Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fés
Centre d'Etudes Doctorales
"Sciences et Technologies"

N°: 04 / 2020

Formation Doctorale :Molécules bioactives,santé et biotechnologie
Discipline : Biologie
Spécialité : Biochimie et biotechnologie
Laboratoire : biotechnologie

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

HAMDANI houda

Mise au point d'un additif alimentaire : évaluation de son effet sur la réduction du méthane entérique et sur les performances zootechniques des bovins et des ovins

Soutenue le 01 février 2020 devant le jury composé de :

Pr. Adnane remmal	***(Faculté des sciences Dhar El mahraz-Fés)***	***Président***
Pr. Bouchra Oumoukhtar	***(Faculté de médecine et de pharmacie –Fés)***	***Rapporteur***
Pr. Mohammed Rihani	***(Faculté des sciences-El jadida)***	***Rapporteur***
Pr. Hakim karib	***(Institut agronomique et vétérinaire Hassan II)***	***Rapporteur***
Pr. Mohammed benyahya	***(Faculté des sciences Dhar El mahraz-Fés)***	***Examinateur***
Pr. Mohammed merzouki	***(Faculté des sciences Dhar El mahraz-Fés)***	***Examinateur***
Pr. Abdelhai Guerouali	***(Institut agronomique et vétérinaire Hassan II)***	***Membre invité***
Pr. Najat Chami	***(Faculté des sciences Dhar El mahraz-Fés)***	***Directeur de thèse***

Année universitaire : 2019-2020

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mon mari Hassan

Pour sa compréhension, sa patience, et son soutien. Que ce travail soit témoin de mon amour et mon respect.

A mon fils Simohammed

Pour le bonheur que tu nous as apporté, tu resteras pour toujours le rayon du soleil qui égaye notre vie

A mes chers parents et à ma sœur Nadia

En reconnaissance des énormes sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation. Pour votre patience, vos prières, votre dévouement et votre présence permanente dans ma vie.

A tous les membres de la famille Iraqui houssaini et Hamdani

Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon amour et mon attachement.

A mes chers amis

Mounia, Samira, chaimae et imane…pour votre amitié, votre amour et vos encouragements.

Remerciements

Mes vifs et sincères remerciements vont particulièrement A mes professeurs encadrants, ***Chami Najat et Remmal Adnane***. Je vous exprime toute ma gratitude et mon profond respect pour votre encadrement étroit et appréciable, pour vos orientations décisives, pour vos conseils précieux et vos remarques constructives. J'ai été très touché par votre gentillesse et votre spontanéité ainsi que par l'effort que vous avez fourni pour me permettre la réalisation de ce travail. J'espère que mon travail sera à la hauteur de votre confiance. Merci chers professeurs.

A ***Pr. Remmal adnane*** qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse. Qu'il me soit permis de vous témoigner ma très haute considération. Mes remerciements respectueux.

Je voudrais remercier les rapporteurs de cette thèse les professeurs ***Oumoukhtar Bouchra, Rihani Mohammed et Hakim Karib*** pour l'intérêt qu'ils ont porté a mon travail.

J'adresse aussi mes remerciements aux professeurs ***Benyahya Mohammed et Merzouki Mohammed*** d'avoir bien voulu examiner ce travail. Merci pour votre disponibilité et pour le temps que vous avez accordé a la critique de ce travail.

Je voudrais exprimer ma gratitude et mes sincères remercîment à **Pr. Guerouali Abdelhai** de l'institut agronomique et vétérinaire Hassan II pour sa collaboration dans la réalisation des essais *in vivo* de mon travail. Merci pour votre disponibilité.

Résumé

L'élevage intensif des ruminants augmente jour après jour pour couvrir les besoins en consommation mondiale de lait et de viande. Cependant, les impacts environnementaux liés à la hausse de cette production animale constituent un danger en matière de réchauffement climatique, puisque les ruminants contribuent pour environ18% à la production mondiale du méthane qui est un gaz à effet de serre.

Au Maroc, la question du changement climatique possède une très grande acuité puisqu'elle touche directement la population fortement dépendante de l'agriculture et de l'élevage.

La recherche scientifique orientée dans le sens d'améliorer l'efficacité alimentaire a permis, vers la fin des années soixante l´utilisation des additifs alimentaires qui ont pour rôle d'améliorer les performances zootechniques. Elles sont capables d'améliorer l'efficacité des rations, d'abaisser les coûts de production, d'influencer les caractéristiques des produits animaux, et de maintenir une bonne santé de l'animal.

Plusieurs additifs alimentaires à base de plantes et de leurs extraits ont été employés pour étudier leur effet promoteur de croissance chez les ruminants et leur effet dépresseur sur la production de méthane. Aussi, plusieurs travaux ont été publiés sur des composés purs des huiles essentielles des plantes aromatiques seuls ou en mélange comme additifs alimentaires.

La première partie de ce travail à été réalisée *in vitro* pour tester l'efficacité de quatre composés majoritaires d'huiles essentielles ; le thymol, le carvacrol, l'eugénol, et le cinnamaldéhyde sur la production de gaz et sur la fermentation microbienne de la flore ruminale des bovins. Les résultats ont montré qu'après utilisation de doses croissantes des CM d'HE, il ya une diminution de la production de gaz de fermentation et aussi une diminution de la charge bactérienne du contenu ruminal. Ces résultats nous ont permis de mettre au point un additif alimentaire (NP RUMEN) à base d'un mélange d'HE et d'autres composés naturelles qui ont des effet bénéfiques sur la digestion et la santé globale du ruminant.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons évalué *in vivo* l'effet de l'addition du NP RUMEN à la ration de base des vaches à différentes doses sur l'émission du méthane entérique. Nous avons également comparé l'effet du NP RUMEN à celui de l'huile de tournesol et à un autre additif alimentaire à base de cannelle (Turboviv®). Les résultats obtenus montrent une diminution importante des émissions du méthane avec le NP RUMEN en comparaison avec les autres additifs utilisés.

Dans la troisième partie, nous avons testé *in vivo* l'effet de l'addition du NP RUMEN à la ration de base sur les performances zootechniques (poids, gain moyen quotidien, production laitière, persistance de lactation) des bovins et des ovins. Nous avons également mesuré les paramètres biochimiques du contenu ruminal (pH et potentiel redox) avant et après addition du NP RUMEN dans la ration. Les résultats des deux essais ont montré une augmentation de la production laitière avec une persistance de lactation chez les vaches, une augmentation du poids moyen, et du gain moyen quotidien des bovins et ovins de l'essai. Les paramètres biochimiques mesurés ont montré aussi une élévation du pH et du potentiel redox du contenu ruminal.

Mots clés : Huiles essentielles, thymol, eugénol, carvacrol, cinnamaldéhyde, Activité antibactérienne, promoteur de croissance, Méthane, additif, ruminants, performances zootechniques.

Abstract

Intensive ruminant farming is increasing day by day to cover the world's milk and meat consumption needs. However, the environmental impacts linked to the increase in this animal production constitute a danger in terms of global warming, since ruminants contribute around 18% of the world's production of methane, which is a greenhouse gas.

In Morocco, the issue of climate change is a very acute one, since it directly affects the population that is highly dependent on agriculture and animal breeding.

Towards the end of the 1960s, scientific research aimed at improving feed efficiency made it possible, towards the end of the 1960s, to use feed additives to improve zootechnical performance. They are capable of improving the efficiency of rations, lowering production costs, influencing the characteristics of animal products, and maintaining good animal health.

Several plant-based feed additives and their extracts have been used to study their growth-promoting effect in ruminants and their depressant effect on methane production. Also, several works have been published on pure compounds of essential oils of aromatic plants alone or in mixtures as feed additives.

The first part of this work was carried out *in vitro* to test the efficacy of four major compounds of essential oils; thymol, carvacrol, eugenol, and cinnamaldehyde on gas production and on microbial fermentation of the ruminal flora of cattle. The results showed that after the use of increasing doses of EO MCs, there is a decrease in the production of fermentation gas and also a decrease in the bacterial load of the ruminal contents. These results allowed us to develop a feed additive (NP RUMEN) based on a mixture of EO and other natural compounds that have beneficial effects on digestion and overall ruminant health.

In the second part of this work, we evaluated *in vivo* the effect of adding NP RUMEN to the base ration of cows at different doses on enteric methane emission. We also compared the effect of NP RUMEN to that of sunflower oil and another cinnamon-based feed additive (Turboviv®). The results obtained show a significant decrease in methane emissions with NP RUMEN compared to the other additives used.

In the third part, we tested *in vivo* the effect of adding NP RUMEN to the basic ration on the zootechnical performance (weight, average daily gain, milk production, lactation persistency) of cattle and sheep. We also measured the biochemical parameters of the ruminal content (pH

and redox potential) before and after the addition of NP RUMEN to the ration. The results of both trials showed an increase in milk production with lactation persistency in the cows, an increase in the average weight, and an increase in the average daily gain of the cattle and sheep in the trial. The biochemical parameters measured also showed an increase in the pH and redox potential of the ruminal contents.

Key words: Essential oils, thymol, eugenol, carvacrol, cinnamaldehyde, antibacterial activity, growth promoter, methane, additive, ruminants, zootechnical performance.

Liste des abréviations

AA : Acide aminé

Add : Additif

AESA : l'Autorité européenne de sécurité des aliments

AFSSA: Agence Française de sécurité sanitaire des aliments

AG : Acides gras

AGV : Acides gras volatiles

ANOVA : Analyse de variance

CB : Cellulose brute

CEE : Communauté économique Européenne

CH_4 : Méthane

CM : Composé majoritaire

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMV : Complément minéral et vitaminé

CS : Aliment de démarrage

GMQ : Gain moyen quotidien

HE : huile essentielle

HT : huile de tournesol

LMR : Limite Maximale de Résidus

MAH : Mise à l'herbe

MAT : Matière azotée

MB : Matière brute

MG : Matière grasse

MP : Matière protéique

MS : Matière sèche

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)

NEC : note d'état corporel

$N\text{-}NH_3$: Azote ammoniacal

NP RUMEN : Natural promotor rumen

OMS : Organisation Mondiale de Santé

PBS : Pulpe de betterave surpressée

Listes des figures

***Figure 1**: Structures chimiques du carvacrol, de son isomère le thymol, et de l'eugénol. 14*

***Figure 2**: Anatomie du tube digestif d'un ruminant 16*

***Figure 3** : Anatomie des estomacs des ruminants 16*

***Figure 4**: L'arbre phylogénétique des Archaea méthanogènes 20*

***Figure 5**: Les principales voies de fermentations ruminales des polymères glucidiques 22*

***Figure 6** : Schématisation du système de chambre respiratoire à circuit ouvert 25*

***Figure 7**: Tête d'un bovin à l'intérieur de la cage à tête 26*

***Figure 8**: Dispositif visant à mesurer les émissions de CH_4 par les animaux avec la technique du marqueur SF_6, mise en place sur le site INRA de Laqueuille 28*

***Figure 9:** Mise en place d'un système de tunnel dans une bergerie..... 29*

***Figure 10**: Schéma représentant le système de collecte et de mesure des gaz de fermentation 30*

***Figure 11**: Illustration schématique du système RUSITEC décrit par Czerkawski 30*

***Figure 12**: Dénombrement des bactéries gazogènes du rumen..... 43*

***Figure 13**: Cinétique de la production de gaz du jus de rumen traité au thymol..... 46*

***Figure 14**: Cinétique de la charge bactérienne du jus de rumen durant 24 H..... 46*

***Figure 15**: Effet des différentes concentrations du thymol sur la production de gaz..... 49*

***Figure 16**: La charge bactérienne des 3 isolats de rumen au cours des 24 h d'incubation en anaérobiose. 50*

***Figure 17**: Effet des différentes concentrations du carvacrol sur la production du gaz Anaérobiose. 51*

***Figure 18**: La charge bactérienne des 3 isolats de rumen au cours des 24 h d'incubation en anaérobiose**.** 51*

***Figure 19**: Effet des différentes concentrations d'eugénol sur la production du gaz in vitro.. ..... 52*

***Figure 20**: La charge bactérienne des 3 isolats de rumen après 24 h d'incubation en anaérobiose**…… ..**53*

***Figure 21**: Effet des différentes concentrations du cinnamaldehyde sur la production du gaz in vitro 54*

***Figure 22**: La charge bactérienne des 3 isolats de rumen au cours des 24 h d'incubation en anaérobiose. 55*

***Figure 23:** Dispositif expérimental de mesure du méthane..... 62*

Figure 24 *: Enregistreur graphique 63*

Figure 25*: Comparaison de la production de méthane avant et après l'ajout d'huile de tournesol et du produit NP RUMEN chez les 5 vaches. 69*

Figure 26*: Production du méthane chez les 5 vaches après l'ajout de 50 g et 100g de l'additif NP RUMEN à la ration alimentaire 71*

Figure 27*: Comparaison de la production de méthane entre la période témoin et la période de traitement à l'additif commercial TURBOVIV et le produit NP RUMEN. 73*

Figure 28*: Evolution de la production laitière des 3 lots de vaches supplémentés durant la période expérimentale 86*

Figure 29 : *Evolution de la production laitière des vaches durant la période de l'essai* ***…...87***

Figure30*: Gain de poids moyen quotidien des agneaux pendant la période d'essai d'engraissement. 89*

Figure 31 : *Evolution du poids chez les taurillons des 4 lots supplémentés de 100 g de NP RUMEN durant la période expérimentale* ***……..……..89***

Liste des photos

Photo 1*: Test de fermentation de jus de rumen 47*

Photo 2*: La fermentation des isolats purifiés 48*

Photo 3: *Coloration de Gram des trois isolats de jus de rumen 48*

Photo 4*: Mesure du pH du jus de rumen à l'aide du pH-mètre 84*

Liste des tableaux

Tableau 1 *: mesure de la production de gaz après Incubation 24h pendant 37 C*:* *45*
Tableau 2 *: Test de la fermentation de jus de rumen..... 47*
Tableau 3*: La production du gaz à effet de serre par les trois isolats. 48*
Tableau 4*: Caractéristiques de vaches utilisées dans l'expérimentation..... 61*
Tableau 5 *: Caractéristiques des animaux utilisés dans l'expérimentation 64*
Tableau 6 *: Caractéristiques des animaux utilisés dans l'expérimentation 66*
Tableau 7*: la production du méthane des 5 vaches sans additif alimentaire pendant une semaine..... 68*
Tableau 8 *: Production de méthane des 5 vaches après l'ajout de l'huile de tournesol à L'aliment. 68*
Tableau 9*: la production du méthane des 5 vaches après l'ajout du produit NP RUMEN 69*
Tableau 10 : *la production du méthane des 5 vaches sans additif alimentaire..... 70*
Tableau 11 *: Production du méthane chez les 5 vaches après l'ajout de 50 g et 100g de l'additif NP RUMEN à la ration alimentaire. 70*
Tableau 12*: Production du méthane chez les 5 vaches durant la période témoin 72*
Tableau 13 *: Production du méthane chez les 5 vaches après l'ajout de 100 g du NP RUMEN à la ration alimentaire*..... 72*
Tableau 14 *: Production du méthane chez les 5 vaches après l'ajout de 100 g de l'additif commercial TURBOVIV à la ration alimentaire..... 73*
Tableau 15 : *Caractéristiques des animaux utilisés dans l'expérimentation 81*
Tableau 16 : *Production laitière moyenne des vaches durant la période expérimentale 86*
Tableau 17*: Quantité moyenne de production laitière en L/vache/J pendant les deux périodes expérimentales..... 87*
Tableau 18 *: Coefficient de persistance de la lactation durant l'essai 88*
Tableau 19*: Gain de poids moyen en % des agneaux durant la période d'essai..... 88*
Tableau 20*: Performances moyennes (Poids moyen, GMQ) réalisées par les lots, témoin et supplémenté de NP RUMEN chez les taurillons Aubrac et Prim' Holstein sur la période globale de l'essai. 90*
Tableau 21*: Effet de l'addition du NP RUMEN sur le pH du jus de rumen. 90*
Tableaμu 22 *:Effet de l'addition du NP RUMEN sur le potentiel redox du jus de rumen. 91*

Sommaire

Introduction générale **1**

Partie bibliographique **4**

I .Utilisation des additifs en élevage des ruminants **4**

1. Les compléments azotés 4

2. Les vitamines 4

3. Les hormones 4

4.Les ionophores 5

5. Les antibiotiques(ATB) 6

6. Utilisation de plantes entières pour leurs propriétés pharmacologiques 7

7. La culture de levures 7

8. Les huiles essentielles 8

8.1 Définition 8

8.2 Aromathérapie 9

8.3 Domaines d'utilisations des HE 9

8.4 Activité antimicrobienne des HE 9

8.5 Les paramètres impliqués dans l'activité biologique des HE 11

8.6 Les composés majoritaires des HE 14

9. Carde réglementaire d'utilisation des additifs dans l'alimentation animale……..…15

II. Particularités anatomique et digestive des réservoirs gastriques des ruminants **15**

1. Anatomie du tube digestif des ruminants 15

1.1 La cavité buccale 16

1.2 L'estomac 16

1.3 Le rumen 17

1.4 Le réseau (Réticulum) 17

1.5 Le réticulo-rumen 17

1.6 Le feuillet 17

1.7 La caillette 17

1.8 L'intestin grêle 17

1.9 Le gros intestin 18

2. Les conditions physico-chimiques du milieu ruminal 18

2.1 L'anaérobiose 18

2.2 Le pH 18
2.3 La température 18
2.4 L'humidité 18
2.5 La pression osmotique 19
3. Les microorganismes ruminaux impliqués dans la production du méthane 19
3.1 La population méthanogène du rumen 19
3.2 Les protozoaires 20
III. Les mécanismes de production de méthane par les ruminants 21
1. Les mécanismes de la méthanogenèse ruminale 21
IV. Modes d'expression et moyens de mesure et d'estimation du méthane produit par les ruminants 23
1. Les modes d'expression de la production de CH_4 23
2. Moyens de mesure et d'estimation du méthane produit par les ruminants 23
2.1 Techniques individuelles 23
2.2 Techniques de groupe 28
2.3 Méthode de mesure indirecte des émissions de méthane par les acides gras du lait .. 30
V.L'impact de la production du méthane digestif sur l'environnement 31
VI. Moyens de réduire la méthanogénèse au niveau ruminal 32
1. Effet de l'alimentation (Composition de la ration) 32
2. Extraits de plantes 33
2.1 Les saponines 33
2.2 Les huiles essentielles 33
2.3 Les plantes riches en tannins 34
3. Les manipulations biotechnologiques de l'écosystème microbien ruminal 34
3.1 Au niveau de l'animal 34
3.2 Au niveau des additifs 35
VII. Effet de l'utilisation des extraits de plantes aromatiques et des HE sur les paramètres zootechniques du ruminant 36
1. Elevage laitier 36
2. Atelier d'engraissement 37
3. Action sur les parasites 38
***Première partie* 39**
Etude *in vitro* de l'activité antibactérienne du thymol, du carvacrol, de l'eugénol, et du cinnamaldéhyde sur la fermentation du jus de rumen 39
1. Introduction : 40

2. Matériel et méthodes : 41
2.1)Action du thymol sur la fermentation et la production du méthane du jus de rumen 41
2.1.1) Mode de prélèvement 41
2.1.2) Préparation de la solution de thymol 41
2.1.3) Milieux de culture 41
2.1.4) Test *in Vitro* de l'activité du thymol sur la production de gaz et la fermentation bactérienne du jus de rumen 41
2.1.5) Test *in vitro* de l'activité du thymol sur la cinétique de la production de méthane 42
2.2 Isolement des bactéries gazogènes à partir de la flore microbienne du rumen 42
2.2.1) Mode de prélèvement 42
2.2.2) Dispersion des composés phénoliques testés 42
2.2.3) Milieux de culture 42
2.2.4) Test préliminaire de fermentation *in vitro* 42
2.2.5) Culture des isolats gazogènes 42
2.2.6) Test de confirmation de la production du gaz par les trois isolats 43
2.2.7) Identification microscopique des trois isolats du rumen 43
2. 3 Evaluation de l'activité antibactérienne des composés majoritaires des HE sur la fermentation des bactéries isolées 44
2.3.1) Préparation des différentes concentrations des composés majoritaires 44
2.3.2) Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) 44
3. Résultats 45
3.1 Action du thymol sur la production du méthane du jus de rumen 45
3.1.1) Test *in Vitro* de l'activité du thymol sur la production de gaz et la fermentation bactérienne du jus de rumen 45
3.1.2) Cinétique de la production de méthane après traitement aux différentes doses de thymol 46
3.2 Action du thymol sur la flore microbienne du rumen 47
3.2.1) Test préliminaire de fermentation *in vitro* 47
3.2.2) Test de confirmation de production de gaz par les trois isolats gazogènes 48
3.2.3) Identification microscopique des trois isolats du rumen 48
3.2.4) Evaluation de l'activité antibactérienne des composés majoritaires des HE sur la fermentation des bactéries isolées 49
- Effet du thymol sur la production de gaz des trois isolats 49
- Effet du carvacrol sur la production de gaz des trois isolats 51
- Effet de L'eugénol sur la production de gaz des trois isolats 52

- Effet du cinnamaldéhyde sur la production de gaz des trois isolats 54
4. Discussion 56
4.1 Action du thymol sur de fermentation *du jus de rumen in vitro* 56
4.2 Action du thymol en comparaison avec le carvacrol, l'eugénol et le cinnamaldéhyde sur la flore microbienne du rumen 57
Deuxième partie **59**
Etude *in vivo* de l'activité d'un additif alimentaire NP RUMEN sur l'émission de méthane entérique chez les bovins **59**
1. Introduction **60**
2. Matériel et méthodes : **61**
2.1 Estimation des émissions du méthane par les vaches laitières n'ayant reçu aucun additif alimentaire 61
2.1.1) Animaux 61
2.1.2) Dispositif expérimental 61
2.1.3) Mesure de la production de méthane 62
2.1.4) Analyse statistique 63
2.2 Effet de l'additif alimentaire NP RUMEN et de l'addition de l'huile de tournesol sur la réduction du méthane entérique chez les bovins 63
2.2.1) Rationnement 63
2.2.2) Protocole expérimental 64
2.3 Effet dose-réponse de l'administration de l'additif alimentaire NP RUMEN sur la réduction du méthane entérique chez les bovins 64
2.3.1) Animaux 64
2.3.2) Rationnement 65
2.3.4) Protocole expérimental 65
2.4 Effet de l'administration de l'additif alimentaire NP RUMEN en comparaison avec un additif commercial, le TURBOVIV sur la réduction de méthane entérique chez les bovins 65
2.4.1) Animaux 65
2.4.2) Rationnement 66
2.4.3) Protocole expérimental 66
3. Résultats **68**
3.1 Effet de l'additif alimentaire NP RUMEN ou de l'addition de l'huile de tournesol sur la réduction de méthane entérique chez les bovins 68
3.1.1) Production de méthane durant la première période (période contrôle) 68
3.1.2) Production de méthane après l'ajout de l'huile de tournesol 68
3.1.3) Production de méthane après ajout de l'additif NP RUMEN 69

3.2 Effet dose-réponse de l'administration de l'additif alimentaire NP RUMEN sur la réduction du méthane entérique chez les bovins 70
3.2.1) Production moyenne de méthane durant la période contrôle (sans additif)..... 70
3.2.3) Production de méthane après ajout de deux doses différentes de l'additif NP RUMEN 70
3.3 Effet de l'administration de l'additif alimentaire NP RUMEN en comparaison avec un additif commercial le TURBOVIV sur la réduction de méthane entérique chez les bovins72
3.3.1) Production moyenne de méthane durant la période de contrôle (sans additif)..... 72
3.3.2) Production de méthane après ajout de l'additif NP RUMEN..... 72
3.3.3) Production de méthane après ajout de l'additif commercial Turboviv 73
4. Discussion..... 74
4.1 Effet de l'additif alimentaire NP RUMEN ou de l'addition de l'huile de tournesol sur la réduction du méthane entérique chez les bovins 74
4.1.1) Effet de l'addition de l'huile de Tournesol (HT) sur la production du méthane 74
4.1.2) Effet du NP RUMEN sur la réduction de méthane entérique chez les bovins 75
4.2 Effet dose-réponse de l'administration de l'additif alimentaire NP RUMEN sur la réduction du méthane entérique chez les bovins 76
4.2.1) Production de méthane après ajout de 50 et 100 g de l'additif NP RUMEN 77
4.3 Effet de l'administration de l'additif NP RUMEN en comparaison avec un additif commercial le Turboviv sur la réduction de méthane entérique chez les bovins 77
***Troisième partie*..... 79**
Evaluation de l'effet de l'addition du NP RUMEN à la ration de base sur les performances zootechniques chez les ruminants..... 79
1. Introduction 80
2. Matériel et méthodes :..... 81
2.1 Effet de l'additif NP RUMEN sur la production laitière chez les bovins 81
2.1.1) Animaux 81
2.1.2) Rationnement..... 81
2.1.3) Protocol expérimental..... 81
2.2 Effet de l'additif NP RUMEN sur la persistance de lactation chez les vaches laitières pendant la phase de décroissance de lactation..... 82
2.2.1) Animaux 82
2.2.2) Rationnement..... 82
2.2.3) Protocole expérimental..... 82
2.3 Effet de l'additif NP RUMEN sur l'évolution du poids et le gain moyen quotidien (GMQ) chez les ovins..... 82

2.3.1) Animaux 82
2.3.2) Rationnement 82
2.3.3) Protocole expérimental 82
2.4 Effet de l'additif NP RUMEN sur les performances zootechniques et les indicateurs biochimiques du rumen chez les bovins 83
2.4.1) Animaux 83
2.4.2) Rationnement 83
2.4.4) Indicateurs biochimiques du jus rumen 84
A-Mesure du pH ruminal 84
B- Potentiel redox 84
2.4.5) Traitement statistique 84
3. Résultats 86
3.1 Effet de l'additif NP RUMEN sur la production laitière chez les bovins 86
3.1.1) Evolution de la production laitière 86
3.2 Effet du NP RUMEN sur la persistance de lactation chez les vaches laitières pendant la phase de décroissance de lactation 87
3.2.1) Mesure de la production laitière des vaches 87
3.2.2) Mesure de coefficient de persistance de la lactation 88
3.3 Effet de l'additif NP RUMEN sur l'évolution du poids moyen et sur le gain moyen quotidien (GMQ) chez les ovins 88
3.4 Effet de l'additif NP RUMEN sur les performances zootechniques et les indicateurs biochimiques du jus de rumen chez les taurillons 89
3.4.1) Mesure du poids moyen et du gain moyen quotidien des taurillons 89
3.4.2) Mesure du pH ruminal des taurillons 90
3.4.3) Mesure du potentiel redox du jus de rumen des taurillons 91
4. Discussion 92
4.1 Effet de l'additif NP RUMEN sur la production laitière chez les bovins 92
4.2 Activité de l'additif NP RUMEN sur la persistance de lactation chez les vaches laitières pendant la phase de décroissance de lactation 93
4.3 Effet de l'additif NP RUMEN sur l'évolution du poids et le gain moyen quotidien (GMQ) chez les ovins 94
4.4 Effet de l'additif NP RUMEN sur les performances de production et les indicateurs biochimiques du rumen chez les taurillons 94
4.4.1) Gain de poids et Gain Moyen Quotidien 94
4.4.2) pH ruminal. 95
4.4.3) potentiel redox……..……95

Conclusion et perspectives…….97

References bibiliographique…….99

Annexes……..122

Introduction générale

L'évolution de la production animale vers des systèmes de plus en plus intensifs a permis d'accroître la productivité des ruminants d'élevage en lait et en viande. Cette progression s'est effectuée en orientant la sélection et les conditions d'élevage vers la maximisation de la vitesse de croissance, de l'efficacité alimentaire en faisant appel à l'utilisation des additifs alimentaires comme les antibiotiques, premier groupe d'additifs utilisé dans l'alimentation animale. Ces antibiotiques ont prouvé leur efficacité comme facteurs de croissance. Cependant, le développement des microbes résistants et l'apparition de résidus dans les productions alimentaires comme la viande et le lait ont mis fin à l'utilisation des antibiotiques dans l'alimentation animale.

La haute productivité des bovins d'élevage a engendré aussi le problème de la production du méthane par les ruminants qui est le résultat de la dégradation anaérobie de la matière végétale ingérée par les microorganismes contenus dans leur tractus digestif. Ce gaz représente d'une part, une perte énergétique estimée à 12% de l'énergie contenue dans les aliments ingérés et d'autre part, un gaz à effet de serre très puissant qui possède un pouvoir radiatif élevé (Martin et coll., 2006). Si on arrive à réduire ces pertes en énergie, on pourrait s'attendre à une amélioration de la productivité de l'animal tout en évitant les problèmes métaboliques et digestifs car cette part de l'énergie pourrait être utilisée pour la production du lait ou de la viande et réduire par la même la production de gaz à effet de serre.

L'utilisation des additifs naturels comme les huiles essentielles, serait une piste intéressante à explorer pour remplacer l'utilisation des antibiotiques et des additifs chimiques qui représentent une grande toxicité à long terme avec un coût élevé. Aussi pour équilibrer la flore ruminale et prévenir les accidents métaboliques.

Les huiles essentielles représentent certains métabolites secondaires présents dans la majorité des plantes. Différentes études (Deans et Ritchie., 1987 ; Chao et coll., 2000) ont démontré les effets antimicrobiens des huiles essentielles contre un large éventail de microorganismes, y compris les bactéries, les protozoaires et les champignons.

L'objectif principal de notre étude est de développer un additif alimentaire naturel à base D'huiles essentielles afin de remplacer les additifs alimentaires chimiques habituellement utilisés comme stimulateurs de croissance et qui constituent un danger pour l'animal et pour l'homme.

Dans La première partie de ce travail, nous avons évalué *in vitro* l'efficacité de quatre composés majoritaires d'huiles essentielles (le thymol, le carvacrol, l'eugénol, et le cinnamaldéhyde) sur la production de méthane et sur la fermentation microbienne de la flore ruminale des bovins. D'après les résultats obtenus *in vitro* sur l'activité antimicrobienne des HE et leurs activités sur la fermentation du jus de rumen chez les bovins, nous avons pu mettre au point un additif alimentaire à base de substances naturelles variées que nous avons appelé NP RUMEN.

Le deuxième chapitre de ce travail se focalise sur l'évaluation de l'effet de cet additif *in vivo* sur les émissions du méthane entérique des vaches laitières. Cet effet a été comparé à d'autres additifs commerciaux utilisés dans l'alimentation des ruminants.

Enfin, dans le troisième chapitre, nous avons évalué l'effet de l'incorporation de l'additif NP RUMEN dans la ration sur les performances de production (la production laitière, la persistance de lactation, la vitesse de croissance, le gain de poids et le gain moyen quotidien) chez les ruminants.

Partie bibliographique

Partie bibliographique

I .Utilisation des additifs en élevage des ruminants

L'alimentation des animaux d'élevage conditionne leur santé et leur croissance. C'est pourquoi les éleveurs cherchent à ajouter à la nourriture du bétail des additifs alimentaires nécessaires pour garantir une croissance optimale et une santé idéale aux animaux d'élevage. Tout cela dans le but d'améliorer la production, en qualité et/ou en quantité. Parmi les additifs alimentaires ont peut citer : Les compléments azotés, Les vitamines, les hormones … (Orskov et Grubb., 1978).

1. Les compléments azotés

Afin de compenser les déficits des rations apportées aux animaux et de les maintenir en bonne santé, les éleveurs ajoutent des compléments riches en énergie, en azote ou en minéraux. Dans le cas des ruminants Une complémentation minimale, destinée aux micro-organismes du rumen permettant d'optimiser leur activité cellulolytique. Cela apporte les éléments nécessaires à leur multiplication et à la dégradation des polyosides. Ces apports sont essentiellement sous forme d'azote (susceptible de fermenter pour donner l'ammoniac nécessaire à la synthèse microbienne) de minéraux et de vitamines (Orskov et Grubb.,1978).

2. Les vitamines

Les compléments vitaminés sont très utilisés dans l'ensemble des filières de production, à l'exception de la filière de production de veau de boucherie. Les vitamines, appartenant à différentes familles chimiques sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. Elles agissent à petites doses et catalysent un grand nombre de réactions métabolismes. Les vitamines principalement utilisées sont les vitamines A, D et E. La vitamine A intervient dans toutes les fonctions qui mettent en jeu la multiplication et le renouvellement cellulaire. L'impact essentiel de la vitamine D se situe au niveau de la fixation phosphocalcique et prévient donc le rachitisme. La vitamine E joue le rôle d'antioxydant naturel majeur. Elle participe à la protection des épithéliums et au bon fonctionnement musculaire et nerveux (Orskov et Grubb.,1978).

3. Les hormones

Les hormones permettent un développement physique et sexuel plus important, un ajustement du niveau d'activité de certains organes et le maintien de paramètres physiologiques tels que la pression osmotique et la glycémie. Certaines hormones sont utilisées pour améliorer la rentabilité de la production. En effet, avec l'administration d'hormones, les animaux se développent plus vite pour une même quantité d'aliments ingérés. Les coûts de production

sont ainsi réduits tout en améliorant l'efficacité de l'alimentation et la qualité de la viande (Charrière., 2003).

Les stimulants administrés aux animaux peuvent être des hormones sexuelles naturelles ou des hormones synthétisées à partir d'hormones naturelles. D'autres substances comme le DES (diéthylstilbestrol) ont pu être utilisées mais sont interdites depuis 1981 en France dans l'élevage car elles engendrent des effets secondaires chez l'homme.

Des exemples d'hormones synthétisées utilisées sont :

- L'acétate de trenbolone (TBA) : stéroïde synthétique doté de propriétés anabolisantes. Le produit commercial est généralement administré aux bovins en association avec l'estradiol-17βou le zéranol. La trenbolone a des propriétés semblables à celles de la testostérone (Charrière.,2003).

- L'acétate de melengestrol (MGA) : hormone utilisée en élevage dans certains pays non membre de l'Union Européenne, en particulier aux Etats-Unis. Cette utilisation a notamment pour but d'éviter que les génisses d'élevage n'entrent en chaleur. Par ailleurs, la MGA présente également des propriétés anabolisantes (Charrière., 2003).

- Les β-agonistes ont également été utilisés dans la production animale, dans le même dessein que celui des hormones. La substance dont on a le plus parlé est le clenbutérol qui a la particularité de promouvoir la croissance du tissu musculaire au détriment de la partie graisseuse (Charrière., 2003).

4. Les ionophores

Un ionophore, est une petite molécule fabriquée par un microorganisme ressemblant à un champignon (*Streptomyces*) pour se défendre contre d'autres microbes, principalement des bactéries et des protozoaires. Il est spécifique de bactéries dites « à Gram positives » parce que leur paroi cellulaire est moins épaisse et moins étanche aux ionophores que celle des bactéries dites « à Gram négatives » (Martineau., 2004).
Les ionophores sont liposolubles et peuvent donc servir de véhicule pour le transport d'ions à travers la membrane cellulaire des bactéries. Cette propriété leur permet de déséquilibrer des mécanismes essentiels à la survie de certains groupes de bactéries. Ils stimulent de façon sélective la croissance de bactéries productrices d'acide propionique entraînant ainsi une amélioration de l'efficacité alimentaire et de la croissance des génisses laitières. De plus, l'acide propionique est utilisé par la vache dans la fabrication du sucre sanguin permettant

d'atténuer la mobilisation des réserves de l'animal, l'engorgement graisseux du foie dans les cas de l'acétonémie clinique et subclinique (symptômes non apparents) en début de lactation (Kennelly et Lien., 1997).

Les ionophores sont recommandés pour l'amélioration de la croissance et de l'efficacité alimentaire des génisses laitières ce qui leur permet d'atteindre plus tôt le premier vêlage.

Ils sont utilisés principalement par les éleveurs de volaille et de bovins de boucherie dans la lutte contre la coccidiose, une maladie parasitaire de l'intestin. On s'en sert aussi pour améliorer la conversion alimentaire. Les ionophores sont utiles dans la prévention de la coccidiose. Depuis 1997, l'ionophore monensin est homologué pour prévenir l'acétonémie subclinique chez la vache laitière. Le monensin est administré environ trois semaines avant la date prévue de la mise bas sous forme de bolus (ou capsule à relâchement lent), ou directement dans la moulée à partir d'un prémélange concentré (Martineau., 2004).

5. Les antibiotiques(ATB)

Les antibiotiques sont utilisés en tant que promoteurs de croissance. Ces agents chimio-thérapeutiques sont mis en cause dans plusieurs problèmes de santé animale et de santé publique pour leur toxicité. Les ATB peuvent générer des résidus dans les produits alimentaires d'origine animale et sont impliqués dans l'émergence de la résistance aux agents infectieux (Pericás., 2011).

C'est pour toutes ces raisons que ces agents ont été interdits par la Commission Européenne à Bruxelles le 22 décembre 2005.

La découverte des antibiotiques a permis d'améliorer la santé de la population. Ce sont des agents utilisés pour détruire ou empêcher la croissance de micro-organismes bactériens. Ils font partie des agents ayant révolutionné le traitement des maladies infectieuses et entraîné une diminution considérable de la morbidité et de la mortalité. Mais les organismes provoquant des maladies possèdent une remarquable capacité d'adaptation, et notamment la faculté d'acquérir et de transmettre la résistance antimicrobienne, ce qui met en péril l'efficacité des antibiotiques. Cette propriété étant favorisée par leur utilisation excessive, il convient donc de diminuer leur usage afin de limiter l'émergence et la prolifération de nouveaux germes résistants (Eustache., 2006).

Cette stratégie de l'utilisation des antibiotiques comme facteurs pour limiter la prolifération des germes résistants a été développée chez les éleveurs. Pendant des dizaines d'année les antibiotiques étaient ajoutés en petites quantités dans les aliments pour animaux pour améliorer leur croissance. Mais finalement il a été décidé d'interdire progressivement leur commercialisation à cette fin productive. Les antibiotiques sont, dorénavant, uniquement

réservés aux traitements des infections humaines ou animales. A noter que l'Union européenne avait déjà interdit d'incorporer des antibiotiques humains dans l'alimentation animale. Les 4 derniers antibiotiques interdits depuis le 1er janvier 2006 sont les suivants : monensine sodium, salinomycines-sodium, avilamycine et Flavophospholipol (Eustache., 2006).

