

The metabolism of terprenoides in caprins

Malecky Mostafa

▶ **To cite this version:**

Malecky Mostafa. The metabolism of terprenoides in caprins. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2008. English. NNT : 2008AGPT0032 . pastel-00004406

HAL Id: pastel-00004406
https://pastel.hal.science/pastel-00004406

Submitted on 3 Dec 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur

de

l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

Spécialité : Physiologie de la Nutrition Animale (biotechnologie)

Présentée et soutenue publiquement par

Mostafa MALECKY

le 27 Mai

MÉTABOLISME DES TERPÉNOÏDES CHEZ LES CAPRINS

Directeur de thèse : ***Daniel SAUVANT***

Codirecteur de thèse : ***Laurent BROUDISCOU***

Travail réalisé : INRA, UMR 791 Physiologie de la Nutrition et Alimentation, F-75231 Paris

Devant le jury composé de:

Philippe SCHMIDELY	Professeur, **AgroParisTech**	**Président du jury**
Francis ENJALBERT	Professeur, **ENV, Toulouse**	**Rapporteur**
Max FEINBERG	Directeur de Recherches, **INRA**	**Rapporteur**
Corine BAYOURTHE	Professeur, **ENSA,Toulouse**	**Examinateur**
Agnes CORNU	Ingénieur d'Étude, **INRA**	**Examinateur**

Table des matières

1. Introduction générale 8

2. Partie bibliographique 12

2.1. Terpènes 13
2.1.1. Structure et propriétés physico-chimiques 13
2.1.1.1. Définition 13
2.1.1.2. Classification 14
2.1.1.2.1. Hémiterpènes 14
2.1.1.2.2. Monoterpènes 15
2.1.1.2.3. Sesquiterpènes 17
2.1.1.2.4. Diterpènes 19
2.1.1.2.5. Sesterpènes 19
2.1.1.2.6. Triterpènes 20
2.1.1.2.7. Tetraterpènes 20
2.1.1.2.8. Polyterpènes 20
2.1.1.3. L'analyse des terpènes 21
2.1.1.3.1. L'échantillonnage et la préparation 21
2.1.1.3.1.1. Les méthodes d'extrcation classiques 21
2.1.1.3.1.2. microextraction en phase solide (SPME) 22
2.1.1.3.1.2. Analyse chromatographique et identification 27
2.1.2. La répartition des terpènes dans le monde vivant 27
2.1.2.1. La biosynthèse des tetrpénoïdes dans le règne végétal 28
2.1.2.1.1. La biosynthèse d'unité de base isoprène 28
2.1.2.1.2. Les organes végétaux synthétisant des tetrpénoïdes 28
2.1.2.2. Les fonctions biologiques de tetrpénoïdes 29
2.1.3. Les huiles essentielles et leur activité anti-microbienne 30
2.1.3.1. Les facteurs déterminant le degré d'activité antimicrobienne des HES 31
2.1.3.1.1. Les méthodes d'évaluation d'activité antimicrobienne 31
2.1.3.1.2. L'effet de la matrice biologique 32
2.1.3.1.3. Le type et la structure moléculaire des terpénoïdes 32
2.1.3.1.4. Le type des microorganismes cibles 33
2.1.3.2. Le mode d'action antimicrobienne des huiles essentielles 34
2.1.4. Stabilisation des effluents des ruminants par les huiles essentielles 35
2.1.5. Conclusion 35

2.2. Biotransformation des terpènes 35
2.2.1. Introduction 36
2.2.2. Biodégradation d'origine microbienne 36
2.2.2.1. Biotransformation de terpènes en aérobiose 37
2.2.2.2. Limonène comme molécule modèle 38
2.2.2.3. Biotransformation en anaérobiose 40
2.2.2.3.1. Les bactéries dénitrifiantes 40
2.2.2.3.2. Les bactéries méthanogènes 43
2.2.2.3.3. Biotransformation des terpènes par la flore microbienne du rumen 43

