

Effets des extraits naturels de plantes sur la dégradation des protéines et le profil de fermentation dans des systèmes continus simulant le rumen

P.W. CARDOZO (1), S. CALSAMIGLIA (1), A. FERRET (1), et C. KAMEL (2)

(1) Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Espagne

(2) Centre for Animal Science, School of Biology, University of Leeds, LS2 9JT, Leeds, United Kingdom

RESUME - Huit fermenteurs à double flux ont été utilisés au cours de quatre périodes consécutives de 10 jours chacune pour l'étude de l'effet de six extraits naturels de plantes sur la dégradation protéique ruminale et sur le profil fermentaire. Les fermenteurs ont été alimentés avec une ration fourrage de luzerne / concentré (60 / 40). Les traitements ont été les suivants : sans extraits (CTR), 15 mg/kg MS d'un mélange des différents extraits en proportion égale (MIX) et 7,5 mg/kg de MS d'extraits d'*Allium sativum* (GAR), de *Cinnamomum cassia* (CAS), de *Yucca schidigera* (YUC), de *Pimpinella anisum* (ANI), d'*Origanum vulgare* (ORE) et de *Capsicum annuum* (CAP), testés individuellement. Au cours des jours 9 et 10 suivant les 8 jours d'adaptation, des échantillons ont été récoltés afin de déterminer les concentrations en AGV (2 heures après l'alimentation) en azote peptidique, en acides aminés et en azote ammoniacal (0, 2, 4, 6 et 8 heures après l'alimentation).

Durant la période d'adaptation, les concentrations en AGV totaux et en azote ammoniacal n'ont pas été affectées par les traitements. Les extraits de CAS, GAR, ANI, et d'ORE augmentent la proportion d'acétate et diminuent celle de propionate durant les 6 premiers jours de fermentation. Toutefois, cette différence disparaît après le 7^{ème} jour, suggérant que la flore du rumen s'est adaptée aux additifs en moins de 7 jours. Ceci laisse supposer que les données d'études de fermentation *in vitro* sur une durée plus courte peuvent conduire à des conclusions erronées et doivent être interprétées avec prudence. La concentration moyenne en azote peptidique a été supérieure de 30,7 % dans le groupe MIX et de 26,2 % dans les groupes CAS et YUC à celle du CTR (6,5 mg/100 mL). La concentration moyenne en acides aminés libres a été supérieure de 17 % et 14 % respectivement pour les groupes GAR et ANI comparés au groupe CTR (7,2 mg/100mL). La concentration moyenne en azote ammoniacal a été supérieure de 31 % dans le groupe ANI et inférieure de 25,5 % dans le groupe GAR, comparé au groupe CTR (5,5 mg/mL). L'accumulation d'acides aminés et d'azote ammoniacal dans le groupe ANI suggère que la peptidolyse et la désamination ont été stimulées. L'accumulation d'acides aminés et la réduction de l'azote ammoniacal dans le groupe GAR suggèrent que la désamination a été inhibée. L'accumulation d'azote peptidique et la réduction en azote ammoniacal dans le groupe CAS suggèrent que le CAS inhibe l'activité peptidolytique. Une sélection rigoureuse de ces additifs peut permettre d'agir sur la dégradation protéique dans le rumen.

Effects of natural plant extracts on protein degradation and fermentation profile in continuous culture

P.W. CARDOZO (1), S. CALSAMIGLIA (1), A. FERRET (1), et C. KAMEL (2)

(1) Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Espagne

SUMMARY - Eight dual-flow continuous culture fermenters were used in four consecutive periods of 10 days to study the effects of six natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profile. Fermenters were fed a 60 : 40, alfalfa hay : concentrate diet. Treatments were : no extract (CTR), 15 mg/kg DM of a mixture of equal proportions of all extracts (MIX), and 7.5 mg/kg DM of extracts of *Allium sativum* (GAR), *Cinnamomum cassia* (CAS), *Yucca schidigera* (YUC), *Pimpinella anisum* (ANI), *Origanum vulgare* (ORE) or *Capsicum annuum* (CAP). On days 9 and 10 following the 8-day adaptation period, samples for VFA (2 h after feeding), and peptide, AA and ammonia N concentrations were taken (0, 2, 4, 6, and 8 h after feeding).