6. Utilisation de plantes entières pour leurs propriétés pharmacologiques

L'effet de la chicorée (*Cichorium intybus)* plantée dans certains pâturages ou ajoutée à la ration de ruminants a été testé au cours d'un essai réalisé en élevage biologique pour contrôler le parasitisme interne des animaux (Athanasiadou et coll., 2005). Un autre essai a également indiqué que la laitue (*Lactuca sativa*) ou l'ortie urticante *(Urtica dioica)* utilisée à l'état brut sec, à raison de 100 mg/g d'aliment, pourrait stabiliser le pH du rumen et éviter le risque d'acidose chez les ruminants à potentiel de production élevé (Kliem et coll., 2005).

Certaines plantes riches en composés biologiquement actifs peuvent être utilisées entières au lieu d'extraits. Ainsi, un broyat sec de *Yucca schidigera* aurait les mêmes effets sur les protozoaires et la production d'ammoniaque dans le rumen de génisses que les saponines extraites (Hristov et coll., 1999). De même, l'ajout du péricarpe de la graine de *Sapindus saponaria* aurait permis de retrouver les effets des saponines sur l'écosystème microbien ruminal et son activité. Nisbet et Martin (1990) ont montré que l'ajout de l'acide malique à la ration de ruminants stimule l'utilisation du lactate par les bactéries du rumen, en particulier par *Selenomonas ruminantium*, ce qui réduit le risque d'acidose lactique dans le cas de régimes riches en amidon fermentescible.

7. La culture de levures

Dans une culture de la levure *Saccharomyces cerevisiae* composeé de son milieu de culture et des substances produites par la levure au cours du processus de fermentation, ce sont les sous-produits de fermentation de la culture qui sont les agents actifs et qui ont un effet bénéfique sur la fermentation ruminale. Ces métabolites stimulent la croissance bactérienne et tout particulièrement, les bactéries de type cellulolytique dans le rumen. Cet impact positif sur la croissance bactérienne se répercute avantageusement sur la consommation de matière sèche de l'animal et sur sa production de protéines et de matière grasse du lait. La culture de levure favorise aussi la croissance des bactéries utilisant l'acide lactique. Ce phénomène contribue à stabiliser le pH ruminal et à réduire les symptômes associés à l'acidose comme, par exemple, les problèmes de fluctuation de consommation.

Il est donc conseillé de servir la culture de levure en période de préparation au vêlage jusqu'à 10 semaines après la parturition (Aseltine., 1991).

Les levures vivantes ont prouvé leur efficacité depuis de nombreuses années et font l'objet d'une soixantaine de publications scientifiques. Elle sont connues pour augmenter significativement le pH du rumen : de + 0,1 point de pH sur des rations riches en fibres, jusqu'à + 0,5 point de pH en moyenne sur des rations à haut niveau d'amidon (Vergonjeanne., 2015). Les levures ont des effets indirects sur les conditions ruminales en augmentant l'activité enzymatique (polysaccharides-hydrolases et glycosidases) des bactéries cellulolytiques et en limitant la production d'acide lactique (Vergonjeanne., 2015).

Par ailleurs, une vache ingère chaque jour 7 à 8 litres d'oxygène, mais l'O_2 est très toxique pour l'écosystème ruminal. Les levures contribuent à consommer cet oxygène afin de maintenir les conditions anaérobies et l'équilibre bactérien (Vergonjeanne., 2015).

Les levures jouent également sur le comportement des animaux puisque les vaches supplémentées passent en moyenne 22 minutes de plus couchées à ruminer dans leurs logettes. De même, le comportement alimentaire est également plus régulier.. Les prises alimentaires étaient plus fréquentes et moindres avec la levure vivante, ce qui contribue également à maintenir l'équilibre du rumen (Vergonjeanne., 2015).

Concernant l'effet de la supplémentation en levure vivantes sur la production laitière, la majorité des essais montrent un gain de production de 1 à 1,3 kg de lait corrigé par vache et par jour sur l'ensemble de la lactation, avec une différence pouvant aller jusqu'à + 2,7 kg de lait durant le pic de lactation. Le taux butyreux du lait augmente lui aussi de + 0,12 % à + 0,43 %, sans évolution significative du taux protéique pendant le pic de lactation. De plus, ces performances laitières sont obtenues tout en limitant la perte d'état corporel, mais il ne faut pas oublier qu'une vache doit aussi être en mesure de se reproduire deux à trois mois après avoir vêlé (Vergonjeanne., 2015).

8. Les huiles essentielles

8.1 Définition

Une huile essentielle (HE) est définit comme: « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'HE est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques.

Dans la plante, les HE peuvent être stockées dans divers organes : fleurs (origan), feuilles (citronnelle, eucalyptus), écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), rhizomes (acore), fruits (badiane) ou graines (carvi) (Brunechon., 1987).

8.2 Aromathérapie

L'aromathérapie est l'utilisation médicale des extraits aromatiques de plantes. La phytothérapie, au contraire fait usage de l'ensemble des éléments d'une plante. Plusieurs préparations à base d'huiles essentielles (HE) sont prescrites pour le traitement de plusieurs infections bactériennes, fongiques et virales (Franchomme, 1981 ; Roulier, 1992 ; Gulluce et coll., 2003 ; Ouraïni et coll., 2005).

8.3 Domaines d'utilisations des HE

Les HE sont utilisés en parfumerie, en cosmétologie, en conserverie, en pâtisserie, dans la fabrication des insecticides et en industrie pharmaceutique (Cracker et Simon., 1986).

Dans les domaines phytosanitaire et agro-alimentaire, les HE ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes (Zambonelli et coll., 2004) et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (Mangena et Muyima., 1999).

Certaines HE agissent comme des agents antiseptiques, d'autres comme des agents analgésiques; anti-enzymatiques ; sédatifs ou stimulants (Margaris et coll., 1982).

Les HE stimulent la sécrétion des enzymes digestives gastriques et intestinales. Par exemple, l'HE de lavande a un effet carminatif et spasmolytique (Kelsey et coll., 1984).

8.4 Activité antimicrobienne des HE

8.4.1 Pouvoir antibactérien des HE

L'évaluation de l'effet bactériostatique et bactéricide des HE a fait l'objet de plusieurs publications. Les HE les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antimicrobiennes appartiennent à la famille des *Labiatae* : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc.

Certaines études ont rapporté que l'HE de thym, ainsi que le thymol, son composé majoritaire, inhibent la croissance de *Salmonella typhimurium*, de *Staphylococcus aureus*, d'*Escherichia coli* et d'autres espèces bactériennes (Janssen et coll., 1987 ; Juven et coll., 1994). Le carvacrol est le composé majoritaire de l'HE de thym et de l'origan. Il a montré son efficacité dans le traitement des infections des voies respiratoires supérieures et aussi sur les microbes de la muqueuse orale (Didry et coll., 1993, 1994).

D'après les travaux de Sivropoulou et coll. (1996), les HE de menthe et d'origan présentent une activité antibactérienne remarquable sur des souches à Gram positive et à Gram négative.

De même, Skandamis et coll. (2002) ont rapporté que l'HE d'origan est un excellent agent antibactérien, efficace sur *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Salmonella pullorum*, et d'autres bactéries pathogènes.

En effet, le large spectre d'activité antimicrobienne *in vitro* de l'HE d'origan est attribué à la grande portion en dérivés phénoliques qu'elle contient comme le carvacrol et le thymol (Manohar et coll., 2001). Dans le même contexte, Rhayour et coll., (2003) ont rapporté que les HE de girofle, d'origan ainsi que leurs composés majoritaires ont un effet bactéricide sur *Escherichia coli, Bacillus subtilis* et *Mycobactérium fortuitum.*

Ces effets antibactériens des HE ont été également testés *in vivo* sur des modèles animaux afin de traiter certaines infections expérimentales d'origine bactérienne provoquées par *Helicobacter pylori* chez la souris (Bergonzelli et coll., 2003; Ohno et coll., 2003).

De même, les travaux d'Ezzaouia et coll. (2007) ont montré que parmi 30 HE testées, 10 HE avaient une activité antimicrobienne sur plusieurs espèces de bactèries mutirésistantes isolées dans le milieu hospitalier.

8.4.2 Pouvoir antifongique des HE

Le pouvoir antifongique des HE a été décrit dans plusieurs études (Knobloch et coll., 1989; Cosentino et coll., 1999; Arras et Usai, 2001; Gulluce et coll., 2003). Dans ce contexte, il a été démontré que cet effet antifongique des HE est du à la présence des composés majoritaires phénoliques (Boonchird et Flegel, 1982; Viollon et Chaumont, 1994; Manohar et coll., 2001; Arras et Usai, 2001; Gören et coll., 2004).

L'étude d'Akgul et Kivanc (1988) sur le pouvoir fongicide des HE a montré que l'HE d'origan, ainsi que ses composés majoritaires le thymol et le carvacrol étaient les plus efficaces sur plusieurs espèces de champignons. Ensuite, Lima et coll., (1993) ont testé l'activité antifongique de 13 HE de différentes plantes sur des dermatophytes, l'HE d'*Oscimum gratissimum* s'est montrée la plus active en inhibant 80% des souches de dermatophytes étudiées.

Viollon et Chaumont, (1994) ont montré que l'HE de thym, le thymol et le carvacrol ont une activité antifongique importante sur des champignons incluant *Cryptococcus neoformans, Aspergillus, Saprolegnia,* et *Zygorrhynchus.*

Les HE de *Tanacetum santolinoides,* de *Satureja pilosa,* de *Melaleuca alternifolia* et de *Santolina chamaecyparissus,* ont montré un effet fongicide sur *Candida albicans* (Nenoff et coll., 1996 ; Suresh et coll., 1997). De même, l'étude d'Ali-Shtayeh et coll. (1997) a montré que le carvacrol est 1,5 fois plus efficace que la nystatine sur *Candida albicans*.

Dans d'autres études, les propriétés antifongiques de l'HE d'origan ont été examinées *in vitro* et *in vivo* (Manohar et coll., 2001). Dans ce travail, l'HE d'origan et le carvacrol qu'elle contient ont inhibé la croissance de *Candida albicans*. Enfin, les travaux réalisés dans notre labotratoire ont montré une activité fongicide de l'eugénol et du thymol *in vitro* sur *Saccharomyces cereviciae* (Bennis et coll., 2004a ; 2004b). De même les études réalisées par Chami et coll. (2004a, 2004b, 2005a, 2005b), ont montré l'activité fongicide de l'eugénol et du carvacrol sur *Candida albicans* in *vitro* et *in vivo* sur deux modèles animaux de candidose orale et vaginale.

8.4.3 Pouvoir antiviral des HE

De nombreuses pathologies virales traitées avec les HE ont montré une amélioration importante. Siddiqui et coll. (1996) ont montré l'action antivirale de l'HE d'origan et du girofle sur le virus de l'Herpes Simplex (HSV-1), ainsi que sur le virus responsable de la maladie de Newcastle. Dans la même optique, Schuhmacher et Reichling (2003) ont montré l'effet antiviral *in vitro* de l'HE de *Mentha piperita* sur les virus de l'Herpes Simplex (HSV-1 et HSV-2).

8.4.4 Pouvoir antiparasitaire des HE

L'utilisation des HE pour leur effet antiparasitaire a été rapportée par plusieurs travaux. Hatimi et coll., (2001) ont montré l'activité antileishmanienne de l'HE *d'Artemisia herba-alba* vis-à-vis de deux espèces de *Leishmania* (*Leishmania tropica* et *Leishmania major*). De la même manière, Santoro et coll., (2007) ont montré que les HE d'origan et thym inhibent la croissance de *Trypanasoma cruzi.* Des travaux menés dans notre laboratoire par Remmal et coll., (2011) ont montré une action antiparasitaire *in vitro* des HE de girofle, de l'arbre de thé, de thym et d'armoise sur les ookystes d'*Eimeria*. Achahbar (2011) a aussi montré l'efficacité des HE de girofle, de thym et d'armoise ainsi que du thymol et de l'eugénol dans le traitement préventif et curatif de la coccidiose experimentale chez le poulet de chair.

8.5 Les paramètres impliqués dans l'activité biologique des HE

L'activité antimicrobienne des HE dépend de plusieurs paramètres tels que le type de microorganismes testé, la composition de l'HE et la méthode utilisée.

8.5.1 La souche microbienne

Les différents microorganismes n'ont pas une sensibilité similaire vis à vis des HE. Une HE peut être biocide vis à vis de certaines souches, biostatique vis à vis d'autres ou n'avoir aucun effet (Hermal., 1993). C'est pour cela qu'il est important de mentionner la dénomination complète ainsi que le Gram des microorganismes. *Bacillus subtilis* et *Staphylocoque aureus* (Gram+), *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-), *Candida albicans* (Levures)

et *Aspergillus niger* (champignons) sont parmi les microorganismes les plus étudiés. Les champignons montrent généralement une sensibilité supérieure par rapport aux bactéries (Cox et coll., 2000; Amaral et coll., 1998). Satrani et coll. (2007) ont montré que les bactéries ont été plus vulnérables que les champignons à l'HE de la camomille sauvage (*Cladanthus mixtus)*. Ce résultat est expliqué par le fait que les terpénols sont abondants par rapport aux hydrocarbures terpéniques. Dans le même contexte, Knobloch et coll. (1989) ont montré que les terpénols sont plus efficaces sur les bactéries que les champignons.

Les bactéries Gram- apparaissent plus résistantes que les Gram+ vis à vis des HE grâce à la structure de leur membrane externe (Cox et coll., 2000; Amaral et coll., 1998). Ainsi, la membrane extérne des Gram- est plus riche en lipo-polysaccharides et en protéines que celle des bactéries à Gram+ qui ce qui la rend plus hydrophile et empêche ainssi les terpènes hydrophobes d'y adhérer. Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires grâce à leurs groupes fonctionnels et atteindre ainsi la membrane interne plus vulnérable (Dorman et Deans., 2000).

8.5.2 Le rôle de la composition chimique de l'HE

L'activité biologique d'une HE est en relation avec sa composition chimique, c'est à dire la nature des groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques), et leurs proportions. L'activité d'une HE est souvent due à l'activité de ses composés majoritaires. Ces composés évalués séparément sous la forme de composés purifiés, confirment ou infirment l'activité d'une l'HE de composition semblable. Il est probable que les composés minoritaires entrent en synergie avec les composés majoritaires. De cette manière, la valeur d'une HE tient à son « totum », c'est à dire à l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires (Lahlou., 2004).

Les molécules réputées actives sont les terpénoïdes, car les hydrocarbones saturés et les acétates ioniques sont inactifs (Griffin et coll., 1999). L'effet des terpènoïdes sur les membranes bactériennes isolées suggère que leur activité est fonction des propriétés lipophiles de leurs constituants terpéniques, de la nature des groupes fonctionnels, de leur solubilité en phase aqueuse et de la stéréochimie de la molécule (Dorman et Deans., 2000).

Les travaux de Zakarya et coll. (1993) ont démontré l'importance de la spécification du genre et de l'espèce, ainsi que de la variété de la plante d'où provient l'HE.

Les composés chimiques de plus grande efficacité et avec un large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools (α-terpineol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes et les cétones (Cosentino et coll., 1999; Dorman et Deans., 2000).

L’activité antifongique décroît selon le type de fonctions chimiques (Hernandez., 2005): Phénols >alcools> aldéhydes> cétones> ethers> hydrocarbures.

8.5.3 Le rôle de la méthode utilisée

Les méthodes de détermination du pouvoir antimicrobien des HE a une grande influence sur les résultats obtenus. Les difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants des HE dans l'eau, de leur volatilité et des problèmes de standardisation des méthodes. Les méthodes existantes se répartissent en 3 catégories principales :

- La méthode de microdilution

Il s’agit d’une méthode en milieu liquide, les HE sont dispersé dans une solution de détergent avant de les introduire dans le bouillon de culture (Morris et coll., 1979). En faisant varier les concentrations d’HE, on peut déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et par repiquage, on peut déterminer les concentrations minimales bactéricides (CMB). Cependant, le travail réalisé par Remmal et coll. (1993a, b) a montré que les détergents (tel le tween 80 et 20, et le triton 100), ainsi que les solvants tels l’éthanol ont un effet dépréciateur de l’efficacité des HE alors que l’agar à 0,2 % donne une bonne émulsion des HE sans altérer l’activité antimicrobienne propre de l’HE testée.

- La méthode de disques (aromatogramme)

Cette méthode consiste à déposer un disque de papier imprégné d’une quantité donnée d’HE au centre d’une surface gélosée uniformément ensemencée avec la suspension du microorganisme à étudier . Cette méthode rend compte de l’effet de la fraction volatile ainsi que celui des composés en contact. L’activité antimicrobienne se traduit par une zone d’inhibition autour du disque. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l’HE. Plus il est petit, plus la souche est résistante (Fauchère et Avril., 2002). L’inconvénient de cette méthode vient du fait que les HE ne diffusent pas bien dans la gélose.

- La méthode de micro-atmosphère

La différence de cette méthode avec la précédente réside principalement dans la position du disque imprégné d’HE. Dans cette méthode, le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l’expérience. Celui-ci n’est donc plus en contact avec le milieu gélosé (Billerbeck et coll., 2002).

8.6 Les composés majoritaires des HE

Les composés majoritaires que nous avons testés dans ce travail sont le carvacrol, le thymol l'eugénol, et le cinnamaldéhyde .

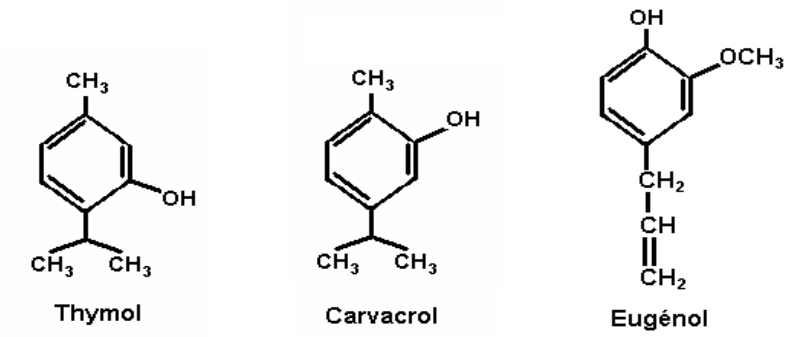

Figure 1: Structures chimiques du carvacrol, du thymol, et de l'eugénol.

8.6.1 Le carvacrol

De formule chimique $C_{10}H_{14}O$ (figure 10), le carvacrol se présente sous forme d'un liquide visqueux, de couleur orange brique. Il a l'odeur du thym. Le carvacrol est isolé à partir de l'HE extraite des Labiacées telles que l'HE d'origan (*Origanum vulgare*), de thym et de bergamote sauvage. Le carvacrol est insoluble dans l'eau mais soluble dans l'alcool et l'éther. Il est utilisé comme désinfectant, comme antimycosique et comme antihelmintique (Burchfield et Storrs., 1962), il possède donc une activité antimicrobienne très importante (Cox et coll., 2000*;* Lambert et coll., 2001*;* Walsh et coll., 2003).

8.6.2 Le thymol

Le thymol est l'un des principaux phénols reconnus dans l'HE d'*Origanum syriacum* et du *thymus vulgaris,* de formule chimique $C_{10}H_{14}O$ (figure 1) (Tyler et coll., 1981). Le thymol isomère du carvacrol est isolé par cristallisation sous l'action du froid ou par traitement à l'hydroxyde de sodium. Celui utilisé dans ce travail se présente sous forme de cristaux incolores et a l'odeur caractéristique du thym. Le thymol est reconnu comme agent antimicrobien et antimycosique (Burchfield et Storrs., 1962 ; Walsh et coll., 2003).

8.6.3 L'eugénol

L'eugénol de formule brute $C_{10}H_{12}O_2$ est un phénol qui forme le composé majoritaire de l'HE de clou de girofle (*Eugenia caryophyllus)* et de la cannelle de ceylan (*Cinnamomum zeylanicum)*. Il est utilisé comme antiseptique par les chirurgiens dentistes (Pauli., 2001).

8.6.4 Le cinnamaldéhyde

Le cinnamaldéhyde ou le 3-phénylpropénal est un composé organique de la famille des phénylpropanoïdes, de formule C_9H_8O. C'est un exemple d'aldéhyde parfumé.

Il est le composant principal (90 %) de l'essence de cannelle et se trouve à l'état naturel dans le tronc du cannelier de Ceylan, du camphrier et du cannelier de Chine. Il est reconnu comme agent anti-infectieux majeur à très large spectre d'action, et à forte activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, (Linda et coll. ,2006).

9. Carde réglementaire d'utilisation des additifs dans l'alimentation animale

L'utilisation des additifs, des prémélanges et des aliments complémentaires autorisés dans l'alimentation animale est regie par l'arrêté du ministre de l'agriculture et de la pêche maritime n°1490-13 du 22 joumada ii 1434 (3 mai 2013) fixant la liste et les teneurs maximales des substances indésirables dans les aliments pour animaux ainsi que la liste et les limites d'utilisation des additifs, des prémélanges et des aliments complémentaires destinés à l'alimentation animale.

(BO. n° 6184 du 05/09/2013, page 2297).

II. Particularités anatomique et digestive des réservoirs gastriques des ruminants

1. Anatomie du tube digestif des ruminants

Les herbivores, et particulièrement les ruminants, occupent dans le monde une place prépondérante parmi les animaux domestiques élevés à des fins de production. Leur contribution à la satisfaction des besoins alimentaires de l'humanité, revêt une importance capitale. Le ruminant présente par rapport aux monogastriques l'avantage de pouvoir extraire et utiliser l'énergie contenue dans une biomasse végétale non-utilisable directement par l'homme, à cause de sa trop grande richesse en lignocellulose. A ce titre, le ruminant ne peut être considéré comme un concurrent direct de l'homme vis-à-vis de sa biomasse alimentaire. Le ruminant doit cette spécificité à quelques particularités digestives et à un tube digestif (TD) qui n'est pourtant pas fondamentalement différent de celui des monogastriques (Barone., 1984).

Le tube digestif des ruminants est composé de différentes portions : la cavité buccale, l'œsophage, l'estomac et les intestins (Barone., 1984).

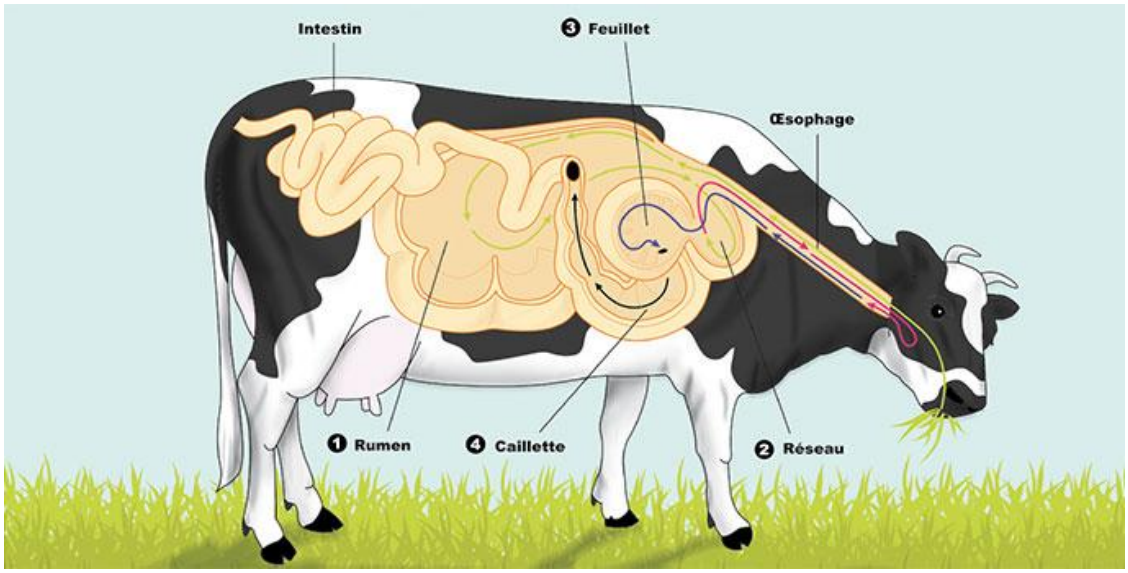

Figure 2: Anatomie du tube digestif d'un ruminant (Milka., 2011).

1.1 La cavité buccale

La fente orale des ruminants est bordée par une lèvre supérieure et une lèvre inférieure. Ces lèvres sont généralement minces et mobiles (Barone., 1984) (Barone., 1984).

1.2 L'estomac

L'estomac des ruminants est la portion digestive comprise entre l'œsophage et l'intestin. Il occupe 2/3 de la cavité abdominale. En dehors de la gestation, il présente un pro-ventricule très développé divisé en quatre compartiments qui sont : le rumen (panse), le réticulum (réseau) et l'omasum (le feuillet), et une portion analogue à l'estomac des monogastriques : l'abomasum (caillette) (Guillaume., 2007).

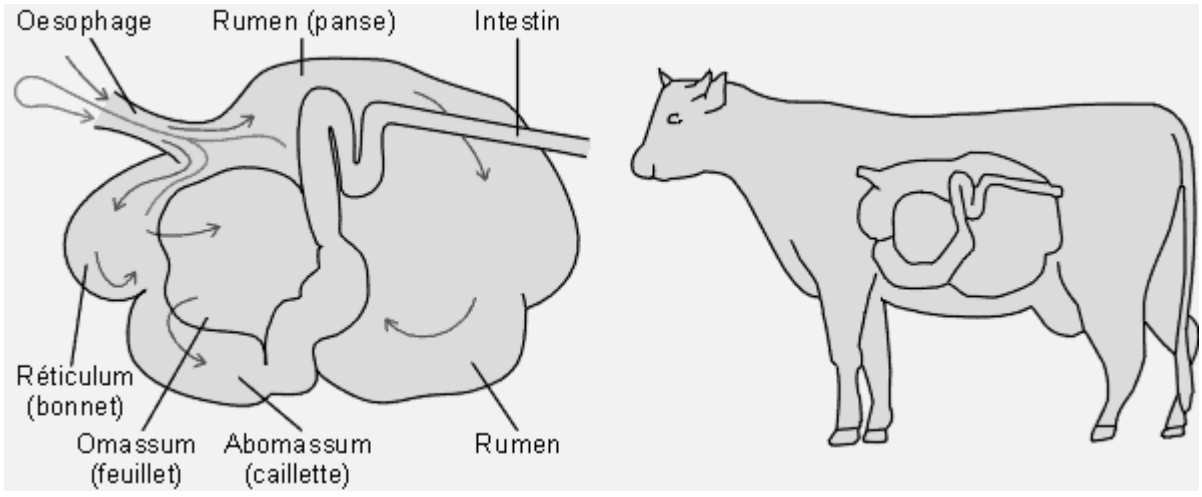

Figure 3 : Anatomie des estomacs du ruminant

1.3 Le rumen

Le rumen est le plus volumineux des réservoirs pré-gastriques qui diffèrent selon les types de ruminants. Il peut contenir autour de 150 litres chez un bovin adulte pour un poids vide proche de 7 kilogrammes (Guillaume., 2007). C'est le compartiment où s'effectue la plus grande partie de la dégradation des aliments ingérés par l'animal grâce à la présence d'une grande population microbienne (Milka., 2011). Le rumen s'ouvre très largement vers l'avant sur le réseau (Thivend et coll., 1958).

1.4 Le réseau (Réticulum)

Quand on parle de la digestion, on inclut toujours le réseau qui joue un rôle central dans la circulation des particules. C'est le segment responsable des contractions qui assurent la motricité de l'ensemble des réservoirs gastriques (Ruckebusch., 1971). Il sert également comme un tamis retenant les particules trop longues dans le rumen tout en permettant aux petites de poursuivre leur route vers l'omasum (Milka., 2011).

1.5 Le réticulo-rumen

Le réticulo-rumen correspond à la zone d'absorption des acides gras volatils et d'une partie de l'ammoniaque résultant de la dégradation des glucides (Milka., 2011).

1.6 Le feuillet

Le feuillet (omasum) est un organe sphérique à l'intérieur duquel on trouve de très nombreuses lames recouvertes d'un épithélium kératinisé qui possède des papilles. La cavité du feuillet est limitée à un canal qui communique en amont avec le réseau à l'aide d'un sphincter, et en aval avec la caillette par un orifice dilatable et plus large (Ruckebusch., 1971).

1.7 La caillette

La caillette est le seul réservoir sécrétoire de l'estomac des ruminants. Les fonctions digestives de la caillette du ruminant sont identiques à celles de l'estomac des mammifères monogastriques. Elle se caractérise également par une cavité tapissée par une muqueuse glandulaire analogue à celle des monogastriques qui est toujours recouverte par une couche de mucus (Ruckebusch., 1971).

1.8 L'intestin grêle

L'intestin grêle est subdivisé en 3 segments successifs qui sont : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Il constitue aussi la partie la plus étroite et la plus longue de tractus digestif des ruminants (Barone., 1984).

1.9 Le gros intestin

Le gros intestin se divise anatomiquement en 3 parties: le caecum, le colon et le réctum .Le caecum et le colon constituent tous les deux le deuxième compartiment de la fermentation après le rumino –réticulum (Milka, 2011). C'est au niveau de gros intestin où s'effectue une grande partie d'absorption des éléments comme les acides gras, l'eau et les sels minéraux (Milka, 2011).

2. Les conditions physico-chimiques du milieu ruminal

2.1 L'anaérobiose

Le rumen constitue un écosystème fortement anaérobie. Les apports en oxygène dans ce milieu sont faibles. L'O_2 ne représente que 1% des gaz du sac dorsal du rumen (Guillaume., 2007), l'O_2 peut entrer dans le milieu soit par l'alimentation, l'ingestion ou bien par diffusion à partir des vaisseaux des parois ruminales, cette carence en O_2 induit l'élimination des bactéries aérobie facultatives. Le rumen se caractérise aussi par une teneur élevée en gaz : 60% en CO_2, 27% en CH_4, 7% du N_2, et 0.2% en H_2 (Tiret., 2001).

2.2 Le pH

Le pH du milieu ruminal joue un rôle important dans la sélection des microorganismes du rumen ainsi que dans l'orientation des fermentations. La valeur du pH du rumen est normalement comprise entre 5,5 et 7,3, mais cette valeur peut changer en fonction des produits issus de la fermentation dans un milieu fortement réducteur : la production des acides lactiques et la production des acides gras volatils peuvent rendre le milieu acide (pH=6), et il peut également varier selon les fluctuations alimentaires dans la période post-prandiale (Guillaume., 2007).

2.3 La température

Elle est généralement supérieure à celle du corps de l'animal. Elle est comprise entre 39,5° C et 40° C. Cependant, elle peut atteindre 41°C si les fermentations sont très intenses dans le rumen et peut également chuter lorsque l'animal reçoit une grande quantité d'eau froide : elle peut atteindre une valeur allant de 5 à 10° C durant une heure *(*Guillaume., 2007 ; Amélie., 2012).

2.4 L'humidité

Elle est généralement élevée dans le rumen : la teneur en eau est à l'ordre de 85% mais cette valeur n'est pas stable dans l'ensemble du rumen. Les apports hydriques sont généralement assurés soit par l'eau avalée soit par une salivation intense (Guillaume., 2007).

2.5 La pression osmotique

La valeur de la pression osmotique du milieu ruminal peut changer avec l'ingestion et l'abreuvement. Elle peut atteindre une valeur moyenne à l'ordre de 250 mOsm/L avant l'ingestion d'un repas et atteindre 400 mOsm/L après le repas (Amélie., 2012).

3. Les microorganismes ruminaux impliqués dans la production du méthane

La flore ruminale constitue l'une des particularités de la digestion des ruminants. En effet, la micro-population du rumen se caractérise par son extrême diversité car on y trouve un important nombre de bactéries, de protozoaires et de champignons, de bactériophages et autres. Sa composition varie en fonction des changements de l'environnement des espèces de ruminants (bovins, ovins) de l'âge de l'animal et de la composition de la ration (Guillaume., 2007).

3.1 La population méthanogène du rumen

Les méthanogènes sont des archaebactéries qui produisent le CH_4 comme principal produit de fermentation en conditions anaérobiques (Garcia et coll., 2000 ; Yanagita et coll., 2000 ; Guillaume., 2007). Il s'agit de bactéries anaérobies strictes, représentant environ 4% des microorganismes ruminaux. Leurs caractéristiques sont spéciales comme la composition en lipides de leur paroi cellulaire et la présence de coenzymes spécifiques qui permettent de les classer dans le domaine des Archaea, de phylum d'Euryarcheota qui s'organisent en 5 ordres: Les Methanobacteriales, les Methanococcales, les Methanomicrobiales, les Methanosaricinales et les Methanopyrales (Garcia et coll., 2000 ; Yanagita et coll., 2000 ; Guillaume., 2007).

Les méthanogènes se caractérisent généralement par la présence d'un transporteur d'électrons de bas potentiel, le facteur F_{420}, c'est le responsable d'une auto-fluorescence bleu- vert quand les cellules sont exposées à une lumière ultraviolette et à une longueur d'onde de 420 nm (Edwardst et coll., 1975).

Methanobrevibacter spp (Mbb) est la principale espèce méthanogène qui a été identifiée que ce soit par des méthodes de culture, ou par des analyses génomiques (Stewart et coll., 1988). La plus importante souche de Mbb est *Methanobacterium.ruminantium* qui est un coccobacille à Gram positif, non motile, d'environ 1,8 µm de long, et 0,7 µm de large. Les principaux substrats fermentés par cette bactérie sont : le dihydrogène (H_2) et le dioxyde de carbone (CO_2), le formate (HCOOH) peut également être utilisé lorsqu'il est présent en grandes concentration dans le rumen (Guillaume., 2007).

De plus, *Methanomicrobium* est une souche dominante dans le rumen (occupe près de 54% des méthanogènes Chez les ovins). Elle appartient à la famille des *Methanomicrobiales*

(Guillaume et coll., 2007). Il s'agit d'un bacille Gram négatif, faiblement motile, d'une taille de 0,7 µm sur 1,5 à 2 µm. , non sporulant (Guillaume., 2007). Il existe une autre espèce de bactéries méthanogènes qui a été identifiée dans le rumen: il s'agit de *Methanosarcinasp*. (Yanagita et coll., 2000), qui appartient à la famille des *Methanosarcinaceae* .Elle est Gram positive et non motile, d'un diamètre compris entre 1,5 et 2 µm, qui se présente en large groupe, ou en paquet. Les principaux substrats utilisés par cette souche pour la production de méthane incluent toujours le H_2 et le CO_2 (Stewart et coll., 1988).

En plus des espèces principales du rumen précédemment citées, on peut rajouter *Methanobacterium formicicum, Methanonosarcina barkeri* et *Methanoculleusol entagyi* qui ont été identifiées par (PCR) (Stewart et coll., 1988 ; Yanagita et coll., 2000).

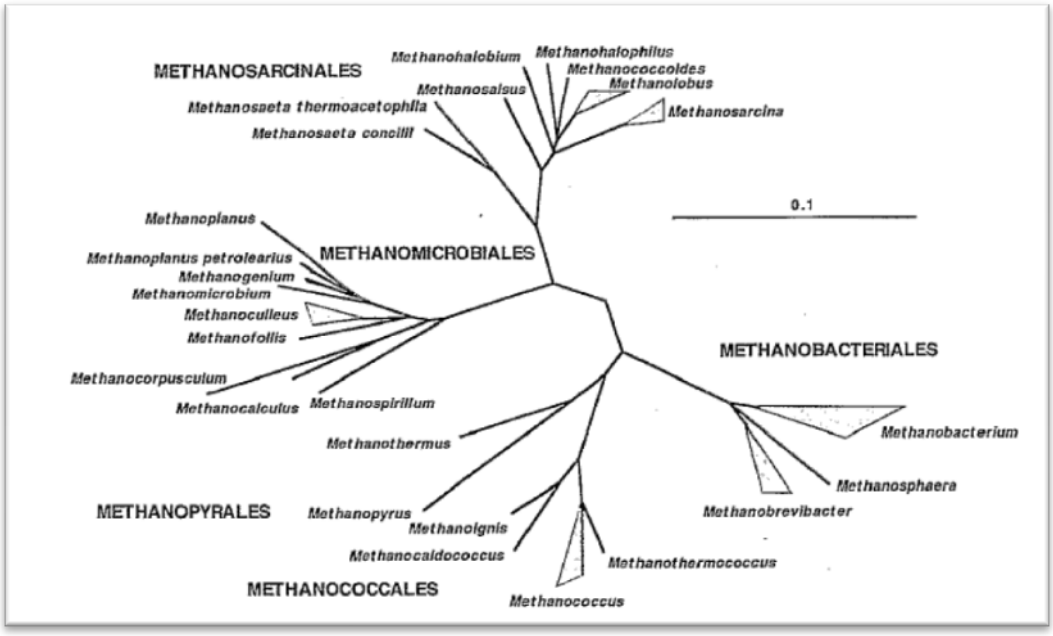

Figure 4: L'arbre phylogénétique des Archaea méthanogènes (Garcia et coll., 2000).

3.2 Les protozoaires

Les protozoaires du rumen sont principalement des ciliés, mais on observe également la présence de flagellés en nombre plus réduit (Thivend et coll., 1985).

Les ciliés du rumen sont 20 à 100 fois plus grands en taille que les bactéries mais ils sont 40 fois moins nombreux, en distingue deux groupes : les holotriches et les entodiniomorphes (Thivend et coll, *1985*).

Parmi les holotriches, ce sont les genres *lsotricha* et *Dasytricha* qui sont les plus fréquents dans le rumen. Pour les entodiniomorphes, ce sont les genres *Entodinium, Diplodinium, Epidinium, Ophryoscolex, Polyplastron et Eudiplodinium* qui sont les plus abondants dans le rumen. Leur nombre n'excède généralement pas 2 à 5 x 10^6 organismes / ml de contenu de rumen (Hungate., 1966 ; Thivend et coll., 1985).

Les protozoaires du contenu de rumen se caractérisent généralement par la production des enzymes qui participent à la digestion des particules ingérées. Ils sont capables aussi de vivre en symbiose avec les bactéries ruminales qui vivent à l'intérieur des protozoaires ciliés, dans des vacuoles localisées au sein de leurs endoplasmes. Les protozoaires meurent rapidement lorsque ces bactéries sont éliminées après un traitement par les antibiotiques (Bonhomme et *coll*, 1982).