2.2.4. Conclusion 44
2.3. Les terpènes et la nutrition des ruminants 44
2.3.1. Rappels sur la physiologie du rumen 44
2.3.1.1. Condition de milieu 45
2.3.1.2. Les microorganismes du rumen 45
2.3.1.3. Le métabolisme digestif des macromolécules dans le rumen 46
2.3.2. Application des terpènes dans la nutrition et l'alimentation des ruminants 47
2.3.2.1. Le rôle des terpènes dans l'ingestion et le comportement alimentaire des ruminants 47
2.3.2.2. L'impact de terpènes sur le métabolisme du rumen 49
2.3.2.2.1. Les terpènes et leur impact sur les microorganismes du rumen 50
2.3.2.2.2. Les terpènes et le métabolisme ruminal des glucides 51
2.3.2.2.3. Les terpènes et le métabolisme ruminal des matières azotées 57
2.3.2.2.4. L'effet des terpènes sur métabolisme ruminal des lipides 59
2.3.3. Application des huiles essentielles en lute contre les parasites intestinaux 59
2.3.4. Conclusion 61
2.4. Les terpènes dans la traçabilité des produits animaux 61
2.4.1. Introduction 61
2.4.2. Les prairies et leurs diversités 62
2.4.3. Les pâturages et les caractéristiques des produits laitiers 64
2.4.3.1. L'origine des caractéristiques sensorielles des produits laitiers 65
2.4.3.2. L'impact du pâturage sur la caractéristique sensorielle des produits animaux 65
2.4.4. La traçabilité des produits animaux par les terpènes 66
2.4.5. Les animaux et leurs productions dans la région Méditerranéenne 68
2.4.6. Conclusion 70
2.5. Conclusion générale 70
2.6. Les questionnements scientifiques et les objectifs expérimentaux 72
3. Partie expérimentale 75
3.1. Matériels et Méthodes 76
3.1.1. Expérimentations in vitro 76
3.1.1.1. Les terpènes 76
3.1.1.2. Maintenance des fermenteurs continus en double effluent 77
3.1.1.3. Incubation en batch 78
3.1.1.4. Les analyses chimiques 79
3.1.2. Expérimentation in vivo 79
3.1.2.1. Les animaux et leur régime 79
3.1.2.2. Aliments et mode d'alimentation 80
3.1.2.3. Mesures et prélèvements 80
3.1.2.4. Les analyses réalisées 81
3.2. Aspects méthodologiques (Articles 1 et 2) 82
3.2.1. Optimisation de la SPME en milieu fermentaire (Article 1) 82
3.2.1.1. Introduction 82
3.2.1.2. Matériel et méthodes 83

3.2.1.3. Résultats et discussion 85
3.2.1.4. Conclusion 91
3.2.2. Optimisation de la SPME dans le sang (Article 2) 92
3.2.2.1. Introduction 92
3.2.2.2. Experimental 94
3.2.2.3. Results 97
3.2.2.4. Discussion 103
3.3. Métabolisme de terpènes (In vitro) 108
3.3.1. Expérimentation 1 (Article 3) 108
3.3.1.1. Introduction 109
3.3.1.2. Materials and Methods 110
3.3.1.3. Results 113
3.31.4. Discussion 113
3.3.2. Expérimentation 1 (Article 4) 117
3.3.2.1. Introduction 117
3.3.2.2. Experimental 119
3.3.2.3. Results 123
3.3.2.4. Discussion 124
3.3.3. Expérimentation 2 (article5) 128
3.3.3.1. Introduction 128
3.3.3.2. Materials and Methods 129
3.3.3.3. Results 134
3.3.3.4. Discussion 137
3.4. Métabolisme de terpènes (in vivo), expérimentation 3 (Article 6) 142
3.4.1. Introduction 143
3.4.2. Materials and Methods 143
3.4.3. Results 149
3.4.4. Discussion 151
3.4.5. Conclusion 157
Discussion générale 158
Conclusion et perspectives 171
Références bibliographiques 174
Annexes 201

Liste des Abréviations

A/P	Acetate /propionate	IPD	Isopentenyl-diphosphate
BP	Boiling point	PPi	Pyrophosphate
CLA	Conjugated linoleic acid	CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CP	Crude protein	-	-
DMAP	Dimethylallyl pyrophosphate	-	-
DMI	Dry matter intake	MSI	Matière sèche ingéré
DVB	Divinylbenzene	-	-
EMPS	Efficiency of microbial protein synthesis	-	-
EO	Essential Oil	HES	Huiles essentielles
FCM	Fat corrected milk	-	-
FPP	Farnesil pyrophosphate	-	-
GC	Gas Chromatography	-	-
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry	-	-
GGPP	Geranylgeranyl pyrophosphate	-	-
Glu	Glutamine	-	-
GPP	Geranyl pyrophosphate	-	-
HPLC	High performance liquid chromatography	-	-
HS-SPME	Head-Space Solid Phase Microextraction	-	-
IPP	Isopentenyl pyrophosphate	-	-
LLE	Liquid-liquid extraction	-	-
LOD	Limit of detection	-	-
MUFA	Mono unsaturated fatty acids	-	-
MVA	Mevalonic acid	-	-
MW	Molecular weight	-	-
NPP	Neryl pyrophosphate	-	-
OM	Organic matter	-	-
PA	Polyacrylate	-	-
PDMS	Polydimethylsiloxane	-	-
PDO	Protected designation of origin	AOP	Appellation d'origine protégée
PGI	Protected geographic indication	IGP	Indication géographique protégée
PUFA	Poly unsaturated fatty acid	-	-
RSM	Response surface methodology	-	-
SATFA	Saturated fatty acid	-	-
SCC	Somatic cell count	-	-
SFE	Supercritical fluid extraction	-	-
SPE	Solid Phase Extraction	-	-
SPME	Solid Phase Microextraction	-	-
TMR	Total mixed ration	-	-
VFA	Volatile fatty acids	AGV	Acides gras volatils
BS	Buffer solution	TB	Taux butyreux
AAU	Arbitrary area unit	TP	Taux protéique

