

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/281798515>

Effet d'une supplémentation en huiles essentielles et composés d'huiles essentielles chez le ruminant : analyse statistique

Article · January 2007

CITATIONS

3

READS

293

4 authors, including:



Virginie Noirot

13 PUBLICATIONS 249 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Daniel Sauvart

AgroParisTech

506 PUBLICATIONS 6,110 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Laboratory of Materials, molecules and applications [View project](#)



Description of a pig psychosocial chronic stress model [View project](#)

Effet d'une supplémentation en huiles essentielles et composés d'huiles essentielles chez le ruminant : analyse statistique

V. NOIROT¹, R. MONCOULON², D. SAUVANT³, C. BAYOURTHE^{2*}

¹Génuol, Z.I. Albipôle F-81000 Albi-Terssac - FRANCE

²INRA, Université de Toulouse, UMR1289, Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème et Métabolisme, Chemin de Borde-Rouge-Auzeville, BP 52627, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex ; INPT-ENSAT, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex, ENVT, F-31076 Toulouse Cedex 3 - FRANCE

³UMR INRA INA P-G, Physiologie de la Nutrition et Alimentation, 16 rue Claude Bernard, F-75231 Paris cedex 05 - FRANCE

* Auteur chargé de la correspondance : E-mail : bayourth@ensat.fr

RÉSUMÉ

Les huiles essentielles sont des composés chimiques dits secondaires produits par les plantes. Ils sont potentiellement capables de modifier les fermentations ruminales. Une analyse statistique a été conduite à partir de données issues de la littérature et réunissant 11 références, afin de qualifier les réponses générales des fermentations ruminales à une supplémentation en huiles essentielles ou leurs composés. Les différents produits testés ont été séparés en deux groupes : le groupe n°1 correspondait aux produits considérés comme les plus antimicrobiens d'après la littérature *i.e.* produits étant ou contenant de la cinnamaldéhyde, de l'eugénole, du thymol, du carvacrol ou de la vanilline. Le groupe n°2 contenait les autres produits. Les effets des deux groupes de produits ont été testés sur différentes variables comme le pH, les acides gras volatils (AGV) et l'ammoniac (N-NH₃). Les essais conduits *in vitro* et *in vivo* ont été étudiés séparément, et *in vitro*, les mesures réalisées en temps répétés ont été traitées séparément de celles réalisées à un temps unique et de moyennes de mesures. Les deux groupes de produits ont augmenté le pH et diminué la concentration en AGV totaux mesurés *in vitro*. Le groupe n°1 a diminué les concentrations en N-NH₃, en petits peptides, en acides aminés et en AGV totaux, ainsi que la proportion d'acétate *in vitro*. Les produits du groupe n°2 ont augmenté les concentrations en N-NH₃ et en petits peptides, et la proportion d'acétate *in vitro*, mais ces effets n'ont pas été retrouvés dans tous les cas. Généralement, plus la dose était importante plus les effets étaient marqués. *In vivo*, les produits du groupe 1 ont eu tendance à augmenter le pH et à diminuer la concentration en N-NH₃ dans le rumen.

Mots-clés : Ruminants, huile essentielle, composés d'huiles essentielles, analyse statistique.

Introduction

La digestion microbienne dans le rumen est un phénomène majeur dont l'efficacité peut être améliorée par l'utilisation d'additifs alimentaires. En agissant sur l'équilibre de la population microbienne, ils permettent un certain "contrôle" du lieu de digestion et/ou une orientation des fermentations vers la formation de produits terminaux qui doivent être utilisés plus efficacement par l'animal. Les régulateurs de flore, de nature antibiotique, ont été largement utilisés dans le passé. Cependant leur utilisation est aujourd'hui interdite en élevage laitier et à viande dans l'Union Européenne. Dans ce contexte, les extraits végétaux, véhiculant une image de produit plus naturel, offrent de nouvelles opportunités.

Parmi les extraits de plantes utilisés en alimentation animale, les plus connus sont les huiles essentielles (HE). Ce sont des

SUMMARY

Effect of essential oils and essential oils compounds supplementations in ruminant species: statistical analysis

Essential oils are secondary plant compounds that have great potential in manipulating ruminal fermentation. A statistical analysis was conducted from a literature database built up from 11 references in order to generalize responses of essential oils or essential oil compounds on ruminal fermentation. The different products tested were divided in two groups: group 1 containing products with high antimicrobial activity (cinnamaldehyde, eugenol, thymol, carvacrol, vanillin) and group 2 containing other products. The effect of each group was studied on different variables such as pH, volatile fatty acids and, N-NH₃ concentrations. The study was conducted by separating *in vitro* and *in vivo* results, and, concerning *in vitro* data, by separating results obtained from repeated measures in time from those obtained at a defined time and from means of measures. The two groups increased pH and decreased total VFA concentration *in vitro*. *In vitro*, group 1 decreased N-NH₃, small peptides, amino acids and total VFA concentrations, and acetate proportion. *In vitro*, group 2 increased N-NH₃ and small peptides concentrations and increased acetate proportion. The intensity of the effects was related to the dose. *In vivo*, group 1 tended to increase pH and to decrease ruminal N-NH₃ concentration.

Keywords: Ruminant, essential oils, essential oil compounds, statistical analysis, fermentations.

mélanges de produits lipophiles, liquides et volatils présents dans les végétaux supérieurs. Ils sont généralement extraits par distillation à la vapeur d'eau [1-32]. Les HE, utilisées traditionnellement chez l'homme pour leurs propriétés antiseptiques ou conservatrices, ont une activité antibactérienne sur un large spectre bactérien [20, 25, 30, 31, 41]. Du fait de ce caractère biocide naturel, il est apparu important d'évaluer l'effet des HE et des composés aromatiques issus des HE (CHE) sur l'activité des microorganismes du rumen. A ce jour, le seul article de synthèse relatif aux effets de ces produits sur les fermentations ruminales est celui de WALLACE *et al.* [43]. Cependant, celui-ci est exclusivement axé sur les effets d'un mélange spécifique de CHE (Crina®). Il demeure donc incomplet par rapport à la diversité des produits utilisés. L'objectif de cette étude a donc été de réaliser une analyse statistique, à partir d'une base de données issues de la littérature, pour tenter de qualifier les effets des HE et des composés

aromatiques issus des HE sur les fermentations ruminales, témoins directs de l'activité bactérienne.

duits ont été testés dont 9 CHE, un mélange de CHE (le produit commercial CRINA®) et 8 HE.

Matériel et Méthodes

CONSTRUCTION DE LA BASE DE DONNÉES

La base de données a été construite à partir de 11 références bibliographiques [2, 7-10, 12, 13, 18, 27, 36, 39], représentant 25 expérimentations. Ces références ont été sélectionnées sur les critères communs suivants :

- les résultats devaient être obtenus avec des extraits qualifiés d'HE ou avec des molécules aromatiques contenues dans ce type d'extrait ; les autres types d'extraits comme les poudres de plantes ou les extraits obtenus par d'autres solvants que l'eau (oléorésines par exemple) ont été exclus,

- les doses expérimentées devaient être indiquées, ainsi que la quantité de substrat utilisée *in vitro* ou la quantité d'aliment ingérée *in vivo*,

- la présence d'un indicateur de la variance intra-expérimentation était nécessaire.

