006 ; de Oliveira *et al.*, 2011).

This effect is believed to be due to the inactivation of enzymes (proteinases) responsible for larval exsheathment (Rogers, 1982 ; Gamble, 1989).

Molan *et al.* (2000) showed that CT of *Lotus pedunculatus*, *Lotus corniculatus*, *Hedysarum coronarium* and *Onobrychis viciifolia* were able to reduce egg hatching by 34% and inhibit larval development (L1 to L3) by 91%, or even cause death of L1 and L2 *Teladorsagia circumcincta* larvae, and thereby interrupting the life cycle of nematodes (Molan and Faraj, 2010).

CT may be able to cross the nematode cuticle and prevent glucose absorption or block post-synaptic receptors leading to larval paralysis (Lem *et al.*, 2014). CT are also capable of

causing changes in the ultrastructure of larvae (Brunet et al., 2011; Kommuru et al., 2015; Martinez-Ortiz-de-Montellano et al., 2010). Brunet *et al.* (2011) observed a severe alteration of the hypodermis, muscle cell lyses and intestinal cells using electron microscopy.

CT chemical structure and anthelmintic activity relationships

Literature shows that CT bioactivities are dose-dependent, but also related to their chemical structure (Mueller-Harvey *et al.*, 2019). Four parameters are to be taken into account: (i) the type of flavan-3-ol subunits giving rise to two main classes of CT—Procyanidins (PC) and Prodelphinidins (PD)—differentiated by the presence of an additional hydroxyl on the B-ring of PD, (ii) the size of the tannins materialised by the mean degree of polymerisation (mDP), (iii) the presence of galloyl-groups on the C-ring (Mueller-Harvey *et al.*, 2019), and (iv) the stereochemistry of the C-ring of the flavan-3-ol subunit (cis or trans) (Naumann *et al.*, 2014). PDs are reported to be more active than PCs because of the additional hydroxyl function on the B-ring that would allow more hydrogen bonds to the protein of the larvae (Brunet and Hoste, 2006 ; Quijada *et al.*, 2015 ; Williams *et al.*, 2014). For the same reasons, galloylated CT would also be more active (Brunet and Hoste, 2006).

The plants used in the study were collected based on their diversity at a farm level, and we chose to differentiate them based on their pellet chromatographic profiles. On this basis, *M. esculenta* is different from *C. cajan* and *L. leucocephala* due to the larger amount of compound 4.

Regarding development inhibition, our results confirm the important anthelmintic potential of *M. esculenta* CT (Marie-Magdeleine *et al.*, 2010). The differences observed between species could be explained by the differences in CT composition reflected by the chromatographic profiles but also by the PC/PD ratio and the presence of galloyl groups. (Marie-Magdeleine *et al.*, (2018) reported that *M. esculenta* is richer in PD (PC/PD ratio = 0.16), which is quite different from *C. cajan* (PC/PD = 0.85). *L. leucocephala* has a more balanced composition

(PC/PD =0.59). Marie-Magdeleine *et al.*, (2018) also reported that the percentage of galloyl groups is very high for *M. esculenta* (37.44%) and *L. leucocephala* (26.44%), whereas no galloyl group is found in *C. cajan*.

Specific composition of *M. esculenta* (high amount of compound 4 but also higher amount of PD and galloyl groups, as mentioned by Marie-Magdeleine *et al.*, (2018)) could therefore explain its better activity on inhibiting larval development.

Concerning exsheathment inhibition, *L. leucocephala* and *C. Cajan* CT are the most active. These results confirm those obtained by Alonso-Diaz *et al.*, (2008) and de Oliveira *et al.* (2011) regarding the activity of *L. leucocephala* against *H. contortus* exsheathment.

Molan *et al.*, (2003) and Brunet and Hoste, (2006) showed that PD monomers were more active on the exsheathment of *H. contortus*, *in vitro*. *C. cajan* and *L. leucocephala* have greater amounts of PD monomers in their composition compared to *M. esculenta*.

As for development inhibition, the differences between the exsheathment inhibition property of *L. leucocephala* and *C. cajan* on one hand, and *M. esculenta* on the other hand, can be explained by different compositions shown by the extract profiles and characteristics of the CT.

Effect of pelleting on the anthelmintic properties of the plant species

Comparison of EC₅₀ shows that the anthelmintic potential of the extracts is globally preserved after pelleting. The EC₅₀ of FDL are similar to the EC₅₀ of pellets for *M. esculenta* for inhibiting larval development and for *C. cajan* and *L. leucocephala* for inhibiting larval exsheathment. Similar results have been obtained using *Sericea lespedeza* pellets on *H. contortus* (Kommuru *et al.*, 2015 ; Terrill *et al.*, 2007).

For both tests, the pelleting process (drying and pelleting) had a low impact on the anthelmintic properties of the plant species used in this study. This result could be related to the characteristics of our process, where the temperatures reached were compatible with

maintaining the biological properties of the tannins (25/35 °C during the air drying under shelter).

Pelleting plants leads to an increase of non-extractable CT (protein binding) compared to fresh plants (Mueller-Harvey *et al.*, 2019). We worked on CT extracts, so further experiments *in vivo* will be necessary to assess the effect of pelleting on the bioavailability of the CT. Moreover, according to Shaik *et al.* (2006), it seems that the main factor in anthelmintic activity is not the amount of extractable tannins, but the chemical structure of tannins involved.

Our results show that pelleting increased the amount of free flavan-3-ols in the extracts. As mentioned before, monomers of flavan-3-ols have been reported to have an effect on exsheathment, in particular PD monomers (Brunet and Hoste, 2006 ; Molan *et al.*, 2003), which are the most represented in the free flavan-3-ols of the pellets extracts.

Synergistic effects in CT extracts against larval exsheathment.

Quijada *et al.* (2015) showed that *H. Contortus* exsheathment could be inhibited by compounds belonging to a different chemical class from that of CT. Mengistu *et al.* (2017) showed that the anthelmintic activity of a tannin-rich plant extract against *H. contortus* exsheathment was due to the presence of both phenolic and non-phenolic compounds. However, in this study, we used CT extracts from FDL and pellets; therefore, our results on the synergy of exsheathment inhibition could be explained by different tannin associations, or also by the synergy with flavonoid monomers, which were found in our extracts. Klongsiriwet *et al.*, (2015) showed a synergistic effect between tannin and flavonoid monomers (quercetin and luteolin).

L. leucocephala contains quercetin (Von Son-de Fernex *et al.*, 2015) which could therefore have a synergistic action with the compounds of the other plant species.

In addition to the two main CT structures, PD and PC, there are other types of CT including propelargonidins, profisetinidins, prorobinetinidins and proguibourtinidins (Salminen and Karonen, 2011). These different molecules show the complexity of a CT mix and could also be responsible for the synergistic activities found for inhibiting *H. contortus* exsheathment.

CONCLUSION

The current study showed that pelleting has very little effect on anthelmintic activity and can even enhance this activity by increasing the amount of free flavan-3-ol monomers in the pellets. Therefore, the main parameter to develop nutraceutical pellets with anthelmintic properties is the choice of the plant containing the active compounds.

The combination of the plants composing the mix is to be considered because of the possible synergy between the activities of biomolecules, as found for the exsheathment phase of *H. contortus*.

In vitro tests could be carried out with whole plant extracts to evaluate the synergistic activity of the different phenolic and non-phenolic compounds of the plant species. Further *in vivo* tests will be required to assess the global nutraceutical activity of these pellets.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge the PTEA INRA experimental unit for parasite production. This work was completed with the financial support of the Region Guadeloupe, European funding FEDER, AgroEcoDiv project.