Au niveau du rumen, il existe un autre groupe de protozoaires, c'est le groupe des flagellés. Ces derniers n'ont fait l'objet que d'un nombre très limité d'études. Leur rôle dans l'écosystème ruminal n'est pas encore identifié, Cinq espèces seulement ont été décrites: les *Monocercomonas-ruminantium, les Monocercomonoides caprae, les Chilomastix caprae, les Tetratrichomonas buttreyi et les Pentatrichomonas homimis* (Thivend et coll., 1985).

III. Les mécanismes de production de méthane par les ruminants

1. Les mécanismes de la méthanogenèse ruminale

Les aliments ingérés par les ruminants séjournent pendant 20 à 70 heures dans le rumen où vit une population microbienne anaérobie qui s'attache au matériel végétal et sécrète des enzymes : les dépolymérases qui dégradent les polyosides des aliments ingérés tels que : la cellulose, l'hémicelluloses, l'amidon, et les pectines en oses simples (5 ou 6 atomes de carbones comme le xylose et le glucose) et les convertissent ensuite en pyruvate , puis en acides gras volatils : l'acétate , le butyrate , le propionate, le lactate, et donnent aussi de l'hydrogène et du CO_2 (Martin et *coll*, 2006).

-La stœchiométrie des principales voies fermentatives

- La stœchiométrie des principales voies fermentatives peut être résumée comme suit (Martin et coll., 2006):

- <u>Réactions productrices d'H_2</u>

Glucose → 2 pyruvates + **4 H^+**

(Voie d'Embden Meyerhof- Parnas)

Pyruvate + H_2O → acetate (C_2) + CO_2 +**2 H^+**

- <u>Réactions utilisatrices d'H_2</u>

Pyruvate + **4H** → propionate (C_3) + $2H_2O$.

$2(C_2)$ + **4H** → butyrate (C_4) + $2H_2O$.

CO_2 + **8H** → méthane (CH_4) + $2H_2O$.

Ces réactions montrent que la formation d'acétate s'accompagne toujours d'une production d'hydrogène et par conséquent du méthane grâce à la présence des Archaea-méthanogènes hydrogénotrophes qui réduisent l'H_2 formé en méthane. L'accepteur final d'électrons dans ce cas est le CO_2 alors que le donneur c'est l'H_2 (Martin et coll., 2006). Par contre, la production du propionate est reliée à la production de CO_2 qui rentre dans la formation de cet acide. Donc il existerait une relation inverse entre la production de propionate et celle de CH_4 (Martin et coll., 2006). L'hydrogène qui résulte peut également être recyclé par une voie non productrice de CH_4, mais productrice d'acétate (l'acétogénèse) (Sauvent., 2011).

En plus des acides gras volatils comme produits de fermentation, il y a en parallèle la synthèse de l'ATP si les phosphorylases interviennent dans l'hydrolyse des disaccharides. L'aboutissement des réactions oxydatives en conditions anoxiques se traduisent généralement par le transfert de l'H_2 et des substrats issus de réactions métabolique vers les cofacteurs tels le NAD^+ selon l'équation suivante (Milka., 2011).

$$NAD^+ + e^- + H^+ \leftrightarrow NADHH^+$$

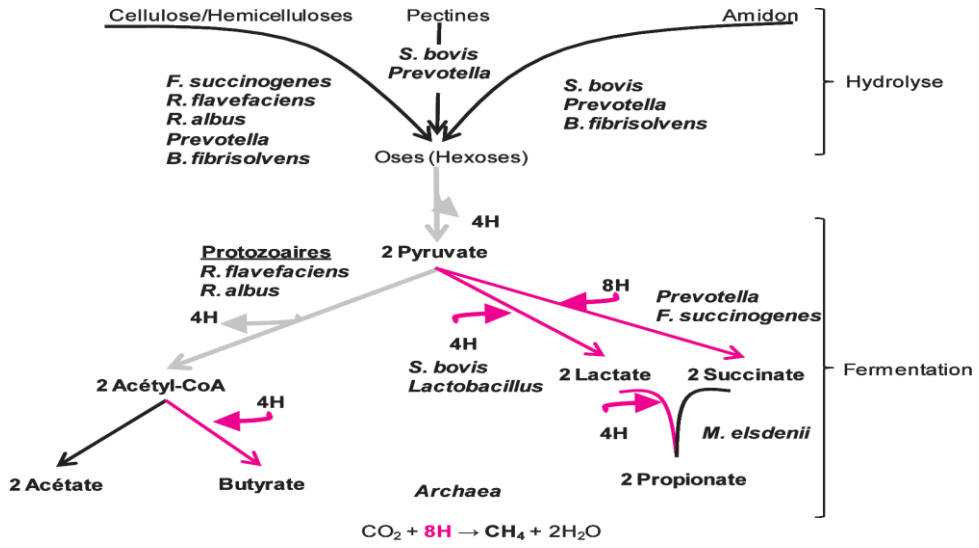

Figure 5: Les principales voies de fermentations ruminales des polymères glucidiques (Garcia., 1998).

La production journalière de méthane des ruminants est influencée par de nombreux facteurs liés à l'animal comme : L'espèce de ruminants (bovins ou ovins), l'âge de l'animal et l'alimentation qu'il reçoit au cours de la journée (la nature du fourrage et le pourcentage de concentré dans la ration sans oublier les apports d'additifs alimentaires tels que : les antibiotiques et les matières grasses (Vermorel., 1995).

IV. Modes d'expression et moyens de mesure et d'estimation du méthane produit par les ruminants

1. Les modes d'expression de la production de CH_4

Dans la littérature, la production du méthane est exprimée en CH_4 dans des unités très variables : en énergie (kcal ou MJ), en volume ou en masse. De plus, la base d'expression varie très largement, ainsi, le CH_4 produit peut-être exprimé par animal, ou par kg de poids vif pour pouvoir comparer bovins, ovins et caprins entre eux (Sauvant et coll., 2006), ou par unité de produit élaboré (kg de lait, carcasse, viande…).

Actuellement, le CH_4 produit est de plus en plus exprimé par unité d'intrant. Dans ce cas, plusieurs unités existent dans la littérature : Energie brute, kg de matière sèche ingérée (MSI), kg de matière organique digestible (MOD) ou ingérée, beaucoup plus rarement en raison des difficultés de mesure.

Cette diversité d'unités et surtout de modes d'expression de la production de CH_4 peut soulever la question de l'interprétation des résultats publiés. En effet, selon l'expression, des conclusions peuvent être contradictoires ou prêter à une interprétation erronée, voire risquée. Par exemple, les ruminants dont le potentiel de production est faible à moyen et recevant une ration pauvre produisent bien moins de CH_4 par animal que les ruminants à potentiel de production élevé et alimentés avec des rations riches. En revanche, ils produisent plus de CH_4, exprimé par unité de produit ou bien de quantités ingérées. Dans un tel contexte, il convient d'être très prudent au niveau des conclusions à tirer sur la production de CH4, par exemple entre les pays tempérés et tropicaux.

2. Moyens de mesure et d'estimation du méthane produit par les ruminants

Afin de mesurer le méthane entérique émis par les ruminants, plusieurs études ont été menées pour trouver des moyens de mesures exactes et fiables, Ces moyens de mesures peuvent être directs ou indirects, individuels ou collectifs. Les principales techniques de mesures seront discutées, ainsi que certains de leurs avantages et leurs inconvénients.

2.1 Techniques individuelles

2.1.1 Technique de chambres respiratoires

La chambre respiratoire ou la chambre calorimétriques permet une mesure directe de la production du méthane (Blaxter., 1967). En effet, ces chambres respiratoires donnent les mesures les plus précises et les plus fiables de production de méthane, et sont considérées comme la norme d'or pour les mesures du méthane. Il existe deux types de chambres

calorimétriques qui sont utilisées : une calorimétrie à circuit fermé et une calorimétrie à circuit ouvert.

La Calorimétrie à circuit fermé permet d'avoir les mesures les plus précises de méthane émis sur une période expérimentale d'environ 3 jours. Elle a été couramment utilisée dans les premières expériences métaboliques (Blaxter et Wainman., 1961). Blaxter et Clapperton (1965) ont utilisé les données de nombreuses expériences de calorimétrie en circuit fermé pour développer leurs équations de prédiction de la production de méthane.

Dans ce système, un animal est placé dans une chambre étanche, avec de l'air circulant dans le système (Blaxter., 1967). L'air de la climatisation est utilisé pour maintenir la température et l'humidité constantes à l'intérieur de la chambre.L'air au sein de la chambre passe à travers des absorbants pour capter le CO_2 et l'eau (H_2O), tandis que l'oxygène (O_2) est libéré dans la chambre. Le méthane est accumulé à l'intérieur de la chambre au cours de la période de mesure.

Des échantillons de gaz sont pris pour l'analyse du CH_4 au début et à la fin de chaque période expérimentale. Le volume de la chambre, le volume de l'animal, la température et l'humidité de l'air sont tous mesurés. La production du méthane est calculée à partir de la différence entre les concentrations mesurées à partir des échantillons pré- et post-expérimentaux.

La calorimétrie à circuit ouvert consiste à faire passer l'air extérieur par une chambre d'un animal, le débit d'air et les concentrations de O_2, CO_2 et de CH_4 sont mesurés au niveau de l'air entrant et sortant de la chambre (Blaxter., 1967 ; Blümmel et coll., 2005). L'utilisation de l'air qui traverse la chambre et la différence de concentrations du méthane entrant et sortant de la chambre, ainsi la quantité du méthane peut être calculée.

Le grand avantage des chambres respiratoires est de fournir des mesures exactes et fiables mais aussi avec cette technique on peut mesurer la consommation alimentaire et avoir des valeurs précises sur les émissions de méthane par kg de matière sèche ingérée. Cependant, la non-applicabilité sur les systèmes de pâturage et le cout élevé restent les inconvénients majeurs des systèmes des enceintes (Kempton et coll., 1976).

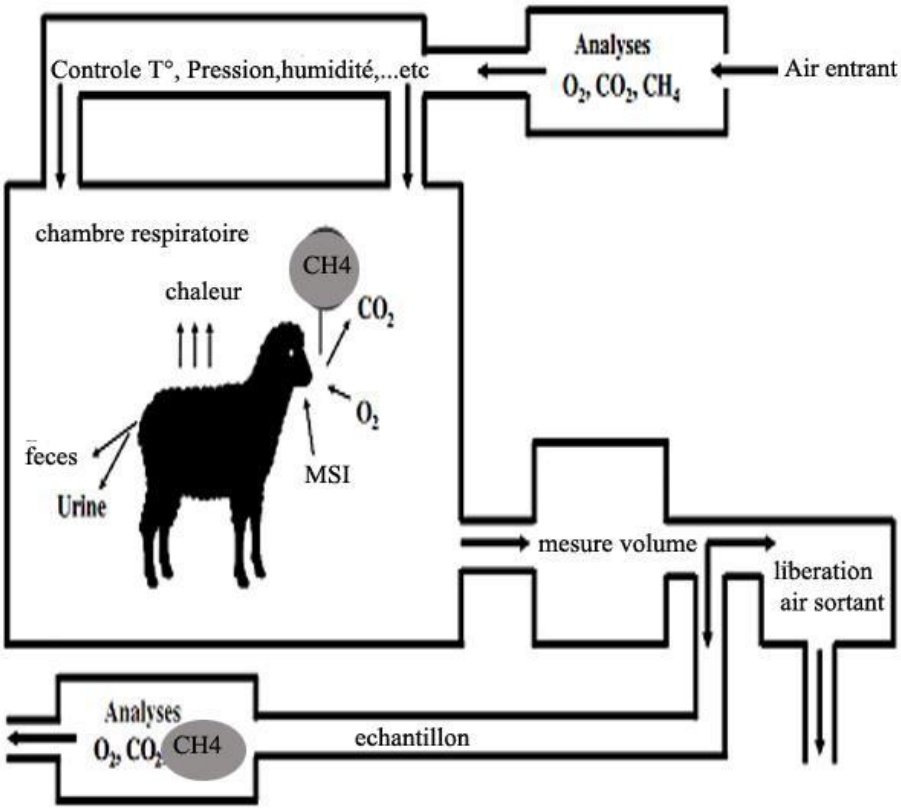

Figure 6 : Schématisation du système de chambre respiratoire à circuit ouvert (Blaxter et Clapperton, 1965).

2.1.2 Système de la Cage à tête

Le système de la cage à tête fonctionne de la même manière que celui d'une calorimétrie à circuit ouvert, à l'exception que seule la tête de l'animal est enfermé (figure 7). Le capot contournant la tête de l'animal doit être étanche, et un type de joint souple comme un rideau de nylon doit être utilisé autour du cou de l'animal (Takahashi et coll., 1999). Un autre modèle a été utilisé par Boadi et coll (2002) permet à l'animal de se tenir debout ou de se coucher, en ayant accès à la nourriture et à l'eau (figure 7).



Figure 7: Tête d'un bovin à l'intérieur de la cage à tête **(Harinder et Makkar., 1995).**

2.1.3 Système de masque respiratoire

Ce système consiste à poser un masque sur la tête de l'animal pendant une durée limitée, mais d'une manière répétitive dans le même jour, généralement trois mesures d'une heure par jour (Kempton etcoll., 1976).

Les analyses sont effectuées de la même manière que pour les mesures de calorimétrie à circuit ouvert. Cette courte durée peut donner des résultats variables, en raison de la variation intra-jour de la production de méthane (Johnson et Johnson., 1995).

2.1.4 Les techniques de marquage

Des techniques de mesure adaptées, ont été développées comme les techniques de marquage, Afin d'évaluer les émissions du méthane chez les animaux dans leur environnement naturel, et dans les conditions de pâturage, (Neftel et coll., 2005).

Le principe des techniques de marquage est que les émissions de méthane peuvent être mesurées si le taux d'émission d'un marqueur (stable, non toxique et physiologiquement inerte) gaz du rumen est connu (Hegarty., 2013). Ces méthodes nécessitent l'utilisation d'un plus grand nombre d'animaux par expérience, ce qui peut être à la fois un avantage et un inconvénient. Les quantités alimentaires ingérées ne peuvent être estimées que si les animaux sont logés individuellement, ce qui signifie une plus grande inexactitude dans les estimations du rendement en méthane par rapport aux différents apports de matière sèche. La plupart des

mesures de marquage ne prennent pas en considération le méthane libéré par le gros intestin (Neftel et coll., 2005).

- **Isotopes**

Les techniques utilisant les isotopes pour mesurer la production de méthane nécessitent l'utilisation du C_{14} du H_3 et du CH_4 marqué (Murray et coll., 1976). Le méthane marqué peut être perfusé par une canule en continu dans le rumen à un taux connu, les animaux doivent être attachés. Les échantillons peuvent être prélevés directement du rumen, ou à partir des échantillons des gaz éructés et expirés et / ou des gaz collectés en utilisant la calorimétrie ou des masques.

- **Mesure de méthane avec la technique du marqueur SF6 (l'hexafluorure de soufre)**

Cette méthode est relativement nouvelle, elle a été décrite pour la première fois en 1993-1994 (Johnson et coll., 1994; Zimmerman., 1993). L'objectif principal de la méthode était d'enquêter sur l'efficacité énergétique au pâturage (Zimmerman., 1993). Johnson et coll (1994) ; Okally et coll (1992) et Laubachet et coll (2008) ont recommandé l'utilisation de la méthode SF6 chez le bétail au pâturage impliquant de grands troupeaux. La méthode SF6 est largement utilisée en Nouvelle-zélande (Lassey et coll., 2011) au Canada (Mcginn et *coll*., 2009 ; Mccaughey et coll., 1997), en Australie (Goopy et coll., 2004), et aux Etats-Unis (Johnson et coll., 1994 ; Tekippe et coll., 2011), et dans les pays de l'Europe du nord comme la Suède (Patel et coll., 2011).

La technique de SF6 repose sur une libération constante de SF6 à partir d'un bolus administré dans le rumen d'un animal avant la période expérimentale (Martin et coll., 2008). Les échantillons de gaz sont recueillis à partir du nez et de la bouche de l'animal par l'intermédiaire d'un harnais (polyvinyl chloride) (Figure 8). Ces échantillons sont ensuite analysés en utilisant un chromatographe en phase gazeuse (Lassey et coll., 1997). La vitesse de libération de SF6 du bolus et le rapport de SF6 à CH_4 dans l'échantillon sont utilisés pour calculer les émissions du méthane provenant de chaque animal. (Storm et coll., 2012).

Production de CH_4 en g / jour= vitesse de libération en g / jour × [CH4 (µ g / m^3) / SF6 (µg / m^3)])

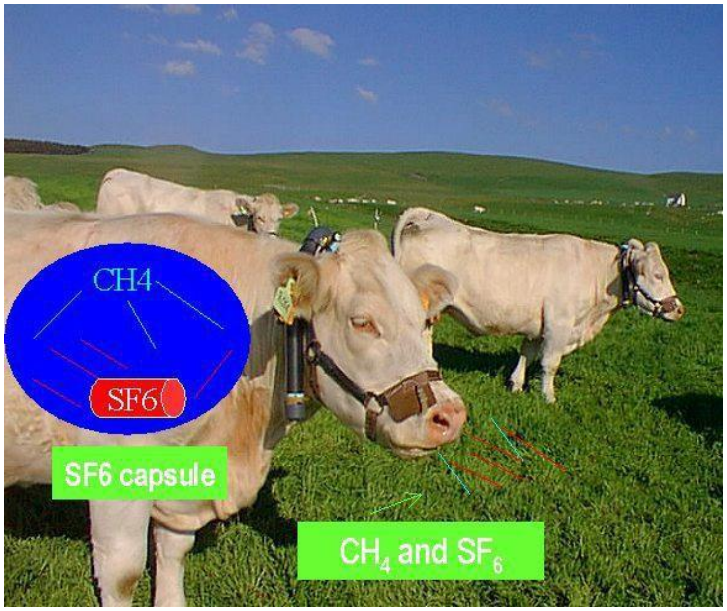

Figure 8: Dispositif visant à mesurer les émissions de CH_4 par les animaux avec la technique du marqueur SF_6, mis en place sur le site INRA de Laqueuille (France).

- **Autres marqueurs utilisés**

La méthode de marquage par l'éthane (C_2H_6) repose sur les mêmes principes que la technique de SF6 .L'éthane est injecté ou perfusé directement dans le rumen sur une période de temps (1 heure) et des échantillons sont extraits directement du rumen pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (Moate et coll., 1997). Les mesures effectuées de cette manière donnent des valeurs instantanées de production de méthane, mais ne tiennent pas compte des gaz dissous dans le liquide du rumen ou piégés dans les bulles de gaz.

2.2 Techniques de groupe

2.2.1 Techniques micro-météorologiques

Ces techniques sont moins intrusives que les techniques des marqueurs ou des enceintes. Les techniques micro-météorologiques n'exigent pas d'entrer en contact avec des animaux.

Mais, l'indisponibilité de mesures du méthane pour chaque animal reste leur inconvénient majeur. Les techniques micro-météorologiques sont fortement dépendantes de la météo, de la force et de la direction du vent, ce qui limite l'utilité de ces techniques. Le manque de la précision signifie que ces techniques ne sont pas adaptées pour détecter les petites différences entre les groupes d'animaux ou les traitements (O'Hara et coll., 2003).

2.2.2 Poly tunnels

Les mesures de la production du méthane se fait par aspiration de l'air à travers le poly tunnel et les concentrations de méthane sont mesurées dans l'air entrant et sortant du poly tunnel. Le poly tunnel est maintenu à une pression légèrement négative (figure 9). Le débit

d'air, l'humidité et la température sont mesurés à l'intérieur du poly tunnel, avec un flux d'air contrôlé à des taux allant jusqu'à 0,9 m^3/s(Lockyer et Jarvis., 1995; Lockyer., 1997).

Des échantillons de l'air entrant et sortant du tunnel sont collectés automatiquement toutes les deux minutes et analysés en utilisant un détecteur à ionisation de flamme. La production de méthane peut être estimée à l'aide de l'air qui traverse le tunnel (Lockyer et Jarvis, 1995).



Figure 9: Mise en place d'un système de tunnel dans une bergerie

(Harinder et Makkar, 1995)

2.2.3. Techniques *in vitro*

Le principe de base des systèmes *in vitro* est de permettre la fermentation des aliments tout en maintenant un environnement similaire à la panse (Storm., 2012). Les aliments sont incubés à 39 ° C avec du liquide ruminal, des tampons et des minéraux. Ensuite la production totale de gaz, et la production du méthane sont mesurées.

Les techniques *in vitro* sont utiles pour fournir des informations préliminaires sur la fermentation et couramment utilisées pour évaluer les effets des additifs alimentaires sur la production de CH_4 et peuvent être utilisées aussi pour comparer les aliments.

Parmi ces techniques on note :

- **Système de Menke et Steingass, pour la mesure des gaz de fermentation :** Développée par Menke et coll en (1979). Ce systéme permet de mesurer la composition des gaz de fermentation tels que le méthane, l'hydrogène, et le dioxyde de carbone.

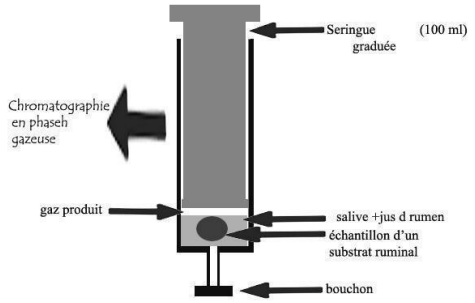

Figure 10: Schéma représentant le système de collecte et de mesure des gaz de fermentation (Menke et Steingass., 1979).

- **Technique de simulation du rumen (RUSITEC) :** Développée par Czerkawski (1977), cette technique permet de maintenir un milieu microbien ruminal dans des conditions strictement contrôlées, sur une période de temps prolongée.

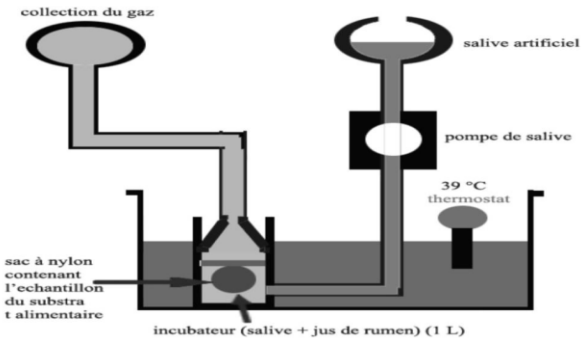

Figure 11: Illustration schématique du système RUSITEC décrit par Czerkawski (1977).

2.3 Méthode de mesure indirecte des émissions de méthane par les acides gras du lait

Il y a un lien étroit entre la composition du lait en acides gras et les émissions de méthane car ces deux synthèses sont biochimiquement liées. En effet, plus du tiers des acides gras du lait sont issus d'une synthèse, qui se déroule dans la mamelle à partir des acides gras volatils produits lors de la fermentation des glucides alimentaires par les microbes du rumen. Parmi ces acides gras volatils, l'acide acétique (C_2) et l'acide butyrique (C_4), sont à l'origine des acides gras courts et moyens (AG à moins de 16 atomes de carbone) (Chilliard et coll., 2000) (Chilliard et coll., 2001 ;Couvreur et Hurtaud., 2007). Ces mêmes acides gras volatils sont également liés à la production du méthane dans le rumen (Moss et coll., 2000; Martin et coll., 2006). De ce fait, par la quantité des acides gras courts et moyens du lait, la production de méthane est indirectement connue. Une méthode a été mise au point pour déterminer indirectement les émissions du méthane par un ruminant laitier par lecture des profils en

acides gras des lipides du lait et la production laitière de cet animal suivant l'équation de prédiction suivante :

CH_4 produit = (AG≤C16 / AG totaux) *(a*Production de laitb)

- Avec « AG≤C16/AG totaux » exprimé en pourcentage (%) et représentant le rapport entre la somme des acides gras avec 16 atomes de carbone et moins est la quantité totale en acides gras ;
- Avec « Production de lait » exprimée en kg par vache et par an et représentant la quantité totale de lait produite par animal et par année ;
- Avec « CH_4 produit » exprimé en g par litre de lait et représentant la quantité de CH_4 produite ;
- Avec « a » et « b » comme paramètres numériques, a compris entre 10 et 13 et b compris entre -0,40 et -0,45.

Les travaux menés en 2009 par l'équipe de l'INRA de Theix –Clermont en collaboration avec l'équipe deValorex (Weill et Chesneau.,2008) ont mis en évidence que, dans l'état actuel des connaissances et dans le cadre de la méthodologie exposée ci-dessus, a et b valent respectivement 11,368 et -0,4274. Ces paramètres sont évolutifs et pourront ainsi être modifiés en fonction des connaissances scientifiques et des sources végétales employées. Cette relation a été validée par des données bibliographiques et par des résultats expérimentaux (Weill et coll., 2008 ; Chilliard et coll., 2009 ;Martin et coll., 2009).

V.L'impact de la production du méthane digestif sur l'environnement

Le réchauffement climatique est un problème d'actualité qui menace la vie sur notre planète. Ce réchauffement est le résultat de l'accumulation des gaz à effet de serre dans l'atmosphère. Ces gaz absorbent les rayonnements infrarouges (IR) issus de l'émission de rayons de grandes longueurs d'onde par la surface terrestre. Une partie de ces rayonnements se transforme en chaleur dans l'atmosphère et dans la troposphère (ozone O3). Les plus dangereux gaz à effet de serre sont : le CO_2 et le CH_4 (Vermorel., 1995).

Dans le cadre des négociations en relation avec le protocole de Kyoto qui a pour but de protéger l'environnement et de favoriser la réduction de 8% des émissions de gaz à effet de serre (GES) pour la période d'engagement entre 2008 et 2012 par rapport à 1990 *(*Martin et coll.,2006*)*, la mesure du protocole a porté sur les principaux gaz à effet de serre impliqués dans le changement climatique: Le dioxyde de carbone (CO_2), le méthane (CH_4), le protoxyde d'azote (N_2O) et les trois carbures halogénés (CFC, HFC, PFC).Ces gaz sont classés selon leurs toxicités (Martin et coll., 2006).

En ce qui concerne le méthane, son pouvoir de réchauffement est 20 fois plus élevé par unité de poids que celui du CO_2 bien que sa concentration dans l'atmosphère soit 200 fois plus faible que celle du CO_2 (Vermorel., 1995 ; Martin etcoll., 2006). En outre, la comparaison entre la quantité du méthane rejetée dans l'atmosphère par les ruminants avec celle de CO_2 rejetée comme résultat de la fermentation des glucides d'origine végétale (20%), montre que cette quantité est en moyenne 11 fois plus importante en volume et 30 fois en poids. Malgré cela, la contribution des ruminants à l'effet de serre *via* leur production de CO_2 est considérée comme négligeable car ce gaz est peut être recyclé lors de la photosynthèse par les végétaux (Martin et coll., 2006).

Le méthane est classé comme deuxième gaz à effet de serre après le CO_2 en raison de son pouvoir radiatif élevé dû à une longue durée de vie (Vermorel., 1995). En effet, sa contribution à l'effet de serre total a été estimée à 18 % contre 49 % pour le CO_2, 6 % pour le N_2O et 14 % pour les CFC (Vermorel., 1995). Cet effet nocif pour la planète est dû aux différents mécanismes de production de méthane en milieu anaérobie. L'agriculture seule contribue au dégagement d'environ 50% de l'ensemble des émissions de CH_4, alors que les trois quarts étant couverts par les activités liées à la riziculture et à l'élevage (Moss et coll., 2000).

En ce qui concerne l'élevage, sa contribution aux émissions de gaz à effet de serre est comprise entre 9% et 18% (Martin et coll., 2006 ; Milka., 2011) , le CH_4 émis provoque plus de 60% du pouvoir de réchauffement global des émissions de gaz à effet de serre liées à l'élevage contre 25% pour NO_2 issu des effluents d'élevage , sans oublier le CO_2 (15%) issu de la consommation de fuel pour le fonctionnement de la ferme . Au final, la contribution de l'élevage au réchauffement climatique n'est pas négligeable (Martin et coll., 2006 ; Milka., 2011).

VI. Moyens de réduire la méthanogénèse au niveau ruminal

Toute orientation fermentaire qui diminuera la production de CH_4 entérique ou bien augmentera l'utilisation de l'hydrogène métabolique sera utile pour réduire la méthanogenèse. Ces orientations sont les résultats d'intervention de différents effets (Martin et coll., 2006) :

1. Effet de l'alimentation (Composition de la ration)

Les stratégies de réduction du méthane entérique repose essentiellement sur la compréhension des différents processus aboutissant à la production de CH_4 dans la panse. Parmi ces stratégies, on trouve principalement l'alimentation. En effet, l'accroissement de la proportion d'aliment concentré dans la ration entraîne une diminution de la production de méthane par kg de matière sèche ingérée. Des études anciennes ont montré que si la ration des ruminants est

riche en céréales, les émissions de méthane diminuent plus par kg de glucides digestibles que les concentrés riches en parois (Moe et coll., 1973). Ces études ont montré aussi que le remplacement de pulpe de betterave par de l'orge pour une ration riche en concentré destiné à la consommation des ruminants réduisait de 34% les émissions de méthane par kg de matière sèche. Dans ce cas, l'orientation de fermentation est la cause de cette diminution, l'orge oriente la fermentation vers la production du propionate qui est généralement une réaction consommatrice de l'hydrogène, alors que les pulpes orientent le processus métabolique vers la production de l'acétate qui génère en parallèle le précurseur H_2 de méthane entérique (Doreau et coll., 2011).

En effet, la production de méthane par kilogramme de lait est plus élevée pour une ration à base d'ensilage d'herbe que pour une ration à base d'ensilage de maïs. Aussi, la production de CH_4 est plus élevée pour des vaches recevant une ration à base de foin que pour d'autres vaches recevant une ration à base d'ensilage de maïs (Doreau et coll., 2011).

En outre, l'enrichissement de la ration par des lipides est une voie nutritionnelle prometteuse de l'environnement contre les émissions de méthane car les lipides ne fournissent pas les substrats précurseurs de la production de méthane dans le rumen (Doreau et coll., 2011 ; Clinquart et coll., 1995).

2. Extraits de plantes

Certaines plantes ou extraits de plantes ont montrés une efficacité remarquable dans la réduction de CH_4 entérique par leurs propriétés bactéricides (Doreau et coll., 2011).

2.1 Les saponines

Les saponines sont généralement des glycosides présentes dans de nombreuses plantes telles que le *Yucca schidigeria* et *Quillaja saponaria*. Leur rôle est la diminution de la dégradation des protéines dans le milieu ruminal. Ils favorisent aussi la synthèse des protéines microbiennes, Ce qui limite la quantité d'hydrogène disponible pour la production du méthane par les populations méthanogènes du rumen (Doreau et coll. 2011).

2.2 Les huiles essentielles

Dans le cadre des évolutions que connait actuellement la législation de l'utilisation à long terme des additifs chimiques et des antibiotiques qui ont été exclus en raison des conséquences sur le pH ruminal et sur le coût du traitement, plusieurs études ont été réalisées sur la capacité des huiles essentielles des plantes aromatiques à diminuer la production de méthane entérique *in vitro*. La majorité des travaux suggèrent que leur effet est lié essentiellement à leur structure chimique et à la concentration utilisée (Hamza et coll., 2014).

Plusieurs études ont rapporté une réduction du méthane rejeté comme résultat de la fermentation dans le rumen par des composés purs d'huiles essentielles seuls ou en mélange avec d'autres composés purs (le cinamaldehyde, le carvacrol, le thymol, et l'eugénol) ainsi que pour les huiles essentielles plus complexes (l'huile de thym, de cannelle, d'origan et de la noix de cajou (Macheboeuf., 2008).

Evans et Martin (2000) ont observé que le thymol, est un inhibiteur puissant du méthane *in vitro*. Ils ont pensé que cela est probablement dû à sa forte activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram-positif et à Gram négatif et qui détruit les bactéries productrices de méthane

2.3 Les plantes riches en tannins

Les tannins sont consommés dans certains fourrages distribués aux animaux sous forme d'extraits ajoutés à la ration (Doreau et coll., 2011). Il existe deux familles de tannins. Les tannins hydrolysables et les tannins condensés. Leur effet sur la production de méthane a été très bien étudié (Doreau et coll., 2011). Plusieurs études ont été réalisées afin de confirmer l'effet de tannins de nombreuses plantes sur l'émission du méthane surtout les légumineuses d'origine tropicale et en particulier les légumineuses arbustives comme *Leucaena leucocephala* (Doreau et coll., 2011).

Grainger *et coll (*2009) ont montré que l'extrait de tannins d'écorce *d'acacia noir* (*Acacia. mearnsii*) réduisait la production de méthane par des vaches laitières au pâturage à un taux d'incorporation de 2% de la matière sèche ingérée (Grainger et coll., 2009).

3. Les manipulations biotechnologiques de l'écosystème microbien ruminal

Ces manipulations biotechnologiques agissent de manière spécifique sur la population microbienne du rumen à l'aide d'additifs (Jouany., 1994) :

3.1 Au niveau de l'animal

3.1.1 La défaunation

Le but principal de la défaunation est l'élimination des agents responsables de la production d'H_2 comme les protozoaires, car ces derniers utilisent deux voies fermentaires qui produisent assez d'H_2 au cours de la production des acides gras volatils comme le butyrate et l'acétate (Popova et coll., 2011). Il n'est donc pas étonnant que les *Archaea* méthanogènes aient été retrouvés à l'intérieur des cellules (endosymbiose) ou encore attachés à la surface des protozoaires (ectosymbiose) dans le rumen (Popova et coll., 2011). Les *Archaea* méthanogènes associés aux protozoaires seraient responsables de 9 à 25% du méthane produit dans le rumen (Newbold et coll., 1995). Donc la suppression de la fraction d'*Archea* - méthanogènes fixée à la surface et dans les cellules des protozoaires ciliés est une technique adoptée pour réduire les émissions du méthane entérique. Cette défaunation peut être obtenue

soit en isolant le ruminant dès la naissance, soit en lavant le rumen via la canule avec des produits chimiques qui ont un pouvoir tensioactif très puissant ou juste à l'eau, bien que ces pratiques ne peuvent pas être appliqués dans les élevages. La défaunation améliore généralement la digestion de l'azote mais diminue celle des tissus végétaux (Argyle et coll., 1988).

30 à 45% des émissions du méthane sont observée après défaunation du rumen (Vermorel et coll., 1989).Cependant, Ranilla et collaborateurs (2004) ont montré dans une étude *in vivo* que l'effet de la défaunation sur la production de méthane disparait après une longue période d'environ 12 mois.

3.2 Au niveau des additifs

Il existent plusieurs additifs qui agissent d'une manière directe sur l'écosystème ruminal, on peut citer :les antibiotiques, les additifs chimiques, les bactéricides et les probiotiques .

3.2.1 Les antibiotiques

Les antibiotiques ionophores sont les plus couramment utilisés pour réduire du méthane. Ils agissent spécifiquement sur les bactéries à Gram + qui peuplent la panse. On trouve principalement : le monensin et le lasalocide. Ces deux traitements se caractérisent par des propriétés spécifiques : stimulation du transport actif des cations et réduction de la production d'ATP qui se traduit par une toxicité remarquable vis-à-vis de ces bactéries, puis par l'orientation des fermentations ruminales vers l'acide propionique (Jouany., 1994). Les antibiotiques sont fréquemment utilisés dans les processus de réduction des émissions de méthane car ils entrainent une diminution à court terme de 0 à 30% de méthane. Mais ces traitements sont généralement interdits dans l'Union Européenne depuis 2006 car ils représentent une grande toxicité à long terme (Jouany., 1994 ; Beauchemin., 2008).

3.2.2 Les additifs chimiques

Les diacides organiques (l'aspartate, le malate et le fumarate) sont les plus utilisés pour diminuer la méthanogenèse. Lorsqu'ils sont ajoutés à la ration des ruminants, ce sont les principaux précurseurs de synthèse des acides volatils (le succinate, et le propionate) qui possèdent une forte efficacité pour fixer de l'hydrogène disponible dans le rumen (60%) (Callaway., 1996 ; Martin et coll., 2006). En effet, une incorporation de 2 kg d'acide organique dans la ration d'une vache laitière qui rejette 500 litres de méthane par jour favorise une réduction à l'ordre de 10% de la production de méthane chez cette vache. Les résultats obtenus sont très encourageants mais cette technique est inapplicable en raison des conséquences sur le pH ruminal et sur le coût du traitement (Martin., 2006 ; Newbold., 2006).

3.2.3 Addition de probiotiques

Les probiotiques sont définis comme étant des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additifs alimentaires qui contribuent au maintien de l'équilibre de la microflore intestinale de l'hôte. L'incorporation des probiotiques dans l'alimentation des ruminants aboutira à prévenir les animaux de la maladie de l'acidose et à limiter ainsi l'infection par les germes potentiellement pathogènes tels que : *Escherischia coli* et *Salmonella* spp (Doreau et coll., 2011).

Plusieurs études ont portés sur les probiotiques parmi lesquelles on trouve principalement celles ou l'on introduit les levures, et surtout la souche de *Saccharomyces cerevisiae* qui est largement utilisée pour réduire la production du méthane entérique, car elle stimule la croissance des bactéries acétogènes qui réduisent 2 moles de CO_2 dégagées par 4 moles d' H_2 présent dans le milieu ruminal (Doreau et coll., 2011).

En outre, l'incorporation d'une levure active déshydratée dans la ration des jeunes taureaux se traduit par une augmentation significative du gain moyen quotidien de poids estimé à 6% et d'un accroissement de 1,1 litre de lait par jour chez la vache laitière (Renz., 1954).

3.2.4Les bactériocines

Les bactériocines sont des agents antimicrobiens naturels produits par des bactéries du rumen qui sont utilisées pour modifier la fermentation au niveau de rumen. Ainsi, elles peuvent également être utiles pour prévenir les troubles métaboliques chez les ruminants comme par exemple la maladie de l'acidose lactique. Callaway et coll *(1997)* ont rapporté dans une étude *in vitro* que les deux bactériocines (la nicine et la bovicine) produites par les 2 souches suivantes : *Lactococcus lactis* et *Streptococcus bovis* sont plus actives et plus puissantes sur les bactéries à Gram + de rumen, que le monensin même à faible pH. La diminution de méthane qu'elles induisent est à l'ordre de 20% et de 53 % respectivement. Leur effet est résumé dans l'orientation de la fermentation ruminale vers la production de propionate. Cependant, plusieurs études doivent être réalisées pour s'assurer de leurs effets avant de les considérer comme additifs pour les ruminants (Callaway et coll., 1997 ; Yasuo., 2010).