Liste des tableaux

Tableau B 1: La Comparaison entre certaines méthodes d'extraction classique et la SPME (Supelco, Bulletin 923, J.Pawliszyn) 24
Tableau B 2: les fibres de la SPME disponibles dans le commerce (Vas et Vékey, 2004) 26
Tableau B 3: Composants majeurs de certaines huiles essentielles présentant des propriétés antimicrobiennes 31
Tableau B 4: Effet[a] des composés terpéniques sous différentes formes: Huiles essentielles (HES), terpènes purs (TP) et mélanges de terpènes purs (MT) sur le métabolisme digestif et les fermentations ruminales des glucides 53
Tableau B 5: Effet[a] des composés terpéniques sous différentes formes: Huiles essentielles (HE), terpène pur (TP) et mélange de terpènes purs (MT) sur le métabolisme ruminal des matières azotées..... 60

3. Partie expérimentale

3.1. Matétrilles et méthodes
Tableau M 1: Ingrédients et composition chimique des rations incubées dans les fermenteurs 78
Tableau M 2: Composition de la solution tampon nutritive des incubations en batch 78

3.2. Aspects méthodologiques, SPME en milieu fermentaire (Artcile 1)
Tableau 1: Mélanges de terpènes avec leur indice de Kovats sur deux types de phase 83
Tableau 2: Matrice de Hoke D6 et plan d'expérience associé 84
Tableau 3: Optimisation de la SPME, résultats des régressions linéaires 88
T**ableau 4**: Linéarité et répétabilité de la SPME des terpènes testés 89
Tableau 5: Effet des matrices fermentaires sur les taux de récupération par SPME de 8 monoterpenes, exprimés relativement aux aires de pics mesurées en solution tampon... 90

3.2.2. SPME dans le Sang (Article 2)
Table 1: Natural and coded variables, levels, design responses..... 98
Table 2: Effect of extraction duration and temperature and sample ionic strength on the peak areas of α- pinene, β-pinene, p-cymene and linalool (arbitrary surface units)..... 99
Table 3: External standard calibration method, analysis of variance and significance levels of effects 102
Table 4: Internal standard calibration method, analysis of variance, significance levels of effects and calibration coefficients..... 102
Table 5: Intra-assay precisions, relative standard deviation (RSD) at high and low levels, recovery rates and limits of detection (LOD)..... 105

3.3.1. Métabolisme de terpènes (in vitro), (Article 3)
Table 1: The characteristic of tested molecules. 112
Table 2: Analysis of variance of chromatographic results in TERP and CTRL incubations, relative amounts recovered after 24hr-incubations (RAR) and disappearance rates (dr) of individual terpenes (µmol /ml inoculum /day)..... 114

3.3.2. Expérimentation 1, (Article 4)
Table 1: The characteristics of tested molecules..... 121

Table 2: analysis of variance of chromatographic results in TERP and CTRL incubations, relative amounts recovered (RAR) after 24hr-incubations 125

3.3.3. Expérimentattion 2, (Article 5)
Table 1: Effect of inoculum source (I) and vancomycin (V) on the amounts of terpene recovered after 3-h incubation with mixed rumen microorganisms. 135
Table 2: Effect of inoculum source (I) and L-cysteine hydrochloride (C) on the amounts of terpene recovered after 3-h incubation with mixed rumen microorganisms. 136
Table 3: Terpene degraded fraction after a period of 6 h (±SEM, n=8) and potentially degradable fraction a (± confidence interval at P>95%) when exposed to starch- and fibre-adapted inocula. 137