REFERENCES

- Alonso-Diaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Hoste, H., 2008, In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology* 153, 313-319.
- Aumont, G., Pouillot, R., Simon, R., Hostache, G., Varo, H., Barré, N., 1997, Parasitisme digestif des petits ruminants dans les Antilles françaises. *Inra Productions Animales* 10 (1), 79-89.
- Azando, E.V.B., Hounzangbe-Adote, M.S., Olounlade, P.A., Brunet, S., Fabre, N., Valentin, A., Hoste, H., 2011, Involvement of tannins and flavonoids in the in vitro effects of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts on the exsheathment of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 180, 292-297.
- Bahuaud, D., De Montellano, C.M.O., Chauveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2006, Effects of four tanniferous plant extracts on the in vitro exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology* 132, 545-554.
- Brunet, S., Aufrere, J., El Babili, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2007, The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both in vitro and in vivo. *Parasitology* 134, 1253-1262.
- Brunet, S., Fourquaux, I., Hoste, H., 2011, Ultrastructural changes in the third-stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. *Parasitology International* 60, 419-424.
- Brunet, S., Hoste, H., 2006, Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7481-7487.
- de Oliveira, L.M.B., Bevilaqua, C.M.L., Macedo, I.T.F., de Moraes, S.M., Monteiro, M.V.B., Campello, C.C., Ribeiro, W.L.C., Batista, E.K.F., 2011, Effect of six tropical tanniferous plant extracts on larval exsheathment of *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria* 20, 155-160.
- Dzowela, B.H., Hove, L., Mafongoya, P.L., 1995, Effect of drying method on chemical composition and in vitro digestibility of multi-purpose tree and shrub fodders. *Tropical Grasslands* 29, 263-269.
- Gamble, H.R.L., R.; Purcell, J. P., 1989, Light and scanning microscopy of the ecdysis of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Journal of Parasitology* 75, 303-307.
- Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F.J., 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.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Mueller-Harvey, I., Sotirakie, S., Louvandini, H., Thamsborg, S.M., Terrill, T.H., 2015, Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology* 212, 5-17.
- Hove, L., Ndlovu, L.R., Sibanda, S., 2003, The effects of drying temperature on chemical composition and nutritive value of some tropical fodder shrubs. *Agroforestry Systems* 59, 231-241.
- Kaplan, R.M., 2004, Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology* 20, 477-481.

- Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., 2012, An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* 186, 70-78.
- Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, A.R., Mueller-Harvey, I., Williamson, E.M., Hoste, H., 2015, Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *International Journal for Parasitology-Drugs and Drug Resistance* 5, 127-134.
- Kommuru, D.S., Whitley, N.C., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., Burke, J.M., Gujja, S., Mechineni, A., Terrill, T.H., 2015, Effect of sericea lespedeza leaf meal pellets on adult female *Haemonchus contortus* in goats. *Veterinary Parasitology* 207, 170-175.
- Lem, M.F., Vincent, K.P., Josue, W.P., Jeannette, Y., Gertrude, M.T., and Joseph, T., 2014, *In Vitro* Ovicidal and Larvicidal Activities of Stem Bark of *Terminalia glaucescens* (Combretaceae) against *Haemonchus contortus*. *American Journal of Plant Sciences* 5, 2859-2868.
- Marie-Magdeleine, C., Macheboeuf, D., Philibert, L., Arece Garcia, J., L., U., 2018, Various condensed tannins from tropical plants as potential multi-purpose nutraceutical in ruminant feed. *Advances in Animal Biosciences* 9, 680.
- Marie-Magdeleine, C., Udino, L., Philibert, L., Bocage, B., Archimede, H., 2010, In vitro effects of Cassava (*Manihot esculenta*) leaf extracts on four development stages of *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 173, 85-92.
- Martinez-Ortiz-de-Montellano, C., Vargas-Magana, J.J., Canul-Ku, H.L., Miranda-Soberanis, R., Capetillo-Leal, C., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., 2010, Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology* 172, 283-290.
- Mengistu, G., Hoste, H., Karonene, M., Salminen, J.P., Hendriks, W.H., Pellikaan, W.F., 2017, The in vitro anthelmintic properties of browse plant species against *Haemonchus contortus* is determined by the polyphenol content and composition. *Veterinary Parasitology* 237, 110-116.
- Molan, A.L., Faraj, A.M., 2010, The effects of condensed tannins extracted from different plant species on egg hatching and larval development of *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Folia Parasitologica* 57, 62-68.
- Molan, A.L., Meagher, L.P., Spencer, P.A., Sivakumaran, S., 2003, Effect of flavan-3-ols on in vitro egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology* 33, 1691-1698.
- Molan, A.L., Waghorn, G.C., Min, B.R., McNabb, W.C., 2000, The effect of condensed tannins from seven herbages on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration in vitro. *Folia Parasitologica* 47, 39-44.
- Mueller-Harvey, I., Bee, G., Dohme-Meier, F., Hoste, H., Karonen, M., Kölliker, R., al., e., 2019, Benefits of Condensed Tannins in Forage Legumes Fed to Ruminants: Importance of Structure, Concentration, and Diet Composition. *Crop Science* 59, 1-25.
- Naumann, H.D., Armstrong, S.A., Lambert, B.D., Muir, J.P., Tedeschi, L.O., Kothmann, M.M., 2014, Effect of molecular weight and concentration of legume condensed tannins on in vitro larval migration inhibition of *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 199, 93-98.
- Papadopoulos, E., 2008, Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Ruminant Research* 76, 99-103.

- Quijada, J., Fryganas, C., Ropiak, H.M., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I., Hoste, H., 2015, Anthelmintic Activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from Small Ruminants Are Influenced by Structural Features of Condensed Tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 6346-6354.
- Rogers, W.P., 1982, Enzymes in the exsheathing fluid of nematodes and their biological significance. *International Journal of Parasitology* 12, , 495-502.
- Salminen, J.P., Karonen, M., 2011, Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Functional Ecology* 25, 325-338.
- Shaik, S.A., Terrill, T.H., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Kaplan, R.M., Burke, J.M., Mosjidis, J.A., 2006, *Sericea lespedeza* hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Veterinary Parasitology* 139, 150-157.
- Sutherland, I.A., Leathwick, D.M., 2010, Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? *Trends Parasitol.*
- Terrill, T.H., Mosjidis, J.A., Moore, D.A., Shaik, S.A., Miller, J.E., Burke, J.M., Muir, J.P., Wolfe, R., 2007, Effect of pelleting on efficacy of *sericea lespedeza* hay as a natural dewormer in goats. *Veterinary Parasitology* 146, 117-122.
- Terrill, T.H., Waghorn, G.C., Woolley, D.J., McNabb, W.C., Barry, T.N., 1994, Assay and digestion of c-14-labeled condensed tannins in the gastrointestinal-tract of sheep. *British Journal of Nutrition* 72, 467-477.
- Von Son-de Fernex, E., Alonso-Diaz, M.A., Mendoza-de Gives, P., Valles-de la Mora, B., Gonzalez-Cortazar, M., Zamilpa, A., Gallegos, E.C., 2015, Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia* spp. *Veterinary Parasitology* 214, 89-95.
- Williams, A.R., Fryganas, C., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I., Thamsborg, S.M., 2014, Direct Anthelmintic Effects of Condensed Tannins from Diverse Plant Sources against *Ascaris suum*. *Plos One* 9.
- Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., von Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N.C., 2004, Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology* 20, 469-476.

Annexe 5. Minatchy N., Marie Magdeleine C., Garin M., Nimirf F., Romil-Granville D., Calif V., Bambou J.C. and Archimède H. Nutraceutical properties of *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta*, *Cajanus cajan* in goat kids infected with *Haemonchus contortus*.

(soumis)

Nutraceutical properties of *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta*, *Cajanus cajan* in goat kids infected with *Haemonchus contortus*

Nathalie Minatchy¹, Carine Marie Magdeleine¹, Miguel Garin¹, Ferdy Nimirf², Dimitri Romil-Granville², Valeriuse Calif¹, Jean-Christophe Bambou¹ and Harry Archimède^{1*}

¹INRA, UR143 Unité de Recherches Zootechniques, Domaine Duclos Prise d'eau, F-97170 Petit-Bourg, Guadeloupe

²INRA, UE1294 Plateforme Tropicale de recherche sur l'Animal, Domaine Duclos Prise d'eau, F-97170 Petit-Bourg, Guadeloupe

* Corresponding author. Tel.: ☎590-255933; fax: ☎590-255936.