VII. Effet de l'utilisation des extraits de plantes aromatiques et des HE sur les paramètres zootechniques du ruminant

1. Elevage laitier

Une hausse de la production de lait représente un risque pour la santé de la vache laitière et impose donc des exigences plus strictes en termes de stabulation, d'alimentation et de soins des animaux. C'est principalement une bonne conduite d'élevage durant le dernier tiers de la lactation et pendant le tarissement qui garantit un bon métabolisme et une bonne réponse

immunitaire de la vache à l'approche de sa prochaine lactation. À cette période critique, une alimentation inadéquate, un manque de confort et le stress peuvent être à l'origine de troubles métaboliques ultérieurs. Ceci peut augmenter les risques des troubles digestifs dans le rumen et donc la chute de la production et du taux butyreux du lait chez la vache laitière. Une telle situation a favorisé le recours à l'incorporation des additifs autorisés en alimentation animale pour augmenter les performances zootechniques des élevages laitiers intensifs tels que les huiles essentielles qui sont utilisées pour réduire et éviter les troubles digestifs engendrés par l'adoption des rations sèches (Martin et coll., 2006).

Des travaux ont été menés dans les conditions marocaines d'élevage pour évaluer l'effet de l'incorporation de deux produits commerciaux sur les performances de production chez des vaches laitières de race Holstein, conduites en stabulation libre et recevant une ration sèche . Ces deux additifs sont : Optitek MPI de la société Centralys, à base d'extraits végétaux et de substances aromatiques et Protek, produit par Provimi et contenant des extraits végétaux et des minéraux. L'incorporation du produit Optitek MPI dans la ration des vaches laitières recevant une ration sèche pourrait présenter un intérêt pour l'augmentation de la production laitière. Le produit ProTek lui n'a montré aucun effet sur les paramètres de la production laitière. L'effet d'extraits végétaux pourrait être dû à l'effet dose-type, l'adaptation du microbiote ruminal aux extraits végétaux, la palatabilité du produit et le régime alimentaire adopté.

2. Atelier d'engraissement

Les veaux issus du troupeau laitier sont souvent sujets à un ensemble de problèmes sérieux de bien-être animal. Ceux-ci incluent des problèmes de santé, un manque d'espace, un moindre confort, un isolement social, des comportements anormaux. Les maladies des veaux telles que la diarrhée et les problèmes respiratoires, causées par des mauvaises conditions dans les étables ou par une mauvaise alimentation, ont des conséquences non négligeables qui entraînent une diminution de la croissance et des frais vétérinaires élevés.

D'où la nécessité de booster l'immunité, d'améliorer les performances zootechniques des jeunes veaux, notamment pour une bonne production de viande.

Gautier et coll., (2006) ont fait l'observation surprenante d'un effet positif de synergie entre un dérivé aromatique phénolique, l'eugénol, en combinaison avec un dérivé aromatique aldéhydique ;le cinnamaldehyde. La combinaison des deux molécules dans un additif alimentaire a permis d'améliorer la digestibilité des aliments pour animaux ruminants, et ceci se répercute sur leurs performances zootechniques des ruminants.

3. Action sur les parasites

La gestion du parasitisme chez les ruminants s'appuie principalement sur l'utilisation de molécules anthelminthiques de synthèse. L'emploi massif de ces drogues chimiques ne s'est pas toujours fait dans les règles de l'art et la conséquence directe a été le développement de la résistance des parasites à ces molécules de synthèse (Chartier et coll., 2001 ; Kaplan., 2004 ; Waller., 2006). De nombreux cas de parasites résistants sont rapportés dans le monde et ont pris une importance considérable dans les pays tropicaux (Jabbar et coll., 2006). Cette résistance des nématodes aux antiparasitaires classiques inquiète et interpelle la communauté scientifique pour la recherche de nouvelles méthodes de contrôle du parasitisme. Actuellement, il est difficile de s'affranchir totalement de l'emploi des anthelminthiques classiques (Waller., 2006 ; Ketzis et coll., 2006),mais la production doit répondre aux attentes des consommateurs de plus en plus portés vers des produits issus d'élevages reposant sur un moindre usage d'intrants chimiques (Hammond et coll., 1997 ;Waller and Thamsborg., 2004). Dans ce contexte. Aussi, l'utilisation des plantes médicinales apparaît comme une alternative dans la lutte antiparasitaire. Les plantes peuvent être efficaces dans la lutte contre les parasites. Dès 1920, on a utilisé en médecine humaine de l'huile de *Chenopodium ambrosioides.* Aujourd'hui beaucoup de traitements contre les parasites externes des petits animaux sont à base de pyrethrinoïdes synthétiques (au départ issu de *Chrysanthemum cinerariaefolium*). De nombreuses recherches sur les plantes médicinales ayant un rôle antiparasitaire ont été effectuées avec d'excellents résultats. Par exemple, Hammond et coll. (1997) et Akhtar et coll. en (2000) ont obtenu les résultats intéressants en utilisant des anthelminthiques à base de plantes respectivement dans les régions tropicales et indo-pakistanaises.

Macedo en (2011) a démontré l'efficacité de l'huile essentielle de *Corymbia citriodora* contre les nématodes gastro-intestinaux et les trypanosomes. L'huile essentielle de *Corymbia citriodora* a eu un effet significatif sur l'inhibition de l'éclosion des œufs et sur l'inhibition du développement larvaire de *Haemonchus contortus*. L'action de l'huile essentielle de *Corymbia citriodora* a été similaire à celle du thiabendazole et de l'ivermectine.
L'utilisation des huiles essentielles comme traitement de parasitose doit être réalisée de façon répétée, et sans attendre que les cas s'aggravent (Laroche et Cluzet., 2014)

Première partie

Etude *in vitro* de l'activité antibactérienne du thymol, du carvacrol, de l'eugénol, et du cinnamaldéhyde sur la fermentation du jus de rumen

1. Introduction :

La production du méthane (CH_4) par les intestins des ruminants est le résultat de la dégradation anaérobie de la matière végétale par les microorganismes contenus dans leur tractus digestif. Ce gaz représente d'une part, une perte énergétique estimée à 12% de l'énergie contenu dans les aliments ingérés et d'autre part, C'est un gaz à effet de serre très puissant qui possède un pouvoir radiatif élevé. Si ces pertes étaient réduites, on pourrait s'attendre à une amélioration de la productivité de l'animal car cette part de l'énergie pourrait être utilisée pour la production du lait ou de la viande *(*Milka., 2011).

Par conséquent, la réduction du méthane fermentaire représente aujourd'hui un intérêt économique et environnemental car les ruminants participent à hauteur de 3% du réchauffement climatique (Martin et coll, 2006 *;* Milka., 2011).

Les stratégies étudiées actuellement pour réduire ce gaz (CH_4) se focalisent principalement sur la compréhension de l'écosystème microbien du rumen. Il s'agit d'éliminer un groupe microbien et dans ce sens, on inclut toujours l'utilisation des additifs chimiques comme les antibiotiques (Milka., 2011). L'utilisation de ces additifs représente une grande toxicité à long terme avec un coût élevé. La réorganisation métabolique est également une technique courante utilisée pour réduire les émissions d'origine entérique. Cette technique se base généralement sur la manipulation biotechnologique de l'écosystème microbien de la panse, une des quatre poches de l'estomac où s'accumule la nourriture (Milka., 2011).

Dans ce contexte, l'objectif de cette première partie du travail a consisté à faire :

- Un test *in vitro* de l'efficacité du thymol sur la fermentation et la cinétique de la production de gaz sur un échantillon de jus de rumen
- Comprarer *in vitro* l'efficacité du thymol à celles du carvacrol, de l'eugénol, et du cinnamaldéhyde à différentes concentrations sur des isolats gazogènes isolés du jus de rumen.

2. Matériel et méthodes :

2.1 Action du thymol sur la fermentation et la production du méthane du jus de rumen

2.1.1) Mode de prélèvement

Le contenu ruminal est prélevé par sondage œsophagien de vache laitière dans des bocaux stériles fermés et ensuite étiquetés. Ils sont transportés au laboratoire dans des sacs isothermes à une température d'environ 4°C. Au laboratoire, avant d'entamer les différentes analyses, le jus du rumen est filtré sur deux couches de bandes à gaze stériles pour éliminer les débris végétaux.

2.1.2) Préparation de la solution de thymol

Le thymol utilisé dans ce travail est obtenu par Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), sous forme de poudre cristallisée. Afin de déterminer l'activité antibactérienne du thymol, nous avons adopté la méthode de préparation mise au point dans notre laboratoire par Remmal et *coll.,* (1993a et b). Le thymol est mis en émulsion dans un bain-marie à 50°C puis, préparé à une concentration de 10% dans une solution de 0,2% d'agar.

2.1.3) Milieux de culture

Le milieu de culture utilisé pour la culture des bactéries anaérobies d'origine ruminale est le milieu Mueller Hinton (M.H) liquide et solide (Biokar, France)

2.1.4) Test *in Vitro* de l'activité du thymol sur la production de gaz et la fermentation bactérienne du jus de rumen

Un mililitre de la solution de thymol est ajouté à 9 ml d agar-agar 0,2% nous a permis d'avoir une émulsion mère au 1/10. A partir de cette émulsion, nous avons préparé les concentrations suivantes: 1/500 (2 mg/ml), 1/1000 (1 mg/ml), 1/2000 (0,5mg/ml), 1/4000(0,25mg/ml)

Des tubes à vis ont été utilisés contenant chacun 9 ml de milieu Mueller Hinton liquide (Stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes) + 1 ml du jus de rumen frais et un volume déterminé de la solution mère. Des tubes témoins contenant le milieu de culture seul sont préparés.

Ces tubes à vis ont été agités puis mis dans des petits tubes de 6 ml qui sont ensuite renversés dans tubes stériles fermés hermétiquement et placés dans des jarres en anaérobiose et incubés à 37 C. La production de gaz est vérifié à l' œil nu après 24h.

2.1.5) Test *in vitro* de l'activité du thymol sur la cinétique de la production de méthane

Nous avons utilisé le même protocole précédemment et mesuré la production de gaz et la densité optique à 600 nm, pour mesurer la turbidité de la solution testée qui est fonction de la charge bactérienne après 6h, 12h, 18h et 24h.

2.2 Isolement des bactéries gazogènes à partir de la flore microbienne du rumen

2.2.1) Mode de prélèvement

Les jus de rumen que nous avons utilisés ont été prélevés à partir de 5 vaches laitières du laboratoire de Métabolisme Energétique de l'Unité de Physiologie Animale et Thérapeutique de l'IAV HASSAN II. Les jus de rumen ont été ramenés au laboratoire dans des flacons stériles hermétiquement fermés. Une filtration de ces jus a été réalisée à l'aide d'un tamis fin stérile d'un diamètre de 0.2 mm, puis le filtrat de chaque échantillon a été conservé à 4 °C dans le glycérol stérile à 20%.

2.2.2) Dispersion des composés phénoliques testés

Nous avons adopté la méthode de dilution mise au point dans notre laboratoire par Remmal et *coll.,* (1993a et b). Les composés phénoliques testés ont été dispersés au 1/10ème dans une solution légèrement visqueuse d'agar stérile (0,2%). Le thymol à été fourni par Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), Le cinnamaldehyde et le Le carvacrol ont été fournis par **Flagresso** (Autriche) et l'eugénol par **Fluka** (suisse) .

2.2.3) Milieux de culture

Le milieu de culture utilisé pour la culture des bactéries anaérobies d'origine ruminale est le milieu Mueller Hinton (M.H) liquide et solide.

2.2.4) Test préliminaire de fermentation *in vitro*

Ce test a pour but de voir si le jus de rumen contient des souches gazogènes en condition anaérobie. A partir du filtrat du jus de rumen, nous avons préparé une dilution au 1/10 ^{éme} dans des tubes à vis dans le milieu Mueller Hinton stérile. Ensuite, les tubes à vis sont mis dans d'autres tubes de 6ml et déposés ensuite dans des tubes à essai stériles qui sont bouchés puis incubés dans des jarres sterile et placés en anaérobioses dans une étuve à 37 °C pendant 24 h. Chaque essai est répété 2 fois. Le témoin négatif qui ne contient que le milieu de culture est également préparé.

2.2.5) Culture des isolats gazogènes

Un volume d'un ml de filtrat qui montre un dégagement de gaz important est suspendu dans 9 ml de sérum physiologique stérile. L'isolement des bactéries anaérobies viables est effectué par la méthode de l'ensemencement en profondeur selon laquelle la suspension subit une série

de dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-8}. A partir de chaque dilution, un volume d'un ml est déposé en profondeur dans une boite de Pétri puis environ 20 ml de milieu nutritif gélosé Mueller Hinton stérile sont rajoutés (figure 12).

Après incubation des boites de Pétri à 37°C pendant 24h en anaérobiose, trois isolats différents ont été identifiés selon l'aspect, la couleur et la forme des colonies.

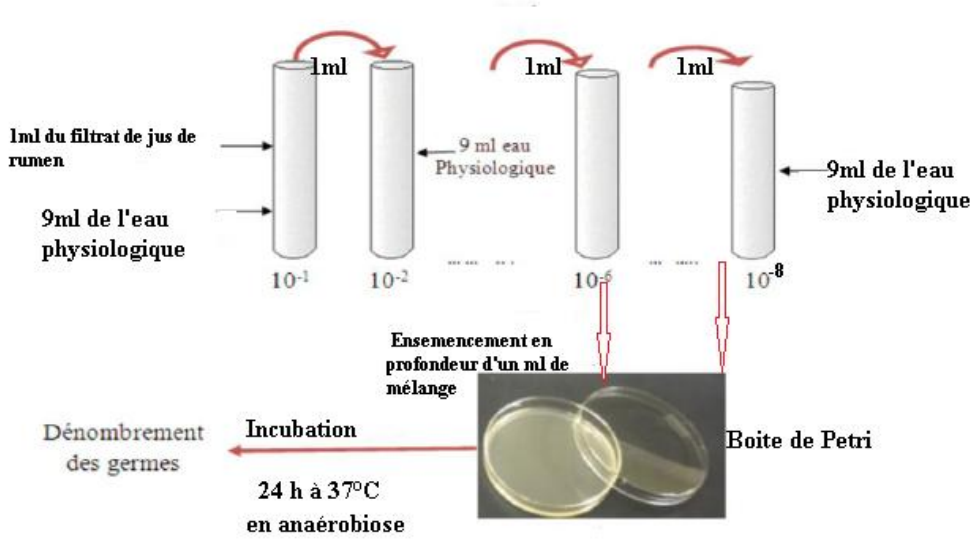

Figure 12: Dénombrement des bactéries gazogènes du rumen

2.2.6) Test de confirmation de la production du gaz par les trois isolats

La technique que nous avons utilisée pour mesurer la production de gaz est la même que celle décrite précédemment (page 41). A partir des cultures d'une nuit de chaque isolat, des colonies sont prélevées aseptiquement à l'aide d'une anse puis suspendues dans 9 ml de sérum physiologique stérile.

Un volume d'un ml de chaque inoculum (isolat 1,2 et 3) d'origine ruminal est suspendu dans 9 ml de milieu Mueller Hinton stérile, puis versé dans des tubes de 6 ml qui sont ensuite renversés sous forme de cloches dans des tubes à essai stériles. Un témoin, contenant le milieu de culture seul est également préparé. Après incubation des tubes en anaérobiose à l'étuve pendant 24h à 37°C. La fermentation est examinée et les résultats sont analysés à l'œil nu.

2.2.7) Identification morphologique des trois isolats du rumen

Nous avons utilisé le test de coloration de Gram pour identifier les trois souches isolées à partir du jus de rumen selon le protocole suivant :

Un frottis est préparé sur la lame de verre. Lorsque la lame est complètement séchée, Le cristal violet est mis sur le frottis pendant une minute puis la lame est rincée avec un jet d'eau faible. Après cela, une goutte de lugol est rajoutée pendant une minute, ensuite la lame est

rincée sous un faible jet d'eau. Ensuite la solution de décolorant (alcool 95%) est versée sur la lame de manière à recouvrir entièrement le frottis et immédiatement après 15 secondes, la lame est rincée de nouveau sous un faible jet d'eau. Finalement, la fuchsine basique est mise sur le frottis pendant une minute et la lame est encore rincée sous un faible jet d'eau. Les bactéries sont observées au microscope optique à l'aide de l'objectif ×1000 à huile' immersion.

2. 3 Evaluation de l'activité antibactérienne des composés majoritaires des HE sur la fermentation des bactéries isolées

Ce test a pour but de sélectionner les composés majoritaires (CM) des HE qui ont un effet antibactérien sur les isolats de rumen. L'expérience a été menée avec les CM(s) suivants : Le thymol, le carvacrol, l'eugénol, et le cinnamaldheyde. L'activité antimicrobienne des différents CM a été étudiée par la technique du tube renversé dans des flacons stériles contenant à la base 5ml d'agar stérile.

2.3.1) Préparation des différentes concentrations des composés majoritaires

Afin de déterminer l'action antibactérienne des CM d'huiles essentielles, nous avons utilisé la méthode de dilution des huiles par dispersion dans l'agar 0,2 % décrite par Remmal et coll.,(1993a et b).Tout d'abord une émulsion mère (1/10) a été préparée en ajoutant un ml du CM à 9ml de solution d'agar-agar à 0,2%. A partir de cette émulsion (10%), nous avons préparé différentes concentrations d'huiles essentielle (1/2000 (0,5 mg /ml), 1/4000 (0,25mg/ml),1/8000 (0,125mg/ml) ,1/12000 (0,0833 mg/ml) et 1/16000 (0,062mg/ml).

2.3.2) Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Dans des tubes à vis, contenant chacun 9ml de milieu nutritif Mueller Hinton liquide stérile, un volume déterminé de la solution mère (1/10) des CM (s) d'HE a été ajoutée afin d'obtenir les concentrations finales des CM(s) suivantes : 1/2000 (0,5 mg /ml), 1/4000(0,25mg/ml), 1/8000 (0,125mg/ml) ,1/12000(0,0833 mg/ml) et 1/16000(0,062mg/ml). Puis un volume de 100 µl de l'inoculum (dont la DO à 600 nm est de 0,6) est ajouté dans les tubes. Un tube témoin, contenant le milieu de culture seul est également préparé.

Ensuite, les tubes à vis sont agités avant d'être versés dans des tubes de prélèvements de 6 ml qui sont ensuite renversés dans des flacons stériles sous forme de cloches. Après incubation des flacons à l'étuve pendant 24h à 37°C en anaérobiose, la fermentation est vérifiée et les résultats sont analysés à l'œil nu ainsi que la densité optique à la longueur d'onde de 600 nm. Valeur à laquelle se situe le pic d'absorbance des bactéries vivantes.

3. Résultats

3.1 Action du thymol sur la production du méthane du jus de rumen

3.1.1) Test *in Vitro* de l'activité du thymol sur la production de gaz et la fermentation bactérienne du jus de rumen

Concentration du thymol(mg/ml)	**Production de gaz en ml**			
	Tube 1	**Tube 2**	**Tube 3**	**Moyenne**
Témoin	**2**	**1,6**	**2**	**1,86±0,23**
1/500 (2 mg/ml)	**0**	**0**	**0**	**0±0****
1/1000 (1 mg/ml)	**0,2**	**0**	**0,8**	**0,33±0,41****
1/2000 (0.5 mg/ml)	**1**	**0,6**	**0,6**	**0,73±0,23***
1/4000(0.25 mg/ml)	**1,6**	**0,5**	**1,4**	**1,16±0,58**

Tableau 1 : Mesure de la production de gaz après incubation à 37 C après 24h *: p<0.05: différence significative entre le témoin et les échantillons testés. **: p<0.01 différence très significative entre le témoin et les échantillons testés.

Les résultats du test sont présentés dans le tableau 1. Ces résultats montrent une diminution très significative ($p<0,05$) de la production de gaz au fur et à mesure que la concentration en thymol augmente. Cette production de gaz devient nulle à la concentration de 1/500.

3.1.2) Cinétique de la production de méthane après traitement aux différentes doses de thymol

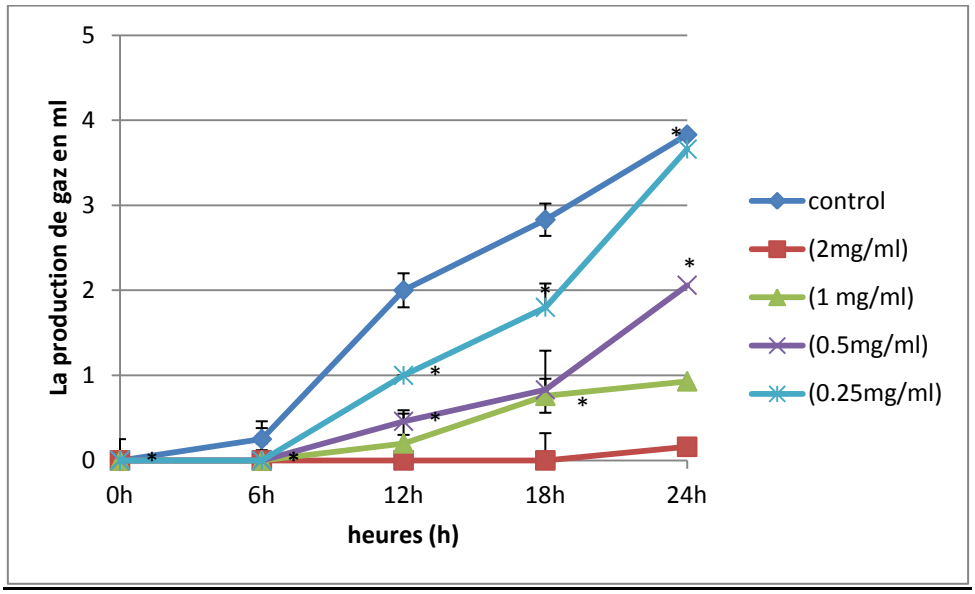

Figure 13: Cinétique de la production de gaz à partir du jus de rumen traité au thymol

****: p<0.05: différence significative entre le témoin et les échantillons testés.***

Dans les tubes témoins, la production de gaz augmente progressivement entre 6h et 24h. Cette production est de plus en plus faible quand la concentration en thymol augmente aux fortes doses de 1mg/ml et 2 mg/ml où elle est significativement (p<0,05) plus faible par rapport à celle du témoin.

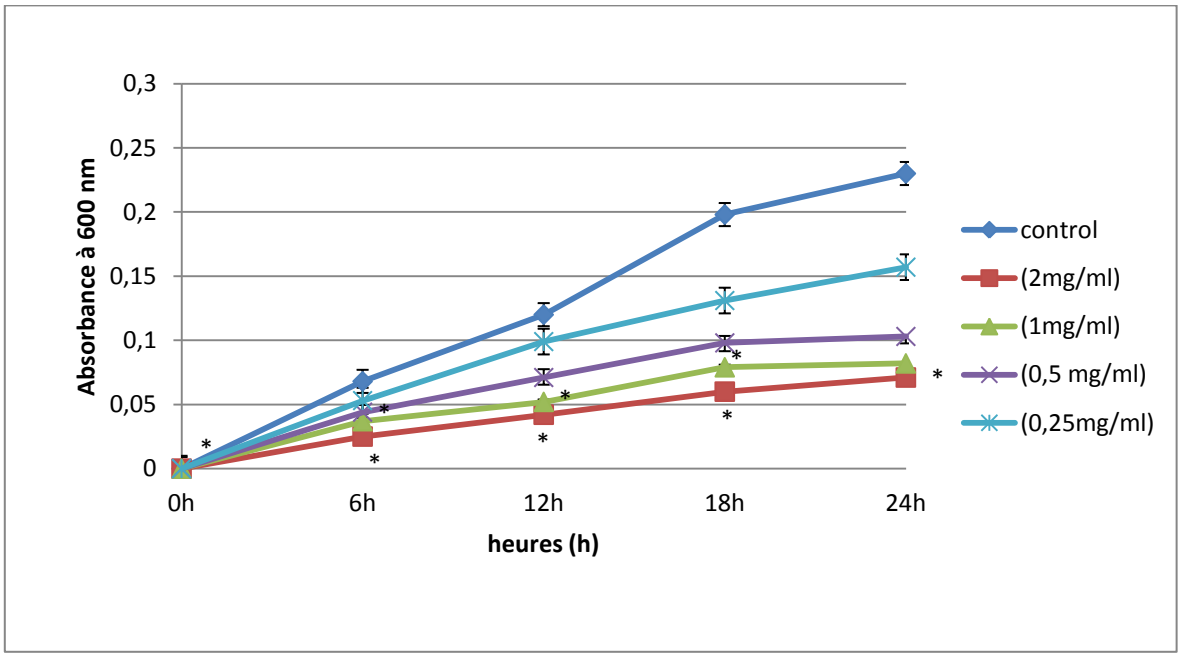

Figure 14: Cinétique de la charge bactérienne du jus de rumen traité au thymol pendant 24h

****: p<0.05: différence significative entre le témoin et les échantillons testés.***

Les résultats de la figure 14 présentent l'effet des différentes concentrations du thymol sur la charge bactérienne du jus de rumen. On note une diminution significative de la charge bactérienne surtout avec les concentrations de 1mg/ml et 2 mg/ml d'une manière dose dépendante entre 6h et 24h.

3.2 Action du thymol sur la flore microbienne du rumen

3.2.1) Test préliminaire de fermentation *in vitro*

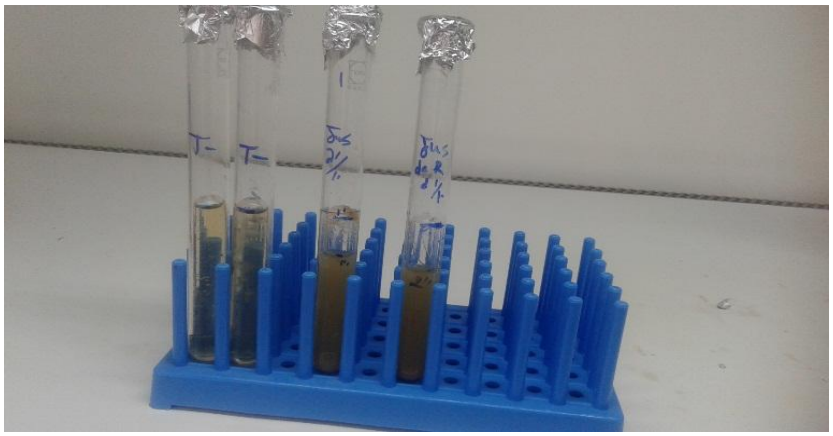

Photo 1: Test de fermentation de jus de rumen

	La production du gaz en ml
Témoin	0
Tubes contenant le jus de rumen	2.3

Tableau 2 : Test de la fermentation de jus de rumen

Les résultats du test de fermentation des filtrats de jus de rumen (photo1) après 24h d'incubation en anaérobiose sont présentés dans le tableau 2. Ces résultats montrent que le niveau du milieu de culture diminue d'un volume de 2.3 ml dans les cloches où nous avons inoculé le jus de rumen par rapport à celui des témoins négatifs qui ne contiennent que le milieu de culture.

3.2.2) Test de confirmation de production de gaz par les trois isolats gazogènes

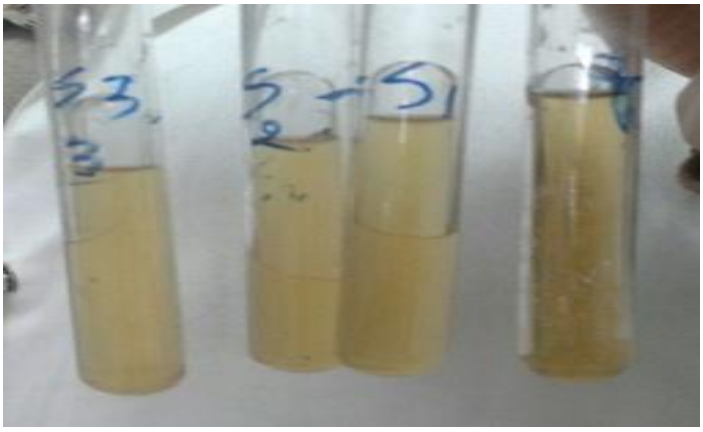

Photo 2: La fermentation des isolats purifiés

	La production du gaz (en ml)
Témoin négatif	0
Isolat 1	1
Isolat 2	1.4
Isolat 3	2

Tableau 3: La production du gaz à effet de serre par les trois isolats.

Les résultats du tableau 3 montrent que les trois isolats sont capables de dégager le gaz de la fermentation. Nous avons constaté également que l'isolat 3 produit plus de gaz en comparaison avec les autres isolats (Photo2).

3.2.3) Identification microscopique des trois isolats du rumen

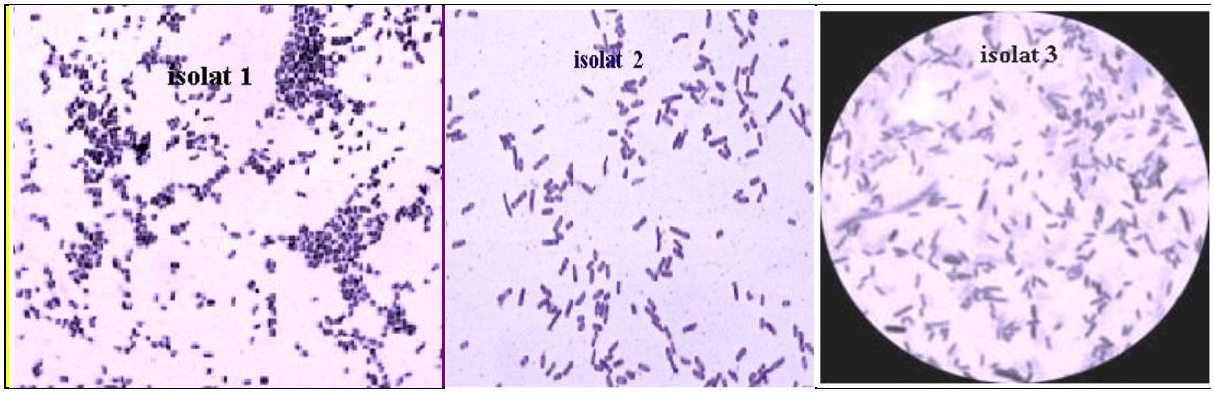

Photo 3: Coloration de Gram des trois isolats de jus de rumen

Les résultats d'identification par la coloration de Gram des germes isolés à partir du jus de rumen sont illustrés sur la photo 3. Ces résultats montrent que les bactéries qui ont été isolées à partir du jus de rumen sont des bacilles à Gram positif. Ces isolats appartiennent à l'ordre

des methanobacteriales, la famille des methanobacteriaceae, le genre des methanobrevibacter (Miller .,1981 ;Garcia et coll.,2000 ; Janssen et Kirs 2008).

3.2.4) Evaluation de l'activité antibactérienne des composés majoritaires des HE sur la fermentation des bactéries isolées

Pour chaque CM testé, nous avons évalué l'effet en fonction des différentes doses utilisées sur la production de gaz et sur la charge bactérienne des isolats testés par mesure de la DO à 600 nm.

- **Effet du thymol sur la production de gaz des trois isolats**

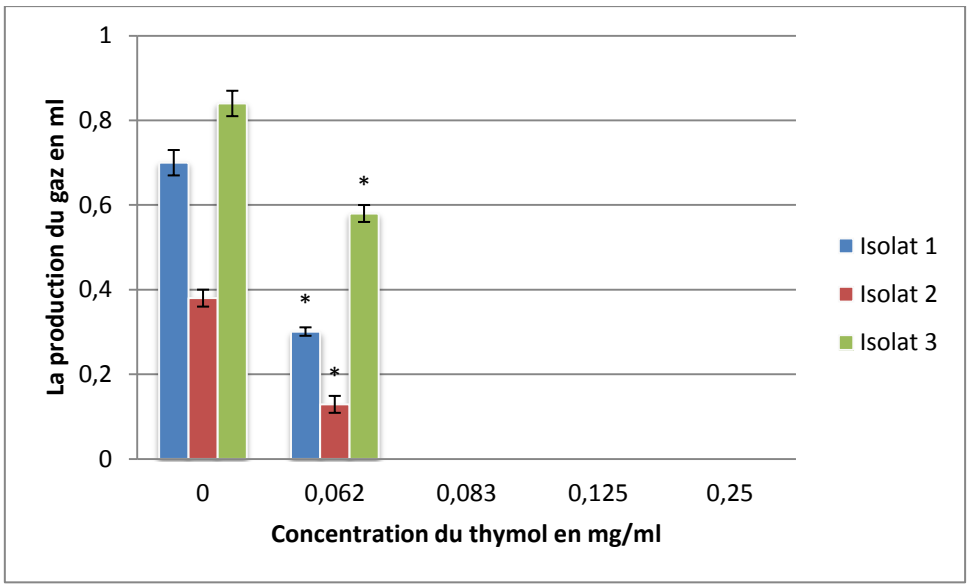

Figure 15: Effet des différentes concentrations du thymol sur la production de gaz

****: p<0.05: différence significative entre le témoin et les échantillons testés.***

Les résultats présentés sur la figure 15 montrent que l'isolat 3 non traité au thymol a produit une importante quantité de gaz (0,857ml). L'isolat 1 et l' isolat 2 ont produit respectivement 0,699 ml et 0, 387ml. Après traitement au thymol nous avons constaté que la production du gaz à été faible pour les isolats 1 et 2 à la concentration de 0,062 mg/ml. Aucune quantité de gaz n'est produite à la concentration de 0,083mg/ml et aux concentrations supérieures.

- **Effet du thymol sur la charge bactérienne des trois isolats**

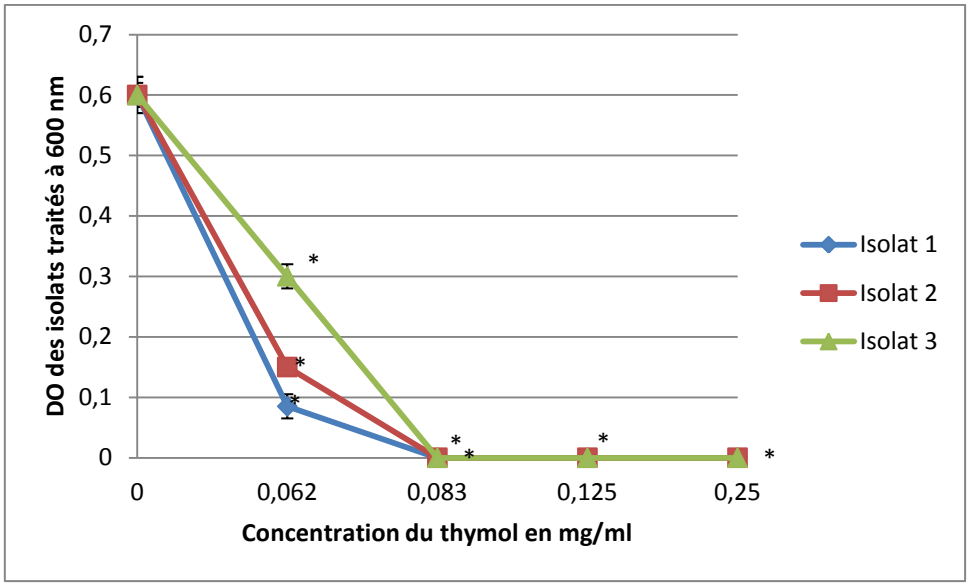

Figure 16: La charge bactérienne des 3 isolats de rumen au cours des 24 h d'incubation en anaérobiose. *: p<0.05: différence significative entre le témoin et les échantillons testés.

Les résultats de la figure 16 présentent l'effet de différentes concentrations du thymol sur la charge bactérienne des trois isolats. Nous avons constaté également que la charge bactérienne des isolats diminue d'une manière significative ($p<0,05$) dans les cloches des flacons traités au thymol et d'une manière dose-dépendante aux concentrations comprises entre 0 mg/ml et 0.083 mg/ml. Les 3 isolats ont une grande sensibilité au thymol avec une CMI de 0.083 mg/ml.

- **Effet du carvacrol sur la production de gaz des trois isolats**

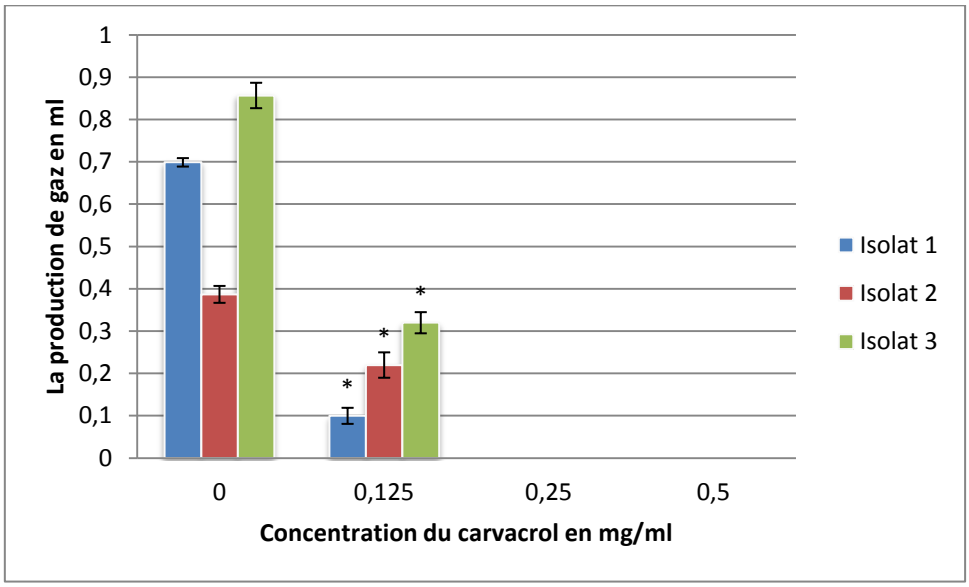

Figure 17: Effet des différentes concentrations de carvacrol sur la production du gaz en Anaérobiose. *: p<0.05: différence significative entre le témoin et les échantillons testés.

Les résultats présentés sur la figure 17 montrent que les témoins non traités de l'isolat 1 et de l'isolat 2 ont une production du gaz plus faible que celle de l'isolat 3. Pour les trois isolats, nous avons constaté une diminution significative (p<0,05) de production de gaz à la concentration de 0.125mg/ ml de carvacrol. Aux concentrations plus fortes, il n'y a plus de production du gaz.