3.4. Métabolisme de terpènes (in vivo), expérimentattion 3, (Article 6)
Table 1: Ingredient and chemical composition of the TMR 145
Table 2: Ruminal fermentation characteristics in dairy goats fed a TMR with 0 (CTRL), 50 (LOW) or 500 µL/kg DM (HIGH) of a terpene blend 148
Table 3: Nutrient daily flows and digestibilities in dairy goats fed a TMR with 0 (CTRL), 50 (LOW) or 500 µL/kg DM (HIGH) of a terpene blend 150
Table 4: Molar composition of dietary and duodenal terpenes in dairy goats fed a TMR with 50 (LOW) or 500 µL/kg DM (HIGH) of a terpene blend 151
Table 5: Dry matter intake and production parameters of dairy goats fed a TMR with 0 (CTRL), 50 (LOW) or 500 µL/kg DM (HIGH) of a terpene blend 152
Table 6: Milk fatty acids composition in dairy goats fed a TMR with 0 (CTRL), 50 (LOW) or 500 µL/kg DM (HIGH) of a terpene blend 153

Liste des figures

2. Partie bibliographique

Figure B 1: La molécule d'isoprène 13
Figure B 2: Certains molécules représentatives des monoterpènes acycliques et monocycliques (Loomis et Croteau, 1980) 16
Figure B 3: Principaux sesquiterpènes (Loomis et Croteau, 1980) 18
Figure B 4: 4 molécules représentatives des 4 familles principales de sesquiterpènes monocycliques 18
Figure B 5: Phytane 19
Figure B 6: Cyclophytane 19
Figure B 7: 3,7,11,15,19-Pentamethylicosan 19
Figure B 8: Structure moléculaire de squalène 20
Figure B 9: Dispositif de la SPME 24
Figure B 10: Les processus absorption et adsorption 25
Figure B 11: Formation de l'isoprène actif (IPP) de l'acide mévalonique et isomérisation en DMAPP 28
Figure B 12: Quelques voies métaboliques de la biotransformation du limonène 39
Figure B 13: La voie métabolique initiale de métabolisme du linalool 41
Figure B 14: La voie métabolique proposée à la rupture d'anneau de menthol conduisant à une bêta -oxydation semblable à la bêta - oxydation des acides gras 42
Figure B 15: Comparaison de fraction des plantes contenants de terpènes en différentes altitudes (Mariaca et al., 1997) 63

3. Partie expérimentale

3.2. Aspects méthodologiques, SPME en milieu fermentaire (Artcile 1)
Figure 1: Effet de la durée (DU) et de la température (TR) sur la réponse de l'α-phellandrène à pH 6,75 86
Figure 2: Effet de la durée (DU) de la température (TR) sur la réponse du linalool à pH 6,75 86
Figure 3: Effet du pH et de la température sur la réponse du 4-terpinéol à une durée de 20 minutes 88

3.2.2. SPME dans le Sang (Article 2)
Figure 1: p-cymene peak area as a function of extraction time and sample NaCl concentration, at a sample temperature of 35°C. 100
Figure 2: Linalool peak area as a function of extraction time and temperature, at a NaCl concentration of 250 g/L. 101

3.4. Métabolisme de terpènes (in vivo), expérimentattion 3, (Article 6)
Figure 1: Molar concentration of total VFA and molar proportions of acetate and propionate 1h, 3h, and 7h after morning meal in dairy goats fed a TMR with 0 (CTRL), 50 (LOW) or 500 µL/kg DM (HIGH) of a terpene blend 155

Schéma B 1: La voie métabolique globale de la synthèse de différentes classes de terpènes . 14

1. Introduction générale

Le terme de terpénoïde est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène, ces composés sont majoritairement d'origine végétale.

Dans le règne végétal, les tetrpénoïdes sont considérés en tant que métabolites secondaires qui jouent des rôles écologiques importants, notamment en contribuant aux phénomènes de communication et de défense. Depuis l'antiquité, quelques caractéristiques des tetrpénoïdes étaient connues pour l'homme et certaines épices ont été utilisées pour leurs particularités de parfum, leur saveur et leur effet de conservateur (Bauer et al., 2001). L'exploitation de ces composés s'effectuait sous forme d'huiles extraites de plantes (huiles essentielles) par le moyen de la distillation, cette technique étant employée en Egypte, Inde et Perse il y a plus de 2000 ans (Guenther, 1948).

