

Utilisation d'extraits végétaux (huiles essentielles et extrait de polyphénols) pour diminuer la dégradation ruminale des protéines – Étude *in vitro*

D. MACHEBOEUF (1), Y. PAPON (1), M. ARTURO-SCHAAN (2), J.-L. MOUSSET (3), R. CHEREL (2)

(1) INRA, Unité de Recherches sur les Herbivores, Theix - 63122 Saint-Genès-Champanelle - France

(2) CCPA, Z.A. Nord Est du Bois de Teillay - 35150 Janzé - France

(3) Techna, Les Landes de Bauges, BP10 route de Saint-Etienne de Montclus - 44220 Couëron - France

RESUME - La dose efficace pour réduire la dégradation des protéines par l'écosystème microbien ruminal *in vitro* a été déterminée pour 5 huiles essentielles naturelles (HE) (de thym, d'origan, d'origan au thymol, de cannelle et d'aneth), 3 molécules pures (*thymol*, *carvacrol* et *cinnamaldehyde*) et un extrait de polyphénols. Elle a permis de réduire de 10 à 40 % la production d'ammoniac par rapport à un témoin sans additif. Trois types de profils dose-réponse ont permis de discriminer l'action des HE à base de *cinnamaldehyde*, des HE à base de *thymol/carvacrol* ou à base de *carvone*. Des mélanges de 3 additifs dans différentes proportions ont été testés pour rechercher une combinaison optimale résultant d'interactions possibles entre des produits dont les modes d'action sont différents.

Use of plant extracts (essential oils and polyphenol extract) to reduce the ruminal degradability of proteins – an *in vitro* essay

D. MACHEBOEUF (1), Y. PAPON (1), M. ARTURO-SCHAAN (2), J.-L. MOUSSET (3), R. CHEREL (2)

(1) INRA, Unité de Recherches sur les Herbivores, Theix - 63122 Saint-Genès-Champanelle - France

SUMMARY - The capacity of 5 natural essential oils (EO) (*Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, thymol chemo-type of *Origanum vulgare*, *Cinnamomum verum*, *Anethum graveolens*), 3 pure constituents (thymol, carvacrol, cinnamaldehyde) and one polyphenol extract, to reduce the degradability of proteins in the rumen was assessed by *in vitro* fermentation. The active doses induced a decrease in the ammonia production from 10 to 40 %, in contrast to the control without an additive. Three profiles of dose-response curves discriminated EO with cinnamaldehyde from EO with thymol or carvacrol and EO with carvone. Several mixtures of the three feed additives were tested in combination using a simplex centroid experimental design to take advantage of their different modes of action and of possible interactions between them.

INTRODUCTION

L'interdiction en Europe le 1^{er} janvier 2006 de tous les antibiotiques utilisés comme additifs dans l'alimentation animale a provoqué un regain d'intérêt pour les substituts d'origine naturelle que représentent les extraits végétaux. Dans ces extraits, des métabolites secondaires des plantes, tels que les polyphénols et les huiles essentielles, sont connus depuis fort longtemps pour leurs propriétés, respectivement astringentes et antibactériennes. Ces composés pourraient donc être utilisés comme additifs dans l'alimentation des ruminants, pour modifier l'orientation des fermentations ruminales et améliorer la nutrition des animaux. Ainsi une diminution de la dégradation des protéines dans le rumen augmente la quantité d'acides aminés disponibles pour les besoins du ruminant.

L'objectif de cette étude était d'une part, de déterminer pour 8 huiles essentielles et un extrait riche en polyphénols, la dose maximale en additif tolérée par l'écosystème du rumen et la dose utile pour obtenir une diminution significative de la dégradation des protéines par les micro-organismes. D'autre part, des mélanges de 3 produits dans différentes proportions ont été testés pour rechercher la combinaison optimale issue d'interactions possibles entre produits.

Compte tenu du grand nombre d'expériences requis par ces deux types d'essai (essai dose-réponse et plan de mélange), l'expérimentation a été réalisée *in vitro* ce qui permettait par ailleurs de comparer l'effet des additifs dans des conditions bien contrôlées.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. EXTRAITS VEGETAUX

Parmi les produits qui ont été testés, 3 étaient purs (*carvacrol*, *thymol*, *cinnamaldehyde*) et 5 étaient des huiles essentielles naturelles extraites de l'aneth (40 % *carvone*), de la cannelle (79 % *cinnamaldehyde*), du thym (47 % *thymol*), de l'origan (89 % *carvacrol*, 5 % *thymol*) et de l'origan au thymol (21 % *carvacrol*, 35 % *thymol*). Un extrait végétal à base de polyphénols fourni par les sociétés CCPA et Techna a également été testé.