- **Effet du carvacrol sur la charge bactérienne des isolats**

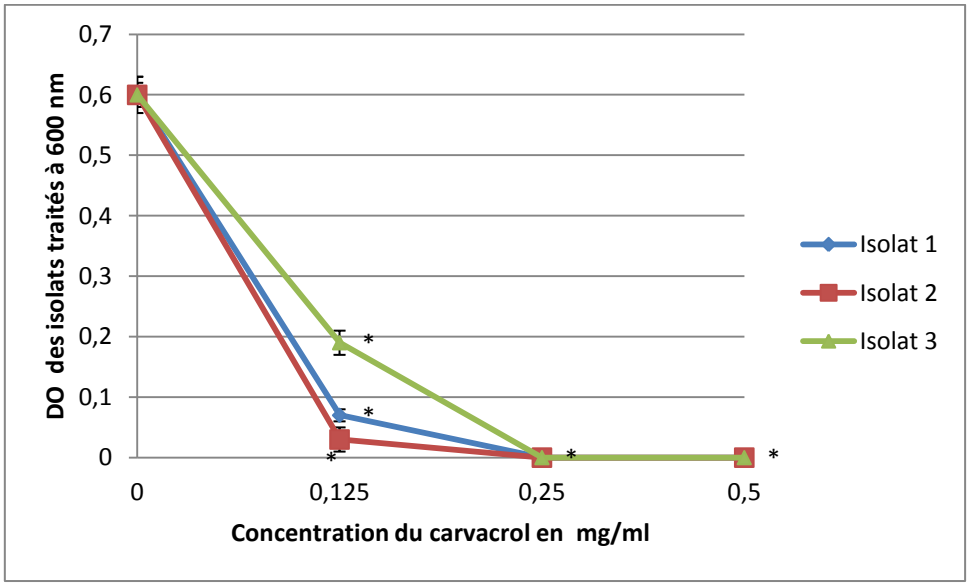

Figure 18: La charge bactérienne des 3 isolats de rumen après 24 h d'incubation en anaérobiose. *: p<0.05: différence significative entre le témoin et les échantillons testés.

La figure 18 montre que la charge bactérienne des isolats évaluée par la DO à 600 nm est réduite dans les cloches des flacons traités au carvacrol d'une manière dose-dépendante. Les trois isolats présentent la même sensibilité vis-à-vis du carvacrol avec une CMI de 0.25 mg/ml.

- Effet de L'eugénol sur la production de gaz des trois isolats

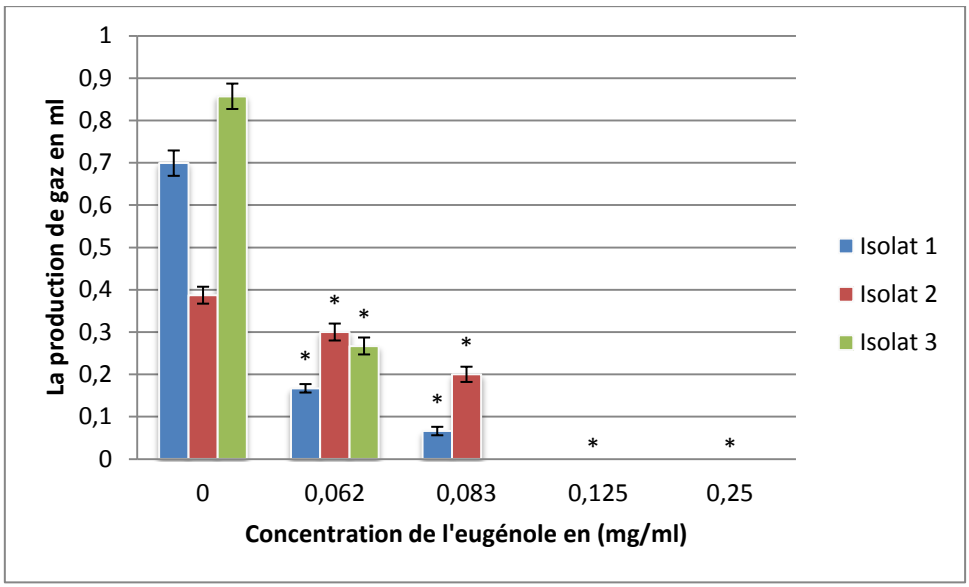

Figure 19: Effet des différentes concentrations d'eugénol sur la production du gaz in vitro.*: p<0.05: différence significative entre le témoin et les échantillons testés.

Les résultats représentés sur la figure 19 montrent que la production du gaz des trois isolats a baissé dans les cloches en parallèle avec l'augmentation de la concentration de l'eugénol.

Nous avons constaté que les témoins non traités des trois isolats produisent une quantité de gaz du même ordre que celle obtenue dans les tests précédents. Cependant, après traitement à l'eugénol, la production du gaz diffère d'un isolat à l'autre. L'isolat 3 est le plus sensible, à la concentration de 0,083 mg/ml d'eugénol, la production de gaz pour cet isolat est complètement inhibée.

- **Effet de l'eugénol sur la charge bactérienne des trois isolats**

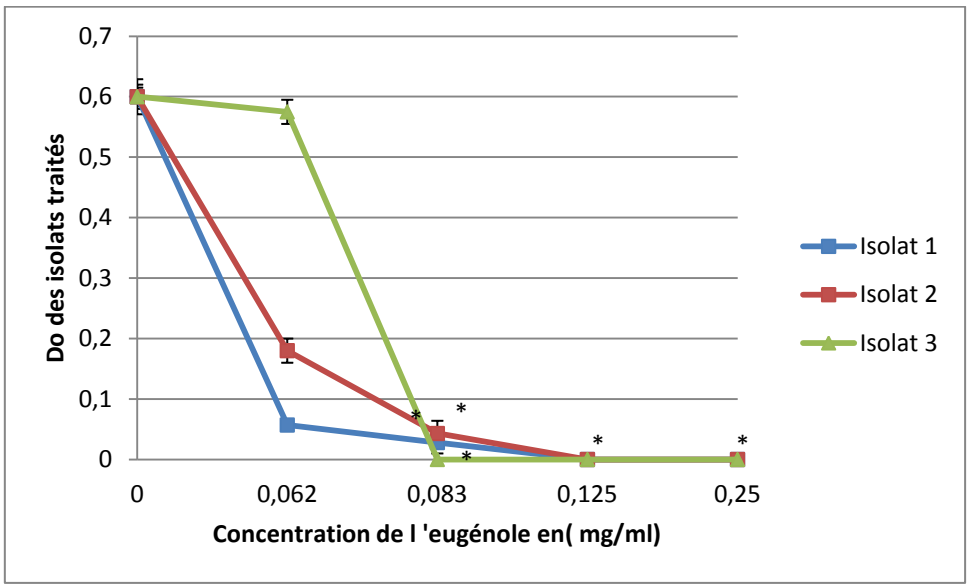

Figure 20: La charge bactérienne des 3 isolats de rumen après 24 h d'incubation en anaérobiose. *: p<0.05: différence significative entre le témoin et les échantillons testés.

La figure (20) montre que la charge des trois isolats diminue en parallèle avec l'augmentation de la concentration de l'eugénol. Cependant, la sensibilité des trois isolats vis-à-vis de l'eugénol n'est pas la même. L'isolat 3 est le plus sensible avec une CMI de 0.083 mg /ml. Les deux autres isolats ont une CMI un peu plus élevée (0.125 mg/ml).

- **Effet du cinnamaldéhyde sur la production de gaz des trois isolats**

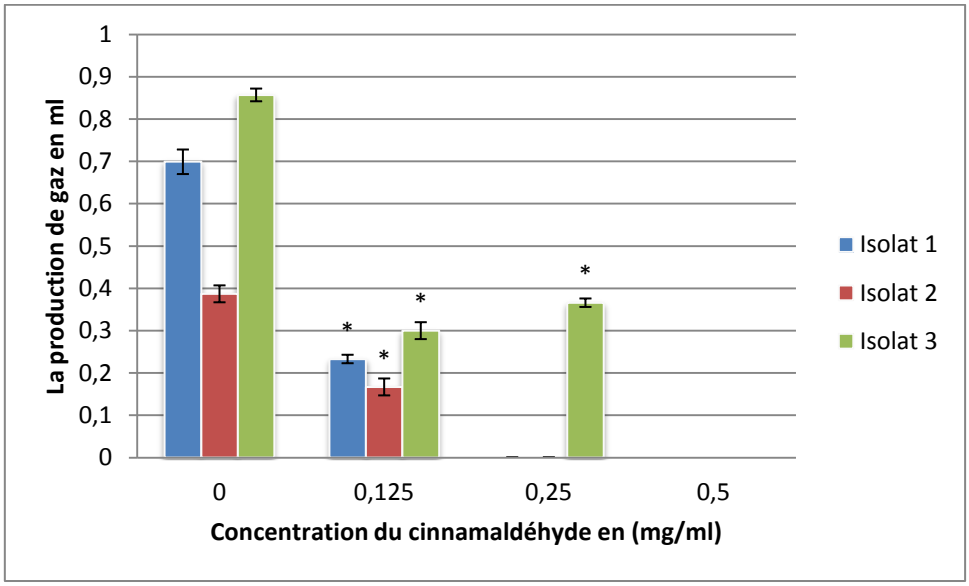

Figure 21: Effet des différentes concentrations du cinnamaldéhyde sur la production du gaz in vitro. *: $p<0.05$: différence significative entre le témoin et les échantillons testés.

Les résultats obtenus avec le cinnamaldéhyde sont analogues à ceux obtenus avec le thymol, le carvacrol et l'eugénol. La production de gaz par les trois isolats de rumen diminue en parallèle avec l'augmentation de la concentration du cinnamaldéhyde. Les isolats 1et 2 ne produisent plus du gaz à partir de la concentration de 0,25mg/ml. La production du gaz par l'isolat 3 s'est arrêtée à la concentration de 0,5 mg/ml seulement.

- **Effet du cinnamaldéhyde sur la charge bactérienne des trois isolats**

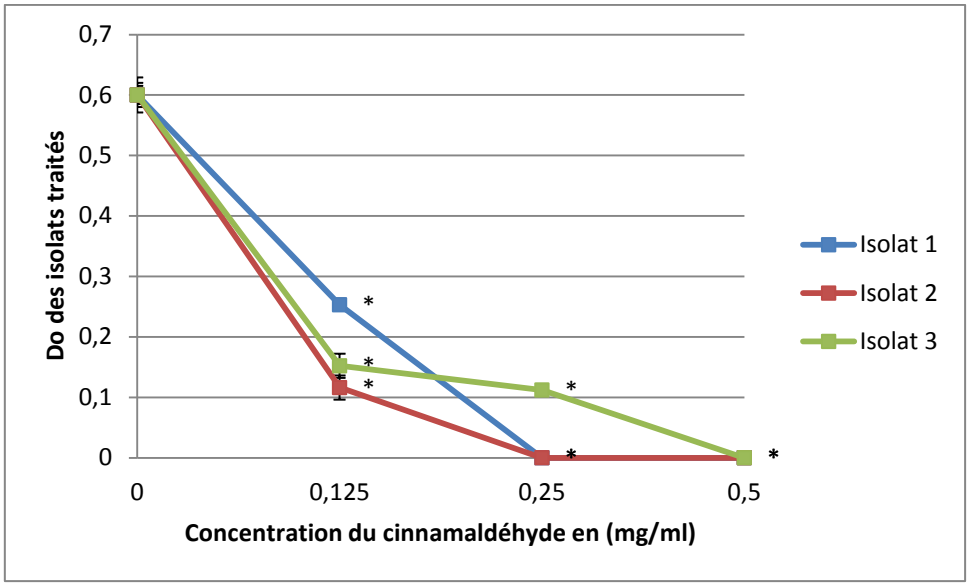

Figure 22: La charge bactérienne des 3 isolats de rumen après des 24 h d'incubation en anaérobiose.*: p<0.05: différence significative entre le témoin et les échantillons testés.

L'évolution de la charge bactérienne pour les isolats traités au cinnamaldéhyde est semblable à celle obtenue pour les tests précédents.

La sensibilité des trois isolats bactériens vis-à-vis de ce composé diffère d'une bactérie à l'autre. Les isolats 1et 2 sont les plus sensibles car ils possèdent une CMI de 0,25 mg/ml tandis que l'isolat 3 a une CMI plus élevée (0,5mg/ml).

4. Discussion

La mesure de la production de méthane représente un paramètre indispensable dans l'étude de la fermentation ruminale. Le méthane représente d'une part une perte d'énergie pour le ruminant et d'autre part un gaz à effet de serre très puissant. Sa diminution ne peut être que bénéfique pour l'animal et pour l'environnement.

Nous avons testé plusieurs techniques au laboratoire afin d'étudier l'efficacité de plusieurs composés majoritaires d'HE sur la fermentation du jus de rumen des bovins et afin de mettre au point une nouvelle méthode pour évaluer l'émission de gaz. La méthode que nous avons testée est inspiré de celle de durhams (1898). Celle que nous avons mise au point, consiste à placer des tubes sous forme de cloches renversés dans des flacons stériles vides ou contenant un volume d l'agar 2‰, pour éviter toute pénétration de l'air qui contient de l'oxygène (qui est un facteur limitant de la croissance des micro populations de rumen qui sont fortement anaérobies).

L'objectif de ce travail à été d'évaluer l'efficacité de quatre CM afin sur la réduction de la fermentation microbienne de la flore ruminale des bovins *in vitro,* à fin de mettre au point un additif alimentaire qui serait capable de remplacer les additifs chimiques normalement utilisés par les éleveurs. Ces derniers sont décrits comme étant toxiques pour les ruminants à long terme.

4.1 Action du thymol sur de fermentation *du jus de rumen in vitro*

La quantité de gaz produite lors de la fermentation du jus de rumen après traitement aux différentes doses de thymol a diminué d'une manière dose-dépendante. Cet effet a été plus prononcé après 24 h d'incubation.

La mesure de la densité optique à 600 nm confirme les résultats obtenus après la fermentation du jus de rumen. Elle montre que la charge bactérienne contenue dans le jus de rumen a diminué après addition du thymol.

Nos résultats sont semblables à ceux rapportés dans la littérature par plusieurs auteurs (Hart et coll., 2008;Rochfort et coll., 2008). Selon ces auteurs, cet impact antimicrobien du thymol serait principalement attribué à de multiples mécanismes pouvant inhiber une grande variété de bactéries méthanogènes et d'autres micro-organismes du rumen (Calsamiglia et coll., 2007).

Plusieurs études ont été réalisées sur la capacité des huiles essentielles à diminuer la production de méthane (Hart et coll., 2008 ; Rochfort et coll., 2008 ; Calsamiglia et coll., 2007). La totalité des travaux suggère que l'effet des HE est lié principalement aux composés phénoliques contenus dans les CM des HE et à la concentration utilisée.

En effet, plusieurs travaux réalisés sur des composés isolés d'HE seuls ou en mélange (Le thymol, le carvacrol, le cinnamaldéhyde, l'eugénol et l'anéthol) rapportent que ces molécules possèdent toutes un effet très significatif sur la diminution du méthane qui peut atteindre l'inhibition totale dans le cas de concentrations élevées (Macheboeuf et coll., 2006).

Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les HE, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires. Les principaux mécanismes et sites d'action des différents constituants des huiles essentielles sont : L'altération de la paroi cellulaire (Thoroski et coll., 1989 ; Helander et coll., 1998), la dégradation de la membrane cytoplasmique (Knobloch et coll., 1989 ; Sikkema et coll., 1994, Ultee et coll., 2002), l'altération des protéines membranaires (Juven et coll., 1994, Ultee et coll., 1999), la fuite du contenu cellulaire (Helander et coll., 1998 ; Cox et coll., 2000 ; Lambert et coll., 2001), la coagulation du cytoplasme (Gustafson et al., 1998), et l'épuisement de la force de mouvement des protons (Ultee et al., 2001 ; Ultee et al., 2002).

Le thymol semble altérer la perméabilité de la membrane plasmique et entraîner une perte du matériel intracellulaire (Rasooli et coll., 2006). De plus, d'après ces auteurs après avoir traversé la membrane, le thymol peut interagir en intracellulaire entraînant une diminution de la taille des bactéries, une altération de la paroi bactérienne, et une agrégation du cytoplasme.Ceci explique donc sa plus forte action sur les bactéries méthanogènes du rumen.

4.2 Action du thymol en comparaison avec le carvacrol, l'eugénol et le cinnamaldéhyde sur la flore microbienne du rumen

Le thymol dans cette étude a montré une efficacité remarquable dans l'inhibition des trois isolats responsables de la production de gaz à effet de serre (gazogènes). Et ceci à la faible dose de 0.083 mg/ml par rapport à l'eugénol (0.125 mg/ml) , au carvacrol (0,25mg/ml), et au cinnamaldehyde (0.5mg/ml). Ce résultat confirme ce qui a été démontré par Evans et Martin en 2006. Ces auteurs ont rapporté qu'une réduction de 93% de la production du méthane *in vitro* a été obtenue avec l'utilisation d'une dose de 400 mg du thymol /litre du milieu de culture .

La comparaison de l'activité du thymol, avec le carvacrol, l'eugénol, et le cinnamaldehyde, nous a permis de constater que la sensibilité des bactéries ruminales vis-vis des quatre composés majoritaires étudiés diffère selon les doses testées, et selon les propriétés antimicrobiennes de chaque composé. Il est très difficile de comparer nos résultats obtenus *in vitro* avec ceux rapportés dans la littérature du fait de la différence des techniques utilisées, et des doses des composés ajoutées au mélange de fermentation.

L’activité antimicrobienne est expliquée généralement par le fait que les composés testés sont formés de molécules lipophiles capables de pénétrer la double couche phospholipidique des membranes des bactéries de rumen, et provoquer des perturbations du transport des substances nutritives (Ultee et coll., 1999).

Helander et coll (1998) avaient également observé que, contrairement aux trois composés majoritaires d’huiles essentielles le thymol, le carvacrol, et l’eugénol, le cinnamaldehyde n’a pas d’incidence sur la stabilité de la membrane cytoplasmique des bactéries ruminales. Ils ont alors suggérés, que son mécanisme d’action serait lié à son interaction avec les protéines présentes dans le périplasme ou dans les parties les plus profondes de la cellule (Nikaido., 1994) ce qui explique la faible réduction de la production de gaz lors du traitement par ce composé.

Deuxième partie

Etude *in vivo* de l'activité d'un additif alimentaire NP RUMEN sur l'émission de méthane entérique chez les bovins

1. Introduction

Les émissions de méthane dans l'atmosphère par les ruminants contribuent de façon importante au phénomène du réchauffement climatique. Les scientifiques tentent de développer des stratégies afin de réduire ces émissions dans l'atmosphère. Les recherches conduites au cours des deux dernières décennies ont permis de montrer que certains additifs alimentaires peuvent être utilisés pour réduire la méthanogenèse ruminale tels que les additifs à base d'huiles essentielles, les lipides alimentaires riches en acides gras polyinsaturés et autres.

D'après les résultats obtenus *in vitro* dans la première partie de ce travail sur l'activité antimicrobienne de certains CM d'HE et de leur activité sur la fermentation du jus de rumen chez les bovins, nous avons mis au point un additif alimentaire à base de substances naturelles que nous avons appelé NP RUMEN. Nous avons évalué l'effet de cet additif sur les émissions du méthane entérique *in vivo* sur des vaches laitières. Notre démarche pour cela a consisté à :

1 - Estimer les émissions du méthane par les vaches laitières n'ayant reçu aucun additif alimentaire.

2 -Tester, *in vivo*, l'effet de l'additif alimentaire NP RUMEN, et de l'huile de tournesol sur la réduction de l'émission du méthane chez les vaches laitières.

3-Tester, *in vivo* l'effet dose-réponse de l'administration de l'additif alimentaire NP RUMEN sur la réduction de l'émission du méthane entérique chez les vaches laitières.

4- Tester, *in vivo,* l'effet d'un additif alimentaire à base de cannelle (Turboviv®) normalement utilisé par les éleveurs pour la réduction de l'émission du méthane chez les vaches laitière en comparaison avec le NP RUMEN.

2. Matériel et méthodes :

2.1 Estimation des émissions du méthane par les vaches laitières n'ayant reçu aucun additif alimentaire

2.1.1) Animaux

La phase expérimentale s'est déroulée au sein du laboratoire de Métabolisme Energétique de l'Unité de Physiologie Animale et Thérapeutique de l'IAV Hassan II. Cinq vaches, de race Holstein ont été utilisées. Les vaches, non gestantes et taries, ont été préalablement soumises à un examen clinique complet. A l'aide du ruban zootechnique, le poids des animaux a été estimé en se basant sur la mesure du tour de poitrine (TP). Un score de l'état corporel (BCS) a été attribué à chaque vache, en se basant sur l'observation de la quantité du gras au niveau du dos, des hanches et de la base de la queue (Tableau 4).

Vache	Age (années)	Poids (kg)	BCS
A	**5**	**399**	**3**
B	**4**	**459**	**3.5**
C	**4.5**	**325**	**2.5**
D	**4**	**427**	**3**
E	**4**	**331**	**2.5**

Tableau 4: Caractéristiques de vaches utilisées dans l'expérimentation

2.1.2) Dispositif expérimental

La production de méthane a été mesurée par calorimétrie indirecte à circuit ouvert avec le port d'un masque respiratoire sur la face de l'animal pendant une période de 2 heures après la prise alimentaire matinale (figure 22)

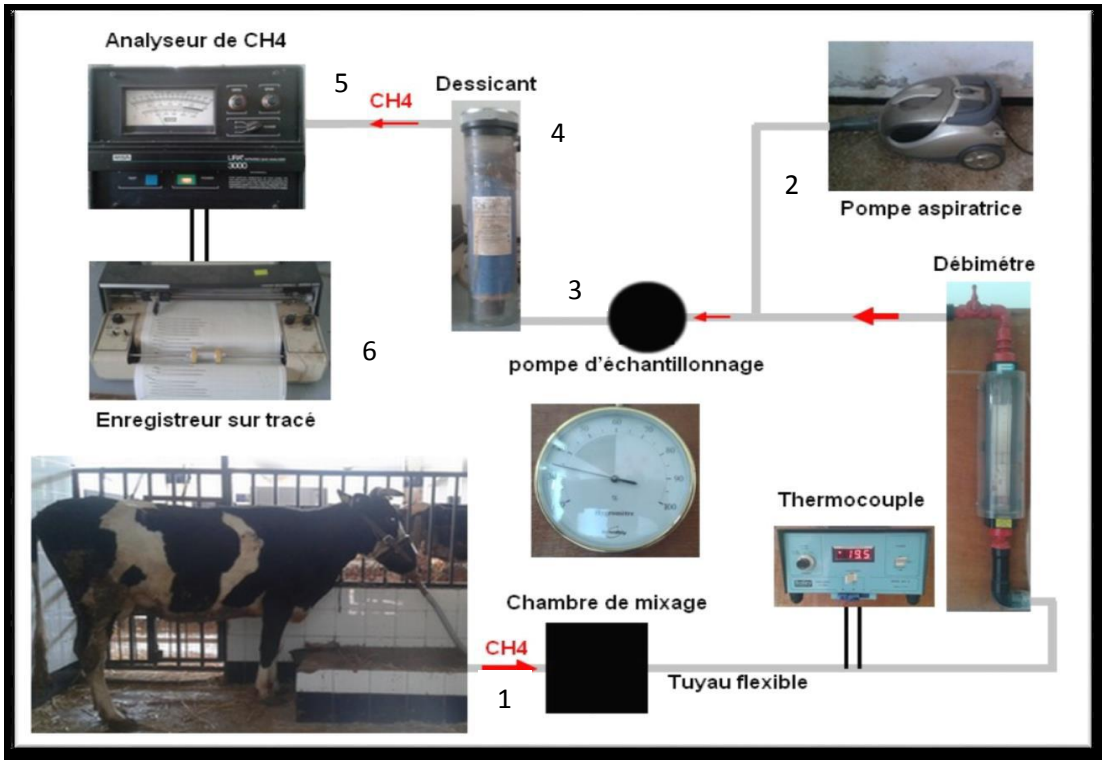

Figure 23: Dispositif expérimental de mesure du méthane

Les gaz émis par les vaches sont aspirés par un tuyau flexible et ils passent d'abord à travers une enceinte de stockage (1). Cette enceinte est liée à un thermocouple permettant la mesure de la température humide et sèche des gaz collectés. Un manomètre à eau permet de mesurer la pression des gaz circulant à l'intérieur du système. Une pompe aspiratrice (2) adaptée au système, collecte et fait circuler les gaz aspirés dans les tuyaux à un débit ajusté manuellement (151,5 litres /min), en réglant le taux de ventilation au moyen d'une vanne. Une deuxième pompe d'échantillonnage (3), branchée au système, prélève des échantillons d'air expiré, qui après déshumidification, sont renvoyés à l'analyseur de méthane (5) qui est préalablement calibré. Le calibrage du système consiste d'abord en l'injection de l'azote dans l'analyseur de méthane, ce qui permet, l'évacuation des molécules de méthane de la cellule d'analyse, et l'injection des gaz contenant le méthane à une concentration connue.

2.1.3) Mesure de la production de méthane

Les mesures de la production de méthane se sont déroulées régulièrement durant une période de 2h après la fin du repas à l'aide d'un masque recouvrant la cavité nasale et buccale de la vache.

La concentration du méthane contenue dans les gaz expirés a été déterminée à l'aide d'un enregistreur graphique connecté à un analyseur de méthane à rayonnements infrarouges (figure 23). L'analyseur de méthane utilisé donne des valeurs instantanées des concentrations

de méthane émises par l'animal exprimées en pics notés sur le tracé, ensuite multipliées par le débit de l'air corrigé aux conditions standards.

Pour bien analyser les données, les valeurs du méthane émis par les animaux pendant 2 heures ont été extrapolées sur 24 heures et exprimées en litre/j.

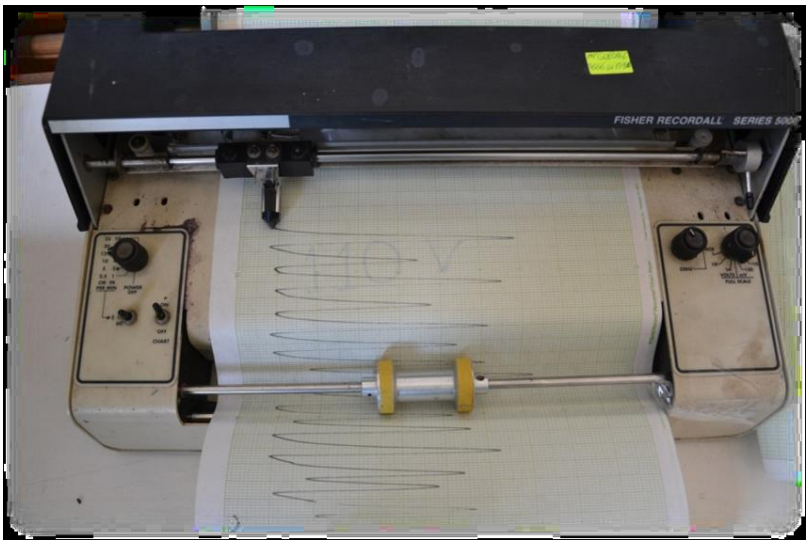

Figure 24 : Enregistreur graphique

2.1.4) Analyse statistique

Pour évaluer l'effet de l'addition de l'huile de tournesol et du produit NP RUMEN sur la production de méthane chez les animaux utilisés, les résultats obtenus ont été soumis à une analyse statistique par comparaison des moyennes en utilisant le test T de Student. L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel statistique SPSS avec un seuil de significativité de 5%.

2.2 Effet de l'additif alimentaire NP RUMEN et de l'addition de l'huile de tournesol sur la réduction du méthane entérique chez les bovins

2.2.1) Rationnement

Durant l'expérimentation, une ration alimentaire composée de 3 kg de foin de luzerne et de 4 kg du concentré industriel a été distribuée à chaque animal, tandis que l'eau est distribuée *ad libitum.* Une quantité de 50 grammes du produit NP RUMEN a été ajoutée à la ration de base pour tester son effet sur la production du méthane chez les bovins.

L'huile de tournesol qui est riche en acides gras polyinsaturés a été testée afin de diminuer la production de méthane chez les bovins. En effet, un volume de 200 ml qui représente 3,3 % de la ration d'huile de tournesol a été ajouté à la ration de base et malaxé avec le concentré industriel. L'alimentation a été distribuée une fois par jour, à 8 h du matin.

2.2.2) Protocole expérimental

L'expérimentation a duré 2 mois répartis en 3 périodes :

- 1ère période : Adaptation à la ration alimentaire et au port du masque pendant une semaine, puis la mesure de l'émission du méthane pendant une autre semaine à raison de trois mesures /semaine.
- 2ème période : l'ajout de l'huile de tournesol à la ration de base pendant 3 semaines : deux semaines d'adaptation et une semaine de mesure du méthane produit à raison de trois mesures /semaine.
- 3ème période : l'ajout du produit NP RUMEN à la ration de base pendant 3 semaines : deux semaines d'adaptation et une semaine de mesure du méthane produit à raison de 3 mesures /semaine.

2.3 Effet dose-réponse de l'administration de l'additif alimentaire NP RUMEN sur la réduction du méthane entérique chez les bovins

2.3.1) Animaux

Cinq autres vaches croisées Holstein ont fait l'objet de cette expérimentation, qui s'est déroulée au sein du Laboratoire du Métabolisme Energétique de l'Unité de Physiologie Animale de l'IAV Hassan II pendant une durée de 2mois.

Ces vaches, vides et en lactation ont été préalablement soumises à un examen clinique complet au début de l'expérimentation. Un score de l'état corporel (BCS) a été attribué à chaque vache, en se basant sur l'observation de la quantité du gras au niveau du dos, des hanches et de la base de la queue. (Tableau 5)

La mesure et le suivi de l'évolution du poids de chaque vache à été réalisé à l'aide d'une balance grands animaux (capacité : 1000 kg et la précision : ±5 kg).

Vache	**Age (années)**	**Poids (KG)**	**BCS**
V1	**10**	**408**	**2.5**
V2	**9**	**358**	**2.5**
V3	**6**	**432**	**3**
V4	**7**	**504**	**2**
V5	***7***	***487***	***2***

Tableau 5 : Caractéristiques des animaux utilisés pour l'expérimentation

2.3.2) Rationnement

Lors de notre expérimentation, les vaches avaient reçu quotidiennement une ration alimentaire composée de 4 kg de concentré industriel, 2 kg de foin de luzerne et 2kg de paille de blé. L'eau a été fournie *ad libidum*. L'alimentation a été distribuée en deux repas par jour ; le concentré et le foin vers 9 heures du matin, et la paille vers 15 heures.

L'additif alimentaire NP RUMEN a été utilisé à deux doses différentes, à 50g et 100g par vache par jour, afin de tester l'effet dose réponse du produit sur la production du méthane entérique chez les vaches laitières.

2.3.4) Protocole expérimental

L'expérimentation s'est déroulée sur 9 semaines reparties en 3 périodes:

-1ère période (témoin) : Adaptation à la ration alimentaire de base et au port du masque, pendant deux semaines, puis la mesure de l'émission du méthane pendant la troisième semaine à raison de 3 mesures /semaine.

-2ème période : l'incorporation de 50 g de l'additif NP RUMEN à la ration pendant 3 semaines : deux semaines d'adaptation et une semaine de mesure du méthane produit à raison de 3 mesures /semaine.

-3ème période : l'incorporation de 100 g de l'additif NP RUMEN à la ration pendant 3semaines : deux semaines d'adaptation et une semaine de mesure du méthane produit à raison de 3 mesures /semaine.

La production de méthane a été mesurée par calorimétrie indirecte comme décrit précédemment.

Afin d'évaluer l'effet dose-réponse de l'addition de NP RUMEN sur la production de méthane chez les animaux utilisés, les résultats obtenus ont été soumis à une analyse statistique par comparaison des moyennes en utilisant le test T de Student. L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel statistique SPSS avec un seuil de significativité de 5%.

2.4 Effet de l'administration de l'additif alimentaire NP RUMEN en comparaison avec un additif commercial, le TURBOVIV sur la réduction de méthane entérique chez les bovins

2.4.1) Animaux

Cinq autres vaches croisées Holstein ont fait l'objet de cette expérimentation, qui s'est également déroulée au sein du Laboratoire du Métabolisme Energétique de l'Unité de Physiologie Animale de l'IAV Hassan II pendant une période de 3 mois.

Ces vaches, non gestantes et en lactation, ont été préalablement soumises à un examen clinique complet au début de l'expérimentation. Un score de l'état corporel (BCS) a été

attribué à chaque vache en se basant sur l'observation de la quantité du gras au niveau du dos, des hanches et de la base de la queue.

La mesure et le suivi de l'évolution du poids de chaque vache est réalisé à l'aide d'une balance grands animaux (capacité : 1000 kg et la précision : ±5 kg).

Vache	Age (années)	Poids (kg)	BCS
V1	**11**	**330**	**2**
V2	**10**	**320**	**2**
V3	**11**	**380**	**2**
V4	**9**	**455**	**2**
V5	**5**	**370**	**2**

Tableau 6 : Caractéristiques des animaux utilisés pour l'expérimentation

2.4.2) Rationnement

Lors de notre expérimentation, les vaches avaient reçu quotidiennement une ration alimentaire composée de 4 kg de concentré industriel, 4 kg de foin d'avoine et 2kg de paille de blé. L'eau a été fournie *ad libidum*. L'alimentation a été distribuée en deux repas par jour ; le concentré industriel et le foin vers 9 h du matin, et la paille vers 15 h.

Deux additifs alimentaires ont été utilisés dans notre expérimentation :

- L'additif 1 : NP RUMEN a été ajouté à la ration alimentaire, à la dose de 100 g par vache et par jour.
- L'additif 2 : TURBOVIV est additionné à la ration alimentaire, à la dose de 100 grammes par vache et par jour.

2.4.3) Protocole expérimental

L'expérimentation s'est déroulée en 11 semaines reparties en 4 périodes:

-1ère période (témoin) : Adaptation à la ration alimentaire de base et au port du masque, pendant deux semaines, puis la mesure de l'émission du méthane pendant la troisième semaine à raison de 3 mesures par semaine.

-2ème période : l'incorporation de 100g de l'additif NP RUMEN à la ration pendant 3 semaines : deux semaines d'adaptation et une semaine de mesure du méthane produit à raison de 3 mesures par semaine.

-3ème période (témoin) : période de repos, les vaches recevaient la ration alimentaire initiale, sans aucun additif alimentaire pendant deux semaines.

- 4ème période : l'incorporation de 100 g de l'additif TURBIVIV à la ration pendant 3 semaines : deux semaines d'adaptation et une semaine de mesure du méthane produit à raison de 3 fois par semaine.

La production de méthane a été mesurée par calorimétrie indirecte à circuit ouvert comme décrit précédemment.

Afin d'évaluer l'effet des deux produits (NP RUMEN et TURBOVIV) sur la production de méthane chez les animaux testés, les résultats obtenus ont été soumis à une analyse statistique par comparaison des moyennes du CH_4 en utilisant le test T de Student. L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel statistique SPSS avec un seuil de significativité de 5%.

3. Résultats

3.1 Effet de l'additif alimentaire NP RUMEN ou de l'addition de l'huile de tournesol sur la réduction de méthane entérique chez les bovins

3.1.1) Production de méthane durant la première période (période contrôle)

Les quantités de méthane produites lors de l'éructation et la respiration ont été calculées en litres/h puis extrapolés sur 24 heures et exprimées en litres/j

	Poids kg	**Production de méthane en L/j**
Vache A	**399**	**173,95 ± 5,16**
Vache B	**459**	**171,38 ± 6,02**
Vache C	**325**	**213,70 ± 2,14**
Vache D	**427**	**185,44 ± 7,24**
Vache E	**331**	**181,30 ± 5,18**

Tableau 7: la production du méthane des 5 vaches pendant la période contrôle

D'après ces résultats, une valeur maximale de production de méthane de 213,7l/j a été enregistrée chez la vache « C ». Notons que cette vache a un poids de 325 kg. La vache « B » qui pèse 459 kg, a produit la quantité de méthane la plus basse (171,38 l/j).

3.1.2) Production de méthane après l'ajout de l'huile de tournesol

200 ml d'huile de tournesol ont été rajoutés à la ration de base pour chaque vache quotidiennement et pendant deux semaines. Nous avons mesuré la production du méthane 3 fois/semaine de la même manière que pour la première période.

	Production de méthane en L/j		**%de réduction de méthane**
	Période de contrôle	**Après ajout d'huile de tournesol**	
Vache A	**173,95± 5,16**	**158,59± 6,13**	**8,83**
Vache B	**171,38± 6,02**	**159,73± 5,16**	**6,79**
Vache C	**213,70± 2,14**	**183,16± 7,02**	**14,29**
Vache D	**185,44± 7,24**	**178,32± 5,18**	**3,83**
Vache E	**181,30± 5,18**	**168,98 ± 5,13**	**6,79**

Tableau 8 : Production de méthane des 5 vaches après l'ajout de l'huile de tournesol à L'aliment.*: p<0.05: différence significative

Les résultats du tableau 8 montrent que l'ajout de l'huile de tournesol à la ration des 5 vaches a donné une réduction non significative de la production de méthane chez toutes les vaches. Cette réduction est en moyenne d'environ 8%.

3.1.3) Production de méthane après ajout de l'additif NP RUMEN à 50 g/v/j

	Production de méthane en L/j		%de réduction de méthane
	Période contrôle	Après ajout d'additif NP RUMEN	
Vache A	**173,95 ± 5,16**	**142,49 ± 7,49***	**17,87**
Vache B	**171,38 ± 6,02**	**157,59 ± 8,34**	**8,04**
Vache C	**213,70 ± 2,14**	**183,6 ± 3,13***	**14,08**
Vache D	**185,44 ± 7,24**	**162,11 ± 9,23**	**12,58**
Vache E	**181,30 ± 5,18**	**161 ± 3,13***	**11,19**

Tableau 9: la production du méthane des 5 vaches après l'ajout du produit NP RUMEN

****: p<0.05: différence significative***

Les résultats du tableau 9 montrent que l'ajout de l'additif NP RUMEN à la ration a donné une réduction significative de la production de méthane pour les vaches A, C, et E ($p<0,05$) Cette réduction est d'environ 12%.