Il faut souligner que la référence [9] contenait à elle seule 13 expérimentations, chaque expérimentation étudiant les effets d'une dose croissante d'une HE ou d'un CHE. Les autres expérimentations testaient les effets d'un produit unique par rapport à un témoin [2, 7, 12, 13, 18, 27, 36, 39] ou comparaient les effets de plusieurs produits [8, 10]. Dix huit produits

CLASSEMENT DES PRODUITS

Les différents produits ont été classés a priori dans deux groupes. Ce classement a été établi en fonction du pouvoir bactériostatique ou bactéricide mesuré *in vitro* sur des bactéries pathogènes [3, 17, 21, 24, 29] (Tableau I). Le groupe 1 contenait les produits les plus antibactériens alors que le groupe 2 rassemblait les autres produits. Le groupe 1 comprenait les phénols (comportant un noyau aromatique et une fonction alcool), l'aldéhyde cinnamique et les produits essentiellement composés de phénols ou d'aldéhyde cinnamique. L'autre groupe était constitué de molécules n'étant ni des phénols, ni de l'aldéhyde cinnamique. Il s'agissait de terpènes hydrocarbonés (alpha pinène) ou de terpènes oxygénés avec une fonction éther (anéthol), alcool (terpinen-4-ol), cétone (carvone) ou ester (salicylate de benzyle). Dans le cas des HE, le groupe attribué a été celui du composé majoritairement le plus représenté. Le classement des produits CRINA® testés a été fait sur la base de la composition de ces produits donnée dans la demande de brevet européen [40]. Ces produits contiennent 5 à 10 % de crésol et de résorcinol, 5 à 10,5 % de thymol, 2 à 4,5 % de guaiacol, 2 à 6 % de vanilline, 1 à 3 % d'eugénol, 1 à 3 % de salicylaldéhyde (aldéhyde) et 4 à 10,5 % de limonène (monoterpène hydrocarboné). Composés majoritairement de phénols, ils ont donc été classés dans le groupe 1. La nature des différents produits, leur famille chimique, et le groupe, dans lequel ils ont été classés, sont présentés dans le tableau 1.

Familles chimiques	HE / CHE ¹	Pouvoir antibactérien ²	Référence
Groupe 1	Vanilline C ₈ H ₈ O ₃	1	[27]
Phénols	CRINA® ³	1	[12, 13, 36, 39]
	Thymol C ₁₀ H ₁₄ O	1	[18]
	Carvacrol C ₁₀ H ₁₄ O	1	[2, 8, 9]
	<i>Origanum vulgare</i> (Origan) : 64 % carvacrol + 16 % thymol	1	[9, 10]
	Eugénol C ₁₀ H ₁₂ O ₂	1	[8, 9]
	<i>Syzygium aromaticum</i> (Clou de girofle) : 85 % eugénol	1	[8, 9]
Aldéhyde cinnamique	<i>Cinnamomum cassia</i> (Cannelle) : 59 % cinnamaldéhyde	1	[9, 10]
	Cinnamaldéhyde C ₉ H ₈ O	1	[7, 8, 9]
Groupe 2			
Alcool	<i>Melaleuca alternifolia</i> HE (Arbre à thé) : 42 % 1-terpinen-4-ol	2	[8, 9]
Cétone	Carvone C ₁₀ H ₁₄ O	4	[8, 9]
	<i>Anethum graveolens</i> (Aneth) : 47 % carvone		[8, 9]
Ether	<i>Pimpinella anisum</i> (Anis) : 86 % anéthol	5	[9, 10]
	Anéthol C ₁₀ H ₁₂ O	5	[8, 9]
Ester	Benzyl salicylate C ₁₄ H ₁₂ O ₃	6	[8, 9]
Terpène	<i>Juniperus oxycedrus</i> (Cade) : 35 % d'alpha-pinène	7	[8, 9]

¹ HE = huile essentielle ; CHE = composé d'huile essentielle.

² Ordre décroissant : du rang 1 (le plus bactéricide/bactériostatique) au rang 7 [3,17,21,24,29].

³ Spécialité commerciale = mélange de CHE composé majoritairement de phénols.

TABEAU 1 : Références bibliographiques et caractéristiques des produits.

CRITÈRES ETUDIÉS

Les effets du groupe (1 vs. 2), ou de l'adjonction d'une HE ou d'un CHE (vs. témoin) lorsqu'un seul groupe chimique était testé, ont été étudiés sur différents paramètres : la concentration en acides gras volatils totaux (AGVt, en g/l ou mmol/l), la proportion des différents AGV (acétate [C₂], propionate [C₃], butyrate [C₄], isobutyrate [iC₄], valérate [C₅], isovalérate [iC₅]), la somme des proportions des AGV ramifiés : isobutyrate et isovalérate (RCAGV), la concentration en ammoniac (N-NH₃, en ppm), le pH ainsi que les concentrations en azote peptidique (N-pep, en mg/100ml) et en acides aminés et petits peptides (S-pep, en mg/100ml) dans le jus de rumen.

ANALYSE STATISTIQUE DES DONNÉES

L'expérimentation a été utilisée comme facteur fixe dans le modèle. En effet, les expérimentations ne pouvaient pas être considérées comme étant tirées au hasard, au sein d'un nombre important de publications du fait de leur faible nombre. De plus, il y avait parfois plusieurs expérimentations dans la

même publication, et les méthodologies utilisées n'étaient pas strictement identiques. Une expérimentation rassemblait une donnée témoin et une ou plusieurs données concernant les résultats des traitements avec les HE ou CHE. La dose du produit testé, exprimée au départ en pourcentage de l'aliment ou de la matière première utilisée comme substrat a été transformée en log (dose + 1) et notée "logdose", pour accorder moins de poids aux doses les plus élevées. Les doses allaient en effet de 0,001 à 9 % du substrat ou de l'aliment. Les caractéristiques des différents essais retenus dans l'analyse statistique sont présentées dans le tableau 2.

Les données analysées ont été les écarts calculés entre les valeurs obtenues après traitement avec des HE ou des CHE, et les valeurs témoins respectives. Ce traitement a permis de s'affranchir de l'effet de l'expérimentation sur la valeur témoin. Les écarts ont été pondérés par les inverses des variances des différences. La variance de la différence a été estimée à partir des déviations standards et des tailles des échantillons présentées dans les articles. La pondération a permis de donner plus de poids aux écarts disposant d'une faible variance et/ou mesurés à partir d'effectifs importants.