During the adaptation period, total VFA and ammonia N concentrations were not affected by treatments. The extracts of CAS, GAR, ANI, and ORE increased the acetate and decreased the propionate proportion during the first 6 days of fermentation. However, these differences disappeared after day 7, suggesting that rumen microbes were adapted to the additives within 7 days and that data from short-term *in vitro* fermentation studies may lead to erroneous conclusions, and should be interpreted with caution. The average peptide N concentration was 30.7 % higher in MIX, and 26.2 % higher in CAS and YUC compared with CTR (6.5 mg/100 mL). The average AA N concentrations were 17 and 14 % higher in GAR and ANI compared with CTR (7.2 mg/100 mL). The average ammonia N concentration was 31 % higher in ANI, and 25.5 % lower in GAR compared with CTR (5.5 mg/100 mL). The accumulation of AA and ammonia N in ANI suggested that peptidolysis and deamination were stimulated. The accumulation of AA N and the reduction in ammonia N in GAR suggests that deamination was inhibited. The accumulation of peptide N and the numerical reduction in AA N concentration in CAS suggests that CAS inhibited the peptidolysis activity. Careful selection of these additives may allow the manipulation of protein degradation in the rumen.

INTRODUCTION

Certaines plantes produisent des métabolites secondaires avec des propriétés antibactériennes et antifongiques (Cowan, 1999). Certains phénols (Chesson *et al.*, 1982), huiles essentielles (Kamel, 2001) et sarsaponines peuvent affecter la fermentation ruminale. Des études avec des extraits de *Yucca* (Grobner *et al.*, 1982 ; Wallace *et al.*, 1994) ont indiqué que la sarsaponine (composé secondaire du *Yucca*) réduisait la concentration en azote ammoniacal. Ryan *et al.* (1997) ont observé que l'extrait de *Yucca* augmentait la concentration en acétate et propionate après 24 heures d'incubation *in vitro*, mais réduisait la concentration en propionate, butyrate et valérate après 48 heures. Cependant, d'autres études ont signalé que les sarsaponines n'affectaient pas la fermentation ruminale (Wang *et al.*, 1997 ; Hristov *et al.*, 1999). D'autre part, Evans et Martin (2000) ont observé que le thymol réduisait la proportion molaire de l'acétate, du propionate et le pH ruminal après 24 heures d'incubation *in vitro*. Il existe d'autres composés secondaires avec des activités antimicrobiennes dont les effets n'ont pas été évalués.

L'objectif de cette étude a été d'évaluer les effets de six extraits naturels de plantes sur la dégradation des protéines dans un système de culture à double flux continu.

1. MATERIELS ET METHODES

8 fermenteurs (1320 ml) à double flux développé par Hoover *et al.* (1976) ont été utilisés. Les conditions de température (38°C), pH (6,4 ± 0,05) et les taux de dilution des fractions liquides et solides (10 et 5 %/h, respectivement) ont été maintenus constants. L'inoculum provenait d'une vache canulée au niveau ruminal et alimentée avec une ration fourrage / concentré (60 / 40) qui répondait aux recommandations du NRC (2001) pour l'alimentation des vaches en production (600 kg de poids vif, 25 kg de lait/jour et 4 % de matières grasses). L'aliment contenait du foin de luzerne (27 % MS), du maïs déshydraté plante entière (20 % MS), de la farine de soja (16 % MS), de la farine de maïs (15 % MS), de la farine d'orge (15 % MS), de la paille moulue (5 % MS), et un mélange de minéraux et vitamines (2 % MS). On a administré à chaque fermenteur 95 g/jour de MS du même aliment en trois portions égales à intervalle de 8 heures. Les traitements ont été les suivants : sans extraits (CTR), témoin négatif, extraits de *Allium sativum* (GAR, 0,7 % d'allicine), *Cinnamomum cassia* (CAS, 59 % d'aldéhyde cinnamique), *Yucca schidigera* (YUC, 8 % de sarsaponines), *Pimpinella anisum* (ANI, 86 % d'anéthol), *Origanum vulgare* (ORE, 64 % de carvacrol et 16 % de thymol) et *Capsicum annuum* (CAP, 12 % de capsïcine). Un traitement supplémentaire correspond au mélange de l'ensemble des extraits (MIX). Les niveaux d'incorporation ont été de 15 mg/kg MS pour le MIX et 7,5 mg/kg MS pour chacun des extraits. L'expérience a consisté en 4 périodes consécutives de 10 jours chacune (8 d'adaptation et 2 d'échantillonnage). Du jour 1 à 10, des échantillons ont été prélevés (2 heures après l'alimentation) afin de déterminer l'évolution de l'azote ammoniacal et des acides gras volatils.

Au cours des jours 9 et 10, des échantillons ont été pris à 0, 2, 4, 6 et 8 heures après le dosage de l'aliment, afin de déterminer l'azote soluble dans l'acide tungstique (N-TA) et dans l'acide trichloroacétique (N-TCA). De la même manière on a récolté des échantillons afin de déterminer l'azote ammoniacal.