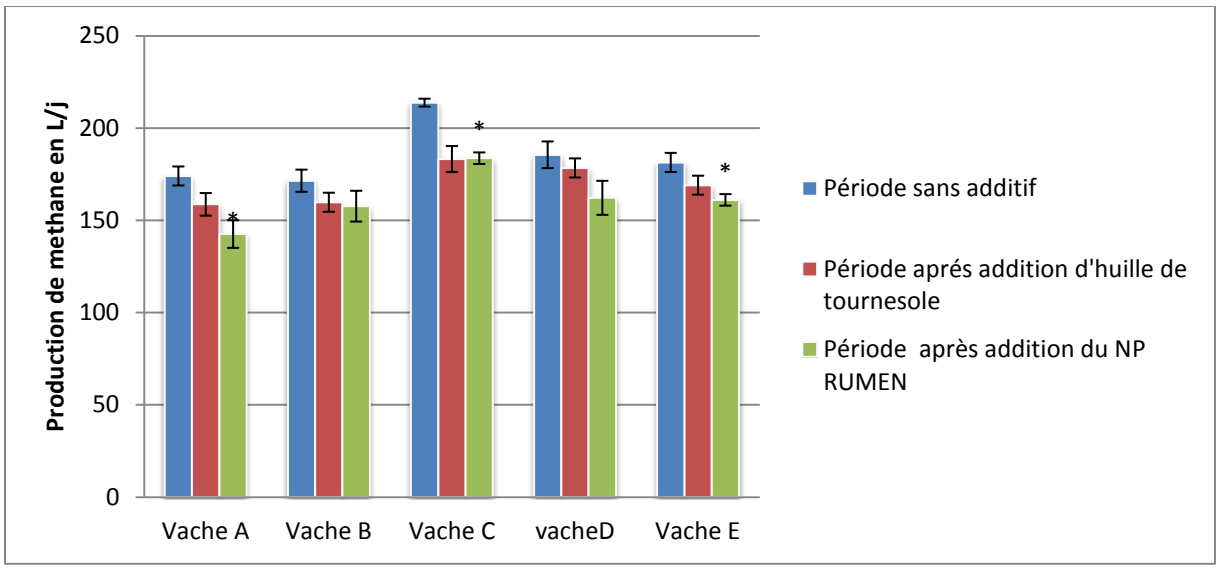

Figure 25: Comparaison de la production de méthane avant et après ajout d'huile de tournesol ou du produit NP RUMEN chez les 5 vaches.*: p<0.05: différence significative

Les résultats de la figure 24 montrent que l'ajout du produit NP RUMEN à la dose de 50g/vache/jour réduit significativement la production du méthane en moyenne12% par rapport à celle produite durant la période de contrôle. L'ajout de l'huile de tournesol a donné une réduction moyenne plus faible d'environ 8 % seulement.

3.2 Effet dose-réponse de l'administration de l'additif alimentaire NP RUMEN sur la réduction du méthane entérique chez les bovins

3.2.1) Production moyenne de méthane durant la période contrôle (sans additif)

	Poids kg	Production de méthane en L/j
Vache 1	**408**	**208,34 ± 5,61**
Vache2	**358**	**201,96 ± 4,01**
Vache 3	**432**	**206,81 ± 4,51**
Vache 4	**504**	**177,36 ± 5,65**
Vache 5	**487**	**184,82 ± 6,32**

Tableau 10 : la production du méthane des 5 vaches pendant la période de contrôle

D'après ces résultats, une valeur maximale de production de méthane de 208,34l/j a été enregistrée chez la vache 1. Notons que cette vache a un poids de 408 kg. La vache 4 qui pèse 504kg a produit la quantité de méthane la plus basse 177,36 l/j.

3.2.3) Production de méthane après ajout de deux doses différentes de l'additif NP RUMEN

	Production de méthane en L/j				
	Période sans additif	**Ajout de 50g/j/vache de l'additif NP RUMEN**	**% de réduction de méthane**	**Ajout de 100g/j/vache de L'additif NP RUMEN**	**% de réduction de méthane**
Vache 1	**208,34 ± 5,61**	**165,6 ± 7,68***	**21,51**	**124,79 ± 4,11***	**40,11**
Vache2	**201,96 ± 4,01**	**171,9 ± 6,77***	**14,89**	**152,49 ± 3,53***	**24,5**
Vache 3	**206,81 ± 4,51**	**153,15 ± 4,09***	**25,95**	**147,69 ± 7,68***	**28,59**
Vache 4	**177,36 ± 5,65**	**150,31 ± 4,04***	**15,26**	**119,33 ± 6,68***	**32,72**
Vache 5	**184,82 ± 6,32**	**128,29 ± 7,61***	**30,59**	**123,6 ± 7,68***	**33,13**

Tableau 11 : Production du méthane chez les 5 vaches après l'ajout de 50 g ou de 100g de l'additif NP RUMEN à la ration alimentaire.*: $p<0.05$: différence significative.

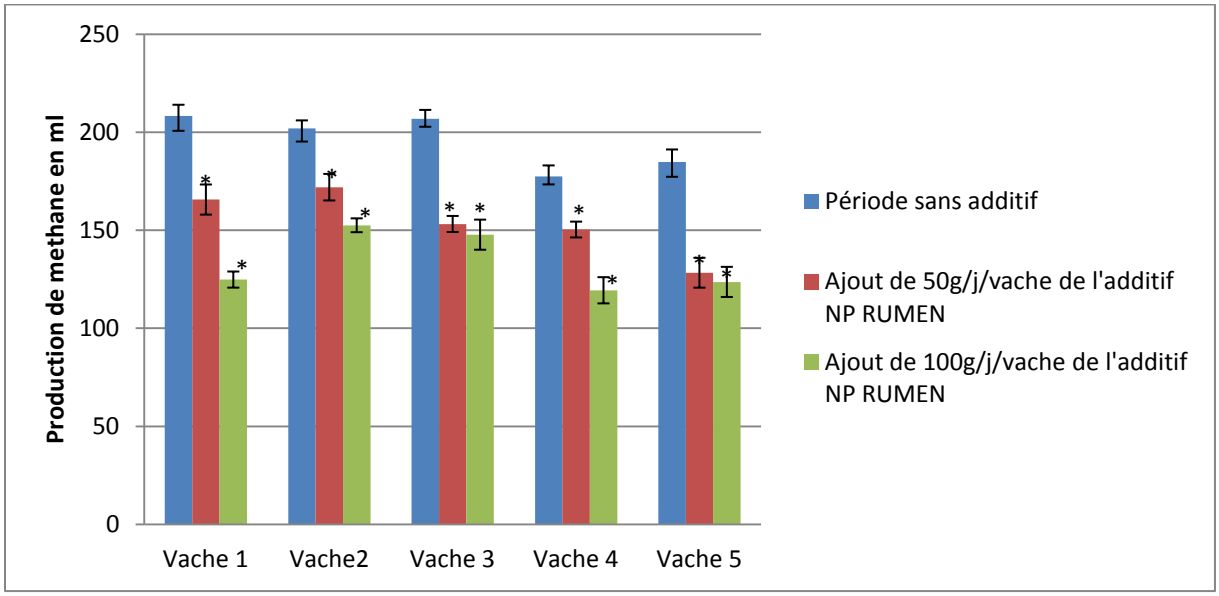

Figure 26: Production du méthane chez les 5 vaches après l'ajout de 50 g et ou 100g de l'additif NP RUMEN à la ration alimentaire.* : p<0.05 : différence significative.

D'après les résultats du tableau 11 et de la figure 25, nous remarquons que :

- Toutes les vaches ont montré une réduction de la production de méthane après ajout du NP RUMEN dans l'aliment.

- L'addition de 50 g de l'additif NP RUMEN à la ration alimentaire a eu un effet significatif ($p<0,05$) sur la réduction de méthane chez les 5 vaches avec un pourcentage de réduction d'environ 21%.

- L'addition de 100 g de l'additif NP RUMEN à la ration alimentaire a eu un effet significativement plus important sur la réduction de méthane chez les 5 vaches avec un pourcentage de réduction d'environ 31%.

3.3 Effet de l'administration de l'additif alimentaire NP RUMEN en comparaison avec un additif commercial le TURBOVIV sur la réduction de méthane entérique chez les bovins

3.3.1) Production moyenne de méthane durant la période de contrôle (sans additif)

	Poids kg	Production de méthane en l/j
Vache A	**335**	**144,14 ± 4,34**
Vache B	**335**	**151,10 ± 5,23**
Vache C	**395**	**147,35 ± 6,43**
vacheD	**480**	**156,51 ± 4,21**
Vache E	**380**	**171,34 ± 6,01**

Tableau 12: Production du méthane chez les 5 vaches durant la période de contrôle

D'après ces résultats, une valeur maximale de production de méthane de 171,34l/j a été enregistrée chez la vache E. Notons que cette vache a un poids de 380 kg. La vache A qui pèse 335kg a produit la quantité de méthane la plus basse 144,14 l/j.

3.3.2) Production de méthane après ajout de l'additif NP RUMEN à 100 g/v/j

	Production de méthane en L/j		% de réduction de méthane
	Période de contrôle	Après ajout d'additif NP RUMEN	
Vache A	**144,14± 4,34**	**135,51± 3,03**	**5,99**
Vache B	**151,10±5,23**	**138,53±3,94**	**8,32**
Vache C	**147,35±6,43**	**128,91±4,41***	**12,69**
Vache D	**156,51±4,21**	**125,09±6,55***	**20,07**
Vache E	**171,34±6,01**	**149,11±5,02***	**12,97**

Tableau 13 : Production du méthane chez les 5 vaches après l'ajout de 100 g du NP RUMEN à la ration alimentaire*: $p<0.05$: différence significative

D'après les résultats du tableau 13, et comparaison avec l'émission du méthane chez les 5 vaches pendant la période de contrôle, nous remarquons que les vaches ont montré une réduction significative ($p<0,05$) de cette production après addition de 100g de NP RUMEN à la ration alimentaire avec un taux de réduction moyen d'environ 12%.

3.3.3) Production de méthane après ajout de l'additif commercial Turboviv

	Production de méthane en L/j		% de réduction de méthane
	Période de contrôle	Ajout de l'additif commercial Turboviv	
Vache A	**144,14 ± 4,34**	**137,14 ± 5,31**	**4,86**
Vache B	**151,10 ± 5,23**	**144,18 ± 4,02**	**4,58**
Vache C	**147,35 ± 6,43**	**132,36 ± 3,34**	**10,17**
Vache D	**156,51 ± 4,21**	**136,92 ± 3,09***	**12,52**
Vache E	**171,34 ± 6,01**	**149,27 ± 3,12***	**12,89**

Tableau 14 : Production du méthane chez les 5 vaches après ajout de 100 g de l'additif commercial TURBOVIV à la ration alimentaire*: p<0.05: différence significative

En comparant la production du méthane chez les vaches ayant reçu le Turboviv à celle de la période témoin, nous remarquons que les vaches D, et E ont montré une réduction significative de la production de méthane après addition de 100g de l'additif commercial TURBOVIV à la ration alimentaire ($p<0,05$) . Le taux de réduction de méthane moyen des cinq vaches est d'environ 9%.

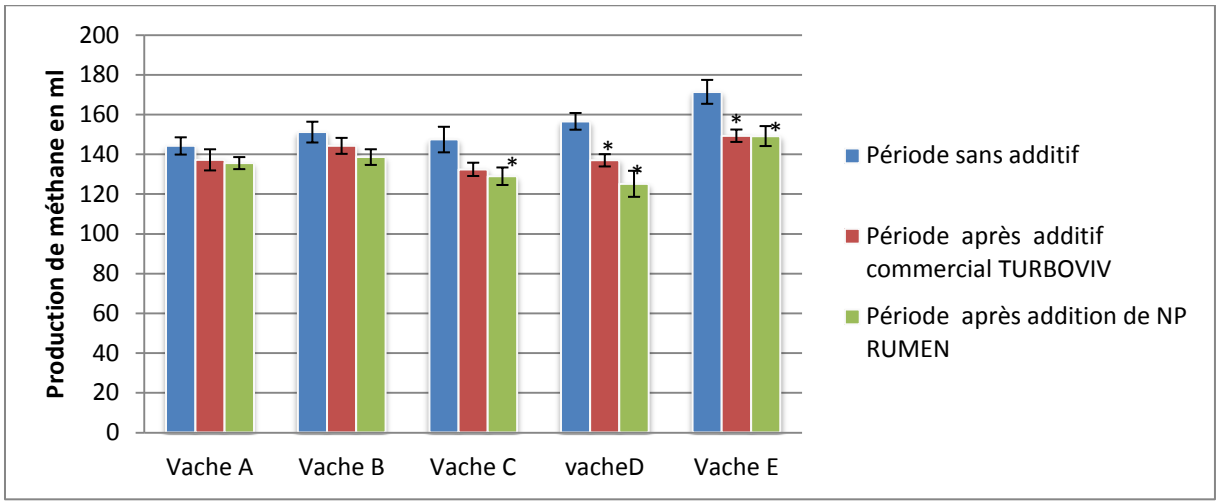

Figure 27: Comparaison de la production de méthane chez les vaches durant la période témoin et celle aprés addition de l'additif commercial TURBOVIV ou du NP RUMEN.*: p<0.05: différence significative.

L'analyse statistique des résultats, a montré que l'addition de 100 g de l'additif NP RUMEN à la ration alimentaire a eu un effet significatif ($p<0.05$) sur la réduction du méthane chez les vaches testées, meilleur que celui obtenu après l'ajout du Turboviv.

4. Discussion

Trois essais ont été réalisés pour évaluer l'effet de l'additif NP RUMEN in *vivo* sur les émissions du méthane entérique chez les vaches laitières.

4.1 Effet de l'additif alimentaire NP RUMEN ou de l'addition de l'huile de tournesol sur la réduction du méthane entérique chez les bovins

La production de méthane par la vache laitière dépend de plusieurs facteurs dont l'âge, l'état physiologique, l'alimentation, et le niveau de production. Dans cette étude, nous avons essayé de travailler sur un lot de vaches, assez homogène, pour pouvoir estimer correctement leurs émissions de méthane en dehors de l'ajout de tout additif alimentaire sensé influencer la production de méthane. En effet, mis à part leurs poids différents, nous avons réussi à choisir des vaches laitières taries, multipares et ayant à peu près le même âge. Cependant, la quantité de méthane produite ne semble pas avoir de relation avec le poids des vaches puisque la vache B au poids le plus élevé (459kg) a émis la quantité de méthane la plus basse, et la vache C au poids le plus bas (325kg) a émis la plus haute quantité de méthane.

4.1.1) Effet de l'addition de l'huile de Tournesol (HT) sur la production du méthane

L'huile de tournesol (HT) est obtenue à partir des graines de tournesol. C'est une source de matière grasse qui peut être utilisée en tant que complément énergétique. Elle contient 12% d'acides gras saturés et 88% d'acides gras insaturés (Grant et Kubik., 1990; Khallouki et coll., 2003).

Plusieurs recherches ont été menées sur les ruminants pour étudier l'effet *in vitro* de l'huile de tournesol sur la méthanogénèse ruminale. Jouany et coll. (2008) ont rapporté, par des études *in vitro* sur le jus de rumen, que l'association de l'acide malique à l'HT réduit significativement la production de méthane, tandis que chacun de ces composés utilisé séparément n'a eu aucun effet. Nos résultats obtenus *in vivo* sur les vaches laitières supplémentées de 200 ml d'huile de tournesol dans la ration journalière ont montré une réduction des émissions de méthane chez les vaches laitières. Ce résultat concorde avec plusieurs travaux publiés (Machmuller et Kreuzer., 1999 ; Dohme et coll., 2000 ; McGinn et coll., 2004).En effet Beauchemin et McGinn (2006) ont rapporté que l'administration de l'huile de tournesol à raison de 45g/kg de matière sèche à des bovins en croissance recevant une ration basée sur le fourrage réduit les émissions de méthane de 11,5% à 22,0%. De plus, Benchaar (2005) a montré que l'HT a permis une réduction de méthane de 20 % chez les bovins de boucherie. Beauchemin et coll., (2007) ont réalisé une étude sur 16 génisses *Angus* et ont montré que les génisses ont réduit de 14 % leur production de méthane quand la ration a été supplémentée de 3% d'HT. Dans une autre étude, l'ajout de 5% de l'HT à la ration

alimentaire des vaches a permis de diminuer de manière significative le volume du gaz produit tout au long du processus de fermentation (Jordan et coll., 2006). C'est pour cette raison que nous avons effectué nos essais avec la dose de 3% d'HT.

Les résultats obtenus après ajout de 3% d'HT dans la ration des vaches laitières dans le présent travail ont montré une réduction de la production de méthane d'environ 8 %.Le pourcentage de réduction reste nettement inferieur aux réductions décrites dans la littérature. Toutefois, la matière grasse de la ration alimentaire destinée aux ruminants ne doit jamais dépasser 6 à 7% de la matière sèche, dans le cas échéant des perturbations de la fermentation et une diminution de la prise alimentaire peuvent se produire (Jordan et coll., 2006).

La réduction de la production de méthane par l'addition d'acides gras insaturés (AGI) a été attribuée à leur rôle d'accepteurs d'électrons au cours des voies métaboliques des glucides au niveau du rumen (Hegarty.,1999), diminuant ainsi la concentration d'hydrogène libre et, par conséquent, la dépression de la méthanogénèse (Johnson.,1995). Les acides gras insaturés (AGI) à forte concentrations au contraire peuvent exercer un effet toxique en limitant la méthanogénèse en inhibant les micro-organismes producteurs (protozoaires, bactéries cellulolytiques) et/ou les utilisateurs de l'hydrogène ruminal tels que les archaebactérie. En effet, les acides gras alimentaires empêchent l'attachement des bactéries cellulolytiques sur les particules d'aliment, ce qui réduit leur efficacité.

4.1.2) Effet du NP RUMEN sur la réduction de méthane entérique chez les bovins

A ce jour, très peu d'études ont été menées pour tester *in vivo* l'effet de l'addition des HE ou de leur CM sur la réduction de la production de méthane chez les bovins.

Dans le présent travail, réalisé *in vivo,* sur cinq vaches laitières, l'ajout de 50 g du produit NP RUMEN à base de CM d'HE à la ration a permis une réduction significative d'environ 12% des émissions de méthane. Il est difficile de comparer nos résultats avec ceux rapportés par d'autres auteurs du fait de la différence des techniques utilisées pour mesurer l'émission de gaz et les doses des CM d'HE ajoutées aux rations alimentaires.

Evans et Martin (2000) ont rapporté que les composés majoritaires des HE sont des inhibiteurs puissants du méthane et ils ont suggéré que cela est probablement dû à une forte activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram-positif, à Gram négatif et les bactéries productrices de méthane. Cette activité antimicrobienne est expliquée par le fait que les HE sont constitués de molécules lipophiles capables de pénétrer la double couche phospholipidique et provoquer des perturbations du transport membranaire des substances nutritives (Ultee et coll., 1999). Hart et coll., (2008) ont rapporté que l'utilisation de concentrations élevées d'HE peut être derrière une inhibition totale de la population

microbienne du rumen. Toutefois, selon d'autres auteurs (Szumacher-Strabel et coll., 2010), l'effet des HE dépend de la quantité et de la composition des huiles utilisées. L'activité anti-méthanogénique des HE est plus prononcée avec les CM de certaines HEs tels que le thymol, le carvacrol, le cinnamaldéhyde et l'eugénol qu'avec les extraits de plantes (Macheboeuf et coll., 2008).

Il faut noter que l'action des HE dépend aussi de la nature des microorganismes ciblés. Les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'action des HE à composés phénoliques que les bactéries à Gram négatif et ceci en raison de la présence d'une membrane externe chez les bactéries à Gram négatif qui représente une barrière capable de diminuer la perméabilité des composés lipophyles (Calsamiglia et coll., 2007). Ainsi, les molécules à faible poids moléculaire comme le thymol peuvent traverser cette barrière (Dorman et coll., 2000). Comme l'action anti-méthanogéne dépend de la concentration des HE utilisées, celle ci ne doit pas être élevée car la méthanogénèse est une voie métabolique essentielle dans l'élimination de l'hydrogène ruminal. Il est admis qu'une réduction allant jusqu'à 20% du méthane digestif ne perturbe pas les fonctions digestives ou fermentaires essentielles du rumen (Martin et coll., 2006).

4.2 Effet dose-réponse de l'administration de l'additif alimentaire NP RUMEN sur la réduction du méthane entérique chez les bovins

La production de méthane mesurée chez les 5 vaches non supplémentées de NP RUMEN (témoin) était d'une valeur moyenne 195.86 L /j, qui est largement inférieure aux valeurs rapportées dans la littérature. Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que les cinq vaches ont été non gestantes et avec une production laitière faible. En effet, Vermol et coll (2008) ont rapporté que le facteur d'émission du méthane augmente linéairement avec la production laitière.

Au niveau individuel, nous avons noté une différence importante dans la production du méthane chez les 5 vaches. Cette variabilité individuelle de la production de méthane pourrait être attribuée aux caractéristiques de l'appareil digestif de l'animal comme cela a été confirmé par Boad et wittenberg (2002). Le comportement alimentaire, le temps de séjour de l'aliment dans le rumen, la salivation, et le profil microbien du rumen jouent un rôle dans la variabilité des valeurs notées chez les 5 vaches.

4.2.1) Production de méthane après ajout de 50 et 100 g de l'additif NP RUMEN

Des études ont rapportés que les huiles essentielles ont la capacité de réduire le méthane entérique. (Evans et martin., 2000 ; Chaves et coll., 2008 ; Macheboeuf et coll., 2008). Evans et martin (2000) ont rapporté dans une étude *in vitro* qu'une réduction de 93% de la production du méthane a été obtenue après utilisation d'une dose de thymol de 400 µg/L de jus de rumen. Les résultats obtenus dans le présent travail réalisé *in vivo* ont montré que l'ajout du produit NP RUMEN engendre une réduction significative de la production de méthane, d'environ 21% lorsque le produit a été ajouté à la dose de 50g /tête /par jour, et d'environ 31% lorsque la dose a été doublée (100g/tête/jour).

Il est très difficile de comparer nos résultats avec ceux rapportés dans la littérature pour deux raisons principales :

- La première, est que la plupart des études décrites dans la littérature ont été réalisées *in vitro*, et les systèmes *in vitro* les plus utilisés reproduisent imparfaitement les processus physiologiques de fermentation dans le rumen. En effet, la motilité et l'aspect normal des microorganismes du rumen surtout les protozoaires, l'intensité de la fermentation, les secrétions, les absorptions dans le rumen et la sécrétion salivaire ont une certaine importance (Warner., 1956). Selon Beauchemin et coll (2009), la plupart des concentrations qui induisent une réduction de la fermentation *in vitro* sont trop élevées pour une application *in vivo*.
- La deuxième raison est que le rendement et la composition des huiles essentielles varient selon plusieurs facteurs tels : l'environnement (température, salinité, pluviosité...), la période de récolte, la composition même de la plante et la technique d'extraction.

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que l'effet dépressif du NP RUMEN sur la production de méthane est lié principalement à la concentration utilisée. En se basant sur ces résultats, le NP RUMEN que nous avons testé ne doit pas été incorporé à une dose supérieure à 100g /tête/jour, pour prévenir une éventuelle perturbation des fonctions digestives et fermentaires de l'animal.

4.3 Effet de l'administration de l'additif NP RUMEN en comparaison avec un additif commercial le Turboviv sur la réduction de méthane entérique chez les bovins

Plusieurs études ont rapporté l'effet dépressif des huiles essentielles sur la production du méthane *in vitro* .Certaines huiles essentielles se sont avérés efficaces pour supprimer la production totale jusqu' à 94% (Chaves et coll., 2008 ; Macheboeuf et coll., 2008 ; Patra et Saxena., 2010 ; Patra., 2011) D'autres huiles essentielles ont montré un effet significatif sur la diminution de la production de méthane de 20 à 60% (Benchaar et coll.,2007 et 2008 ; Patra.,

2011). Plusieurs HE et leurs CM ont été étudiées : le thymol (thym), le carvacrol (origan), l'eugénol (clou de girofle, la cannelle), le cinnamaldéhyde (cannelle), l'anéthol (anis, fenouil) et les huiles de menthe poivrée (Calsamiglia et coll., 2007 ; Benchaar et coll., 2008 ; Benchaar et Greathead., 2011). Benchaar et coll (2011) ont rapporté une réduction *in vitro* de 32% de méthane, avec une dose de thymol de 300 mg / litre du milieu de culture.

Les résultats obtenus dans le présent travail réalisé *in vivo*, ont montré que l'ajout du produit NP RUMEN à la ration alimentaire a engendré une réduction significative de la production de méthane d'environ 12%, lorsque le produit a été ajouté à une dose de 100g par tête et par jour. L'addition du produit Turboviv® à base de cannelle, à la ration alimentaire a engendré une réduction significative de la production de méthane d'environ 9%, lorsque le produit a été ajouté à une dose de 100g /tête et par jour.

L'aldéhyde cinnamique (cinnamaldéhyde) est le composant majeur des huiles essentielles de l'écorce de cannelle. Il représente 60 à 80% de sa composition (Màthé., 2009 ; Calsamiglia et coll., 2007). Il est connu par son effet dépressif sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Ouattara et coll., 1997 ; Helander et coll., 1998 ; Smith-Palmer et coll.,1998). L'étude de Macheboeuf et coll. (2008) sur les effets de l'HE de l'écorce de cannelle et de son principal composant, le cinnamaldéhyde, sur la méthanogénèse ruminale *in vitro*, a montré que la dose de cinnamaldéhyde 132 mg/L du milieu de culture n'a aucun effet sur la production de CH_4. A la dose de 264mg/l la production de CH_4 est légèrement diminuée (13%). A la dose de 396 mg/L, la production de CH_4 est diminuée de 19%, ce qui indique qu'à des doses élevées, le cinnamaldéhyde pourrait inhiber complètement le métabolisme microbien ruminal ce qui n'est pas bénéfique pour l'animal.

En revanche, Ces résultats sont contradictoires avec les résultats de Busquet et coll. (2006), qui ont constaté que la diminution de la production de CH_4 *in vitro* est plus importante avec le cinnamaldéhyde qu'avec l'huile de cannelle.

Afin d'expliquer cette variation entre l'effet de cinnamaldéhyde seul et l'effet d'HE de l'écorce de cannelle, Macheboeuf et coll. (2008) ont suggéré que, bien que le cinnamaldéhyde soit le principal composant actif de l'huile d'écorce de cannelle, d'autres composants présents à des concentrations faibles peuvent interagir avec le cinnamaldéhyde. En effet, l'HE de d'écorce de cannelle contient également jusqu'à 80 g/kg d'eugénol (Davidson et Naidu., 2000). Cependant, la synergie entre le cinnamaldéhyde et l'eugénol a été également rapportée par (Burt., 2004) ; ce qui Pourrait expliquer l'activité antiméthanogène plus prononcée de l'HE d'écorce de cannelle par rapport au cinnamaldéhyde seul.

Troisième partie

Evaluation de l'effet de l'addition du NP RUMEN à la ration de base sur les performances zootechniques chez les ruminants

1. Introduction

Face à une population sans cesse croissante, la demande accrue en protéines animales est confrontée à plusieurs défis. Les animaux en élevage intensif subissent souvent un grand stress physiologique et métabolique (Ghazi et Niar, 2011). La faible productivité zootechnique des élevages bovins est le résultat de plusieurs facteurs en relation avec l'alimentation, et la conduite de l'élevage (Ghazi et Niar, 2011 ; Djermoun et Chehat, 2012). Le problème majeur que rencontre la production de viande et du lait est lié à l'alimentation du bétail qui constitue la première source de dépenses pour les éleveurs (Madani, 2000).

Pour pallier à ces contraintes et potentialiser les performances de l'animal, le recours à l'utilisation de fourrages secs et de concentrés, sous forme de ration sèche constitue une alternative nécessaire. Néanmoins, cette option peut augmenter les risques des troubles digestifs dans le rumen et la chute du taux butyreux du lait chez la vache laitière (Martin et coll., 2006). La nécessite d'utilisation d'additifs alimentaires dans la ration de base pour équilibrer ces troubles digestives et métaboliques s'impose dans le but d'augmenter les performances zootechniques des élevages laitiers et d'engraissement intensifs (Brunschwig et coll., 2009).

Le présent travail a été mené dans les conditions marocaines pour évaluer l'effet de l'incorporation de l'additif NP RUMEN sur les performances de production chez les ruminants.

Dans ce contexte l'objectif de cette partie du travail consiste à tester *in vivo :*

- L'efficacité de l'additif NP RUMEN en comparaison avec le Turboviv sur la production laitière.
- L'efficacité de l'additif NP RUMEN sur l'évolution du poids et le gain moyen quotidien (GMQ) chez les ovins.
- L'efficacité de l'additif NP RUMEN sur le poids, le GMQ, le pH, et le potentiel redox du liquide ruminal chez les bovins.

2. Matériel et méthodes :

2.1 Effet de l'additif NP RUMEN sur la production laitière chez les bovins

2.1.1) Animaux

Un essai expérimental a été réalisé sur 9 vaches laitières de race Holstein dans une ferme de la région de Fès. Ces vaches non gestantes et en lactation, ont été préalablement soumises à un examen clinique complet au début de l'expérimentation.

Vache	Age (années)
V1	5
V2	5
V3	4.5
V4	6
V5	5
V6	6
V7	4.5
V8	5
V9	6

Tableau 15 : Age des animaux utilisés dans l'expérimentation

2.1.2) Rationnement

Lors de notre expérimentation qui a duré 45j, les vaches ont reçu quotidiennement une ration alimentaire composée de 5kg de concentré industriel, 5kg de foin de luzerne et 2kg de paille de blé. L'eau a été fournie *ad libitum*, et l'alimentation a été distribuée en deux repas par jour.

2.1.3) Protocol expérimental

Les neuf vaches laitières ont été reparties en 3 lots (à raison de 3 vaches/lot).

- Lot 1 : lot témoin ayant reçu une ration standard.
- Lot 2: lot ayant reçu la ration standard additionnée de 100g/tête/jour de l'additif commercial TURBOVIV (additif commercial à base de cannelle utilisé pour augmenter la production laitière) durant les 45 jours de l'expérimentation.
- Lot 3 : lot ayant reçu la ration standard additionnée de 100 g /tête/jour de l'additif NP RUMEN durant les 45 jours de l'expérimentation.

La production laitière individuelle quotidienne, a été mesurée à 8h du matin et à 16h l'après-midi durant les 45 jours de l'expérimentation. Un suivi de l'état de santé des vaches a été effectué durant la période de l'expérimentation.

2.2 Effet de l'additif NP RUMEN sur la persistance de lactation chez les vaches laitières pendant la phase de décroissance de lactation

2.2.1) Animaux

L'essai a été conduit sur 30 vaches Holstein en stade de décroissance de lactation (entre 140j et 170j après le vêlage), Ces vaches, non gestantes étaient en bonne santé.

2.2.2) Rationnement

Lors de notre expérimentation qui a duré 60 j, les vaches ont reçu quotidiennement une ration alimentaire standard composée d'ensilage de maïs, de foin d'avoine, d'aliment composé VL 2,5 et de paille. L'eau a été fournie *ad libitum*. L'alimentation a été distribuée en deux repas par jour à (8h et à 15h).

2.2.3) Protocole expérimental

Les 30 vaches ont été réparties en deux lots de quinze vaches.

L'essai s'est déroulé en deux phases : une première phase pré-expérimentale de 30j où les deux lots recevaient la ration standard seule. Une deuxième phase expérimentale de 30 j où le lot 2 reçoit en plus de la ration standard, 75 g/vache/jour de l'additif NP RUMEN.

- LOT 1 : lot témoin alimenté seulement avec la ration standard (n=15)
- LOT 2 : lot d'essai alimenté avec la ration standard + 100g /tête/jour du NP RUMEN. (n=15)

La quantité de lait produite a été notée après chaque traite tous les jours, matin et soir durant les deux périodes de l'essai. La persistance de la lactation est calculée en pourcentage de production d'un mois sur celui du mois précédant.

2.3 Effet de l'additif NP RUMEN sur l'évolution du poids et le gain moyen quotidien (GMQ) chez les ovins

2.3.1) Animaux

L'essai a été conduit sur un troupeau de 30 agneaux âgés de 6 mois en période d'engraissement, pour évaluer l'effet de l'additif NP RUMEN sur l'évolution du poids, et sur le gain moyen quotidien pendant 30 jours.

2.3.2) Rationnement

Pour ces agneaux, la ration journalière est composée de 0.5 kg d'orge, 0,25 kg de pulpe de luzerne et 0.5 kg de tourteau de tournesol distribuée en 2 repas/j. L'eau est fournie *ad libitum*.

2.3.3) Protocole expérimental

Le troupeau a été reparti en 2 lots de quinze agneaux chacun :

- Lot 1 : reçoit la ration journalière sans additif. (n=15)
- Lot 2: reçoit la ration journalière avec 10 g /tête du NP RUMEN. (n=15)

Les animaux ont été pesés avant le début de l'expérimentation puis tous les 15 jours durant la période de l'essai qui a duré 30j.

2.4 Effet de l'additif NP RUMEN sur les performances zootechniques et les indicateurs biochimiques du rumen chez les bovins

Une étude s'étalant sur une période de 90 jours dans une entreprise agricole spécialisée dans l'engraissement des taurillons a été réalisé afin de tester l'effet de l'additif NP RUMEN sur les performances de production (poids moyen, GMQ) de deux races bovines, la *Prim' Holstein* et la race *Aubrac.*

2.4.1) Animaux

L'expérimentation a été réalisée sur un effectif de 120 taurillons, âgés de 10 à 12 mois , dont 60 sont de race *Prim' Holstein* et d'un poids vif moyen de 370 kg. Les 60 autres taurillons de race *Aubrac,* avaient un poids vif moyen de 468 kg.

2.4.2) Rationnement

La ration alimentaire des taurillons était à base d'ensilage de maïs, de pulpe de betterave surpressée (PBS), de déchets de biscuits, d'un aliment composé industriel, de paille, de bicarbonate de sodium, d'un supplément protéique, de matière grasse d'origine végétale et de complément minéral vitaminé (CMV). Cette ration à été administrée deux fois/jour pour les taurillons des deux races.

2.4.3) Protocole expérimental

Les taurillons ont été répartis en 4 lots comme suit:

- Lot 1 : lot témoin des taurillons de race *Prim' Holstein* alimenté avec la ration standard seulement. (n=30)
- Lot 2 : lot d'essai des taurillons de race *Prim' Holstein* alimenté avec la ration standard + 100g/tête/jour du NP RUMEN. (n=30)
- Lot 3 : lot témoin des taurillons de race *Aubrac* alimenté avec la ration standard seulement. (n=30)
- Lot 4 : lot d'essai des taurillons de race *Aubrac* alimenté avec la ration standard + 100g /tête/jour du NP RUMEN. (n=30).

Les animaux ayant reçu la ration supplémentée d'additif alimentaire NP RUMEN durant une période d'adaptation, étalée sur deux semaines, ont été pesés individuellement à J15. Ensuite, la pesée individuelle a été effectuée toutes les deux semaines à l'aide d'une bascule à

affichage électronique. Le poids moyen et le gain moyen quotidien des taurillons ont été calculés.

2.4.4) Indicateurs biochimiques du jus rumen

A-Mesure du pH ruminal

Après une période 45jours d'alimentation des taurillons au régime alimentaire additionné de NP RUMEN, des prélèvements du jus de rumen ont été effectués au hasard sur les 12 animaux de chaque lot. Le prélèvement a été effectué 5h après la distribution du repas matinal, à l'aide d'une sonde oesophagienne, munie d'une pompe à prélèvement. Une quantité de 200 ml du jus de rumen a été récupérée, après élimination des premiers jets évacués. Après prélèvement et séparation des particules alimentaires de la phase liquide, par filtration, le pH du jus de rumen a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre (photo 4).



Photo 4: pH-mètre pour mesure du pH du jus de rumen

B- Potentiel redox

La mesure du potentiel redox est l'un des critères indicateurs de l'activité microbienne ruminale. Le potentiel redox a été estimé par le test au bleu de méthylène: 2 tubes de 20 ml sont remplis de jus de rumen. 1 ml de bleu de méthylène à 0,03% est ajouté à l'un des deux tubes, l'autre sert de témoin. Ensuite, le temps nécessaire au tube additionné de bleu de méthylène pour le retour à une coloration identique est mesuré puis comparé à celui du tube témoin. Il persiste toujours un anneau coloré à l'endroit de contact avec l'oxygène de l'air.

2.4.5) Traitement statistique

Les résultats obtenus ont été soumis à une analyse statistique par comparaison des moyennes des valeurs relevées chez les animaux traités par rapport aux témoins non traités en utilisant le

test T de Student. L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel statistique SPSS avec un seuil de significativité de 5%.

3. Résultats

3.1 Effet de l'additif NP RUMEN sur la production laitière chez les bovins

3.1.1) Evolution de la production laitière

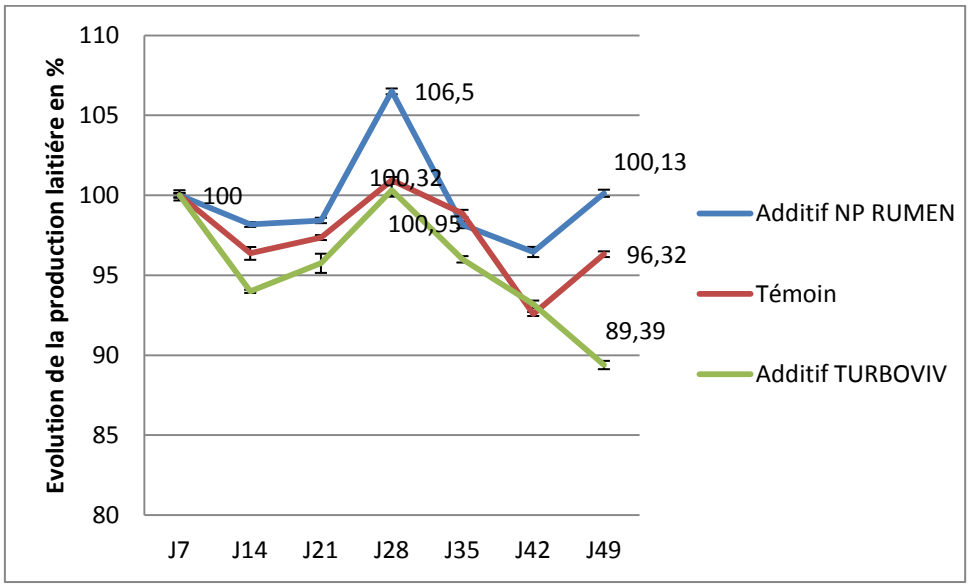

Figure 28: Evolution de la production laitière des 3 lots de vaches supplémentés durant la période expérimentale

Les résultats présentés sur la figure 27 montrent que l'évolution de la production laitière est similaire pour les 3 lots de l'expérimentation durant la période de mesure avec une tendance à la baisse durant la première semaine puis une légère élévation pour atteindre un pic vers la troisième semaine de (J28). Une augmentation importante de la production laitière à été observée chez le lot de vaches ayant reçu 100g de l'additif NP RUMEN à J28.