E-mail address: Harry.Archimede@inra.fr

Abstract

Background: Proteins and condensed tannin-rich foliage (TRF), which includes the legumes, are potentially useful as nutraceuticals. However, large variability with respect to the responses of animals to TRF have been reported in the literature. The main objective of this study was to evaluate the diet and anthelmintic properties of three TRF types both individually and in combination. We hypothesized that synergistic or antagonistic effects on feed and anthelmintic values related to associations between TRF types may occur.

Results: Nutritional and anthelmintic characteristics of *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta*, *Cajanus cajan* and a mixture of the compounds (1/3 *Leucaena leucocephala*, 1/3 *Manihot esculenta*, 1/3 *Cajanus cajan*) were evaluated using alfalfa pellets as a control. TRF ingredients were combined with *Dichanthium* hay (48/52 dry matter) in mixed diets and were consumed by 4-month-old Creole goat kids. *Dichanthium* hay was also evaluated as a food source alone. Measurements were carried out in animals without parasites and in animals artificially infected with *Haemonchus contortus*. Individual food intake and the digestibility of each diet were measured along with kid growth. There were no significant differences between the growth rates of pre-infected animals and animals fed mixed diets that included alfalfa, which indicated that goats fed TRFs were adequately fed. The anthelmintic potential of *Leucaena leucocephala* TRF was the highest tested, while the *Cajanus cajan* TRF was lowest

Conclusions: This work confirms dietary and anthelmintic properties, which vary depending on the TRF considered. Feeding on mixed rations of TRF allow Creole goats to experience high rates of growth. However, the anthelmintic potential of each type of TRF tested was more variable. The combination of TRF did not have synergistic or antagonistic effects on feed value or the anthelmintic potential of TRF.

Key words: Créole goat kids, nutraceutical, *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta*, *Cajanus cajan*

Background

The fight for food security and considerations regarding the worsening of global warming have produced public opinion that is increasingly hostile to the use of synthetic chemical molecules in the food production chain, which prompted us to evaluate existing agro systems and farming practices [1]. To date, parasite control of small farmed ruminants is primarily based on the preventive or curative use of chemotherapeutics. Integrated control of gastrointestinal nematodes of livestock is an ongoing area of research. With this in mind, protein and condensed tannin-rich foliage (TRF), including legumes, are potentially useful nutraceutical compounds. However, a large degree of variability with respect to the responses of animals has been reported in the literature [2,3]. Condensed tannins (CTs) and proteins directly and indirectly affect the development and effects of gastrointestinal nematodes (GINs). Nevertheless, the beneficial effects of condensed tannins against GINs can be offset by their depressive effect on food intake and digestion, feed value and, consequently, animal growth and/or milk production. CTs reduce methane emissions and ammonia volatilization within urine or dung [4]. Initially, dietary concentrations of CTs were suspected to explain the large degree of variability observed within animal responses to CTs in relation to dose-dependent anthelmintic [5], methane emission [4] and protein digestibility effects reported in the literature. Recent work has highlighted the importance of the molecular composition and structural traits of CTs, as well as of the diet containing CTs [2]. The main objective of this study is to evaluate the nutraceutical properties of *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta*, *Cajanus cajan* pellets and a mixture of the three foliage types. We also hypothesized that synergistic effects may result from intake a combination of TRF types.

Results

The chemical compositions of types of feed are reported in Table 1. *Dichanthium spp* hay is characterized by its low crude protein (CP) levels and high fibre content, which indicates that it is a low quality grass. The foliage considered had higher CP content than alfalfa, except *Cajanus cajanus*, which had less CP. Intake and total tract digestion values of experimental diets are reported in Table 2. Diet intake was lower in kids provided hay compared to those provided mixed diets according to $LW^{0.75}$ consumption values reported. Among the mixed diets considered, intake was lower for *Cajanus cajan* and mixed foliage, which was in line with the decreased hay intake observed in kids provided the diet.

Table 1. Chemical composition (Organic matter (OM), Crude Protein (CP), Neutral Detergent Fibre (NDF), Acid Detergent Fibre (ADF), Acid Detergent Lignin (ADL), Condensed Tannin (CT)) of diet ingredients.

	OM	CP	NDF	ADF	ADL	TC
<i>Dichanthium spp</i> hay	92.4	7.2	73.5	39.0	6.2	0
Alfalfa pellet	89.3	17.9	31.3	21.9	5.6	0
<i>Leucaena leucocephala</i> pellet	91.3	21.8	28.8	18.6	10.3	12.3
<i>Manihot esculenta</i> pellet	91.0	20.5	46.3	32.7	16.6	7.7
<i>Cajanus cajan</i> pellet	93.8	15.9	47.4	34.1	16.6	21.3

Table 2. Mean values of Dry Matter (DM), Organic Matter (OM), Crude Protein (CP), Neutral Detergent Fibre (NDF) and Acid Detergent Fibre (ADF) intake and total tract digestibility (ttd) of *Dichanthium* hay or mixed diets of *Dichanthium* hay and alfalfa, *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta*, *Cajanus cajan* or a blend (1/3 *Cajanus cajan*, 1/3 *Leucaena leucocephala*, 1/3 *Manihot esculenta*) of foliage as pellet fed by of Creole kids goats.

	<i>Dichanthium spp</i>	Alfalfa	<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>Manihot esculenta</i>	<i>Cajanus Cajan</i>	Blend	SEM	P
Intake								
DM (g/d)	312.4c	444.5a	455.1a	447.5a	414.2b	404.0b	14.50	0.001
DM(g/LW ^{0.75})	41.2c	62.6a	62.6a	61.4a	57.4b	56.3b	1.81	0.001
DM Hay (g/d)	312.4c	270.1a	270.5a	265.3a	231.7b	224.1b	13.60	0.001
Digestible DM (g/LW ^{0.75})	27.3d	41.2a	38.1a	35.5b	31.8c	30.5c	0.90	0.001
OM (g/d)	283.6c	407.2a	416.9a	409.9a	379.4b	370.1b	10.41	0.001
CP (g/d)	22.6e	50.8f	60.1a	56.3b	45.8d	50.3c	0.79	0.001
NDF (g/d)	229.5d	253.3a	252.8a	279.0b	256.7a	236.6ad	8.23	0.001
ADF (g/d)	121.6e	143.5a	140.2a	162.5b	152.3d	138.0a	4.35	0.001
CT (g/d)	0.0e	0.0e	22.6a	14.0b	38.8d	24.4c	0.07	0.001
Total tract digestibility								
DM (%)	61.9a	63.6d	60.4a	55.9b	53.9b	53.5b	1.78	0.001
CP (%)	41.6c	58.5d	53.2a	48.9b	44.8c	45.1b	1.77	0.001
NDF (%)	71.5c	67.9d	64.3a	62.9a	60.5b	59.2b	1.52	0.001
ADF (%)	68.2d	64.3e	58.6a	52.8b	50.8c	49.3c	1.75	0.001

There was no depressive effect of the infestation on intake. Observed variation (< 10%) within diets week to week was similar to that observed for non-infested animals given the hay. These differences were due to the quality of the hay. There was also no significant effect of infestation on total tract digestion of diet components.

On the basis of a hypothesis stating that components of the diets were non-additive, the estimated tract digestibility values (%) of the dry matter (DM) and Crude Protein (CP) from

Leucaena leucocephala, *Manihot esculenta*, *Cajanus cajan*, the compound blend and alfalfa were 63.1 and 59.5, 52.4 and 53.1, 47.9 and 47.2, 48.7 and 46.0, and 70.9 and 69.5, respectively. The hierarchies observed for neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF) digestion followed the same trends as those observed for dry matter.