Référence bibliographique	Nombre d'expérimentations	Méthode	Animal	Dose (% substrat)	Variables analysées	Analyse statistique ¹
[2]	1	<i>in vivo</i>	bovin non en lact. ²	0,001	pH/N-NH ₃ /AGVt/C ₂ /C ₃ /C ₄	3
[7]	2	<i>in vitro</i> culture continue	bovin non en lact. ²	0,03-0,3	AGVt/C ₂ /C ₅ /C ₄ /IC ₄ /C ₅ /IC ₅ /RCAGV/N-NH ₃ /N-pep/S-pep	1,2
[8]	2	<i>in vitro</i> culture continue	bovin non en lact. ² / vache en lactation	0,007	AGVt/C ₂ /C ₃ /C ₄ /IC ₄ /C ₅ /IC ₅ /RCAGV/N-NH ₃ /N-pep/S-pep	1,2
[9]	13	<i>in vitro</i> "batch"	vache en lactation	0,03-30	pH/ N-NH ₃ /AGVt/C ₂ /C ₃ /C ₄ /RCAGV	1
[10]	1	<i>in vitro</i> culture continue	vache en lactation	0,003	N-NH ₃ /AGVt/C ₂ /C ₃ /C ₄ /RCAGV/N-pep/S-pep	2
[12]	1	<i>in vitro</i> culture continue	bovin non en lact. ² / vache en lactation	0,007-0.7	N-NH ₃ /AGVt/C ₂ /C ₃ /C ₅ /IC ₅ /RCAGV/N-pep/S-pep	1
[13]	1	<i>in vitro</i> culture continue	bovin non en lact. ² / vache en lactation	0,002	N-NH ₃ /AGVt/C ₂ /C ₃ /C ₄ /IC ₄ /IC ₅ /C ₅ /RCAGV	1
[18]	1	<i>in vitro</i> "batch"	bovin non en lact. ²	0,5-4	pH	1
[27]	1	<i>in vitro</i> "batch"	mouton	1-9	N-NH ₃	1
[36]	1	<i>in vivo</i>	mouton	0,011	pH/N-NH ₃ /AGVt/C ₂ /C ₃ /C ₄	3
[39]	1	<i>in vivo</i>	bovin non en lact. ²	0,003-0,009	pH/N-NH ₃ /AGV	3

TABLEAU 2 : Caractéristiques des expérimentations, variables étudiées et analyse statistique réalisée à partir des différentes données issues des 11 références retenues.

Afin de comparer des données obtenues dans des conditions expérimentales les plus similaires possibles, trois analyses statistiques ont été réalisées.

L'analyse statistique 1 a été réalisée sur des données issues d'expérimentations conduites *in vitro* en culture "batch" ou en culture continue, et qui ne comportaient pas de cinétique dans le temps [7,8,9,12,13,18,27]. La dose a été introduite en covariable.

$$Y_{ij} = \mu + E_i + G_j + b(D_{ij} - \bar{D}) + \varepsilon_{ij}$$

L'analyse statistique 2 a été réalisée sur des données issues d'expérimentations conduites elles aussi *in vitro*, mais répétées dans le temps [7,8,10]. La méthodologie était identique dans l'ensemble des expérimentations : il s'agissait de culture continue en fermenteur. Le groupe chimique et l'expérimentation ont été introduits comme effets fixes et le facteur dose ainsi que le facteur temps en covariables. Le modèle suivant a été utilisé :

$$Y_{ij} = \mu + E_i + G_j + b(D_{ij} - \bar{D}) + c(T_{ij} - \bar{T}) + \varepsilon_{ij}$$

Les références [7] et [8] ont été à la fois traitées dans les analyses 1 (données moyennes tous temps confondus) et 2 pour les cinétiques des variables N-NH₃, N-pep et S-pep.

L'analyse statistique 3 a été réalisée à partir des observations issues d'expérimentations conduites *in vivo* [2, 36, 39] avec des HE ou CHE appartenant au groupe 1 uniquement. L'expérimentation a été introduite comme effet fixe et le facteur temps en covariable. Le modèle utilisé a été le suivant :

$$Y_i = \mu + E_i + c(T_i - \bar{T}) + \varepsilon_i$$

avec

Y_{ij} , Y_i = variable expliquée,
 μ = moyenne de la population,

E_i = effet fixe de l'expérimentation,

G_j = effet fixe du groupe chimique ($j = 1,2$),

b, c = coefficients de régression linéaire,

$D_i(j)$ = $\log(\text{dose}+1)$ de la $i^{\text{ème}}$ observation de la variable expliquée (pour le $j^{\text{ème}}$ groupe), introduit en covariable,

$T_i(j)$ = temps de mesure de la $i^{\text{ème}}$ observation de la variable expliquée, (pour le $j^{\text{ème}}$ groupe), introduit en covariable,

ε_i ou ε_{ij} = erreur résiduelle.

Le modèle linéaire généralisé du logiciel Minitab version 14.12.0 (2004) sous Windows a été utilisé pour l'analyse des données. Un test de Student unilatéral a été réalisé sur le rapport moyenne marginale estimée : erreur standard de l'estimation, afin de vérifier si les différences calculées par le modèle étaient différentes de 0, c'est-à-dire si les groupes de produits avaient un effet significatif par rapport aux mesures témoins. Lorsque la covariable dose avait un effet significatif, des modèles de régression linéaire et quadratique avec le logarithme de la dose en variable prédictive ont été testés. Une différence a été déclarée significative pour $P < 0,05$ et une tendance au seuil de 15 %.

Resultats

IN VITRO

Les résultats de l'analyse statistique 1 sont présentés dans le tableau 3. Les produits des deux groupes ont diminué la concentration en AGVt du milieu par rapport aux témoins et augmenté le pH ($P < 0,05$). Les effets observés sur la concentration en AGVt pour les deux groupes de produits n'étaient pas significativement différents. Il n'a pas été possible de comparer les deux groupes chimiques sur le critère du pH, car les effets "groupe" et "expérimentation" n'étaient pas indépendants. Les écarts observés ont varié avec la dose de produit ($P < 0,001$). Notamment les produits du groupe 1

			Groupe 1*				Groupe 2*				P_{groupe}^5	P_{exp}^6	P_{logdose}^7
	Nb réf.	Nb exp.	T ¹	n ²	Ecart ³	ESM ⁴	T	n	Ecart	ESM			
pH	2		5,8	28	+0,32 [#]	0,08					-	0,34	<0,001
pH							6,0	28	+0,09 [#]	0,03	-	0,01	<0,001
AGVt, mmol/l	6	19	148,1	32	-7,1 [#]	1,5	165,3	35	-5,1 [#]	1,8	0,50	0,001	<0,001
C ₂ , %	6	19	57,2	36	-1,0 [#]	0,35	58,0	34	+0,98 [#]	0,41	0,01	<0,001	0,001
C ₃ , %	6	19	25,4	36	+0,54 [°]	0,42	25,9	31	-0,77 [°]	0,49	0,13	0,001	<0,001
C ₄ , %	6	19	10,9	31	+0,58	1,1	9,8	31	-0,14	1,2	0,75	0,34	0,1
RCAGV, %	6	19	2,4	35	+0,16	0,28	2,2	35	+0,36	0,3	0,28	<0,001	0,45
N-NH ₃ , ppm N-	7	21	178,0	41	-20,8 [#]	9,3	215,7	35	-0,8	12,1	0,48	0,83	<0,001
pep, mg/ 100 ml S-	3	4	6,3	11	+0,05	0,43	4,4	7	+0,47	0,58	0,53	0,05	0,37
pep, mg/ 100 ml	3	4	6,3	18	-0,51 [#]	0,2	4,4	18	+0,85 [#]	0,26	0,001	0,01	0,34

* groupe 1 = huiles essentielles et composés riches en phénols et cinnamaldéhydes présentant une forte activité antibactérienne ; groupe 2 = huiles essentielles et composés autres présentant une activité antibactérienne moindre.