Les résultats ont été analysés en utilisant la procédure PROC MIXED (SAS, 2000) pour les mesures répétées (Littell *et al.*, 1998). La période a été considérée comme aléatoire. Les différences ont été retenues à $P < 0,05$ dans le calcul de la moyenne ajustée 'LSMEANS' (SAS, 2000).

2. RESULTATS

2.1. EFFETS DES EXTRAITS PENDANT LES JOURS D'ADAPTATION

La proportion molaire d'acétate (mol/100 mol) des groupes GAR (moyenne de 56,9), YUC (moyenne de 56,7), ANI (moyenne de 57,5), ORE (moyenne de 54,5) et CAP (moyenne de 58,4) a été supérieure à celle du groupe CTR (moyenne de 51,5) pendant les 4 premiers jours. Au 5^{ème} jour, la proportion molaire d'acétate dans le groupe ANI (58,2) a été supérieure à celle du groupe CTR (49,6). Ces différences ont disparu après le septième jour de fermentation.

La proportion molaire (mol/100 mol) de propionate dans les groupes ANI (moyenne des jours 3 à 6, 25,9), YUC (moyenne des jours 3 à 5, 26,6), CAP (moyenne des jours 4 à 6, 25,5), et ORE (moyenne des jours 5 à 6, 25,3) était inférieure à celle obtenue pour le groupe CTR (moyenne de 30,7). Ces différences ont disparu à partir du septième jour, probablement à cause d'une adaptation des populations bactériennes aux dits produits. Ces résultats suggèrent que les études de fermentation *in vitro* de courte durée peuvent aboutir à des conclusions erronées et devraient être interprétées avec davantage de précautions. Toutefois, dans une culture continue à double flux, une période d'adaptation de 6 jours apparaît être suffisante pour tester l'effet à long terme de ce type de substances sur la fermentation microbienne du rumen.

2.2. EFFETS DES EXTRAITS PENDANT LES JOURS D'ECHANTILLONNAGE

Les concentrations totales en acides gras volatils de l'ensemble des traitements ont été similaires à celles du groupe CTR (moyenne de 105,1 mM). La proportion de chaque acide gras volatil n'a pas été affectée par les traitements (Tableau 1).

Les résultats des concentrations moyennes (fractions azotées) durant les 8 heures d'échantillonnage sont présentés dans le Tableau 2. La concentration en azote ammoniacal a eu tendance à diminuer avec les extraits MIX, CAS et YUC. Un effet significatif ($P > 0,05$) a été observé avec GAR. Au contraire, la concentration moyenne d'azote ammoniacal est plus élevée ($P < 0,05$) tout au long du cycle d'adaptation de 8 jours pour ANI (7,2) par rapport au témoin CTR (5,5).

3. DISCUSSION

Les extraits naturels de plantes pourraient être une alternative aux additifs chargés de modifier les fermentations ruminales par leur capacité à améliorer l'utilisation énergétique ou protéique du rumen. Evans et Martin (2000) ont constaté que le thymol (400 µg/mL), un composé secondaire de ORE, diminue *in vitro* les concentrations en acétate et propionate dans un mélange de microorganismes du rumen placé pendant 24h en incubation. Dans l'essai, l'addition de ORE a également affecté les concentrations en acétate pendant les 4 premiers jours et en propionate du 2^{ème} au 5^{ème} jour de la fermentation. Cependant, ces différences ont disparu après 6 jours. Ryan *et al.* (1997) ont observé que YUC (100 mg/mL dans un fluide de rumen de mouton) augmentait la concentration d'acétate et propionate après 24h d'incubation *in vitro* et diminuait les concentrations de propionate, de butyrate et de valérate après 48h. Cependant, dans l'essai réalisé, l'addition de YUC n'a produit aucun effet sur la proportion d'acétate et de propionate.

La concentration totale en AGV n'est pas modifiée de façon significative par les différents produits testés comparés au témoin, ce qui suggère que ces additifs ne modifieraient pas la fermentiscibilité des nutriments énergétiques aux dosages testés. Seules quelques publications portent sur l'effet des extraits naturels de plantes sur la production totale d'AGV dans le rumen. Le manque d'action de YUC sur la concentration totale en AGV au cours de cet essai est pourtant en accord avec des études *in vitro* (Wang *et al.*, 1997) et *in vivo* (Histrov *et al.*, 1999). De plus, il n'existe pas d'informations disponibles sur les effets d'autres extraits portant sur la production totale d'AGV.