Details regarding nitrogen metabolism of kids fed the diets are included in Table 3.

Table 3. Nitrogen balance, Average Daily Gain (ADG), Feed conversion with Creole kids fed *Dichanthium* hay or mixed diets of *Dichanthium* hay and alfalfa, *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta*, *Cajanus cajan* or a blend (1/3 *Cajanus cajan* , 1/3 *Leucaena leucocephala* , 1/3 *Manihot esculenta*) of foliage as a pellet.

	<i>Dichanthium spp</i>	Alfalfa	<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>Manihot esculenta</i>	<i>Cajanus cajan</i>	Blend	SEM	P
N intake (g/d)	3.6e	8.1f	9.6a	9.0b	7.3d	8.0c	0.118	0.001
N faecal excretion (g/d)	2.2b	3.5c	4.7a	4.8a	4.2a	4.6a	0.162	0.001
N urinary excretion (g/d)		1.15a	1.4a	0.9b	0.9b	0.9b	0.169	0.1580
N retained (g/d)		3.5a	3.6a	2.9b	2.1c	2.4c	0.227	0.0001
N faecal excretion ⁽¹⁾ , g/day	4.7b	3.3a	3.6a	4.1b	4.4b	4.4b	0.228	0.0001
N urinary excretion ⁽¹⁾ , g/day		1.2	1.0	0.8	1.2	1.0	0.193	0.4807
ADG, g/day	26.4b	70.3a	70.7a	66.9a	59.1a	60.6a	10.78	0.0262
Feed conversion (feed/kg ADG)	13.2	9.0	8.1	9.0	9.8	12.1	2.23	0.3327

⁽¹⁾ Means were estimated for equal levels of nitrogen (N) intake.

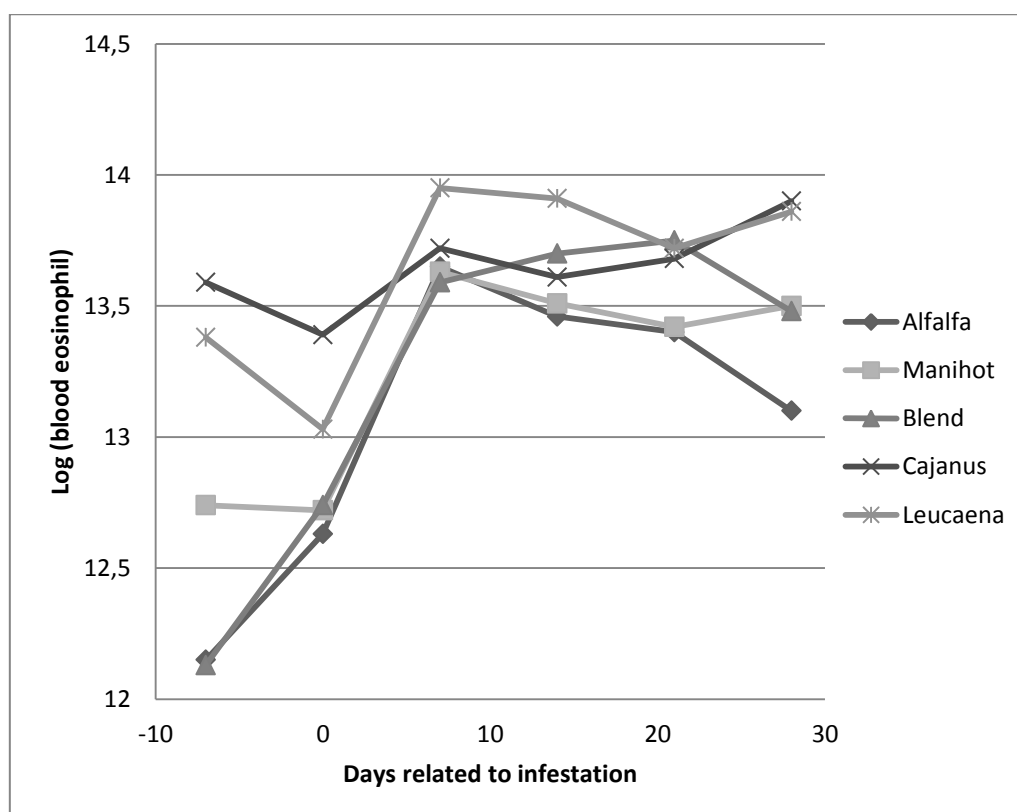
Nitrogen intake was lowest in kids fed hay, and increased (from lowest to highest) in kids fed *Cajanus cajan*, the compound blend, alfalfa, *Manihot esculenta* and *Leucaena leucocephala*. There were no significant differences between diets with regard to urinary nitrogen excretion, even when diets were compared using equal nitrogen intake values. Faecal excretion of nitrogen, when equal quantities of nitrogen intake were compared, was significantly lower in kids fed alfalfa or *Leucaena leucocephala* compared with the others diets.

The average daily gain (ADG) values are reported in Table 2. ADGs were lower in kids fed hay while no significant differences were recorded between other diets. ADG values decreased with infestation. Post infestation values (except for hay diets consumed by uninfected animals) were 61.7, 22.7, 37.7, 47.0, 27.8 and 35.1g/d for kids fed *Leucaena*

leucocephala, *Manihot esculenta*, the blend, *Cajanus cajan*, hay and alfalfa diets, respectively.

Weekly evaluations of eosinophils are summarised in Figure 1.

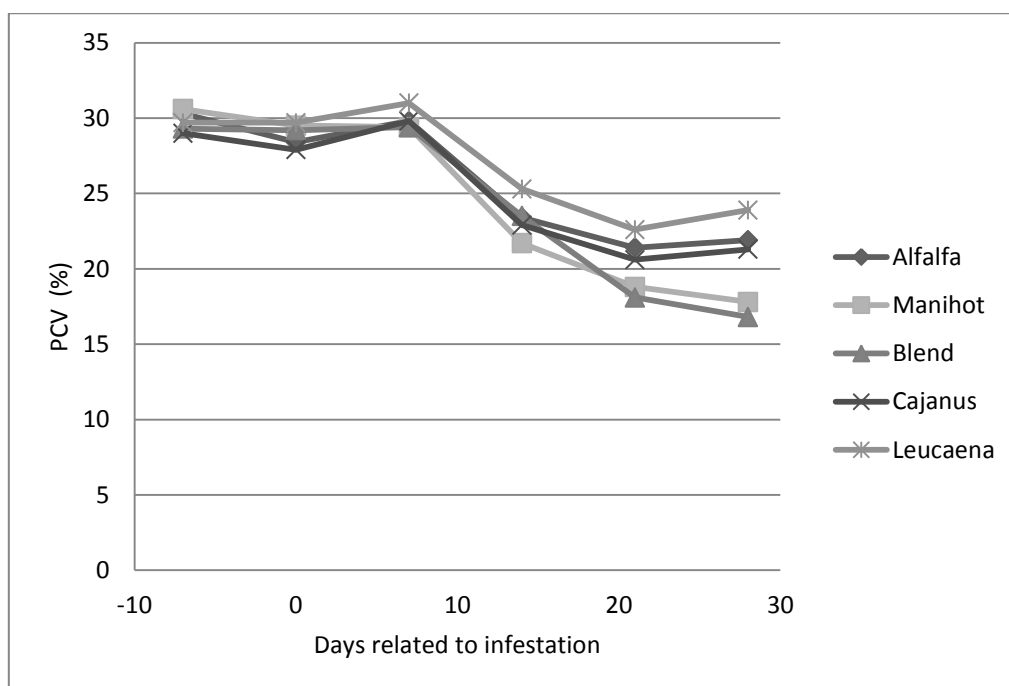
Figure 1. Eosinophil levels in the blood of Creole goat kids fed *Dichanthium* hay or mixed diets of *Dichanthium* hay and alfalfa, *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta*, *Cajanus cajan*, or a blend (1/3 *Cajanus cajan* , 1/3 *Leucaena leucocephala* , 1/3 *Manihot esculenta*) of foliage as a pellet.