¹ témoin ; ² nombre d'observations ; ³ recalculé par le modèle ; ⁴ erreur standard de la moyenne ; ⁵ effet du groupe chimique ; ⁶ effet de l'expérimentation ; ⁷ effet de la dose exprimée en $\log(\text{dose} + 1)$.

Ecart différent de 0 au seuil de 5 % (test de Student unilatéral) ; ° Ecart différent de 0 au seuil de 10 % (test de Student unilatéral).

TABLEAU 3 : Résultats de l'analyse statistique 1 sur les expérimentations *in vitro*, avec la dose en covariable.

ont augmenté le pH de façon linéaire avec le logarithme de la dose (figure 1) :

$$\text{Ecart pH}_{\text{groupe 1}} = 0,075 + 0,766 \log (\text{dose} + 1) ; R^2 = 69,6 \% ; P < 0,001 ; \text{ETR} = 6,7.$$

L'effet du logarithme de la dose sur les AGVt était de nature quadratique (figure 2) :

$$\text{Ecart AGV} = - 2,84 - 12,2 \log (\text{dose} + 1)^2 ; R^2 = 53,9 \% ; P < 0,001 ; \text{ETR} = 2,0.$$

Les effets des deux groupes de produits ont été significativement différents sur la proportion de C₂. Ils ont eu tendance à être différents ($P = 0,13$) sur la proportion de C₃. Alors que les produits du groupe 1 ont diminué la proportion de C₂ (-1 point), et ont eu tendance à augmenter la proportion de C₃ (+0,5 point), ceux du groupe 2 ont eu un effet inverse (+1 point et -0,8 point pour le C₂ et le C₃ respectivement).

La régression avec le logarithme de la dose n'a été signifi-

cative qu'avec les produits du groupe 2 : plus la dose était importante plus la proportion de C₂ diminuait (figure 3) :

$$\text{Ecart C}_2 (\text{groupe 2}) = - 0,0245 - 1,10 \log (\text{dose} + 1) ; R^2 = 49,5 \% ; P < 0,001 ; \text{ETR} = 1,2.$$

Les produits du groupe 1 ont diminué la concentration en N-NH₃ et ont eu tendance à diminuer la proportion d'iC₄ ($P = 0,07$), alors que ceux du groupe 2 n'ont pas eu d'effet sur ces deux paramètres. La concentration en N-NH₃ était négativement liée par régression, de manière quadratique, au logarithme de la dose ($P < 0,001$) avec les produits du groupe 1 (figure 4) :

$$\text{Ecart N-NH}_3 (\text{groupe 1}) = 6,20 - 50,4 \log (\text{dose}+1)^2 ; R^2 = 70,7 \% ; P < 0,001 ; \text{ETR} = 3,2.$$

Les produits testés n'ont pas eu d'effet sur la concentration en N-pep du milieu. Les produits du groupe 1 ont diminué la concentration en S-pep du milieu (-0,51 mg/100 ml). Au contraire, ceux du groupe 2 l'ont augmenté (+0,85 mg/100 ml). Le groupe de produits a eu un effet significatif sur ce paramètre.

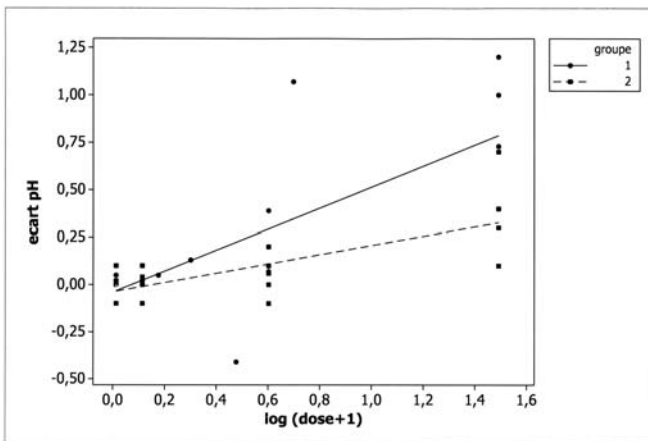


FIGURE 1 : Evolution de l'écart de pH calculé entre la valeur mesurée pour le témoin et celles obtenues pour le groupe 1 ou 2 en fonction du log de la dose ajoutée (unité-pH).

* groupe 1 = huiles essentielles et composés riches en phénols et cinnamaldéhyde présentant une forte activité antibactérienne ; groupe 2 = huiles essentielles et composés autres présentant une activité antibactérienne moindre.

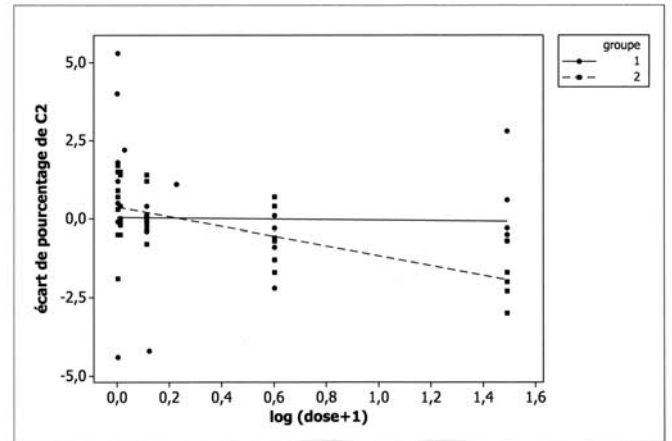


FIGURE 3 : Evolution de l'écart de la proportion d'acétate calculé entre la valeur mesurée pour le témoin et celles obtenues pour le groupe 1 ou 2 en fonction du log de la dose ajoutée (points).

* groupe 1 = huiles essentielles et composés riches en phénols et cinnamaldéhyde présentant une forte activité antibactérienne ; groupe 2 = huiles essentielles et composés autres présentant une activité antibactérienne moindre.