1.2. FERMENTATIONS IN VITRO

Les contenus ruminiaux de trois moutons adultes de race Texel, alimentés au niveau de l'entretien avec un régime composé de 47 % de foin de dactyle, de 45 % d'orge broyé aggloméré et de 8 % de paille hachée, étaient collectés le matin à jeun, mélangés et filtrés sur un tamis de porosité 800 μ m. Les fermenteurs batch, préalablement mis sous atmosphère d'azote et contenant 2 volumes de tampon phosphate-carbonate étaient alors inoculés avec un volume de jus de rumen filtré. Le substrat utilisé pour les fermentations était finement broyé et constitué de 25 % de foin de fléole, de 30 % de tourteau de soja et 45 % de maïs. Les fermenteurs étaient scellés et incubés pendant 16 heures à 39°C avec une agitation intermittente de 30 s toutes les 3 minutes. Le temps d'incubation a été choisi afin d'éviter la phase de lyse microbienne qui intervient après 18 heures.

Le produit à base de polyphénols a été introduit dans les fermenteurs par pesée. Les HE ont été injectées en solution

dans l'éthanol juste avant l'inoculation des fermenteurs. La concentration finale en éthanol dans les batchs était inférieure à 0,5 % et n'avait aucun effet sur l'activité de l'écosystème microbien ruminal.

1.3. REPONSES EXPERIMENTALES

A la fin de l'incubation, le pH et la production de gaz ont été mesurés et la composition des gaz analysée. La concentration du milieu de fermentation en ammoniac (NH₃) et en acides gras volatils (AGV) ainsi que la composition du mélange d'AGV ont été analysées en début et en fin d'incubation permettant le calcul de production des produits de fermentation. La production de NH₃ et les productions d'*isobutyrate* et d'*isovalerate* issus respectivement de la dégradation de la valine et de la leucine ont été utilisées comme les indicateurs de l'activité protéolytique de l'écosystème microbien.

1.4. PLANS EXPERIMENTAUX ET STATISTIQUES

1.4.1. Essai dose-réponse

Pour chaque additif, 5 ou 6 doses ont été testées. Les doses étaient comprises entre 0,012 et 0,067 g/g de matière sèche de substrat pour le produit à base de polyphénols et entre 0,5 et 10 mmol/l de "principe actif" pour les HE. Pour les HE naturelles, le principe actif était supposé être la *carvone* pour l'aneth, le *cinnamaldehyde* pour la cannelle et le mélange *thymol+carvacrol* pour les autres. Tous les traitements ont fait l'objet de 3 mesures. L'attribution de l'additif et de la dose à chaque fermenteur a été effectuée de façon aléatoire. Dans chaque série, 3 fermenteurs témoins (CTRL) avec substrat mais sans additif ont été ajoutés. Les productions des différents métabolites fermentaires ont été exprimées en relatif par rapport à la moyenne des 3 CTRL. Par convention, les valeurs moyennes des CTRL ont été fixées arbitrairement à 1 pour l'ensemble des graphiques.

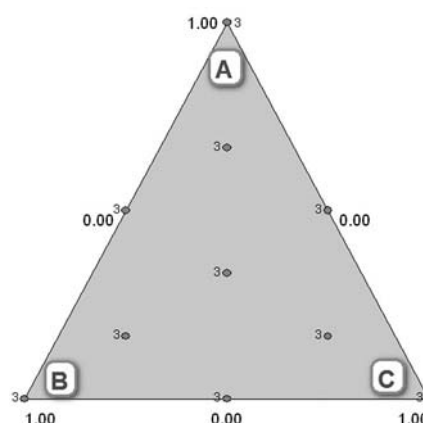
Pour chaque additif, les résultats ont été traités par analyse de variance à une voie (SAS) et par les tests de comparaison de moyennes de Duncan et de Dunnett (comparaison/CTRL).