Overall, eosinophils increased after the infestation and peaked around the seventh day of infestation until they gradually returned to initial levels. There were no significant differences in levels of eosinophils observed between diets provided.

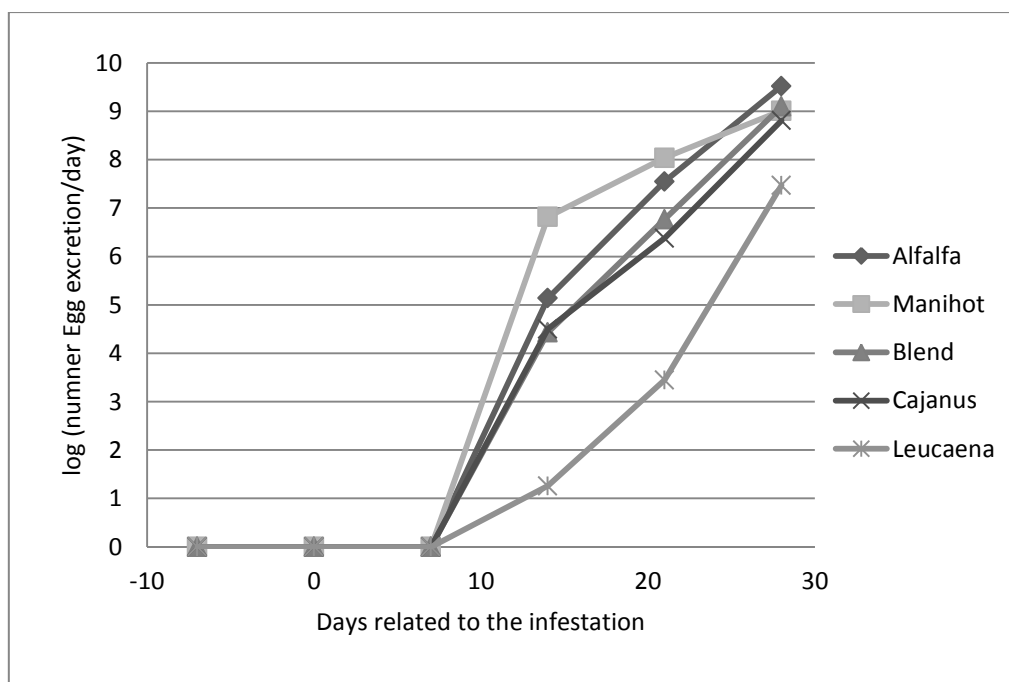
Weekly evaluations of blood packed cell volume (PCV) are summarised in Figure 2. There were no significant differences between values before and after infestation. PCV tended to decrease on the fourteenth day after infestation and differences between diets were greatest 28 days post-infestation. Globally, PCV values were higher ($P < 0.001$) with *Leucaena leucocephala* compared to the other diets. PCVs values were lower ($P < 0.001$) in kids fed *Manihot esculenta* and the compound blend and compared to the other diets.

Figure 2. Packed Cell Volume (PCV) in the blood of Creole goat kids fed *Dichanthium* hay or mixed diets of *Dichanthium* hay and alfalfa, *Cajanus cajan*, *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta*, or a blend (1/3 *Cajanus cajan* , 1/3 *Leucaena leucocephala* , 1/3 *Manihot esculenta*) of foliage as a pellet.



The weekly evaluation of faecal egg counts (FECs) are summarised in Figure 3.

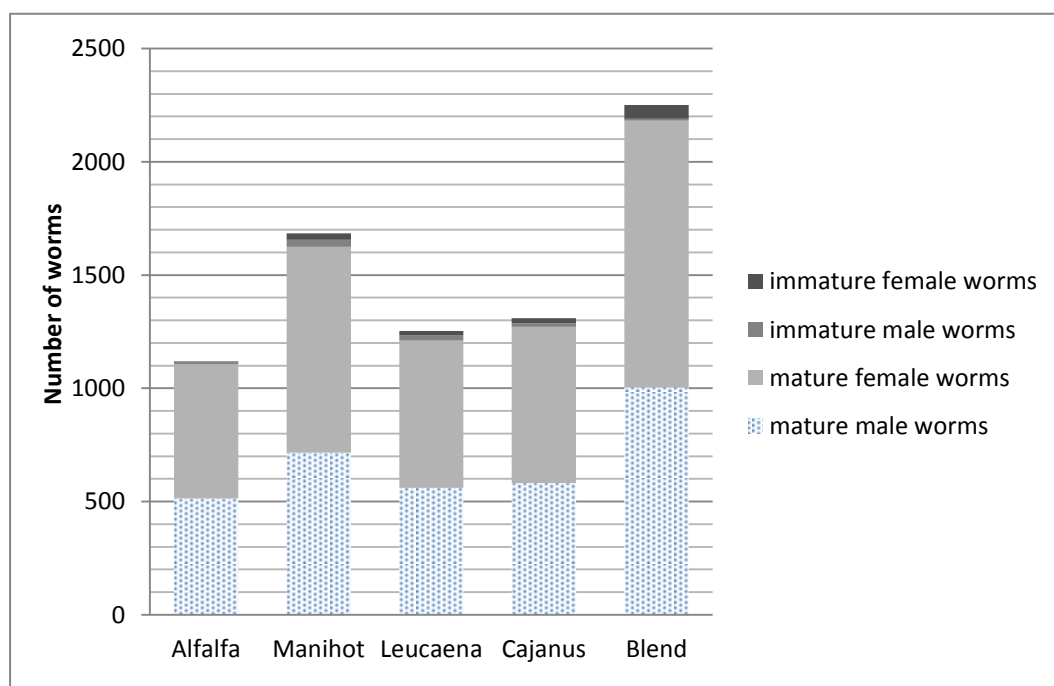
Figure 3. Faecal Egg Counts (FECs) of Creole goat kids fed *Dichanthium* hay or mixed diets of *Dichanthium* hay and alfalfa, *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta*, *Cajanus cajan* or a blend (1/3 *Cajanus cajan* , 1/3 *Leucaena leucocephala* , 1/3 *Manihot esculenta*) of foliage as a pellet.



As expected, the FEC was zero for uninfected kids. FECs varied depending on duration of infestation and diet. The FEC values observed in kids fed *Leucaena leucocephala* were lower ($P < 0.001$) than those of kids fed other diets. There were no significant differences between *Manihot esculenta* and alfalfa diets, and kids fed the diets had significantly higher FEC values than those reported for *Cajanus cajan* and the blend. The high FEC values observed in kids fed *Manihot esculenta* were associated with very high FEC counts in two kids at day 14 post infection.

No significant differences in any of the indicators considered were observed regarding the profiles of abomasum worm populations within kids (Figure 4). The prolificacies of worms were 278, 4981, 502, 562, 6076 eggs et mature worm with *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta*, *Cajanus cajan* foliag, TRF blend and alfalfa. Except for *Manihot esculenta*, the prolificacies tend to be ($P < 0.015$) with the TRF compared with alfalfa.

Figure 4. The number of worms in the abomasum of Creole goat kids fed *Dichanthium* hay or mixed diets of *Dichanthium* hay and alfalfa, *Cajanus cajan*, *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta*, or a blend (1/3 *Cajanus cajan* , 1/3 *Leucaena leucocephala* , 1/3 *Manihot esculenta*) of foliage as a pellet.



Data obtained from kids fed blended diets were consistent with those values obtained for each of the ingredients in the mixture, whatever the nutritional or health criterion.