Chez les vaches ayant reçu 100 g de l'additif TURBOVIV, nous avons enregistré une diminution de production laitière par rapport au lot témoin vers la fin de la période expérimentale (J49).

Ration d'essai	**lot 1 (témoin) (n=3)**	**lot 2(100g d'additif NP RUMEN) (n=3)**	**lot 3 (100g d'additif TURBOVIV) (n=3)**
Quantité moyenne de lait produite en L/vache laitière/jour	19 ± 0.39	21 ± 0.40*	17.1 ± 0.61

Tableau 16 : Production laitière moyenne des vaches durant les 45 jours de l'expérimentation

****: p<0.05: différence significative par rapport au lot témoin***

Les résultats du tableau 16 montrent une moyenne de production de lait par les vaches laitières ayant reçu 100g de l'additif NP RUMEN de 21 L, donc significativement supérieure

à celle du lot témoin. Chez le lot ayant reçu le TURBOVIV, On note une diminution non significative de production moyenne de lait par rapport au lot témoin.

3.2 Effet du NP RUMEN sur la persistance de lactation chez les vaches laitières pendant la phase de décroissance de lactation

3.2.1) Mesure de la production laitière des vaches

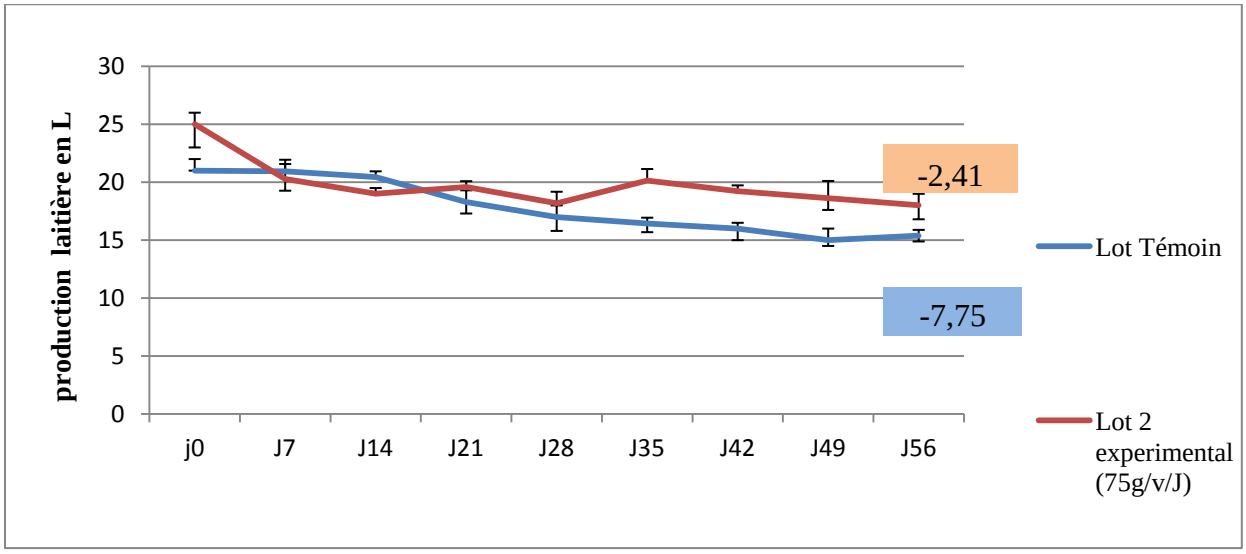

Figure 29 : Evolution de la production laitière des vaches durant la période de l'essai

	Quantité moyenne de lait en L/j durant la période pré-expérimentale	Quantité moyenne de lait en L/j durant la période expérimentale	% de réduction de la production laitière
Lot 1 témoin (n=15)	19, 3 ± 2,10	17,8 ± 1,46	-7,75 %
lot 2 (n=15)	20,7 ± 1,8	20,2 ± 2,64	-2,41 %

Tableau 17: Quantité moyenne de production laitière en L/vache/J pendant les deux périodes expérimentales

Les résultats de la figure 28 et du tableau 17 montrent que le lot témoin a enregistré une baisse de 7,75% de la production laitière durant la période expérimentale qui coïncide avec la phase de décroissance de lactation. Chez le lot 2 ayant reçu l'additif NP RUMEN, nous avons enregistré une très légère baisse de la production laitière journalière durant la période de l'expérimentation (30jours).

3.2.2) Mesure de coefficient de persistance de la lactation

	Lot (Témoin)	**Lot (supplémenté de 100g de NP RUMEN)**
Coefficient de persistance(CP)	0,92	0,98

Tableau 18 : Coefficient de persistance de la lactation durant l'essai

Les résultats du tableau 18 montrent une persistance de la production laitière chez les vaches du lot ayant reçu l'additif NP RUMEN pendant la phase de décroissance de lactation. Le coefficient de persistance de 0,98 est supérieur à la valeur enregistrée chez le lot témoin 0,92

3.3 Effet de l'additif NP RUMEN sur l'évolution du poids moyen et sur le gain moyen quotidien (GMQ) chez les ovins

La mesure de poids des agneaux est effectuée toutes les deux semaines durant toute la durée de l'expérimentation qui est de 30j.

Période d'essai	**J15**	**J30**
Pourcentage du Gain de poids moyen du lot témoin (%) (n=15)	2,41±0.34	3,92±0,49
Pourcentage du Gain de poids moyen du lot traité au NP RUMEN (%) (n=15)	4,48±0,88	16,99± 4,24*

Tableau 19: Pourcentage du Gain de poids moyen des agneaux durant la période d'essai (30j)

****: p<0.05: différence significative par rapport au lot témoin***

Le tableau 19 montre une augmentation du pourcentage de poids moyen des agneaux de J15 puis à J30. Les résultats du tableau montrent que le lot supplémenté au NP RUMEN a enregistré une augmentation significative du gain de poids moyen des agneaux de 16,99% par rapport au lot témoin.

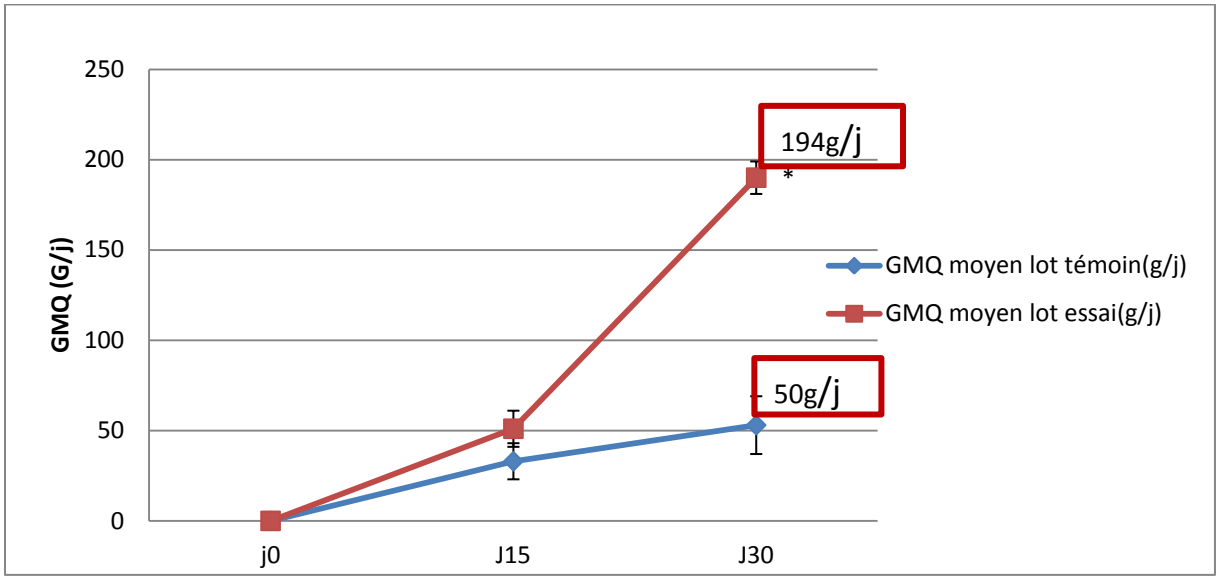

Figure 30: Gain de poids moyen quotidien des agneaux pendant la période d'essai d'engraissement. *: p<0.05: différence significative par rapport au lot témoin

D'après les résultats de la figure 29 l'addition de 10g de l'additif NP RUMEN à la ration alimentaire journalière des agneaux a eu un effet significatif sur l'augmentation du gain quotidien moyen de 194g/j par rapport au lot témoin à J30.

3.4 Effet de l'additif NP RUMEN sur les performances zootechniques et les indicateurs biochimiques du jus de rumen chez les taurillons

3.4.1) Mesure du poids moyen et du gain moyen quotidien des taurillons

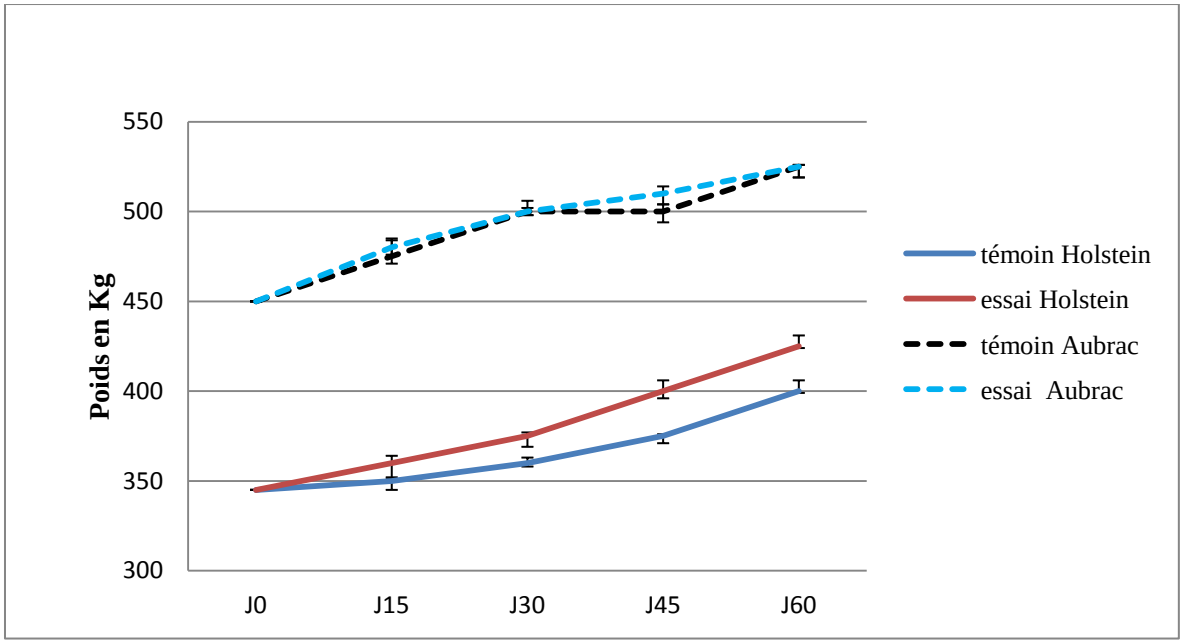

Figure 31 : Evolution du poids chez les taurillons des 4 lots supplémentés de 100 g de NP RUMEN durant la période expérimentale

	Race Holstein (n=60)		Race Aubrac n=60)	
	Lot Témoin (n=30)	**Lot supplémenté de NP RUMEN (n=30)**	**Lot Témoin (n=30)**	**Lot supplémenté de NP RUMEN (n=30)**
Poids moyen en kg	337,73 ± 8,83	367,5 ± 8,48*	490,96 ± 10,46	490,33 ± 9,26
Gain moyen quotidien moyen (kg/j)	1,19 ± 0,04	1,24 ± 0,07	0,99 ± 0,04	0,93 ± 0,03

Tableau 20: Performances moyennes (Poids moyen, GMQ) réalisées par les lots, témoin et supplémenté de NP RUMEN chez les taurillons Aubrac et Prim' Holstein sur la période globale de l'essai (90j). *: $p<0.05$: différence significative par rapport au lot témoin

A partir des résultats présentés sur la figure 30 et le tableau 20, Le NP RUMEN incorporé à la dose de (100g/animal/jour) dans la ration des lots expérimentaux a donné un gain moyen quotidien significativement plus élevé chez les taurillons *Prim' Holstein* ($p<0,05$) par rapport aux témoins non supplémentés. En revanche le poids moyen des taurillons de la race Aubrac n'a pas changé sous l'effet du NP RUMEN à la dose de 100g/j/tête.

3.4.2) Mesure du pH ruminal des taurillons

	Race Holstein (n=60)		Race Aubrac (n=60)	
	Lot Témoin (n=30)	**Lot supplémenté de NP RUMEN (n=30)**	**Lot Témoin (n=30)**	**Lot supplémenté de NP RUMEN (n=30)**
pH moyen	6,58 ± 0,20	7,31 ± 0,76*	6,75 ± 0,69	6,86 ± 0,76

Tableau 21: Effet de l'addition du NP RUMEN sur le pH du jus de rumen.*: $p<0.05$: différence significative par rapport au lot témoin

Les résultats montrent que l'addition du NP RUMEN dans la ration des taurillons de race *Aubrac* n'a pas modifié statistiquement le pH ruminal par rapport au lot témoin (lot traité 6,86 ± 0,76 *vs* 6,75 ± 0,69 pour le lot témoin). Cependant, chez les taurillons de race *Prim' Holstein* le pH a augmenté significativement sous l'effet du NP RUMEN

3.4.3) Mesure du potentiel redox du jus de rumen des taurillons

	Race Holstein (n=60)		Race Aubrac (n=60)	
	Lot Témoin (n=30)	**Lot supplémenté de NP RUMEN(n=30)**	**Lot Témoin (n=30)**	**Lot supplémenté de NP RUMEN (n=30)**
Potentiel redox (temps de réduction en minutes)	7,71 ± 3,10	16,09 ± 10,00*	13,28 ± 6,06	10,03 ± 6,78

Tableau 22 : Effet de l'addition du NP RUMEN sur le potentiel redox du jus de rumen.

****: p<0.05: différence significative par rapport au lot témoin***

Les résultats du tableau 22 montrent une augmentation significative du temps nécessaire au retour du jus de rumen testé à sa coloration normale chez le lot des Taurillons *Holstein*. Ce qui montre que le NP RUMEN diminue l'activité microbienne de la flore ruminale des taurillons *Prim' Holstein.* Cet effet est non significatif chez la race *Aubrac.*

4. Discussion

4.1Effet de l'additif NP RUMEN sur la production laitière chez les bovins

Chez les ruminants laitiers, le volume quotidien de lait produit est déterminé par la qualité de la digestion des aliments ingérés (Banchereau et coll., 2005). Il est en particulier important que la dégradation ruminale des matières organiques (protéines et amidon) soit optimale, de manière à favoriser une dégradation au niveau de l'intestin grêle qui permet l'optimisation du profil protéique de la ration. Une telle orientation de la dégradation au niveau de l'intestin grêle, assure ainsi une optimisation du volume de lait produit (Banchereau et coll., 2005).

Les vaches des 3 lots de l'essai ont ingéré la même quantité d'aliment durant toute l'expérimentation. La production laitière chez les vaches ayant reçu NP RUMEN à raison de 100g/tête/jour a augmenté d'une moyenne de 10 % par rapport au lot témoin. Ce résultat est conforme à celui rapporté par Kung et coll., (2008).Ces auteurs ont supplémenté la ration des vaches de leur expérience d'un mélange contenant le thymol, l'eugénol, la vanilline et le limonène à raison de 1,2 g /vache/jour pendant 9 semaines . Les vaches qui ont reçu cet additif ont produit entre 0,4 et 2 litres/j de lait en plus.

Les extraits de plantes et leurs composés actifs ont des effets sur la dégradation des protéines et l'absorption des acides gras volatils (AGV) chez la vache laitière (Moynat et coll., 2010). La qualité et la quantité de lait produites par les vaches laitières sont influencées par l'augmentation des AGV produits lors de la fermentation ruminale (Busquet et coll., 2006). Moynat et coll. (2010) ont démontré que l'ajout de l'eugénol à la ration des bovins a fait augmenter les AGV totaux de 12% et la proportion de l'acide propionique de 24% et a fait baisser la concentration en méthane de 18%.

Dans notre étude, les vaches qui ont reçu l'additif commercial Turboviv à raison de 100g/tête/jour ont montré une diminution de la production laitière par rapport à celle ayant reçu 100g de l'additif NP RUMEN. Ceci peut être dû à un surdosage de ce produit. Ce dernier contient de l'aldéhyde cinnamique (cinnamaldéhyde) et qui représente 60 à 80% de sa composition. En effet, l'étude de Macheboeuf et coll., (2008) sur les effets de l'HE de l'écorce de cannelle et son principal composant, le cinnamaldéhyde, sur la méthanogénèse ruminale *in vitro*, a montré qu'à la dose de 661 mg/l il y a une réduction de 60% de la concentration des AGV. Des diminutions de l'ordre de 55% de l'acétate, et de l'acide propionique de 92% ont été constatées. Ceci indique qu'à des doses élevées, l'activité antimicrobienne du cinnamaldéhyde pourrait inhiber complètement le métabolisme microbien ruminal, et affecter par conséquent la production laitière.

L'augmentation de la production laitière chez les vaches qui ont reçu le NP RUMEN peut s'expliquer par une bonne utilisation de l'énergie produite lors de la fermentation ruminale. Le NP rumen peut agir directement sur le microbiote ruminal en minimisant les pertes sous forme de méthane comme nous l'avons montré *in vitro* lors de la deuxième partie de ce travail, et en favorisant la formation de propionate et de butyrate nécessaires pour la synthèse et la production du lait (Busquet et coll.,2006).

4.2 Activité de l'additif NP RUMEN sur la persistance de lactation chez les vaches laitières pendant la phase de décroissance de lactation

La production du lait évolue au cours d'une lactation suivant un cycle régulier chez toutes les vaches laitières. La production journalière s'accroît pendant les premières semaines qui suivent le vêlage. Elle passe par un maximum à une date variable selon les animaux, puis diminue progressivement jusqu'au tarissement (Boujnane., 2010).La courbe de lactation est caractérisée par deux phases inégales: Une phase ascendante qui va du vêlage jusqu'au pic de lactation. Sa durée est en moyenne de 3 à 8 semaines et une phase décroissante qui va du pic de lactation jusqu'au tarissement d'environ 300 jours. L'évolution de la production laitière au cours de la lactation est attribuée à l'augmentation durant la phase ascendante du taux de sécrétion de lait qui est partiellement en rapport avec le débit de lait dans la mamelle, et pendant la phase décroissante à la mort des cellules sécrétoires les unes après les autres, ainsi qu'à l'effet inhibiteur de la gestation qui va suivre (Boujnane., 2010).

La production laitière dépend de la persistance qui exprime la capacité de la glande mammaire à maintenir un niveau de production laitière constant après le pic de lactation. La persistance est calculée comme le pourcentage de la production d'un mois sur celle du mois précédant. Elle est en moyenne de 94 %. Les résultats que nous avons obtenus après incorporation de 75g /tête /jour du NP RUMEN dans la ration des 15 vaches ont montré un faible pourcentage de réduction de la production laitière de 2,33 % par rapport à la phase pré expérimentale sans additif où le pourcentage de réduction était de 7,65 %. Ceci se traduit par une persistance de production laitière supérieure au coefficient de persistance normal qui est de 0.98. Ceci montre l'effet du NP RUMEN sur la persistance de la production laitiére.

En effet la persistance de lactation est influencée par plusieurs facteurs. Parmis lesquels l'addition de compléments nutritionnels. Les vaches élevées dans de bonnes conditions ont des persistances de lait plus élevées que celles entretenues dans de mauvaises conditions. De même une faible persistance peut être due à un déficit de la ration en énergie ou en nutriments. Elle peut être aussi due au stress thermique durant les périodes de grande chaleur

l'été. Toutefois, l'étude de la persistance est donc importante durant la période qui va du pic de lactation à 120 jours après la saillie ou l'insémination fécondante (Boujnane., 2010).

4.3 Effet de l'additif NP RUMEN sur l'évolution du poids et le gain moyen quotidien (GMQ) chez les ovins

La supplémentassions de la ration de base des agneaux avec 10g /tête/jour de NP RUMEN a donné une augmentation significative du poids moyen de 16,99%, et du gain moyen quotidien des agneaux de 194 g/j du lot d'essai. Ceci corrhobore avec le résultat rapporté par Blanlu et coll. (2002) qui ont mis en place un essai pour tester un produit à base de principes actifs d'HE et son effet sur l'amélioration de l'état général, et du gain de poids des brebis (gestantes et en lactation) et de leurs agneaux. Les résultats de cet essai ont révélés des différences significatives du gain moyen quotidien (GMQ) entre les agneaux témoins et ceux supplémentés par l'additif à base d'HE.

Plus récemment, Pomport et coll. (2016) ont montré que l'ajout d'additifs à base d'huiles essentielles et d'extraits naturels de plantes, dans l'alimentation des agneaux de boucherie améliore les performances de croissance et augmente le rendement énergétique de la ration. Il permet ainsi d'obtenir des agneaux plus lourds à l'abattoir et de diminuer la durée d'engraissement. Ceci explique pourquoi le produit NP RUMEN que nous avons utilisé a donné un aussi bon résultat chez les ovins.

4.4 Effet de l'additif NP RUMEN sur les performances de production et les indicateurs biochimiques du rumen chez les taurillons

4.4.1) Gain de poids et Gain Moyen Quotidien

Les performances de production, en terme de gain moyen quotidien des taurillons des deux race *Prim' Holstein et Aubrac* ont été mesurés avant et après incorporation de 100g/tête/jour de NP RUMEN dans la ration. L'étude statistique de nos résultats n'a montré aucun effet significatif du NP rumen sur le poids moyen et le GMQ des lots des taurillons *Aubrac* par rapport au lot témoin. Ces résultats s'accordent avec ceux rapportés par Benchaar et coll. (2006) qui ont évalué les performances de croissance des bovins, nourris par un régime à base d'ensilage de maïs et complété par un mélange commercial d'huiles essentielles composé de thymol, d'eugénol, de vanilline et de limonène à raison de 4g/jour. Leurs résultats n'ont montré aucun effet de l'additif sur le poids et le GMQ des bovins.

Au contraire chez les taurillons *Prim' Holstein* supplémentés de NP rumen, nous avons noté une augmentation de poids moyen d'environ 9%. Le gain moyen quotidien GMQ a aussi augmenté d'environ 10%. Hardy et coll. (2006) ont aussi évalué les effets d'un mélange

spécifique d'huiles essentielles et d'extraits de plantes sur les performances de croissance des génisses. Les animaux supplémentés ont montré un GMQ supérieur de 9,2%. Après 2 mois de pâture, les performances de croissance des génisses supplémentées étaient supérieures de 10% par rapport à celles du groupe témoin.

Une autre étude réalisée par Lacombe et coll. (2015) a consisté à évaluer l'efficacité d'un additif phytogénique contenant des substances d'origine végétales(huiles essentiels et extraits végétaux) sur la croissance des veaux destinés à l'engraissement. Les veaux dont l'aliment d'allaitement et l'aliment de démarrage ont été supplémentés de cet additif ont présenté un poids et un GMQ plus élevés.

A la lumière de tous ces essais, on peut dire que nos résultats ont été souvent conformes avec certains travaux, déjà publiés dans ce contexte.

Le faite que le NP RUMEN aie un effet significatif sur les races Prim'Holstein et pas sur la race Aubrac pourrait s'expliquer par une prédisposition génétique différente à la réponse métabolique aux produits contenus dans le NP RUMEN. La dose administrée à la race *Aubrac* était probablement insuffisante pour engendrer un tel effet.

4.4.2) pH ruminal.

La chute du pH est un trouble métabolique majeur chez les ruminants qui nécessite un équilibrée alimentaire adéquat. Plusieurs recherches basés sur l'utilisation de CM d'huiles essentielles en supplementation dans la ration ont montré une efficacité a diminuer le pH ruminal en réduisant les bactéries amylolytiques et en limitant la dégradation des glucides (busquet et colle ;, 2006 ; benchaar et coll., 2003). La supplémentation de la ration alimentaire des taurillons de race *Prim' Holstein* avec100g/tête/jour du NP RUMEN montre une augmention significative du pH du jus de rumen qui passe de 6,58 à 7,31 par rapport au lot témoin. Cela est en accord avec les valeurs obtenues par Evans et Martin (2000) qui ont rapporté que 400 ppm du thymol ont augmenté le pH final dans des incubateurs de culture *in vitro* pendant 24h. De même, Benchaar et coll. (2003) ont signalé que le pH ruminal a été augmenté chez des vaches laitières dont la ration a été supplémentée par d'additif constitué d'un mélange de thymol, d'eugénol, de vanilline, et de limonène.

Quant aux taurillons de race *Aubrac*, la supplémentation de la ration par NP RUMEN a faiblement augmenté le pH (6,75) par rapport au groupe d'animaux témoins. Ce résultat est similaire à celui obtenu par Garcia-Gonzalez et coll. (2006) ; Bodas et coll. (2009) qui ont testé *in vitro* l'addition de 50 mg d'un additif à base d'extraits de plantes à la ration journalière des vaches laitières. Ceci n'a pas affecté le pH du jus de rumen après 24h de fermentation *in vitro*.

La différence des résultats de pH obtenus chez les 2 races peut être liée à plusieurs facteurs, notamment la dose utilisée qui est de l'ordre de 100g/jour. Cette dose serait probablement insuffisante pour entraîner des changements sur le pH ruminal des taurillons de race *Aubrac.* Cela est d'ailleurs confirmé par l'étude menée par Busquet et coll., (2006) qui ont rapporté qu'un mélange à base d'eugénol et de carvacrol n'a pas affecté le pH du jus de rumen des vaches laitières lorsque ce mélange à été incorporé *in vitro* aux concentrations de 3 et 30mg/l du milieu de culture. Cependant, l'addition de ce mélange aux concentrations plus élevées (300 et 3000mg/l du milieu de culture) a augmenté le pH, ce qui laisse suggérer qu'une dose suffisante est nécessaire pour avoir un tel effet sur le pH.

Le NP RUMEN pourrait prévenir le problème d'acidose qui perturbe le système enzymatique et métabolique chez les bovins à des niveaux pouvant entrainer la mort de l'animal. Il devrait être utilisé chez des bovins alimentés de régime hyper énergétiques riche en céréales ou à base d'ensilage de Maïs.

4.4.3) Potentiel redox

La mesure du potentiel redox est l'un des critères indicateurs de l'activité microbienne ruminale. Ce test permet de mesurer les capacités de réduction de la flore bactérienne (Rosenberger., 1981). En conditions normal le temps de décoloration du tube renfermant le bleu de méthylène doit être inferieur à 6 min. Le temps de réduction du bleu de méthylène par le jus de rumen d'animaux recevant des rations riches en aliments énergétiques (de 3-4 minutes), en fourrages (5-6 minutes).Avec une flore ruminal inactive ce temps est supérieur a 10 min (House, 1992).

L'incorporation du NP RUMEN dans la ration a fait augmenter le temps de réduction du bleu de méthylène par le jus de rumen chez les taurillons de race *Prim' Holstein de* 7,71 min à 16,09 min par rapport au lot témoin. Cela peut s'expliquer par la diminution de la flore microbienne, due à l'effet antibactérien de NP RUMEN sur la flore ruminale (Martin et coll., 2006 ; Milka., 2011). Chez les lots de la race Aubrac le NP rumen n'a pas eu d'effet significatif sur le potentiel redox du jus de rumen avec un temps de réduction de 13,28 min chez le lot témoin et 10,03 min chez le lot supplémenté de NP RUMEN. Ceci peut être liée à plusieurs facteurs, notamment la dose utilisée qui est de l'ordre de 100g/jour ou aux facteurs génétiques liée à la race.

Le facteur race a donc joué un rôle déterminant dans la variation des résultats du potentiel redox. En effet, Le NP RUMEN a amélioré le potentiel redox chez les animaux de race *Prim' Holstein*, ce qui confirme son effet antibactérien important sur la flore du rumen, toutefois cet effet reste dépendant de la dose utilisée et de la race des animaux.

Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus dans ce travail *in vivo* et *in vitro* montrent l'efficacité des huiles essentielles sur l'équilibre de la flore ruminale, sur la production de méthane et sur les performances zootechniques des ruminants.

En conclusion Le NP RUMEN a montré une efficacité remarquable sur la diminution de la production du méthane entérique chez les vaches laitières, l'ajout de 50 g du produit NP RUMEN à base de CM d'HE à la ration a permis une réduction d'environ 12% des émissions de méthane, ces résultats sont supérieures à la réduction obtenue avec l'huile de tournesol (source d'acide gras insaturé) qui était de 8% et avec le Turboviv (additif à base de cannelle) qui étais de 9%. Dans une autre expérimentation qui a consisté à tester l'effet dose réponse du NP RUMEN l'addition du produit a engendré une réduction significative de la production de méthane, d'environ 21% lorsque le produit a été ajouté à la dose de 50g /tête /par jour, et d'environ 31% lorsque la dose a été doublée (100g/tête/jour).Ce qui montre bien l'importance de la dose utilisée.

La production laitière chez les vaches ayant reçu NP RUMEN à raison de 100g/tête/jour a augmenté d'une moyenne de 10 % par rapport au lot témoin. Le NP RUMEN peut avoir un effet sur la dégradation des protéines et l'absorption des acides gras volatils (AGV) chez la vache laitière, cet effet doit être démontré par d'autres travaux. Aussi la persistance de lactation pendant la phase de décroissance de lactation a augmenté sous l'effet du produit.

Le présent travail a été mené pour évaluer l'effet de l'incorporation de l'additif NP RUMEN sur les performances de production chez les ruminants, en terme de poids et de gain moyen quotidien des taurillons des deux race *Prim' Holstein et Aubrac.* Après incorporation de 100g/tête/jour de NP RUMEN dans la ration , les taurillons *Prim' Holstein* ont enregistré une augmentation de poids moyen d'environ 9%. Le gain moyen quotidien GMQ a aussi augmenté d'environ 10%. La supplémentassions de la ration de base des agneaux avec 10g /tête/jour de NP RUMEN a donné une augmentation significative du poids moyen de 16,99%, et du gain moyen quotidien des agneaux de 194 g/j du lot d'essai. Ces résultats montrent l'effet promoteur de croissance du NP RUMEN.

Pour confirmer l'effet bénéfiques du produit, nous l'avons testé en supplémentation dans la ration alimentaire des taurillons à une dose de 100g/tête/jour du NP RUMEN pour voir son effet sur le pH ruminal et le potentiel redox du jus de rumen. Les résultats montrent une

augmentation significative du pH du jus de rumen qui passe de 6,58 à 7,31 par rapport au lot témoin. Aussi une diminution de la flore microbienne, due à l'effet antibactérien de NP RUMEN sur la flore ruminale. On peut donc conclure que le produit permettrait de prévenir les problèmes d'acidose ruminale et équilibrerait le métabolisme général du ruminant.

Les essais réalisés nous ont permis d'atteindre les objectifs de l'étude et de concevoir un additif NP RUMEN, composé de substances naturelles qui représente une meilleure alternative aux additifs chimiques et aux antibiotiques dans l'aliment du bétail.

En perspectives, des études ultérieures sont souhaitables afin de tester Les composés majoritaires testés (thymol, carvacrol, eugénole et cinnamaldéhyde) sur le métabolisme hormonal de la croissance et sur les hormones de la reproduction chez les ruminants.

Le NP RUMEN doit être testé sur la qualité du lait (taux protéique, taux butyreux et taux de cellules somatiques).

Le produit doit être testé pour voir son effet sur le parasitisme chez les petits ruminants surtout sur les infestations occasionnées par les strongles gastro-intestinaux et respiratoires qui ont des conséquences insidieuses sur la santé et le bien être de l'animal.

Nos résultats ouvrent également la possibilité de tester le NP RUMEN chez d'autres espèces animales comme les caprins et les camelins et d'étudier son effet sur les paramètres biochimiques et hématologiques sanguins et sur les problèmes de mammites chez la vache laitiére qui engendrent des pertes économiques importantes en terme de production laitière.

Il serait intéressant de voir aussi l'action du NP RUMEN comme immuno-modulateur en testant son effet anti-inflammatoire et antioxydant.

Enfin, il serait également important de tester l'effet du NP RUMEN sur la qualité de la viande notamment, la charge microbienne, le rendement carcasse, la conformation et l'état d'engraissement

Références bibliographique

Achahbar S. (2011). Etude de l'activité ookysticides des huiles essentielles et de leurs composés majoitaires. Application in vivo sur un modèle expérimental de coccidiose sévère chez le poulet.Thése de doctorat soutenue à USMBA, FSDM de Fès.

Akgul A. and Kivanc M. (1988). Inhibitory effects of selected Turkish spices and oregano components on some foodborne fungi. *Int. J. Food Microbiol*. 6: 263–268.

Akhtar, M., and Malik, A. (2000). Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technology*, *74*(1), 35-47.

Ali-Shtayeh M.S., Al-Nuri M.A., Yaghmour R.M. and Faidi Y.R. (1997). Antimicrobial activity of Micromeria nervosa from the Palestinian area. *J. Ethnopharmacol*. 58:143-147.

Amaral J. A., Ekins A. Richards S.R. and Knowles R. (1998). Effect of Selected Monoterpenes on Methane Oxidation, Denitrification, and Aerobic Metabolism by Bacteria in Pure Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 520-525.

Amélie S., (2012)**.**Dynamique et intensité de biotransformation dans le rumen. Thèse soutenue pour obtenir le grade de docteur délivré par L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech)**.**

Arras, G., and Usai, M. (2001). Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: chemical analysis of Thymus capitatus oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *Journal of Food Protection*, *64*(7), 1025-1029.

Argyle J.L., Forster R.J, (1988)**.**Effects of ciliate protozoa on rumen bacterial populations, J.V. Nolan, R.A. Leng et D.I. Demeyeréds., The Roles of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion, Penambul Books, Armidale, Australia.

Aseltine, M. (1991). Certain fungal additives lead to increased ruminant production. Feedstuffs, 28: 18 – 24.

Athanasiadou S,Tzamaloukas O,Kyriazakis I, Jackson F,Coop RL., (2005)**.** Testing for direct anthelmintic effects of bioactive forages against Trichostrongylus colubriformis in grazing sheep.*Vet Parasitol.* 127(3-4):233-43.

Banchereau Th, Jean-Luc Mousset l. (2005). Additif alimentaire pour ruminants laitiers permettant d'accroître la production de lait. EP 1609372 A2.

Barone,(1984).Rumen microorganismes as providers of high-quality –protein *j.Anim.Ferd.sci and technol.*, 120:96-120p.

Beauchemin K. A., Kreuzer M., O'Mara F., McAllister T.A. (2008). Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Austr. J. Exp. Agric.*, 48, 21-27.

Beauchemin, K. A., and McGinn, S. M. (2006). Enteric methane emissions from growing beef cattle as affected by diet and level of intake. *Canadian Journal of Animal Science*, *86*(3), 401-408.

Benchaar, C., Petit, H. V., Berthiaume, R., Whyte, T. D., & Chouinard, P. Y. (2006). Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. *Journal of dairy science*, *89*(11), 4352-4364.

Benchaar, C., Petit, H. V., Berthiaume, R., Ouellet, D. R., Chiquette, J., & Chouinard, P. Y. (2007). Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *Journal of Dairy science*, *90*(2), 886-897.

Benchaar.C,.McAllister,T.A.,Chouinard,P.Y.,(2008).Digestion,rumen fermentation, ciliateprotozoal populations , and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde ,quebracho condensed tannin , or yucca shidigerasaponin extracts .*J Dairy Sci* 91,4756-4777.

Benchaar C., Greathead H., (2011) Essential oil and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants :*animal feed science and technology*. *Elsevier*,145:209-228

Bennis S., Chami F., Chami N., Bouchikhi T. and Remmal A. (2004a) Surface alteration of saccharomyces cereviciae induced by thymol and eugenol. Lett. Appl. Microbiol. 38:454-8.

Bennis S., Chami F., Chami N., Rayour K., Tantaoui-Elaraki A. and Remmal A. (2004b) Eugenol induces damage of bacterial and fungal envelope. Moroccan J. Biol. 1: 33- 39.

Bergonzelli G.E., Donnicola D., Porta N. and Corthésy-Theulaz I.E. (2003). Essential Oils as Components of a Diet-Based Approach to Management of Helicobacter Infection. *Antimicrob. Agents Chemother*. 47: 3240–3246.

Blanluet N., Frehner M., Losa R., Archain D., (2002). Evaluation du produit CRINA® Ruminants dans des rations pour brebis. Renc. Rech. Ruminants, 2002, 9.

Blaxter K., Clapperton J.,(1965)**.** Prediction of the amount of methane produced by ruminant. British Journal of Nutrition, 19, 511-521.

Blaxter K.L., (1967)**.** The energy metabolism of ruminants. London, Hutchinson & Co Ltd, p:332.

Blaxter K.L.et Wainman F.W., (1961)**.** The utilization of food by sheep and cattle. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 57 : 419-425.

Billerbeck V.G., Roques C.G., Bessière J.M., Fonvieille J.L. and Dargent R. (2001). Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.* 47: 9-17.

Blümmel M., Givens D.I., Moss A.R.,(2005)**.** Comparison of methane produced by straw fed sheep in open-circuit respiration with methane predicted by fermentation characteristics measured by an in vitro gas procedure. *Animal Feed Science and Technology* 123-124 : 379-390.