Enfin, les proportions respectives de chaque AGV ne sont pas affectées par les différents traitements ($P < 0,05$) sauf dans le cas de l'acide valérique au niveau d'incorporation testé.

Certains extraits influencent le métabolisme énergétique. En effet, des études récentes ont montré un effet dose-réponse (Busquet *et al.*, 2003).

L'accumulation de N peptidique dans les groupes MIX, CAS et YUC suggère que le rythme de dégradation des protéines augmente, ou que l'activité peptidolytique est inhibée. L'accumulation des acides aminés dans les groupes GAR et ANI suggère que la peptidolyse est stimulée, ou que l'activité de désamination est inhibée. Une accumulation des peptides augmente la synthèse des protéines microbiennes (Griswold *et al.*, 2000). Une accumulation de peptides et d'acides aminés dans le liquide ruminal pourrait augmenter le flux des acides aminés alimentaires dans l'intestin grêle et augmenterait l'efficacité de l'utilisation des protéines par les bactéries du rumen (Cotta et Russell, 1982). La concentration faible en N ammoniacal dans le groupe GAR suggère que l'activité de désamination est inhibée ou que son utilisation est stimulée pour la synthèse de protéines microbiennes. Dans l'étude, YUC n'a pas affecté la concentration d'N ammoniacal. Les études précédentes ont trouvé des effets incompatibles du YUC sur les concentrations en N ammoniacal testées pour un large intervalle de niveaux d'inclusion dans la ration.

Ryan *et al.* (1997) ont signalé que l'inclusion de 6 250 ppm de YUC a réduit la concentration en N ammoniacal de 17,0 mmol/L à 15,6 mmol/L après 48 h d'incubation *in vitro*. Grobner *et al.* (1982) ont montré une réduction de 15 % ($P < 0,08$) de l'ammoniac après 7 jours d'essai de fermentation-culture continue, lors de l'ajout de 60 ppm de sarsaponine pure (un composé secondaire de YUC) dans les fermenteurs. D'autres études ont indiqué que l'extrait de YUC a un fort pouvoir anti-protozoaire (à un taux d'inclusion de 10 000 ppm, Wallace *et al.*, 1994, de 44 000 ppm, Wang *et al.*, 1997, de 5 825 ppm, Hristov *et al.*, 1999). Cependant, les effets des extraits de saponines (la sarsaponine de YUC est une saponine stéroïdienne) sur la concentration des protozoaires dans le rumen ont particulièrement varié (Navas-Camacho *et al.*, 1993, Odenyo *et al.*, 1997). Les données suggèrent que d'autres effets pourraient intervenir en plus des niveaux d'inclusion du YUC, qui agit sur la concentration en N ammoniacal. Nos résultats montrent que l'extrait de YUC pourrait agir davantage sur la dégradation peptidique que sur la désamination. Il est aussi pertinent de noter que le niveau d'inclusion du YUC dans l'essai (7,5 ppm de YUC, contenant 8 % de sarsaponines) était plus faible que les niveaux d'inclusion testés dans les précédents rapports. Cela pourrait être une des raisons possibles pour le manque d'effet du YUC sur la concentration du N ammoniacal. Un effet dose pourrait également expliquer le manque d'effet significatif de l'aldéhyde cinnamique, le principe actif de la *Cinnamomum cassia*, sur le N ammoniacal dans notre étude. Busquet *et al.* (2003) avaient montré un effet de l'aldéhyde cinnamique sur le N ammoniacal à une dose différente que cela utilisé dans cette étude.

L'ANI est le seul additif à stimuler significativement ($P < 0,05$) la concentration de N ammoniacal pendant le cycle d'alimentation de 8 heures, 24 % en plus par rapport au CTR. Les mécanismes par lesquels ANI stimulent la concentration de N ammoniacal restent inconnus. Mais, ils peuvent être attribués à une activité de désamination plus importante, à une plus grande biodisponibilité de N acides aminés ou à une réduction de l'utilisation d'N ammoniacal par les bactéries.

CONCLUSION

Les niveaux d'inclusion des extraits naturels utilisés dans ce travail n'ont pas affecté la concentration en acides gras volatils totaux. Les extraits de YUC, ORE, ANI, GAR et CAP ont modifié la concentration en acétate et propionate pendant les 6 premiers jours, mais leurs effets ont disparu à partir du septième jour, probablement à la suite d'une adaptation des bactéries aux produits. L'extrait YUC a modifié l'activité peptidolytique, l'extrait GAR a altéré la désamination, tandis que l'extrait ANI a stimulé la peptidolyse et la désamination. Une dose appropriée de certains extraits de plantes, en fonction des objectifs visés, pourrait modifier le taux de dégradation des protéines dans le rumen.