Discussion

The chemical compositions of feed provided to goat kids in experiments here are consistent with previously published data [6]. The low intake and total tract digestibility values associated with kids provided *Dichanthium spp* hay were consistent with data showing its chemical composition, which indicated that it was poor quality hay. The method for calculating the digestibility of pellets seems relevant. This is especially true when referring to estimates of the digestibility of alfalfa, for which values are available in the literature. Hay digestion was improved in kids provided mixed diets, which can be attributed to the catalytic activity of TRFs (described below). This, consequently, results in an overestimation of the digestibility of TRF. Further, our data seem to indicate that the digestibility of TRF is highly variable. None TRF-associated values reached values determined for alfalfa, which was classified as high-value feed.

Considering estimated total tract digestion of DM and CP, *Cajanus cajanus* was classified as low-value feed, *Leucaena leucocephala* and *Manihot esculenta* were classified medium-value feed. When the protein value of TRF was assessed on the basis of the total digestibility of CP, the same classification of *Cajanus cajan*, *Leucaena leucocephala* and *Manihot esculenta* was determined. These results are consistent with theoretical degradability (DT_{CP}) values of CP obtained in the laboratory using the same TRF [5]. DT_{CP} values of *Leucaena leucocephala*, *Manihot esculenta* and *Cajanus cajan* were 64.5, 65.0 and 48.0, respectively. When Average Daily Gain (ADG) values were considered, slight differences in comparisons within TRF and between TRF and alfalfa were observed. First, differences in feed value between TRF and alfalfa would decrease. Within the TRFs, *Cajanus cajan* would have a lower feed value.

CTs, by protecting feed from microbial digestion in the rumen and enzymatic digestion in the intestine [7], modulate the potential of TRFs to: i) provide fermentable nitrogen in the rumen; ii) alter the digestibility of proteins in the intestine. It is generally understood that the consumption of more than approximately 4–5% CTs, a value that varies according to the nature of the CTs, results in the reduced protein value of TRFs [2]. TRFs used in this experiment were above this 4–5% threshold, so proteins within the feed were partially protected from digestion. This can be seen when examining DT_{CP} values, which were lower than that of alfalfa. Nevertheless, DT_{CP} values were not exclusively related to CT concentrations with respect to the estimated digestibilities of different TRFs. However, effects of CTs may not be proportional to their concentrations, since the lowest digestibility values observed have not been associated with plants with the highest CT content. Previous works

[7] by other authors have shown that tannins likely produce high-threshold effects, which should be taken into account.

Throughout experiments performed here, no external signs of intoxication (anorexia, ruminal atony, hepatic and renal failure, ulcers along the digestive tract, and severe gastroenteritis) were observed, irrespective of the type of TRF provided. These effects of intoxication have been reported in the literature, but have been mainly associated with plants rich in hydrolysable tannins [7]. Low intake has also been associated with TRF, which is a result of its astringent taste [7]. This was not observed in the present experiment where TRFs were 48% of the diet provided. The growth of Creole goats fed TRFs with alfalfa, with respect to growth potential values (about 80 g/d) and performance values, indicate that TRFs provided in these experiment are good supplements and improve the quality of low-quality forage rations. The rate of incorporation of TRFs into the mixed diets is an important factor when considering their use. Optimal rates of TRF incorporation vary depending on the experimental objective. For instance, enhancing the use of low-value forage may require different quantities of TRF than maximizing animal performance. The use of foliage from browses and tree fodders to supplement low-quality roughage has been the subject of several reports [8–10]. Foliage provides nitrogen, minerals and vitamins that are insufficiently provided by low-quality roughage. Consequently, it improves the activity of rumen microbes, which enhances fibre utilization. We assume the feed of this experiment provided similar benefits. In our experiment, foliage contributed to an average of 48% of the total dry matter ingested. Patra [8] reported that the positive effects of foliage on rumen microbes were obtained when foliage was at least 16% of the diet. Further, foliage levels up to 42% have the potential to enhance the performance of sheep fed low-quality roughage. Our results are in accordance with these reports and indicate a positive effect of supplementation on animal growth. Although not significant, growth differences between diets provided may be explained by the potential of TRF to provide digestible protein within the intestine.

We did not observe any effect of animal infestation on feed intake and digestion. This result is in accordance with some previous reports [11]. Intake and digestibility decreases have been observed in infested animals compared with healthy ones, but this finding has not been exclusively reported in the literature [11]. It is likely that differences in the history and health of animals, the infecting strain, the extent of the infection, and feed characteristics explain the variability observed in the literature [12]. Reductions in PCV, which were observed 14 d post-infection, were expected and reflected the haematophagous activity of *H. contortus* [13]. Cei

et al [11] reported an 23.4% average reduction of PCV in goats for a one-unit increase in log-transformed FEC. Protein over nutrition with diets that increase the supply of digestible protein in the intestine, partially compensates for endogenous losses (blood, sloughed cells, etc.) [14]. PCV values determined here indicate that different TRF types have different capacities to compensate for these types of losses. These differences are not exclusively a result of differences in total digestible protein ingested in relation to the estimate made for each of the diets. We hypothesize that differences in amino acid profiles may also contribute to differential effects of TRF observed.

Reductions in FEC with the consumption of TRF confirm the anthelmintic effects of prodelphinidins and galloylated CT [2]. However, our results show that the anthelmintic activity varied according to the type of TRF provided. These differences were not proportional to concentrations of TC. There are likely effects of specific tannin compositions that are not yet clear [2]. The number and profile of worms (male, female, immature, mature) were not significantly different in kids fed different types of TRFs. However, the quantities of eggs excreted were affected. We hypothesize that the differences in egg excretion could be explained by prolificacy of female worms which, in this experiment, tended to vary according to the diets consumed. The depressive effect of CT on worm fecundity has previously been reported [15–17].

We did not observe any synergistic or antagonistic effects of TRFs in terms of both dietary and health criteria. Concerning anthelmintic activity, the hypothesis of a probable synergy was made on the basis of acquired knowledge indicating that the two major components of CTs, procyanidin (PC) and prodelphinidin (PD) have variable distributions in plants and PD have been shown to have greater anthelmintic activity [2]. In addition, other phenolic compounds have also been shown to be unevenly distributed in plants with anthelmintic activity [2]. To date, evidence of synergy between tannins and phenolic compounds has only been observed *in vitro*.

Conclusion

This work confirms dietary and anthelmintic properties of TRFs, which varied depending upon the type of feed provided. Providing mixed diets of TRFs to Creole goats produced high levels of growth. However, the anthelmintic potential of TRFs was more variable.

Combinations of TRFs did not have synergistic or antagonistic effects on the feed value or the anthelmintic potential of TRFs.

Materials and methods

Location

This research was carried out at the animal experimental station of the National Agricultural Research Institute of the French West Indies, Guadeloupe. This experimental unit in Guadeloupe has an accreditation to experiment (n°A971802) and involved staff has been trained in experimentation and animal welfare. Foliage was collected in a dry and humid area of Guadeloupe. Animals were treated in accordance with the guidelines and regulations for animal experimentation of the French Ministry of Agriculture. The protocol (APAFIS#5527-2016050608133139v2) was validated by the Ministry of National Education, Higher Education and Research under the advice of the Animal Care and Use Committee of French West Indies and Guyana (N°069).

Feed provided

The experiment was designed to evaluate nutritional and anthelmintic properties of *Leucaena leucocephala* (L), *Manihot esculenta* (M) and *Cajanus cajan* (C) foliage alone or in combination (B). The plants are representative of the diversity of resources (peas and tuber byproducts, shrubs used as fodder and/or natural barriers) available within crop and livestock mixed farming systems. These plants also contain different levels of condensed tannins, which were determined based on their HPLC profiles (Minatchy *et al*, unpublished data). Six diets were evaluated: Diet D, *Dichanthium spp* hay *ad libitum*; diet DA, *Dichanthium* hay *ad libitum* + 225 g/d of alfalfa pellet; diet DL, *Dichanthium* hay *ad libitum* + 225 g/d of *Leucaena leucocephala* pellet; diet DM, *Dichanthium* hay *ad libitum* + 225 g/d of *Manihot esculenta* pellet; diet DC, *Dichanthium* hay *ad libitum* + 225 g/d of *Cajanus cajan* pellet; diet DB, *Dichanthium* hay *ad libitum* + 225 g/d of a mixed pellet containing 1/3 *Leucaena leucocephala*, 1/3 *Manihot esculenta* and 1/3 *Cajanus cajan*. The alfalfa pellet was used in experiments as a foliage-rich, tannin-lacking control. The inclusion of mixed TRF sources was intended to detect possible synergies or antagonisms resulting from the association of TRFs on nutritional and anthelmintic criteria. Synergy and antagonism refer to event where two or more agents produce an effect greater or lower in combination than would be predicted from their individual contributions.