1.4.2. Essai de mélange

Parmi les produits précédemment utilisés, le produit à base de polyphénols (A), une HE à base de phénol (B) et une HE à base de phényl-propane (C) ont été sélectionnés pour faire des mélanges d'additifs. Le plan expérimental était un plan simplex centroïde à 3 constituants (figure 1). Les sommets du triangle représentaient chaque additif seul à la dose maximale (codée 1). Les autres points du plan étaient des mélanges de "i" additifs ($0 < i \leq 3$; $0 < \text{dose}(i) < 1$; $\sum \text{dose}(i) = 1$). Les doses maximales choisies correspondaient aux doses qui s'étaient révélées efficaces pour la réduction de la production d'ammoniac dans l'essai dose-réponse. Elles étaient de 0,034 g/g MS de substrat pour A, de 1 mM et 2 mM respectivement pour B et C. Tous les traitements ont été étudiés 3 fois et ont été distribués aléatoirement dans chaque série de fermentation.

Les résultats ont été traités par analyse de variance et des modèles de type linéaire, quadratique ou cubique ont été testés pour ajuster une surface de réponse aux données.

Figure 1 : plan de mélange simplex centroïde à 3 composants



2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. ESSAI DOSE-REPOSE

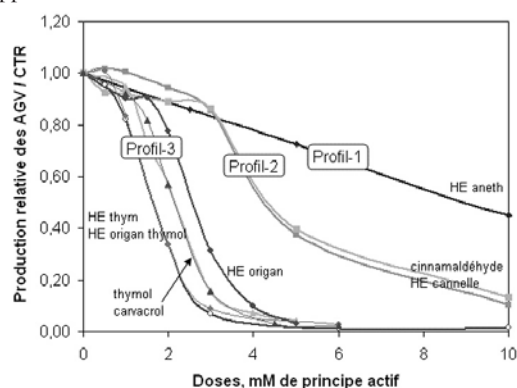
2.1.1. Effet sur les productions de gaz et d'AGV

L'ajout d'extrait de polyphénols n'a eu aucun effet significatif sur la production des AGV et de gaz. En revanche, l'effet dose a été significatif pour l'ensemble des HE et s'est traduit par une réduction de ces productions avec l'augmentation de la dose. On a pu distinguer cependant 3 types de profils pour la production d'AGV (figure 2).

Le premier profil, observé avec l'HE d'aneth était de type linéaire négatif sur les produits de la fermentation. Le profil 2, observé pour le *cinnamaldehyde* et l'HE de cannelle, suivait une courbe sigmoïde négative avec un point d'inflexion autour de la dose 3 mM correspondant à une réduction d'environ 40 à 50 % des AGV et des gaz par rapport au CTRL. L'analyse des gaz a montré que le passage de ce point se caractérisait par la perte de la fonction méthanogène de l'écosystème microbien et l'accumulation d'hydrogène dans le volume mort du fermenteur. Dans le profil 3 constaté pour le *thymol*, le *carvacrol*, et les HE de thym, origan et origan au *thymol*, une chute drastique des productions de gaz et d'AGV et l'arrêt complet des fermentations ont été observés au-delà d'une dose "seuil" (tableau 1). Pour une dose inférieure au seuil, les productions d'AGV totaux n'ont pas été significativement modifiées par rapport au CTRL alors que les HE à base de *thymol* ou *carvacrol* ont accusé une réduction du propionate de -10 à -30 % (-23 % ; $p < 0,001$ pour le *thymol*) compensée en partie par un accroissement non significatif du butyrate. Les propriétés antibactériennes des HE semblent avoir touché plus particulièrement les *Archaea* pour le *cinnamaldehyde* alors qu'elles ont affecté toute la communauté microbienne dans le cas du *thymol* et du *carvacrol*.

L'effet dose a permis de discriminer nettement 3 types de molécules : un composé issu de la voie de synthèse des terpènes (*carvone* ; profil 1), des composés issus de la même voie mais ayant un cycle phénolique (*carvacrol*, *thymol* ; profil 3) et un composé phénolique issu de la voie des phényl-propanes (*cinnamaldehyde* ; profil 2).