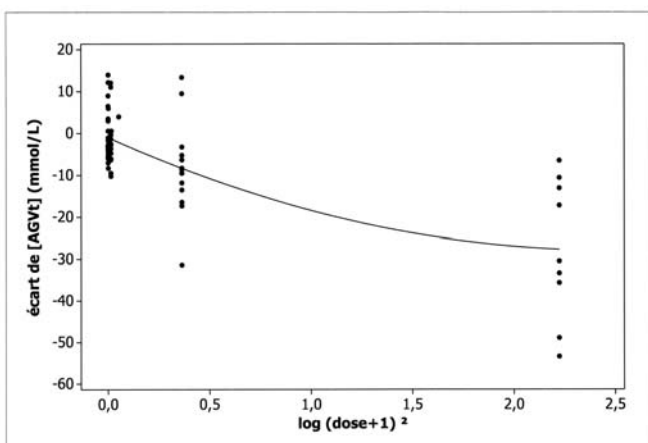


FIGURE 2 : Evolution de l'écart de la concentration en AGV totaux calculé entre la valeur mesurée pour le témoin et celles obtenues pour les groupes 1 et 2 en fonction du log de la dose ajoutée (mmol/L).

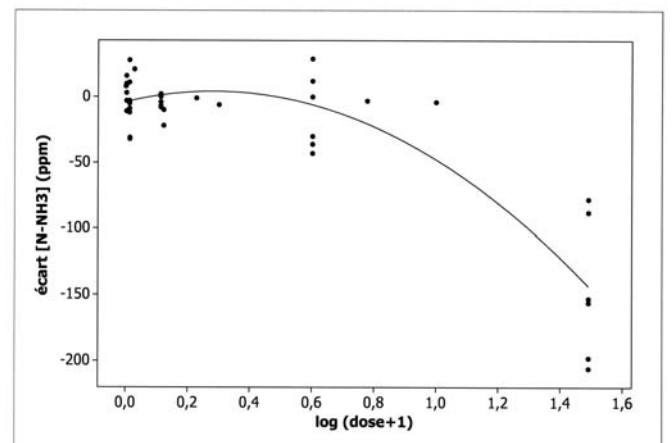


FIGURE 2 : Evolution de l'écart de la concentration en N-NH₃ calculé entre la valeur mesurée pour le témoin et celles obtenues pour les groupes 1 et 2 en fonction du log de la dose ajoutée (ppm).

Les résultats de l'analyse statistique 2 sont présentés dans le tableau 4. Les produits du groupe 1 ont diminué significativement en moyenne, mais aussi à 2 et 6 h après l'introduction du substrat dans le milieu, la teneur en N-NH₃ par rapport à la valeur témoin moyenne. En revanche, les produits du groupe 2 l'ont augmenté ($P < 0,05$). Les deux groupes de produits n'ont globalement pas eu d'effet sur la concentration en N-pep du milieu ($P > 0,05$), à l'exception des produits du

groupe 2 qui ont tendance à augmenter la concentration en N-pep 6 h après l'introduction du substrat dans le milieu. Les produits des deux groupes ont eu un effet significativement différent sur la concentration en S-pep du milieu, en moyenne mais aussi après 2 et 4 h d'incubation ; une tendance a été relevée après 6h ($P = 0,09$). Les produits du groupe 1 ont diminué significativement la concentration en S-pep (0,66 mg/100 ml) alors que ceux du groupe 2 n'a pas eu d'effet ($P > 0,05$).

	Nb réf.	Nb exp.	Groupe 1*				Groupe 2*				P _{groupe} ⁵	P _{exp} ⁶	P _{temps} ⁷	P _{logdose} ⁸
			T ¹	n ²	Ecart ³	ESM ⁴	T	n	Ecart	ESM				
N-NH ₃ ⁹	3	4	95,4	21	-4,6 [#]	2,0	89,5	28	+6,2 [#]	2,2	<0,001	<0,001	0,58	0,44
N-NH ₃ , ppm (2h)	3	4	117,0	8	-13,1 [#]	4,7	87,3	7	+8,4 [#]	5,2	0,002	0,32	-	0,62
N-NH ₃ , ppm (4h)	3	4	79,8	8	+1,2	2,7	46,0	7	+6,8 [#]	3,0	0,08	0,01	-	0,72
N-NH ₃ , ppm (6h)	3	4	81,2	8	-8,7 [#]	4,1	47,0	7	+7,4 [°]	4,5	0,005	0,03	-	0,77
N-pep ⁹	3	4	6,2	32	+0,27	0,5	6,1	28	+0,63	0,6	0,60	0,13	0,6	0,92
N-pep mg/100ml (2h)	3	4	6,5	8	+0,61	0,6	6,2	7	+0,63	0,8	0,98	<0,001	-	0,72
N-pep mg/100ml (4h)	3	4	6,2	8	+0,10	0,6	5,7	7	+0,78	0,7	0,40	0,08	-	0,86
N-pep mg/100ml (6h)	3	4	5,7	8	+0,32	0,5	5,9	7	+0,94 [°]	0,6	0,37	0,03	-	0,95
S-pep ⁹	3	4	4,8	8	-0,66 [#]	0,3	5,8	7	+0,34	0,3	0,02	0,05	0,01	0,81
S-pep mg/100ml (2h)	3	4	6,9	8	+0,68 [°]	0,4	7,8	7	+0,67	0,5	0,05	0,01	-	0,62
S-pep mg/100ml (4h)	3	4	5,1	8	-1,52 [#]	0,5	6,2	7	+0,21	0,6	0,03	0,015	-	0,80
S-pep mg/100ml (6h)	3	4	4,0	8	-0,98 [#]	0,4	4,7	7	+0,11	0,5	0,09	0,33	-	0,92

* groupe 1 = huiles essentielles et composés riches en phénols et cinnamaldéhydes présentant une forte activité antibactérienne ; groupe 2 = huiles essentielles et composés autres présentant une activité antibactérienne moindre.

¹ témoin ; ² nombre d'observations ; ³ recalculé par le modèle ; ⁴ erreur standard de la moyenne ; ⁵ effet du groupe chimique ; ⁶ effet de l'expérimentation ; ⁷ effet du temps de mesure ; ⁸ effet de la dose exprimée en log (dose + 1) ; ⁹ moyenne 2, 4 et 6h.

#Ecart différent de 0 au seuil de 5 % (test de Student unilatéral sur le rapport écart recalculé par le modèle/ESM).

°Ecart différent de 0 au seuil de 10 % (test de Student unilatéral sur le rapport écart recalculé par le modèle/ESM).

TABLEAU 4 : Résultats de l'analyse statistique 2 réalisée sur des observations *in vitro* mesurées à différents temps (2, 4 et 6h), avec le temps et/ou la dose en covariable.