Boadi D. A. and Wittenberg K. M. (2002). Methane production from dairy and beef heifers fed forages differing in nutrient density using the sulfur hexafluoride (SF6) tracer gas technique". *Canadian Journal of Animal Science*. 82 : 201–206.

**Bodas R., Lopez S., Fernandez M., Garcia-Gonzalez R., Rodrıguez A.B., Wallace R.J. *et al.*, *(*2009). Phytogenic additives to decrease in vitro ruminal méthanogènes. Nutritional and foraging ecology of sheep and goats. 85 : 279–283.

Bonhomme A., Fonty G., Sénaud J. (1982). Essai d'obtention et de survie de ciliés entodiniomorphes du rumen en cultures axéniques. *Ann. Microbiol.* (Institut Pasteur), 133B, 335-341;

Boonchird C. and Flegel T.W (1982). *In vitro* antifungal activity of eugenol and vanillin against Candida albicans and Cryptococcus neoformans. *Can. J. Microbiol*. 28: 1235–1241

Boujenan I. (2010) .La courbe de lactation des vaches laitières et ses utilisations . *L'Espace Vétérinaire* N° 92 Mai – Juin

Brunechon J. (1987). Pharmacognosie, Ecole technique de documentation, Ed. Ravoilie.

Brunschwig, B. Dempsey, J. L., S., Winkler, J. R., & Gray, H. B. (2009). Hydrogen evolution catalyzed by cobaloximes. *Accounts of chemical research*, *42*(12), 1995-2004.

Burchfield H.P. and Storrs E.E. (1962). *Biochemical Applications of Gas Chromatography***.** New York: Academic Press.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, *94*(3), 223-253.

Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, P. W. Cardozo, et Kamel., C (2005). Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *J. Dairy Sci.* 88:2508–2516.

Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Kamel, C. (2006). Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science*, *89*(2), 761-771.

Bussieras J., Chermette R. (1995). Helminthologie vétérinaire (Fasc. III). 2nd ed. Maisons Alfort, Service de parasitologie ,299 p.

Callaway T.R., Martin S.A., (1996). Effect of organic acid and monensin treatment on in vitro mixed ruminal microorganisms fermentation of cracked corn, *J. Anim. Sci*., 74, 1982-1989.

Callaway, T. R., A. M. S. Cameiro De Melo and J. B. Russell.,(1997). The effect of nicin and monensin on ruminal fermentations in vitro. *Curr. Microbiol.* 35:90-96.

Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L and Ferret A(2007). Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *J. Dairy Sci*. 90: 2580-2595.

Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., and Ferret A. (2007). Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 90: 2580–2595.

Chami F., **Chami N.**, **Bennis S.**, **Bouchikhi T. and Remmal A.** (2005a) Oregano and clove essential oils induce surface alteration of Saccharomyces cerevisiae, Phytotherapy *reasearch*. 19: 405-8.

Chami F., Chami N., Bennis S., Trouillas J. and Remmal A. (2004a) Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *J. Antimicrob. Chemother*. 54: 909-914.

Chami N., Bennis S., Chami F., Aboussekhra A. and Remmal A. (2005b) Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and in vivo. Oral. *Microbiol. Immunol*. 20: 106-111.

Chami N., Chami F., Bennis S., Trouillas J. and Remmal A. (2004b) Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz. J. Infect. Dis*. 8:217-26.

Chao S.C., Young D.G., Oberg C.J. (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. Journal of Essential Oil Research, 12: 639–649

Charrière J.F., (2003). .L'utilisation des hormones dans la production animale

Chartier, C., Soubirac, F., Pors, I., Silvestre, A., Hubert, J., Couquet, C., & Cabaret, J. (2001). Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of dairy goats under extensive management conditions in southwestern France. *Journal of helminthology*, *75*(4), 325-330.

Chaves, A. V., Stanford, K., Dugan, M. E. R., Gibson, L. L., McAllister, T. A., Van Herk, F., & Benchaar, C. (2008). Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Livestock Science*, *117*(2-3), 215-224.

Chilliard Y., Ferlay A., Doreau M., (2001). Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids", Livest. Prod. Sci., 70: 31-48.

Chilliard Y., Ferlay A., Mansbridge R.M., Doreau M.(2000) . Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of satured, polyinsatured, trans and conjugated fatty acids, *Ann. Zootech*., 49, 181-205.

Chilliard Y., Martin C., Rouel J., Doreau M. (2009)**.** Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output, *J. Dairy Sci*., 92, 5199-5211.

Clinquart A.,Micol D., Brundseaux C., Dufrasne I. Istasse L. (1995) .Utilisation des matières grasses chez les bovins à l'engraissement. INRA prod .Anim. 8 (1), 29-42.

Cosentino S., Tuberoso C.I., Pisano B., Satta M., Mascia V, Arzedi E. and Palmas F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Lett. Appl. Microbiol. 2*9: 130-5.

Couvreur S. et Hurtaud C., (2007)**.** Le globule gras du lait : sécrétion, composition, fonctions et facteurs de variation, INRA, Productions Animales, 20(5), 369-382.

Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R. and Wyllie S.G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil***). J. Appl. Microbiol***.** 88: 170-175.

Cracker L.E. and Simon J.E. (1986). Herbs, spices, and medicinal plants: recent advences in botany, Hort. Pharmacol. 1: 81-134.

Czerkawski J.W et Breckenridge G., (1977)**.** Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). Br. J. Nut. 38 :371–384.

Davidson, P. M., & Naidu, A. S. (2000). Phyto-phenols. In *Natural food antimicrobial systems* (pp. 278-307). CRC Press.

Deans, S. G., & Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International journal of food microbiology*, *5*(2), 165-180.

Didry N., Dubreuil L., and Pinkas M. (1993). Antimicrobial activity of thymol, carvacrol and cinnamidaldehyde alone or in combination. *Pharmazie*, 48; 301-304.

Didry N., Dubreuil L., and Pinkas M. (1994). Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharm. Acta Helv*. 69: 25- 28.

Djermoun, A., and Chehat, F. (2012). Le développement de la filière lait en Algérie: de l'autosuffisance à la dépendance. *Livestock Research for Rural Development*, *24*(1).

Dohme F., A. Machmuller, A. Wasserfallen, and M. Kreuzer, (2000). Comparative efficiency of fats rich in medium chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. Can. *J. Anim. Sci.* 80:473–482.

Doreau .M, Martin. C, Eugéne. M, Popova.M, Morgavi.D.P. (2011)**.** Leviers d'action pour réduire la production de méthane entérique par les ruminants.INRA Prod. Anim., 24 (5), 461-474.

Dorman H.J.D. and Deans S.G. (2000) .Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of

plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol*. 88: 308-16.

Durham, Herbert E. (1898).A simple method for demonstrating the production of gas by bacteria. British medical journal.1:1387.PMC2411497.PMID 20757850.

Edwardst. Mcbride B.C., (1975).A new method for the isolation and identification of methanogenic bacteria. *Appl. Microbiol*. 29 540-545.

Evans J.D., Martin S.A., (2000). Effects of thymol on ruminal microorganisms. Current Microbiology. 41 : 336–340.

Ezzaouia S., Chami N., Chami F., Bennis S., Filali-Maltouf A. and Remmal A. (2007). Investigation of essential oils to fight multiresistant bacteria in hygienic and therapeutic applications. *Int. J. Essen. Oil Ther*. 1: 51-55.

Eustache,**I.** (2006). Alimentation et viande : interdiction définitive des antibiotiques. Commission des communautés européennes Bruxelles.

FAO, 2018. gleam 2.0: assessment of greenhouse gas emissions and mitigation potential

Fauchère J.L. et Avril J.L. (2002). "Bactériologie générale et médicale" Ellipses Editions Paris, 365p.

Franchomme P. (1981). Note préliminaire sur la compléxité biochimique et les potentialités thrapeutiques des huiles essentielles. *Phytomedecine,* 1: 13-23.

François G, Kamel C, Calsamiglia S, Doane D . (2006). Additif alimentaire pour ruminants à base d'eugenol et de cinnamaldehyde. *Phytomedecine,*2 :14-24

Garcia, J.-L., Patel, B .K .C. &Ollivier. B., (2000). Taxonomic, phylogenetic, and Ecologies diversity of Methanogenic archea .*Anaerobe* 6,205-226.

Garcia., J. L. (1998) Les bactéries méthanogènes . *Revu C. R. Acad. Agric*. Fr, 84**,** 23-33.

Gautier, M., Barcelona, R. R., Fritz, S., Grohs, C., Druet, T., Boichard, D., ... & Meuwissen, T. H. (2006). Fine mapping and physical characterization of two linked quantitative trait loci affecting milk fat yield in dairy cattle on BTA26. *Genetics*, *172*(1), 425-436.

Ghazi, K., & Niar, A. (2011). Qualité hygiénique du lait cru de vache dans les différents élevages de la Wilaya de Tiaret (Algérie). *Tropicultura*, *29*(4), 193-196.

Gilles Grosmond, (2007). Huiles essentielles et sante de la mamelle

Goopy J.P. (2004). Hegarty, R.S. Repeatability of methane production in cattle fed concentrate and forage diets. *J. Anim. Feed Sci.*,.13,.75–78.

Goopy, J. P., Woodgate, R., Donaldson, A., Robinson, D. L., & Hegarty, R. S. (2011). Validation of a short-term methane measurement using portable static chambers to estimate daily methane production in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, *166*, 219-226.

Grainger C., Clarke T., Auldist M.J., Beauchemin K.A., McGinn S.M., Waghorn G.C., Eckard R.J., (2009). Potential use of Acacia mearnsii condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. *Can. J. Anim. Sci*., 89, 241-251.

Grant, R. and D. Kubik., (1990). Supplemental fat for high producing dairy cows. Institute of Agriculture.and.Natural.Resources,.University.of.Nebraska-Lincoln..USA. www.ianr.unl.edu/pubs/dairy/g961.htm.

Guillaume, H.B., (2007). Flore du rumen : origine, composition, évolution, conséquences physiopathologiques. Thèse de Doctorat.

Gulluce M., Sokmen M., Daferera D., Agar G., Ozkan H., Kartal N. et al. (2003). In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of Satureja hortensis L. *J. Agric. Food Chem*. 51:3958-65.

Gustafson J. E., Y. C. Liew S. Chew, J. L. Markham H. C. Bell, S. G. Wyllie and J. R. Warmington (1998). Effects of tea tree oil on Escherichia coli Lett. Appl. Microbiol. 26:194-198.

Habila, N, agbaji, Abel S., ladan, Zakari, bello, Isaac A., haruna, Emmanuel, dakare, Monday A. et atolagbe, Taofiq O. (2010). Evaluation of In Vitro Activity of Essential Oils against Trypanosoma brucei brucei and Trypanosoma evansi. *Journal of Parasitology Research*.. Vol. 2010. PMID: 20700425PMCID: PMC2911591.

Hamza. A, Hamza. O. (2014). Effet de l'huile de tournesol et des huiles essentielles, phénoliques sur l'émission de méthane chez la vache laitière. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II – B.P. 6202, rabat instituts, 10101.

Hammond JA, Feiling D, Bishop SC. (1997). Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medecine. *Vet. Res. Comm.*, 21: 213 – 228.

Hart KJ, Yáñez-Ruiz DR, Duval SM, McEwan NR and Newbold CJ (2008). Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Anim.Feed Sci.Technol*. 147:8-35.

Hardy A., MEDINA B., HOUSSIN B., (2006). Effets comparés de deux conduites préventives à base d'extraits végétaux naturels (EIMERICOX®) sur les performances de croissance de génisses laitières (Normande). Renc. Rech. Ruminants, 2006, 13.

Harrinder M., Makkar H. P., Blümmel, M., & Becker, K. (1995). In vitro effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *69*(4), 481-493.

Hatimi S., Boudouma M., Bichichi M., Chaib N. and Idrissi N.G. (2001). Evaluation *in vitro* antileishmanial activity of *Artemisia herba-alba* Asso. *Therapeutic, Bull. Soc. Pathol.* Exot. 94: 29-31.

Hegarty R. S., (1999). Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Aust. J. Agric. Res*. 50: 1321–1327.

Hegarty R. S., (2013). Applicability of short-term emission measurements for on-farm quantification of enteric methane. *Animal, vol*. 7, 2, p. 401-408.

Helander, I. M., H. Alakomi, K. Latva-Kala, T. Mattila-Sandholm, I. Pol, E. J. Smid, L. G. M. Gorris, and A. Wright. (1998). Characteritzation of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem*. 46:3590–3595.

Héléne l. (2007). Essai thérapeutique d'un mélange de trois huiles essentielles par voie intramammaire sur les mammites cliniques en élevage agrobiologique.

Hermal C. (1993). Activité bactériostatique de sept émulsions d'huiles essentielles et de deux associations d'émulsions d'huiles essentielles. *Faculté de Pharmacie*, Université de Montpellier 1 (87).

Hernandez-Ochoa L. and Vilarem G. (2005). Study of essential oil compsition of *Origanum dictamnus* in differents storage conditions. *J. Flavour Fragra.* 20: 245-248.

Hristov AN, McAllister TA, Van Herk FH, Cheng KJ, Newbold CJ, Cheeke PR. (1999). Effect of *Yucca schidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in heifers. *J Anim Sci. 77(9):2554-63.*

Hungate RE.(1966). The rumen bacteria. *In:*Hungate(ed.) *the rumen and its microbes*. Academic press, 8-90. 533 p).

Hungate. R.E. (*1966*)." A Roll Tube Method For Cultivation of Strict Anaerobes" in Methods of Microbiology, *Academic Press, London*.

Jabbar, A., Iqbal, Z. and Khan, M.N. (2006). In vitro anthelmintic activity of Trachyspermum ammi seeds. Pharmacogonosy Magazine, 2, 126–129.

Janssen A.M., Sheffer J.J.C. and Svendsen B. (1987). Antimicrobial activity of essential oils: A 1976-1985 literature review. Aspects on the test methods. *Planta Med.* 53: 395-508.

Janssen, PH. Kirs, M.(2008). Structure of the Archeal community of the rumen.appl.environ.Microbial.74,3619-3625.

Johnson K.A, Johnson D.E.(1995). Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science,* 73: 2483-2492.

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

Jonhson D.E., Phetteplace H.W., Seild A.F. (2002). Methane, nitrous oxide and carbon dioxide emissions from ruminant livestock production systems, Takahashi J., Young B.A., eds., Greenhouse Gases and Animal Agriculture, *Elsevier Science* B.V., 77-85.

Jouany J.-P., (1994)**.** Les fermentations dans le rumen et leur optimisation **.**INRA Prod .Anim.,7 (3) ,207.225).

Jouany J.P., Papon Y., Morgavi D.P., Doreau M., (2008)**.** Linseed oil and a combination of sunflower oil and malic acid decrease rumen methane emissions *in vitro*. In: Livestock and global climate change. Rowlinson P., Steele M., Nefzaoui A. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, Royaume-Uni, 140-143.

Jordan. E. F., O'Mara, P., Kenny D., Hawkins M., Malone R., Lovett D. K., O'Mara, P. F. *J.*, (2006). *Anim. Sci*, 84 (9), 2418-2425.

Juven B.J., Kanner J., Schved F. and Weisslowicz H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 76:626–631.

Kaplan, I. G. (2006). Intermolecular interactions: physical picture, computational methods and model potentials. *John Wiley & Sons*.

Kelsey R.G., Reynolds G.W. and Rodriguez E. (1984). The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. Plenum Press, New York, pp 187-242.

Kempton T.J., Murray R.M., Leng R.A., (1976) **.** Methane production and digestibility measurements in the grey kangaroo and sheep. *Australian Journal of Biological Sciences* 29: 209- 214.

Kennelly J.J. et K.A. Lien, (1997). Effects of ionophore supplementation on milk components from lactating cows. Proceedings of a symposium on Usefulness of ionopores in lactating dairy cattle.*Ontario veterinary college*. p. 40-49.

Ketzis, J. K., Vercruysse, J., Stromberg, B. E., Larsen, M., Athanasiadou, S., & Houdijk, J. G. (2006). Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants. *Veterinary Parasitology*, *139*(4), 321-335.

Khallouki, F., Younos, C., Soulimani, R., Oster, T., Charrouf, Z., Spiegelhalder, B., & Owen, R. W. (2003). Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *European journal of cancer prevention*, *12*(1), 67-75.

Kliem K.E., Morgan R., Mould F.L., (2005). The effect of Lactuca sativa and Urtica dioica on in vitro acidosis.*Proceedings of the British Society of Animal Science*, 188, p226.

Knobloch K., Pauli A., Iberl B., Weigand H. and Weis N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Essen. oil res.* 1: 119–128.

Kung Jr L, Williams P, Schmidt R J, Hu W. (2008). A blend of essential plant oils used as an additive to alter silage fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows. *Journal of Dairy science*, *91*(12), 4793-4800.

Lacombe D., Schieder C., Friedricheit M. (2015).Effet d'un additive phytogenique sur les indices de croissances et la santé e veaux males destines à l'engraissement

Lahlou M. (2004) .Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother. Res.* 18: 435-448.

Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P.J. and Nychas G.J.E. (2001) .A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol*. 91 : 453-462.

Lassey K.R., (2007).Livestock methane emission: from the individual grazing animal through national inventories to the global methane cycle. Agricultural and Forest Meteorology 142: 120- 132.

Lassey K.R., Ulyatt M.J., Martin R.J., Walker C.F., Shelton I.D. (1997).Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand. *Atmospheric Environment*, 31, 2905- 2914.

Lassey, K.R.; Pinares-Patiño, C.S.; Martin, R.J.; Molano, G.; McMillan, A.M.S. (2011). Enteric methane emission rates determined by the SF6 tracer technique: Temporal patterns and averaging periods. *Anim. Feed Sci. Technol.166–167*, 183–191.

Laubach, J., Kelliher, F. M., Knight, T. W., Clark, H., Molano, G., Cavanagh, A., (2008). Methane emissions from beef cattle - a comparison of paddock and animal-scale measurements. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, vol. 48, p. 132-137.

Lima E.O., Gompetz O.F., Giesbrecht A.M. and Paulo M.Q. (1993). *In vitro* antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. *Mycoses,* 36 : 333-336.

Linda S. M. Ooi, Yaolan Li, Sheung-Lau Kam, Hua Wang, Elaine Y. L. Wong, Vincent E. C. (2006).Antimicrobial Activities of Cinnamon Oil and Cinnamaldehyde from the Chinese Medicinal Herb Cinnamomum cassia Blume. *The American Journal of Chinese Medicine* (AJCM), Volume: 34, Issue: 3) pp. 511-522

Lockyer D.R. et Jarvis, S.C. (1995). The measurement of methane losses from grazing animals. Environmental Pollution 90: 383-390.

Lockyer D.R., (1997). Methane emissions from grazing sheep and calves. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 66: 11-18.

Macedo, I Tersia F. (2011). Evaluation of Eucalyptus citriodora essential oil on goat gastrointestinal nematodes. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology. Vol. 20, n° 3, pp. 223-227. PMID: 21961753

McGinn S. M., Beauchemin K. A., Coates T. and Colombatto D. (2004). Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *J ANIM SCI* 2004, 82:3346-3356. http://www.journalofanimalscience.org/content/82/11/3346

Macheboeuf D., Morgavi D.P., Papon Y., Mousset J.L., Arturo-Schaan M.,(2008). Dose response effects of essential oils on *in vitro* fermentation activity of the rumen microbial population. *Anim. Feed Sci. Technol.,* 145, 335-350.

Machmüller A. et Hegarty R.S., (2005).Alternative tracer gases for the ERUCT technique to estimate methane emission from grazing animals. In: Proceedings of the 2nd International Conference on Greenhouse Gases and Animal Agriculture (Eds CR Soliva, J Takahashi, and M Kreuzer) 365-368. (ETH Zurich: Zurich, Switzerland).

Machmüller A., Ossowski D.A., Kreuzer M. (2000)**.** Comparative evaluation of the effects of coconut oil, oilseeds and crystalline fat on methane release, digestion and energy balance in lambs. *Anim. Feed Sci. Technol*. **85:**41-60.

Machmüller, A., and. Kreuzer M., (1999**).** Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. Can. J. Anim. Sci. 79:65–72.

Madani, S., & Shapiro, J. (2000). Alopecia areata update. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *42*(4), 549-566.

Mathé, E. A., Nguyen, G. H., Bowman, E. D., Zhao, Y., Budhu, A., Schetter, A. J., ... & Altorki, N. K. (2009). MicroRNA expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus: associations with survival. *Clinical Cancer Research*, *15*(19), 6192-6200.

Mangena T. and Muyima N.Y.O. (1999). Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of artemisia afra, pteronia incana and rosmarinus officinalis on selected bacteria and yeast strains. *Lett. Appl. Microbiol*. 28: 291-296.

Manohar V., Ingram C., Gray J., Talpur N.A., Echard B.W., Bagchi D. et *al.* (2001). Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biochem.* 228: 111–117.

Margaris N., Koedem A and Vokou D. (1982). Aromatic plants: basic and applied aspects. 7:359. Martinus Nijhoff publishers. The Hague.

Martin C., Morgavi .D, Doreau. M, Jouany .J.P.**(**2006). Comment réduire La production de méthane chez les ruminants. Fourrages *187, 283-300.*

Martin C., Brossard L., Doreau M., (2006). Mécanismes d'apparition de l'acidose ruminale latente et conséquences physiopathologiques et zootechniques. INRA Prod. Anim., 19 (2), 93-108

Martineau, **R.**(2004). L'ionophore monensin : un nouvel additif alimentaire en production laitière.

McCaughey W.P., Wittenberg K., Corrigan D., (1999)**.** Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. *Can. J. Anim. Sci*., 79, 221-226.

McCaughey, W.P.; Wittenberg, K.; Corrigan, D., (1997).Methane production by steers on pasture. Can. J. Anim. Sci., 77, 519–524.

McGinn S.M., Chung Y.H., Beauchemin K.A., Iwaasa A.D., Grainger C., (2009). Use of corn distillers' dried grains to reduce enteric methane loss from beef cattle. *Can. J. Anim. Sci.,* 89, 409-413.

Menke K.H., L. Raab A. Salewski H. Steingass D. Fritz W. Schneider., (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding-stuff from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J. Agric. Sci.* 93:217–222.

Milka P. **(**2011**).** Structure et activité de la communauté des archea méthanogène du rumen en relation avec la production de méthane par les ruminants.

Miller. T. (1989). bergey's manual of systematic bacteriology ,vol.3 , J.T stately et al.eds., williams et wilkins pub.,p2179.

Miller, T. L., and Lin C. (2002). Description of *Methanobrevibacter gottschalkii* sp. nov., *Methanobrevibacter thaueri* sp. nov., *Methanobrevibacter woesei* sp. nov., and *Methanobrevibacter woliniis*p. *nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 52**:**819-822.

Moate P.J., Clarke T., Davis L.H., Laby R.H., (1997). Rumen gases and bloat in grazing dairy cows. Journal of Agricultural Science, Cambridge 129: 459-469.

Moate P.J., Williams S.R.O., Grainger C., Hannah M.C., Ponnampalam E.N., Eckard R.J., (2011). Influence of cold-pressed canola, brewers grains and hominy meal as dietary supplements suitable for reducing enteric methane emissions from lactating dairy cows. Anim. *Feed Sci. Technol., 166*-167, 254-264.

Moe P.W., Tyrrell H.F., Hooven N.W. Jr., (1973). Energy balance measurements with corn meal and ground oats for lactating cows. *J. Dairy Sci.,* 56, 1149-1153.

Morris J.A., Khettry A. and Seitz E.W. (1979). Antimicrobial activity of aromachemicals and essentials oils. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* 56: 595-603.

Moss A., Jouany J.P., Newbold J., (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming, *Ann. Zootech.,* 49, 231-253.

Moynat, C., Brito, V., Casarin, A., Forat, M., & Bravo, D. (2010). Cinnamaldehyde and a blend of capsicum and turmeric oleoresins improve performance of vaccinated broilers subject to coccidiosis. In *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* (Vol. 93, pp. 545-546). *360 park ave south, new york, ny 10010-1710 usa: elsevier science inc*.

Mueller-Harvey I.,Mlambo V.,Smith T.(2005).Tannins in animal nutrition and health – implications for temperate and tropical feeds. Proceedings of the British Society of Animal Science, 188, p72.

Muñoz, C., Yan, T., Wills, D. A., Murray, S., Gordon, A. W., (2012). Comparison ofthe sulfur hexafluoride tracer andrespiration chamber techniques for estimating methane emissions and correction for rectum methane output from dairy cows. *Journal of Dairy Science, vol*. 95 (6), p. 3139-3148.

Muray R.M., Bryant A.M. et Leng R.A, (1976). Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *British Journal of Nutrition* 36, 1-14.

Nathalie L. , Cécile C., (2014). Gérer le parasitisme interne des ruminants. Santé des ruminants.Fiche n°2.

Neftel A., Fischer, C., and Flechard C. (2005). Measurement of greenhouse gas fluxes from agriculture. In: Proceedings of the 2nd International Conference on Greenhouse Gases andAnimal Agriculture (Eds CR Soliva, J Takahashi, M Kreuzer) 20-29. (ETH Zurich: Zurich, Switzerland).

Nenoff P., Haustein U.F and Brandt W. (1996). Antifungal activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) against pathogenic fungi *in vitro*. *Skin Pharmacol.* 9: 388-394.

Newbold C.J., Lassalas B., Jouany J.P., (1995). The importance of methanogenisis associated with ciliates protozoa in ruminal methane production in vitro. *Lett. Appl. Microb*, 21: 230-234.

Newbold C.J., Rode L.M.,(2006).Dietary additives to control methanogenesis in the rumen.

Nes, S.K.; Garmo, T.; Chaves, A.V.; Harstad, O.M.; Iwaasa, A.D.; Krizsan, S.J.; Beauchemin, K.A.; McAllister, T.A.; Norell, L.; Thuen, E.; Vedres, D.; Volden, H., (2010). Effects of Neutral Detergent Fiber (aNDF) Digestibility of Grass Silage on Enteric Methane Emissions from Dairy Cows. In Proceedings of Inteternational Conference Greenhouse Gases in Animal Agriculture, Banff, AB, Canada, 3 October; p. 110.

Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science* 264:382–388.

Nisbet D.J. et Martin S.A., (1990). Effect of dicarboxylic acids and Aspergillus orizae fermentation extract on lactate. *Science* 264:362–371.

O'Hara P., Freney J., Ulyatt M., (2003). Abatement of Agricultural Non-Carbon Dioxide Greenhouse Gas Emissions. A Study of Research Requirements. A report prepared for the Ministry of Agriculture and Forestry on behalf of the Convenor, Ministerial Group on Climate Change, the Minister of Agriculture, and the Primary Industries Council. May 2003, New Zealand Ministry of Agriculture and Forestry, Wellington.

Okally, J.C.; Spiers, W.G. (1992). Effect of monensin on methane and heat productions of steers fed lucerne hay either ad-libitum or at the rate of 250 g/hour. Aust. *J. Agric. Res*.: 43, 1789–1793**.**

Ohno, T., Mitsui, T., & Matsumura, M. (2003). Photocatalytic activity of S-doped TiO2 photocatalyst under visible light. *Chemistry letters*, *32*(4), 364-365.

Ono E.Y., Sugiura Y., Homechin M., Kamogae M., Vizzoni E., Ueno Y. and Hirooka E.Y. (1999). Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Panama, *Brazil*, *Mycopathologia*, 147 : 139-148

Orskov E.R. et Grubb. **D.A.** (1978). The effect of urea on digestion and voluntary intake by sheep of diets supplemented with fat **pathologia, 140 : 129-141**

Ouattara, B., Simard, R. E., Holley, R. A., Piette, G. J. P., & Bégin, A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International journal of food microbiology*, *37*(2-3), 155-162.

Ouraïni D., Agoumi A., Ismaïli-Alaoui M., Alaoui K., Cherrah Y., Amrani M. et *al.* (2005). Étude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *J. Phytothérapie,* 3: 147-157.

Patra A.K., Kamra D.N., Bhar R., Kumar P., Agarwal N. (2011). Effect of Terminalia chebula and Allium sativum on in vivo methane emission by sheep. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr., 95, 187-191.

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*(1), 24-37.

Pauli A. (2001) Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int. J. Aromather*. 11: 126-133.

Pomport P.H, Tristant D., Ricaud J.P, Journault C., Aoun M., (2016**).** Effets du VIANDI® sur les performances zootechniques d'engraissement d'agneaux de boucherie.

Pericás ,**C**. (2011). Food Control .p993-999.

Popova. M., D.P. Morgavi, M. Doreau, C. Martin, (2011).Production de méthane et interactions microbiennes dans le rumen. INRA Prod. Anim, 24 (5), 447-460.

Rasooli I., Rezaei M. B., Allameh, A. (2006). Growth inhibition and morphological alterations of Aspergillus niger by essential oils from Thymus eriocalyx and Thymus x-porlock. *Food Control*, *17*(5), 359-364.

Ranilla M.J.,Morgavi D.P., Jouany J-P., (2004). Effect of time after defaunation on methane production *in vitro",* Reprod. Nutr. Develop., 44 (Suppl.1), S35**.**

Remmal A, Tantaoui-Elaraki A, Bouchikhi T, et al. (1993). Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J Ess Oil Res 5,* 179–84.

Remmal A., Achahbar S., Bouddine L., Chami N. and Chami F. (2011). *In vitro* destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. Vet. Parasitol. 182: 121-126.

Remmal A., Bouchikhi T., Tantaoui-Elaraki A. and Ettayebi M. (1993b). Inhibition of antibacterial activity of essential oils by tween 80 and ethanol in liquid medium. *J. Pharm. Belg.* 48: 352-356.

Remmal A., Tantaoui-Elaraki A., Bouchikhi T. and Ettayebi, M. (1993a) .Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar Medium. *J. Essent. Oil. Res.* 5: 1179-184.

Renz F. (1954).Milk production with the active yeast concentrate "Astrol". Zuchtungskunde. 28: 298-304.

Rhayour K., Bouchikhi T., Tantaoui-Elaraki A., Sendide K. and Remmal A. (2003). The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Essent. Oil. Res.* 15: 356-362.

Ribeirorio, J. C., ribeiro, W. L. C., camurça-vasconcelos, A. L. F., macedo, I. T. F., santos, J. M. L., paula, H. C. B., araújo filho, J. V., magalhães, R. D. et bevilaqua, C. M. L.(2014). Efficacy of free and nanoencapsulated Eucalyptus citriodora essential oils on sheep gastrointestinal nematodes and toxicity for mice. *Veterinary Parasitology*. Vol. 204, n° 3-4, pp. 243-248. PMID: 24929446

Rochfort S, Parker AJ and Dunshea FR (2008). Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochem.*, 69:299-322.

Rosenberger G. (1981).clinical examination of cattle. Parey : Berlin,453p.

Roulier G. (1992) **.**Les huiles essentielles pour votre santé. Traité pratiques d'aromathérapie: propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes. Edt Dngles. France.

Ruckbusch Y., Kayr. N. B., (1971). Etude critique de la motricité gastrique chez les bovins.*Ann. Rech. Vet*., 2, 99-136.

Santoro G.F., das Gracas M., Guimaraes L.G., Salgado A.P., Menna-Barreto R.F. and Soares M.J. (2007) Eff ect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Th ymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol. Res.* 100: 783-790.

Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aaffia A. , Fougrach H., Bourkhiss B., Bousta D., Talbi M. (2007) Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux,* 146 : 85-96

Sauvent. S. Giger-Reverden. D, Serment. A, Broudiscou. L. **(**2011). Influences des régimes et de leur fermentation dans le rumen sur la production de méthane par les ruminants. INRA Prod. Anim., 24 (5), 433-446.

Schuhmacher A, Reichling J. and Schnitzler P. (2003). Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 *in vitro*. *Phytomedicine,* 10:504-10.

Siddiqui Y.M., Ettayebi M., Haddad A.M. and Al-Ahdal M.N. (1996). Effect of essential oils on the enveloped viruses: antiviral activity of oregano and clove oils on herpes simplex virus type 1and Newcastle disease virus. *Med. Sci. Res.* 24: 185-186.

sikkema j., bont j.a.m., poolman b., (1994). interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *journal of biological chemistry*. 269 : 8022–8028.

Sivropoulou A., Papanikolaou, E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, *44*(5), 1202-1205.

Skandamis P., ***Tsigarida E. and Nychas G.J.E.*** ***(***2002). *The effect of oregano essential oil on survival/death of Salmonella Typhimurium in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions. Food Microbiol.* 19*:*97*-103.*

Smits C. H. M., Veldman A., Verkade H.J et Beynen A.C. (1998).The inhibitory effect of carboxymethylcellulose with higt viscosity on lipid absorption in boiler chickens coincides with reduced bile salt concentration and raised microbial numbers in the small intestine. *Poul. Sci.* 77:1534-1539.

Stewart CS, Bryant MP, (1988). The rumen bacteria. *In:* Hobson PN, editors. *The rumen microbial ecosystem. Elsevier Science Publisher,* New York, 21-75. 527 p.

storm, i. m. l. d., hellwing, a. l. f., nielsen, n. i., madsen, j., (2012). methods for measuring and estimating methane emission from ruminants. *Animals sciences*, vol. 2, p. 160-183.

Suresh B., Sriram S., Dhanaraj S.A., Elango K. and chinnaswamay K. (1997) Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. *J. Ethnopharmacol.* 55:151-159.

Szumacher-Strabel, M., & Cieślak, A. (2010). Potential of phytofactors to mitigate rumen ammonia and methane production. *J. Anim. Feed Sci*, *19*(3), 319-337.

Takahashi, J., Chaudhry, A.S., Beneke, R.G., Young, and B.A., (1999). An open circuit hood system for gaseous exchange measurements in small ruminants. Small Ruminant Research 32: 31- 36.

Tekippe, J.A.; Hristov, A.N.; Heyler, K.S.; Cassidy, T.W.; Zheljazkov, V.D.; Ferreira, J.F.S.; Towne G., Nagaraja T.G., Brandt R.T., Kemp K.E., (1990). Dynamics of ruminal ciliated protozoa in feedlot cattle, *Appl. Environ. Microbiol*. 56 3174–3178.

Thoroski, J., Blank, G., & Biliaderis, C. (1989). Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by Bacillus subtilis. *Journal of Food Protection*, *52*(6), 399-403.

***Thivend .P . Fonty. G, Jouany. J. P, Michelle Durand, Gouet .Ph.*(**1985). The rumen fermenter **.**Reprod, Nutr, Dévelop., 25(4 B) ,729-753.

Tiret L., (2001). Physiologie de la digestion. Polycopié, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique de Physiologie et Thérapeutique. 69 p.

Tyler V.E., Brady L.R. and Robbers J.E. (1981) *Pharmacognosy*, 8th edn. Philadelphia: Lea and Febiger.

Ultee A., Kets E. P. W., Smid E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen Bacillus cereus. *Appl. Environ. Microbiol.*, *65*(10), 4606-4610.

Ultee, A., & Smid, E. J. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by Bacillus cereus. *International journal of food microbiology*, *64*(3), 373-378.

Ultee A., Bennik M .H.J., Moezelaar R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus. Applied and EnvironmentalMicrobiology. 68 : 1561–1568.uptake by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Environ. Microbiol*., 56, 3515-3518.

Vergonjeanne, R., & Navigator, H. (2014). Les performances zootechniques sont-elles à la mesure de l'investissement. *Web-agri,[en ligne]*.

Vermorel M. (1995).Emissions annuelles de méthane d'origine digestive par les bovins en France. Variations selon le type d'animal et le niveau de production.INRAProd.Anim., 8 (4) ,265-272.

Vermorel M., Jouany J.P., Eugène M., Sauvant D., Noblet J., Dourmad J.Y. (2008). Evaluation quantitative des émissions de méthane entérique par les animaux d'élevage en 2007 en France, INRA, Productions Animales, 21(5), 403-418.

Viollon C. and Chaumont J.P. (1994). Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia.* 128: 151-153.

Walsh S.E., Maillard J.Y., Russel A.D., Catrenich C.E., Charbonneau D.L. and Bartolo R.G. (2003) Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and Gram negative bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 94: 240-247.

Waller, P. J., & Thamsborg, S. M. (2004). Nematode control in 'green'ruminant production systems. *Trends in parasitology*, *20*(10), 493-497.

Warner A. C. I., (1956**).** Criteria for establishing the validity of in vitro studies with rumen microorganisms in so-called artificial rumen systems. *J. Gen. Microbiol*. 14: 733.

Weill et al., (2008) **.** Existe-t-il un lien entre production de méthane par les vaches laitières et profil en acides gras des laits , Nutrition Clinique et Métabolisme, 22(S1) 71-72.

Yanagita K, Kamagata Y, Kawaharasaki M, Suzuki T, Nakamura Y, Minato H.(2000). Phylogenetic analysis of methanogens in sheep rumen ecosystem and detection of Methanomicrobium mobile by Fluorescence *in Situ* Hybridization. Biosc. Biotechnol. Biochem.64, 1737-1742.

Yasuo Kobayashii (2010).Abatement of Methane Production from Ruminants. Trends in the Manipulation of Rumen Fermentation.Asian-Aust. *J. Anim. Sci.* Vol. 23, No. 3: 410 – 416.

Zakarya D., Fathcolllah T. and Chasctrette M. (1993). Use of multifunctioncal autocorrelation method to estimate molar volumes of alkanes and oxygenated compounds. Comparison between components of autocorrelation vectors and topological indices. *J. Phys. Org. Chem.* 6: 574-582.

Zambonelli A., D'Aurelio A.Z., Severi A., Benvenuti E., Maggi L. and Bianchi A. (2004). Chemical composition and fungicidal activity of comercial essential oils of thymus vulgaris L. *J. Essent. Oil Res.* 16: 69-74.

Zimmerman P.R. (1993). System for Measuring Metabolic Gas Emissions from Animals. US Patent 5, 265,618, 30.

Annexes

Eau physiologique 9%

Pour 1 litre du milieu

NaCl…….9 g

Eau destillée …….1litre

Steriliser à l'autoclave à 121°C pour 15min

Bouillon Mueller Hinton

Pour 1 litre du milieu

Hydrolysat acide de caséine .....17,5 g

Extrait de boeuf.....3,0 g

Amidon .....1,5 g

Stériliser à l'autoclave à 121°C pour 15min

Gélose Mueller Hinton

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone .....17,50 g

Extrait de viande .....2,00 g

Amidon .....1,50 g

Agar .....17,00 g

Stériliser à l'autoclave à 121°C pour 15min