Figure 2 : effet dose-réponse sur la production relative des AGV par rapport à un contrôle sans additif



2.1.2. Effet sur l'activité protéolytique

L'augmentation de la dose de l'extrait de polyphénols a provoqué une réduction linéaire significative de la production de NH_3 ($R^2=0,98$). La différence avec le CTRL était de l'ordre de -13 % (non significative) pour une dose de 0,034 g/g MS de substrat et de l'ordre -24 % ($p<0,05$) pour une dose de 0,067 g/g MS de substrat.

En ce qui concerne les HE, d'une façon générale, l'augmentation de la dose a provoqué dans un premier temps une réduction de NH_3 jusqu'à un minimum, puis un retour à une production comparable au CTRL au passage de la dose seuil et enfin une réduction brutale avec l'arrêt des fermentations pour les doses très élevées (figure 3). Ce profil de courbe original montre qu'il existe pour certaines HE une dose inférieure au seuil et efficace pour la réduction de la production de NH_3 (tableau 1).

Tableau 1 : effet de la dose d'HE sur la production de NH_3

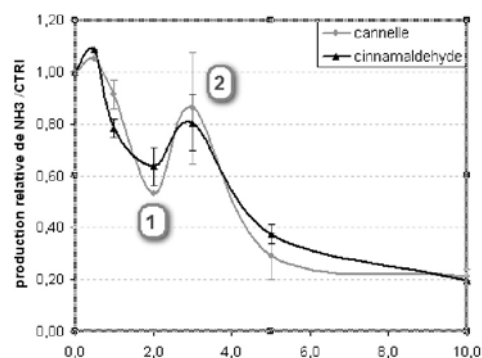
Additif	Dose seuil (mM)	Dose efficace (mM)	Réduction de la production NH_3/CTRL pour la dose efficace
HE aneth	--	2,5	- 12,5 % ns
cinnamaldéhyde	3,0	2,0	- 36,5 % **
HE cannelle	3,0	2,0	- 47 % **
Carvacrol	1,5	1,0	- 17,5 % ns
Thymol	1,5	1,0	- 15,7 % ns
HE thym	1,0	0,5	- 4 % ns
HE origan thy.	1,0	0,5	- 3 % ns
HE origan	2,0	1,5	- 30 % ns

- Interprétation du minimum (figure 3 ; [1])

La réduction de la production de NH_3 n'était pas due à une augmentation de la synthèse microbienne compte tenu des propriétés antibactériennes des HE. Elle était liée à une réduction (significative pour le *thymol*, la cannelle et *cinnamaldéhyde*) des acides isovalériques et isobutyriques issus de la dégradation des acides aminés. Elle pourrait être la conséquence d'un effet négatif des HE sur les protozoaires et donc d'une diminution de la prédation des bactéries. Cependant dans les régimes riches en énergie, les protozoaires sont souvent associés à une production abondante de butyrate (Jouany *et al.*, 1988 ; Brossard *et al.*, 2004). Or celle-ci s'est maintenue au niveau du CTRL ou a augmenté, excepté pour l'aneth, la cannelle et le *cinnamaldéhyde* où elle a diminué (respectivement -52 %, -28 % et -22 %). On pourrait donc émettre l'hypothèse que la réduction de NH_3 résultait d'une diminution de la

dégradation des protéines bactériennes dans le cas de l'aneth, d'une diminution de la dégradation des protéines du substrat pour les HE à base de *carvacrol* et *thymol* et des deux phénomènes simultanés pour les HE à base de *cinnamaldéhyde*.

Figure 3 : effet dose-réponse du *cinnamaldéhyde* et d'HE de cannelle sur la production d'ammoniac



- Interprétation du maximum (figure 3 ; [2])

Les variations observées au niveau du pic de production de NH_3 ont été très fortes et montrent qu'il s'agit d'une zone sensible qui correspond à la dose seuil au-delà de laquelle des fonctions ont été touchées de façon irréversible (méthanogénèse pour les HE à base de *cinnamaldéhyde*, toutes les activités microbiennes pour les HE à base *carvacrol* et *thymol*).

Par ailleurs, Wallace *et al.* (2002) ont observé dans certaines cultures pures de micro-organismes du rumen que l'ajout de HE ne modifiait pas la croissance mais augmentait considérablement la lyse bactérienne. Aussi, peut-on supposer que c'est l'augmentation de la lyse microbienne pour cette dose critique qui est responsable de l'augmentation de la production de NH_3 .