	Nb réf.	Nb exp.	T ¹	n ²	Ecart ³	ESM ⁴	P _{exp} ⁵	P _{temps} ⁶	P _{logdose} ⁷
pH	3	3	6,47	9	+0,14	0,11	0,23	0,96	0,13
N-NH ₃ , ppm	3	3	181,1	9	-23,0	16,8	0,06	0,04	0,11
AGVt, g/l	3	3	6,65	9	+0,52	0,40	0,24	0,001	0,49
C ₂ , %	2	2	66,9	6	-0,15	0,75	0,21	0,66	0,42
C ₃ , %	2	2	17,5	6	+0,09	1,38	0,9	0,90	0,48
C ₄ , %	2	2	10,6	6	+0,20	0,31	0,87	0,053	0,29
IC ₄ , %	2	2	1,0	6	-0,09	0,11	0,78	0,39	0,24
C ₅ , %	2	2	1,6	6	-0,01	0,08	0,95	0,48	0,46
IC ₅ , %	2	2	2,2	6	+0,07	0,27	0,94	0,32	0,41

¹ témoin ; ² nombre d'observations ; ³ recalculé par le modèle ; ⁴ erreur standard de la moyenne

⁵ effet de l'expérimentation ; ⁶ effet du temps de mesure ; ⁷ test de Student sur le rapport LSM/ESM, avec le ddl de l'erreur.

TABLEAU 5 : Résultats de l'analyse statistique 3 sur les expérimentations *in vivo*, avec le temps en covariable, et réalisée uniquement avec des produits du groupe 1 (huiles essentielles et composés riches en phénols et cinnamaldéhydes présentant une forte activité antibactérienne).

IN VIVO

Les résultats de l'analyse statistique 3 sont présentés dans le tableau 5. Le traitement avec les CHE appartenant uniquement au premier groupe, soit celui des phénols et de l'aldéhyde cinnamique, n'a pas eu d'effet significatif sur les différents paramètres fermentaires analysés. Toutefois, des tendances à l'augmentation du pH (+0,14 unité-pH, $P = 0,13$), ainsi qu'à la diminution de la concentration en N-NH₃ ruminal (-23 %, $P = 0,11$) ont été observées. Une analyse de variance avec le facteur log (dose + 1) et/ou log (dose + 1)² en facteurs fixés a montré que le logarithme de la dose n'expliquait pas la variance résiduelle ($P > 0,05$).

Discussion

L'analyse n°1 a montré qu'*in vitro*, c'était la dose, plus que la nature des produits, qui expliquait les réponses significatives observées sur la concentration du milieu en AGVt et en N-NH₃ ainsi que sur le pH. Les effets étaient d'autant plus marqués que la dose était élevée, ce qui est vérifié dans les expérimentations de type "batch" incluses dans cette analyse, où un effet dose est spécifiquement testé : EVANS and MARTIN [18] ont mis en évidence un effet du thymol à partir de 400 ppm, et BUSQUET *et al.* [9] à partir de 300 ppm pour des produits du groupe 1 et de 3000 ppm pour des produits du groupe 2. Cet ordre de grandeur de dose active est relativement proche des concentrations minimales inhibitrices. Il s'agit des plus petites concentrations capables d'inhiber la croissance de diverses bactéries pathogènes, bien que la plupart du temps aérobies, contrairement aux bactéries du rumen. L'effet inhibiteur est généralement mesuré pour des concentrations supérieures à 100 ppm, par exemple de 120 à 2000 ppm avec les HE d'arbre à thé, origan, anis et clou de girofle [22], de 250 à 1000 ppm avec l'aldéhyde cinnamique [15, 28], et enfin de 60 à 4500 ppm avec le carvacrol [23, 42]. En culture continue, seuls BUSQUET *et al.* [7] ont testé un effet de la dose de cinnamaldéhyde, mais 31,2 comme 312,5 ppm dans le milieu de culture n'ont eu d'effet significatif ni sur les concentrations en AGVt ni sur celles en N-NH₃. Dans l'analyse n°2, contrairement à l'analyse n°1, la dose n'a pas eu d'effet sur la réponse. C'est probablement parce que, dans ces expérimentations menées en culture continue, la plage de variation de la dose (0,001 à 0,3 % du substrat) n'était pas aussi importante que celle relevée dans l'analyse 1 (0,02 à 9 %) rassemblant des essais conduits en cultures "batch" et en fermenteurs à flux continu.

Les effets observés avec le groupe 1 comprenant la cinnamaldéhyde et les phénols ont été les mêmes pour les critères communs. Les produits composés majoritairement de phénols ou de cinnamaldéhyde ont diminué la production d'N-NH₃ dans le milieu. Cette catégorie de produits inhiberait donc les activités de désamination et/ou les étapes préalables de dégradation de l'azote, soit la protéolyse ou la peptidolyse, et/ou stimuleraient les activités de synthèse bactérienne. D'autres données permettent de défendre l'hypothèse d'un effet inhibiteur sur la désamination, plus spécifiquement des phénols, avec pour substrat un hydrolysate de caséine en culture "batch", avec le produit CRINA® [36, 33], et le thymol [6].

La diminution de la concentration en S-pep mesurée ne va cependant pas dans le sens d'une diminution des activités de désamination puisqu'on devrait au contraire mesurer une accumulation de ces derniers. Elle proviendrait donc plutôt d'une inhibition de la protéolyse. Une tendance à la diminution des concentrations en S-pep a effectivement été notée par BUSQUET *et al.* [8] avec l'HE de clou de girofle ($P = 0,15$) et semble pouvoir être expliquée dans ce cas précis par une inhibition de la peptidolyse, puisque la proportion de peptides augmente significativement. Dans cette même référence, une diminution numérique mais non significative de la concentration en S-pep a été observée avec l'eugénol et l'aldéhyde cinnamique. Une diminution non significative de la concentration en S-pep a été mesurée par BUSQUET *et al.* [7] avec la cinnamaldéhyde. Une explication possible de l'effet global dans cette analyse pourrait être une augmentation de l'utilisation des acides aminés par les bactéries. Cependant, aucune publication ne confirme cette hypothèse. Au contraire, BUSQUET *et al.* [7] n'ont obtenu aucun effet sur la quantité d'azote bactérien produite par jour ($P > 0,05$) en culture continue, bien qu'elle ait augmenté numériquement de 27 %. Une augmentation de la synthèse bactérienne peut, de plus, être en contradiction avec la diminution globale de la concentration en AGVt du milieu, sauf si les microorganismes touchés par les produits du groupe 1 sont les protozoaires - sous réserve de leur développement *in vitro* -, et non les bactéries. En effet, la défau-nation peut, dans certains cas, conduire à une diminution de la production d'AGVt [26]. Un mélange d'eugénol (phénol) et de cinnamaldéhyde réduit d'ailleurs significativement la population de protozoaires holotriches du rumen *in vivo* chez des génisses recevant un régime riche en céréales [11]. L'effet inhibiteur des produits du groupe 1 sur la concentration en N-NH₃, malgré le peu d'observations traitées, a été confirmé *in vivo* par la tendance mesurée dans l'analyse n°3. Les produits du groupe 2 ont au contraire augmenté la teneur en N-NH₃ du milieu dans l'analyse n°2, et n'ont pas eu d'effet sur la teneur en S-pep. Ces produits augmenteraient donc la désamination ou limiteraient la fixation de l'N-NH₃ par les bactéries dans les expérimentations en culture continue. Cependant, nous n'avons pas observé cet effet dans l'analyse n°1, mais les données analysées ne sont pas les mêmes puisque l'analyse n°1 regroupe à la fois des données obtenues avec la technique "batch" et en culture continue.