Remerciements à AXISS France SAS, 2 rue des Frères Lumière, 01205 Bellegarde-sur-Valserine, France

Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel C., 2003. J. Anim. Sci. 81(Suppl. 1), 148
 Chesson, A., Stewart, C.S., Wallace R.J., 1982. Appl. Environ. Microbiol., 44, 597-603
 Cotta, M.A., Russell, J.B., 1982. J. Dairy Sci. 65, 226-234
 Cowan, M.M., 1999. Clin. Microbiol. Rev., 12, 564-582
 Evans, J.D., Martin, S.A., 2000. Curr. Microbiol., 41, 336-340
 Griswold, K.E., Hoover, W.H., Miller T.K., Thayne W.V., 1996. J. Anim. Sci. 74, 483-491
 Grobner, M.A., Johnson, D.E., Gooball, S.R., Benz, D.A., 1982. J. Anim. Sci. West. Sec. Proc. 33, 64-66
 Hoover, W.H., Crooker, B.A., Sniffen, C.J., 1976. J. Anim. Sci. 43:528-534
 Hristov, A.N., McAllister, T.A., Van Herk, F.H., Cheng, K.J., Newbold, C.J. Cheeke, P.R., 1999. J. Anim. Sci. 77, 2554-2563

Kamel, C., 2001. In GARNSWORTHY, P.C. and WISEMAN J (Editors), Recent advances in animal nutrition, Univ. Press, United Kingdom, 135-149
 Littell, R.C., Henry, P.R., Ammerman C.B., 1998. J. Anim. Sci. 76: 1216-31
 National Research Council, 2001. Nutrient requirements for dairy cattle (7th Ed.), Nat. Acad. Press, Washington, D.C. (USA)
 Odenyo, A.A., Osuji, P.O., Karanfil, O., 1997. Anim. Feed Sci. Technol. 67, 169-180
 Ryan, J.P., Quinn, T., Leek, B.L., 1997. J. Dairy Sci. 81: 3222-3230
 Statistical Analysis Systems, 2000. SAS user's guide (Version 8.1), SAS Inst. Inc., Cary, N.C. (USA)
 Wallace, R.J., Arthaud, L., Newbold, C.J., 1994. Appl. Environ. Microbiol. 60, 1762-1767
 Wang, Y., McAllister, T.A., Newbold, C.J., Rode, L.M., Cheeke, P.R., Cheng, K., 1997. Anim. Feed Sci. Technol. 74, 143-153

Tableau 1 : Effets des extraits naturels de plantes sur les concentrations d'acides gras volatils (moyenne des 8 heures)

Traitement	CTR	MIX	CAS	GAR	YUC	ANI	ORE	CAP	SEM
Acides gras volatils, totaux (mM)	105,2	110,7	102,3	114,5	109,9	101,7	108,7	112,7	4,77
Acides gras volatils, individuels, mg/100 ml									
Acétique	56,9	55,7	58,1	58,3	59,7	57,2	58,7	55,9	2,16
Propionique	23,8	25,5	22,3	21,6	21,3	23,5	20,3	25,7	2,19
Butyrique	12,1	12,7	12,7	12,4	12,3	12,0	13,8	12,5	1,03
Isobutyrique	0,77	0,66	0,70	0,67	0,69	0,75	0,77	0,65	0,06
Valérique	3,5b	3,1	3,9	3,1	3,1	3,5	3,1	2,8a	0,27
Isovalérique	3,0	3,0	2,4	3,9	2,9	3,0	3,4	2,5	0,59
Ramifiés	4,0	3,7	3,2	5,2	3,9	4,2	4,5	3,6	0,63
Acétique C2 / Proponique C3	2,5	2,5	2,8	2,9	2,9	2,5	3,0	2,2	0,32

a,b,c : Des lettres différentes sur une même ligne indiquent des différences significatives (P < 0.05).

Tableau 2 : Effets des extraits naturels de plantes sur les fractions azotées (moyenne des 8 heures)

Traitement	CTR	MIX	CAS	GAR	YUC	ANI	ORE	CAP	SEM
Fractions azotées, mg/100 ml									
N peptidique	6,5a	8,5b	8,2b	8,0	8,2b	7,8	6,6	6,3	1,07
N acides aminés	7,2a	6,7	6,3	8,4	6,4	8,3b	7,3	7,6	0,77
N ammoniacal	5,5a	5,2	5,2	4,1b	5,1	7,2b	6,4	5,2	0,51

a,b,c : Des lettres différentes sur une même ligne indiquent des différences significatives (P < 0,05).