2.1.3. Comparaison des molécules pures et des HE naturelles

Les résultats obtenus avec des HE naturelles ont été très cohérents avec ceux obtenus à partir des produits purs correspondants. Les profils pour le *cinnamaldéhyde* et les HE cannelle (79 % de *cinnamaldéhyde*) sont très proches pour les AGV (figure 2) et pour l' NH_3 (figure 3). Ils suggèrent que les composés minoritaires présents dans l'HE de cannelle n'ont pas eu d'incidence nette sur l'activité du produit naturel. De même, les profils identiques pour le *carvacrol* et le *thymol* montrent que l'emplacement du groupement hydroxyle sur le cycle de la molécule est resté sans conséquence pour son activité.

Par contre, les profils d'HE de thym et d'origan au *thymol* ont été similaires à ceux du *thymol* ou du *carvacrol* mais l'effet est survenu pour des doses plus faibles en principes actifs (*thymol+carvacrol*). Ces observations suggèrent que les autres composés présents dans ces HE naturelles ont eu un effet non négligeable (Macheboeuf *et al.*, 2004). De même, l'origan naturel a eu, quant à lui, un effet similaire mais retardé par rapport au *carvacrol* qui pourrait être causé par la présence d'une molécule antagoniste dans le produit naturel. Aussi, apparaît-il très important dans un domaine non linéaire de connaître pour un mélange naturel, l'effet des constituants présents, même dans des proportions non majoritaires.

2.2. ESSAI DE MELANGE

La variabilité inter-série a été forte. Les différents mélanges testés n'ont pas eu d'effet sur la production totale des AGV. En revanche, les productions de propionate et de gaz ont été influencées significativement ($R^2=0,30$; $p=0,013$) et de façon linéaire négative par la teneur en B du mélange, pour arriver à une réduction par rapport au CTRL de 14 et 11 % respectivement lorsque le produit B devient le seul constituant du mélange.

La production de NH_3 a été ajustée avec un modèle quadratique ($R^2=0,36$; $p=0,06$; figure 4). Les constituants utilisés seuls (les sommets du triangle) ont donné des résultats cohérents avec ceux de l'essai dose-réponse avec des réductions de NH_3 de 12, 17, et 15,5 % respectivement pour A, B et C. L'examen des axes A-B et B-C montre qu'il n'y a pas eu de synergie pour ces couples de constituants alors qu'il pourrait exister une interaction positive entre A et C. Ces deux constituants ont des modes d'action différents qu'il pourrait être intéressant de combiner pour chercher à minimiser la production de NH_3 .

CONCLUSION

- L'effet des HE sur l'écosystème microbien du rumen peut être très varié : soit avoir un effet progressif (HE aneth) ou drastique (HE à base de *thymol*, *carvacrol*) sur l'ensemble des activités microbiennes, soit toucher plus spécifiquement une activité ou une population microbienne (méthanogénèse, *Archaea*, avec les HE à base de *cinnamaldehyde*).
- En deçà des doses seuils, il existe des doses intéressantes qui permettent une réduction de l'activité protéolytique de l'écosystème ruminal sans perturber de façon significative sa production en AGV et donc en ATP.
- Dans le cas d'utilisation de produits d'origine naturelle, il est très important aussi de connaître l'effet en mélange des composés non majoritaires du produit car dans un domaine non linéaire, une petite variation de la composition peut avoir des conséquences importantes.
- La recherche d'interactions positives dans les mélanges d'additifs peut être intéressante pour l'amélioration de l'efficacité d'un produit ou la réduction des coûts.

Brossard L., Martin C., Chaucheyras-Durand F., 2004. Reprod. Nutr. Dev., 44(3) , 195-206

Jouany J.-P., Demeyer D.Y., Grain J., 1988. J. Feed Sc.Technol. 21, 229-265

Macheboeuf D., Papon Y., Arturo-Schaan M., 2004. Reprod. Nutr. Dev., 44 (Suppl .1), S39-S40

SAS, 1988. SAS/Stat user's guide. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA

Wallace J.R., McEwan N.R., McIntosh F.M., 2002. Asian-Aust. J. Anim. Sc., 15(10), 1458-1468

Figure 4 : effet du mélange de 3 constituants (A : extrait végétal à base de polyphénols ; B : HE à base de phénols ; C : HE à base de phényl-propane) sur la production relative d'ammoniac par rapport à un témoin sans additif (CTRL)