Les effets inverses des deux groupes de produits sur les proportions molaires de C₂ et de C₃ peuvent provenir d'une modification de la composition de la microflore, qui serait différente en fonction du groupe de produits. Une diminution du C₂ au profit du C₃ peut provenir d'une réduction de l'activité des bactéries méthanogènes, l'excès de proton étant alors redirigé vers la synthèse de C₃ [35] ou bien d'une augmentation de la population de bactéries productrices de C₃ ou de succinate. On ne peut pas conclure à un effet différent et opposé des deux groupes de produits sur les proportions des deux AGV majeurs, car d'autres résultats disponibles, non traités dans cette analyse, [14, 16, 18], ou bien utilisés dans notre étude [12] ont montré au contraire avec des produits du groupe 1 une augmentation du C₂ au détriment du C₃, ou une augmentation du C₃ au détriment du C₂ avec l'HE d'anis appartenant au groupe 2 dans deux références non analysées ici [11, 19]. Cette différence de résultat peut provenir de la dose comme de la nature du substrat ou du produit testé.

L'augmentation du pH mesurée *in vitro*, de façon *a priori* plus marquée avec les produits du groupe 1 est à relier avec la diminution de la production d'AGVt et avec les propriétés antimicrobiennes des HE et CHE qui sont supérieures, à dose égale, à celles des produits du groupe 2. Une tendance est mesurée *in vivo* avec le groupe 1 sans diminution concomitante de la production d'AGVt.

L'effet de la dose est peut-être lié à celui du temps de contact avec la microflore du rumen. En effet, les fermentations en culture "batch" sont réalisées sur des durées inférieures à 24 heures, et les doses actives sont de l'ordre de 3 % rapportées au substrat. En revanche, en culture continue, où une période d'adaptation préalable de 6 jours est effectuée, une augmentation de la concentration en N-pep ($P < 0,05$) et une tendance à la diminution de la concentration en S-pep avec l'HE de clou de girofle ont été mesurées avec une dose de 0,007 % du substrat ; ce qui correspondait à 2,2 ppm dans le milieu [8]. Quant aux tendances observées *in vivo*, elles résultaient des observations de BAYOURTHE [2] correspondant à 3 jours d'adaptation et de PIVA [39] obtenues après 21 jours d'adaptation. BUSQUET *et al.* [8] ont suggéré, d'après leurs résultats, que la période d'adaptation devait être de 6 jours, et CASTIJELLOS *et al.* [14] ont préconisé 28 jours. Au contraire CARDOZO *et al.* [10] sont arrivés à la conclusion inverse : les effets observés disparaissent après 6 jours d'adaptation, mais avec une dose correspondant à 0,007 % du substrat soit 0,22 ppm dans le milieu, qui est la plus petite dose ramenée au milieu relevée dans l'ensemble des références utilisées dans cette analyse. Nous ne disposons cependant pas d'assez de résultats pour conclure sur un effet du temps d'adaptation.

Conclusion

Cette analyse nous a permis de mettre en lumière quelques effets des HE et des CHE sur les fermentations ruminales. L'impact de la dose est primordial. Il est possible que l'absence d'effet observé dans certains cas en culture continue ou *in vivo* soit liée à l'utilisation de doses trop faibles pour obtenir une réponse sur les fermentations ruminales. Peu d'effets apparaissent cependant comme significatifs, probablement du fait du peu d'observations et d'un effet expérimental important.

Le mode d'action le plus probable des HE et CHE est une modification de la composition et donc de l'activité fermentaire de la microflore ruminale. La diminution des concentrations en N-NH₃ et en AGVt ainsi que l'augmentation du pH avec les produits contenant de la cinnamaldéhyde ou des phénols pourraient traduire une diminution des fermentations ruminales. Une réduction de la croissance et des activités de la flore a effectivement déjà été démontrée *in vitro* sur des cultures de bactéries purifiées avec des produits appartenant au groupe 1 [18, 33].

L'augmentation de la concentration en N-NH₃ avec les produits du groupe 2 pourrait au contraire être expliquée par une stimulation des activités fermentaires, bien que la quantité d'N-NH₃ dans le rumen, puisqu'elle résulte d'un équilibre entre production et consommation, reste difficile à interpréter. Certains résultats de la littérature semblent indiquer une stimu-

lation des fermentations ruminales par les HE ou CHE, comme l'augmentation de la production de gaz *in vitro* avec des terpènes hydrocarbonés [37, 38], l'augmentation de la concentration en AGVt avec le produit CRINA® [12, 36], ou bien l'amélioration de la digestion apparente de l'ADF avec ce même produit [4]. Une possible stimulation des fermentations ruminales peut donc aussi être observée avec des produits riches en phénols. Ces observations pourraient être expliquées par la propriété de certaines bactéries à fermenter les HE et CHE comme elles peuvent le faire sur certains monomères aromatiques issus de la dégradation de la lignine dans le rumen [5] ou bien plus généralement par une modification de la microflore ruminale conduisant à la stimulation du développement de certaines espèces.

Enfin, il reste à souligner que la recherche *in vivo* a besoin d'être alimentée : cinq références concernent des expérimentations *in vivo* sur les 11 références utilisées.

Bibliographie

1. - AFNOR : NF T 75-006, Matières premières aromatiques d'origine naturelle. Vocabulaire, 1998.
2. - BAYOURTHE C. : Effet d'un apport d'huiles essentielles sur la dégradation ruminale d'aliments riches en azote ou en amidon. Communication personnelle, 2001.
3. - BELAICHE P. : Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie. Tome 1, L'Aromatogramme, 201 pages, Maloine S.A. Editeur, Paris, 1979.
4. - BENCHAAR C., WHYTE T.D., PETIT H.V., BERTHIAUME R., OUELLET D.R., CHOUNARD P.Y. : Effects of essential oils and monensin on ruminal pH, ammonia concentration and *in situ* degradation of dry matter and nitrogen in the rumen of lactating dairy cows. In : Proceedings of the 2003 Joint Meeting of American Dairy Science Association and American Society of Animal Science, June 22-26, Phoenix, Arizona, USA, 2003, 273-274.
5. - BESLE J. M., JOUANY J. P., CORNU A. : Transformation of structural phenylpropanoids during cell wall digestion. *FEMS Microbiology Reviews*, 1995, **16**, 33-52.
6. - BRODERICK G.A., BALTHROP J.E. : Chemical inhibition of amino acid deamination by ruminal microbes *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 1979, **49**, 1101-1111.
7. - BUSQUET M., CALSAMIGLIA S., FERRET A., KAMEL C. : Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *J. Dairy Sci.*, 2005, **88**, 2508-2516.
8. - BUSQUET M., CALSAMIGLIA S., FERRET A., KAMEL C. : Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2005, **123-124**, 597-613.
9. - BUSQUET M., CALSAMIGLIA S., FERRET A., KAMEL C. : Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.*, 2006, **89**, 761-771.
10. - CARDOZO P.W., CALSAMIGLIA S., FERRET A., KAMEL C. : Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *J. Anim. Sci.*, 2004, **82**, 3230-3236.
11. - CARDOZO P.W., CALSAMIGLIA S., FERRET A., KAMEL C. : Anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol modified rumen fermentation in beef heifers fed a high-concentrate diet. In : Proceedings of the 2006 Joint Meeting of American Dairy Science Association and American Society of Animal Science, July 9-13, Minneapolis, Minnesota, 2006, 236.
12. - CASTIJELLOS L., CALSAMIGLIA S., FERRET A., LOSA R. : Effects of increasing doses of a specific blend of essential oil compounds on rumen nitrogen metabolism and fermentation profile in continuous culture system. In : Proceedings of the 2004 Joint Meeting of American Dairy Science Association, American Society of Animal Science and, Poultry Science Association, July 25-29, Saint Louis, Missouri, USA, 2004, 334.