The hay used was mainly composed of 60-day-old *Dichanthium* spp derived from a fertilised and irrigated natural savannah grass. *Leucaena leucocephala* was from collections of 9- to 12-month-old fallow, not fertilised farmlands. *Manihot esculenta* foliage was collected from 8- to 12-month-old crops during the harvest of tubers. *Cajanus cajan* foliage was collected from 8- to 10-month-old crops post-harvest. The young stems and leaves of three plants were harvested and subsequently sun dried in a greenhouse for 3 to 5 d. Leaves with petioles were isolated from the stems and were ground (through a 3-mm screen) then granulated with a GR150E system (Oliotechnology, Burgun, Wissembourg, France). The average pellet size was 12 mm long and 3 mm in diameter. Alfalfa pellets came from industry. The composition of feed provided is shown in Table 1.

Animals and experimental design

Forty-nine goat male kids aged approximately 4 mo. old, weighing on average 13 ± 2.0 kg at the beginning of the experiment, were used during a 3-month trial. The age and sex of goats used for the experiment meant animals were particularly sensitive to gastrointestinal strongyles. Moreover, as an animal model and a breeding species, goats are more sensitive to infection than sheep and have unique resistance mechanisms. All the animals came from the INRA farm where they were raised in a pasture in accordance with current French welfare regulations. Before beginning the experiment, all the kids were orally administered praziquantel (Cestocure® Bayer) and ivermectin (Oramec, Merial, Lyon, France, 0.3 mg/kg body weight). Faecal egg counts were performed after treatment to confirm the parasitic-free status of animals.

The experiment included four weeks of diet adaptation, 2 weeks of measurements before artificially infesting a portion of the kids, 6 weeks of post-infestation measurements, the slaughter of kids 4 weeks post-infestation. The kids were experimentally infected with a single oral dose of 10,000 *H. contortus* third-stage, infective larvae (L3). This dose was provided in order to produce very high levels of contamination (based on faecal egg excretion), which were found in kids grown in the pasture.

Six experimental lots based on the diet and the parasitic status (infected *versus* uninfected) of animals were formed as follows: lot 1, six uninfected kids fed diet D; lot 2, nine uninfected and subsequently infected kids fed DA; lot 3, ten uninfected and subsequently infected kids fed DL; lot 4, ten uninfected and subsequently infected kids fed DM; lot 5, seven uninfected

and subsequently infected kids fed DC; lot 6, seven uninfected and subsequently infected kids fed DB. The lots initially contained 10 animals. The numbers included in some were reduced because the pre-experimentation anthelmintic treatment was not 100% effective. According to this experimental design, the pre-infestation period acts as experimental control.

The lots were balanced on the basis of kid weight and ADG between 30 and 90 d. Five animals per group were placed in metabolic cages for the collection of urine and the others in individual boxes on the ground. The kids were fitted with faecal bags in order to collect faeces. Reduced numbers of animals in lots 6 and 7 is a result of the availability of *Cajanus cajan* leaves, which was lower than predicted. A kid was removed from lot 2 because it was not parasites free prior to artificial infestation.

Measurements and calculations

All measurements of the characteristics of kids were carried out individually. Kids were individually weighed every two weeks throughout the trial. Daily live weight gain (DLW) values were estimated using regression of weight over time. Feed intake (offered - refused) was recorded for each kid from Monday to Friday throughout the experiment. The daily dry matter intake of each ingredient and the total intake of dry matter (DM), organic Matter (OM), neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF), and crude protein (CP) were determined on a daily and metabolic weight basis. The feed efficiency (FE) was estimated for each kid by dividing DLW by its daily diet intake. Total faecal collection and sampling were used for chemical analyses and to determine total tract digestibility. Four measurement periods of total tract digestibility (each one lasting 5 days) were carried out during the experiment: two before and three after the artificial infestation. The total tract digestibility was estimated by subtracting feed excreted/feed intake from feed intake.

Blood was sampled every week, using EDTA-coated tubes (Becton Dickinson, Plymouth, UK) from each kid using the jugular vein puncture method. The number of circulating eosinophils was measured according to the method described by Dawkins *et al.* [18]. Eosinophils were counted using a Malassez cell counter. Packed cell volume (PCV) was estimated using a capillary microhaematocrit (centrifuged for 5 min at 12,000 rpm). The same day, faecal samples were collected to determine the faecal egg counts (FECs) using the McMaster method.

Four weeks post-infection, five kids from each infected group were slaughtered to recover and count worms [19]. The abomasum was isolated from animals less than 10 min post-slaughter and immediately processed. It was cut open over a tray which caught stomach contents and was then placed into a flask. The abomasum wall was washed thoroughly under a stream of tap water and the washings were placed into another flask (washing 1). The abomasal mucosa (after being washed) was retained in a third flask for further processing. The abomasal mucosa was immersed in warm tap water for 4–5 h (37 °C) to recover inhibited or non-inhibited larvae, and remaining juvenile and adult worms (washing 2). Water was added to the contents during each washing to 2 L. Contents mixed with water were sieved through a wire-mesh screen with an aperture of 125 mm. The washings were sieved using a wire-mesh screen with an aperture of 32 mm. Each subsample was mixed manually and three aliquots (100 mL) of each subsample were taken to ensure homogeneous sampling. One 100-mL subsample (i.e. approximately 10% of the total wash volume) was taken per animal. Formalin preservative (35% ethanol, 2.5% formol, qsp 1,000 mL distilled water) was added to the subsamples (5%, v/v), which were stored at 4°C for further use. Worms from each subsample were identified and counted using a binocular magnifying glass with magnification of 6.3–50x, separating the males from the females, and the total worm count was determined. The liver, kidney, and abomasum walls were observed to identify necrotic damage and gastritis, which are indicators of the eventual toxicity of diets provided.

Laboratory analyses

The dry matter content of feed, refusals, and faeces was established by drying until a constant weight was obtained using a forced draught oven at 60°C. Samples of the diets, refusals, and faeces were dried under the same conditions and milled through a 1-mm screen (Reich hammer mill, Haan, Germany) prior to analysis. OM and nitrogen analyses were performed according to AOAC [20], methods 923.3 and 992.15, respectively. To determine OM, ashing at 550°C for 6 h was performed and nitrogen analyses were performed using the Dumas method. Analysis of the nitrogen content of fresh urine samples was performed using the same method used to determine the nitrogen content of diets. The crude protein levels were calculated as $N \times 6.25$. The cell wall components (NDF, ADF and Acid Detergent Lignin (ADL)) in the diets and faeces were determined using a sequential procedure (AOAC methods 200.04 and 973.18, respectively, for NDF and ADF + ADL). Condensed tannins (CTs) were extracted in an ultrasonic bath with a 70% (vol/vol) aqueous acetone solution and isolated with Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). Condensed tannin content was

determined using the vanillin–H₂SO₄ method described by Laurent [21]. A 70% (vol/vol) sulfuric acid solution containing 1% vanillin (wt/vol) was added to the methanolic extract of the plant, and absorbance was measured at 500 nm. The concentrations of CTs were determined using individual extracts from each plant as standards.