13. - CASTIJELLOS L., CALSAMIGLIA S., FERRET A., LOSA R. : Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. *Anim. Feed. Sci. Technol.*, 2005, **119**, 29-41.
14. - CASTIJELLOS L., CALSAMIGLIA S., FERRET A., LOSA R. : Effects of adaptation time of a specific blend of essential oils on rumen nitrogen metabolism and fermentation profile in sheep. In : Proceedings of the 2005 Joint Meeting of American Dairy Science Association, American Society of Animal Science, and Canadian Society of Animal Science, July 24-28, Cincinnati, Ohio, USA, 2005, 315.
15. - CHANG S.T., CHEN P.F., CHANG S.C. : Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J. Ethnopharmacol.*, 2001, **77**, 123-127.
16. - CHIQUETTE J., BENCHAAR C. : Effects of different dose levels of essential oils compounds on in vitro methane production by mixed ruminal bacteria. In : Proceedings of the 2005 Joint Meeting of American Dairy Science Association, American Society of Animal Science and Canadian Society of Animal Science, July 24-28, Cincinnati, Ohio, USA, 2005, 306.
17. - DOGNA M. : Huiles essentielles, les répertoires de Michel Dogna, 95 pages, Guy Tredaniel Editeur, Paris, 1990,
18. - EVANS J.D., MARTIN S.A. : Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Current Microbiology*, 2000, **41**, 336-340.
19. - FANDINO I., CALSAMIGLIA S., FERRET A., KAMEL C. : Anise and capsicum as alternative to monensin in beef heifers fed a high-concentrate diet. In: Proceedings of the 2006 Joint Meeting of American Dairy Science Association and American Society of Animal Science, July 9-13, Minneapolis, Minnesota, 2006, 235.
20. - FRANCHOMME P., JOLLOIS R., PENOEL D. : L'aromathérapie exactement, 447 pages, Roger Jollois Editeur, 1990.
21. - FRIEDMAN M., HENIKA P.R., MANDRELL R.E. : Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.*, 2002, **65**, 1545-1560.
22. - HAMMER K.A., CARSON C.F., RILEY T.V. : Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.*, 1999, **86**, 985-990.
23. - HELANDER I.M., ALAKOMI H.L., LATVA-KALA K., MATTILA-SANDHOLM T. : Characterization of the action of selected essential oil compounds on gram negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 3580-3595.
24. - HERNANDEZ OCHOA L.R. : Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combiné "solvant/actif" d'origine végétale, Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 224 pages, 2005.
25. - NOUYE S., YAMAGUSHI H., TAKISAWA T. : Screening of the antibacterial effects of variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *J. Infect. Chemother.*, 2001, **7**, 251-254.
26. - JOUANY J.P., USHIDA K. : The role of protozoa in feed digestion. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.*, 1999, **12**, 113-128.
27. - JUNG H.J.G., FAHEY G.C. : Interactions among phenolic monomers and *in vitro* fermentation. *J. Dairy Sci.*, 1983, **66**, 1255-1263.
28. - KIM H.O., PARK S.W., PARK H.D. : Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* root. *Food Microbiol.*, 2004, **21**, 105-110.
29. - KNOBLOCH K., PAULI A., IBERL B., WEIGAND H., WEIS N. : Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Ess. Oil Res.*, 1989, **1**, 119-128.
30. - LAMBERT R.J., SKANDAMIS P.N., COOTE P.J., NYCHAS G.J. : A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, 2001, **91**, 453-462.
31. - LIS-BALCHIN M., DEANS S., HART S. : A study of the changes in the bioactivity of essential oils used singly and as mixtures in aromatherapy. *J. Altern. Complement. Med.*, 1997, **3**, 249-256.
32. - LOSA R. : The use of essential oils in animal nutrition. Proceedings of the IIIrd Conference of Feed Manufacturers of the Mediterranean, Reus, Spain, March 2000, *Cahiers Options Méditerranéennes*, 2001, **5**, 39-44.
33. - Mc INTOSH F.M., WILLIAMS P., LOSA R., WALLACE R.J., BEEVER D.A., NEWBOLD C.J. : Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**, 5011-5014.
34. - MOLERO R., IBARS M., CALSAMIGLIA S., FERRET A., LOSA R. : Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2004, **114**, 91-104.
35. - MOSS A.R., JOUANY J.P., NEWBOLD J. : Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.*, 2000, **49**, 231-253.
36. - NEWBOLD C.J., McINTOSH F.M., WILLIAMS P., LOSA R., WALLACE R.J. : Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2004, **114**, 105-112.
37. - OH H.K., SAKAI T., JONES M.B., LONGHURST W.M. : The effect of various essential oils isolated from Douglas-fir needles upon sheep and deer rumen microbial activity. *Appl. Microbiol.*, 1967, **15**, 777-784.
38. - OH H.K., SAKAI T., JONES M.B., LONGHURST W.M. : Comparison of rumen microbial inhibition resulting from various essential oils isolated from relatively unpalatable plant species. *Appl. Microbiol.*, 1968, **16**, 39-44.
39. - PIVA G., MORLACCHINI M., RICCARDI R., MASOERO F., PRANDINI A., MANDOLINI F. : Probiotic effect of essential oils in animal feeding. *Microbiologie Aliments Nutrition*, 1991, **9**, 161-169.
40. - ROSSI J. : Composition pour améliorer la digestibilité des aliments destinés aux animaux ruminants. Demande de brevet européen, n°EP 0 630 577 A1, 1994.
41. - SINHA G.K., GULATI B.C. : Antibacterial and antifungal study of some essential oils and some of their constituents. *Indian Perfumer*, 1990, **34**, 126-129.
42. - TEPE B., DAFERERA D., SOKMEN M., POLISSIOU M., SOKMEN A. : The *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and various extracts of *Origanum syriacum* L var *bevanii*. *J. Sci. Food Agric.*, 2004, **84**, 1389-1396.
43. - WALLACE R.J., McEWAN N.R., McINTOSH F.M., TEFERETEGNE B., NEWBOLD C.J. : Natural products as rumen manipulators of rumen fermentation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 2002, **15**, 1458-1468.