Statistical analyses

Data were analysed to compare nutritional characteristics (intake, digestion, nitrogen balance, ADG, feed efficiency) using the mixed SAS procedure [22]. Differences between means were tested using the pdiff option. Significance was declared at probability levels $\leq 5\%$. Only data from the pre-infestation period and the first week post-infestation were considered. The value one-week post-infection was considered since the impact of infestation remained low within that timeframe. The statistical model used was as follows:

$$Y_{ij} = \mu + D_i + T_j + A_k + e_{ijk} \quad (1)$$

where Y_{ij} is the explained variable, μ is the mean, D_i is the diet fixed effect ($i = 1 - 6$), T_j is the time relative to the date of the artificial infestation ($j = 1 - 2$), A_k is the random effect associated with the animal ($k = 1 - 49$) and e_{ijk} is the residual term.

Animal responses (intake, total tract digestibility, nitrogen balance, ADG, eosinophil numbers, PCV, FEC) to the infestation were analysed using the SAS mixed procedure (SAS, 2008). PCVs and FECs were log-transformed ($\log(\text{Eosinophils} + 1)$, $\log(\text{FEC} + 1)$) before analysis; however, only raw means are reported in data tables. The general model was as follows:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + T_j + (D*T)_{ij} + A_k + e_{ijk} \quad (2)$$

Where Y_{ijk} is the explained variable, μ is the mean, D_i is the treatment fixed effect ($i = 1 - 6$), T_j is the time relative to the date of the artificial infestation ($j = 1 - 5$), A_k is the random effect associated with the animal ($k = 1 - 49$), and e_{ijk} is the residual term.

The abomasum worm count was analysed using a randomised design using the general linear model procedure from SAS, which considered diet as a fixed effect. The differences between means were tested using the pdiff option.

Additional files

None

Abbreviations:

ADF Acid detergent fibre

ADG Average Daily Gain

ADL Acid detergent lignin

CP Crude protein

CT Condensed Tannins

DM Dry matter

FEC Faecal Eggs Count

LW Live Weight

NDF Neutral detergent fibre

PCV blood packed cell volume

TRF Tannin and protein-Rich Foliage

Acknowledgements

The authors would like to thank Lucien Philibert, Yoan Felicité, Xavier Godard, Fred Periacarpin, Christian Deloumeau, Claude Barbier and Frederic Pommier for their technical assistance.

Authors' contributions

Nathalie Minatchy (PhD student) conducted the experiment and wrote the paper

Carine Marie Magdeleine (researcher) supervised the work and corrected the paper

Miguel Garin (Master student) assisted the PhD student in the management of the experiment

Valeriuse Calif (technician) performed the laboratory analysis

Ferdy Nimirf and Dimitri Romil-Granville (technicians) carried out the measurements on the animals

Jean-Christophe Bambou (physiologist parasitologist) provided expertise in the design of the protocol and the interpretation of the results

Harry Archimède (thesis supervisor) supervised the work and corrected the paper

Funding

This study was completed with the financial support of INRA, Region Guadeloupe and European funding: FEDER (AgroEcoDiv project), FEADER (RITA TRANS'BOV).

Availability of data and materials

Essential data and materials have been reported in the paper. The entire study database, owned by the National Institute of Agricultural Research (INRA), is available from the corresponding author.

Ethical approval and consent to participate

The animals were treated in accordance with the guidelines and regulations for animal experimentation of the French Ministry of Agriculture. The study was conducted in an INRA experimental unit in Guadeloupe who has an Accreditation to experiment (n°A971802) and involved staff trained in experimentation and animal welfare. The protocol (APAFIS#5527-2016050608133139v2) has been validated by the Ministry of National Education, Higher Education and Research under the advice of the Animal Care and Use Committee of French West Indies and Guyana (N°069).

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest

Author details

¹INRA, UR143, Unité de Recherches Zootechniques, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, French West Indies

²INRA UE1284, Plateforme Tropicale d'Expérimentation sur l'Animal, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, French West Indies

References

1. Charlier, J. *et al.* Mind the gaps in research on the control of gastrointestinal nematodes of farmed ruminants and pigs. *Transbound. Emerg. Dis.* **65**, 217–234; <https://doi.org/10.1111/tbed.12707> (2018).
2. Mueller-Harvey, I. *et al.* Benefits of condensed tannins in forage legumes Fed to ruminants: importance of structure, concentration, and diet composition. *Crop Sci.* **59**,1–25 (2019).
3. Hoste, H *et al.* Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Vet. Parasitol.* **212**, 5–17 (2015).
4. Archimède, H. *et al.* 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 (2016).
5. Marie-Magdeleine et al 2020, unpublished data
6. Archimède, H., Bastianelli, D., Fanchone, A., Gourdine, J.L., Fährasmane, L. Aliments protéiques dans les systèmes mixtes intégrés polyculture-élevage en régions tropicales. *INRA Prod. Anin.* 31 (3), 221-236; <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2018.31.3.2338> (2018).
7. Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F. J. and Mantecón A. R. Tannins and ruminant nutrition. *Span J. Agric. Res.* **2**, 191–202; <https://10.5424/sjar/2004022-73> (2004).
8. Patra, A.K. A meta-analysis on effects of supplementing low-quality roughages with foliages from browses and tree fodders on intake and growth in sheep. *Livest. Sci.* **121**, 239–249 (2008).
9. Patra, A.K. Effects of supplementing low-quality roughages with tree foliages on digestibility, nitrogen utilization and rumen characteristics in sheep: a meta-analysis. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **94**, 338–353 (2009).
10. Niderkorn, V. & Baumont, R. Associative effects between forages on feed intake and digestion in ruminants. *Animal.* **3**, 951–960; <https://doi.org/10.1017/S1751731109004261> (2019).

11. Ceï, W., Salah, N., Alexandre, G., Bambou, JC and Archimède, H. Impact of energy and protein on the gastro-intestinal parasitism of small ruminants: a meta-analysis. *Livest Sci.* **212**, 34–442; <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.03.015> (2018).
12. Kyriazakis, I. Is anorexia during infection in animals affected by food composition? *Anim. Feed. Sci. Tech.* **156**, 1–9 (2010).
13. Coop, R.L., Kyriazakis, I. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends Parasitol.* 2001, **17**, 325–330.
14. Kyriazakis I, Houdijk J. Immunonutrition: nutritional control of parasites. *Small Rumin. Res.* **62**, 79–82 (2006).
15. Niezen, J.H., Waghorn, T.S., Charleston, W.A.G., Waghorn, G.C. Growth and gastrointestinal parasitism in lambs grazing one of seven herbage and dosed with larvae for six weeks. *J.Agric. Sci.* **125**, 281–289 (1995).
16. Landau, S., Azaizeh, H., Muklada, H., Glasser, E.D., Ungar, T., Baram, H., Abbas, N., Markovics, A. Anthelmintic activity of Pistacia lentiscus foliage in two Middle Eastern breeds of goats differing in their propensity to consume tannin-rich browses. *Vet. Parasitol.* **173**, 280–286; <https://doi:10.1016/j.vetpar.2010.07.006> (2010).
17. Min, B.R., Pomroy, W.E., Hart, S.P., Sahlou, T. The effect of short-term consumption of a forage containing condensed tannins on gastro-intestinal nematode parasite infections in grazing wether goats. *Small Rumin. Res.* **51**, 279–283 (2004).
18. Dawkins, H.J.S., Windon, R.G., Eagleson, G.K. Eosinophil responses in sheep selected for high and low responsiveness to *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* **19**, 199–205 (1996).
19. Gaba, S., Chadoeuf, J., Monestiez, P., Sauve, C., Cortet, J., Cabaret, J. Estimation of abomasum strongyle nematode infections in sheep at necropsy: tentative proposals for a simplified technique. *Vet. Parasitol.* **140**, 105–113 (2006).
20. AOAC. Official methods for analysis. Association of Official Analysis Chemists, Gaithersburg, MD, USA (2006).
21. Laurent S. Etude comparative de différentes méthodes d'extraction et de dosage des tannins chez quelques ptéridophytes. (In French). *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **83**, 735–752 (1975).
22. SAS Institute Inc. SAS Language Guide for Personal Computers, Edition 9.1. (2004).