Aujourd'hui, les tetrpénoïdes ont plusieurs usages dans différents secteurs. Ils sont largement utilisés dans le secteur de la nutrition humaine (saveur, conservateur) et l'industrie du parfum (Van de Braak et Leijten, 1999). Depuis ces dernières années et avec la découverte des caractéristiques anticancéreuses de certains monoterpènes (Crowell, 1999), leur importance dans le secteur pharmaceutique a été renforcée.

Une des propriétés biologiques importantes des huiles essentielles est leur activité antimicrobienne (Kalemba et Kunicka, 2004). Ceci est la base d'un des intérêts de ces produits naturels dans le domaine de la nutrition animale notamment chez les ruminants. Les recherches récentes montrent que ces produits ont dans certains cas, le potentiel d'être considérés comme des alternatives naturelles aux antibiotiques. De nombreuses études le plus souvent in vitro se sont intéressées à l'étude de l'impact de ces produits sur le métabolisme du rumen. Les résultats de ces recherches ont rapporté parfois des effets favorables sur le métabolisme du rumen: accroissement de la proportion de propionate et diminution de celle de l'acétate (Cardozo et al., 2005,2006; Busquet et al., 2005a; Busquet et al., 2006; Castillejos et al., 2006), réduction de la dégradation des matières azotées (Cardozo et al., 2004; Busquet et al., 2005b; Castillejos et al., 2006) et diminution de la production du méthane (Broudiscou et al., 2002). Toutefois, ces résultats restent à valider chez l'animal, du fait du faible nombre des études in vivo.

Un autre intérêt de terpènes dans le secteur des filières des produits animaux, est la possibilité d'utiliser ces composés en tant que marqueur pour traçer l'alimentaion des animaux. Cette utilisation est basée sur le transfert direct des terpènes de l'alimentation, notamment de la partie fourrage, jusqu'au produit animal, fournissant ainsi des informations

sur les systèmes d'alimentation utilisés et sur l'origine géographique des produits. Les recherches sur les parcours pâturés ont montré que la teneur et le profil en terpènes des herbes consommées par les animaux varient en fonction de plusieurs éléments comme l'origine botanique et le stade phénologique de la plante (Bugaud et al., 2001; Schantz et Ek, 1971), l'altitude (Mariaca et al., 1997) ou la saison (Fedele et al., 2004, 2005a). Ces éléments dans la plupart de cas associés les uns aux autres créent un profil particulier qualitatif ainsi que quantitatif en terpènes dont la détermination dans les produits animaux, en considérant leur transfert direct, peut donner des indices de chacun de ces éléments.

De nombreux facteurs conditionnant l'efficacité des terpènes pour les 2 objectifs décrits ci-dessus restent encore insuffisamment précisés. En ce qui concerne l'utilisation des terpènes pour modifier le métabolisme du rumen, l'hypothèse est l'utilisation de l'activité antimicrobienne de terpènes afin modifier l'activité et la croissance de certaines populations microbiennes et les équilibres entre les différentes populations microbiennes. Pour atteindre cet objectif, les terpènes ne doivent pas être métabolisés dans le milieu ruminal. Cependant, il n'y a aucune donnée expérimentale explorant cet aspect in vivo. Par ailleurs, du fait d'une diversité considérable des huiles essentielles et de leurs composants actifs, le nombre de données in vivo concernant l'impact de ces produits sur l'ensemble des processus digestifs et les performances des ruminants est très limité.

De la même manière, la possibilité d'utilisation de terpènes en tant que marqueurs, nécessite une stabilité de ces composés lors d'un transfert de l'aliment jusqu'au produit. En considérant cela, il faut noter que toutes les recherches réalisées sur cet aspect, sont limitées aux études explorant les terpènes uniquement dans la ration ou dans le produit, sans tenir compte de leur devenir lors du transfert entre ces deux compartiments.

Toutefois les données expérimentales ont démontré que les terpènes ne sont pas toujours des molécules non métabolisables: certains microorganismes isolés de cultures en aérobiose (Misra et al., 1996; Duetz et al., 2001) ainsi qu'en anaérobiose (Harder et Probian, 1995; Miyazawa et al., 1996; Heyen et Harder, 2000) sont capables de métaboliser ces molécules. En particulier, l'oxydation en anaérobiose des terpènes est souvent associée à certaines voies métaboliques redox comme celles conduisant à la formation de nitrite ou de méthane (Foss et al. (1998).

En conséquence, notre hypothèse était qu'en considérant l'existence de deux facteurs qui soutiennent le métabolisme anaérobiose de terpènes (plusieurs types de microorganismes ainsi qu'un milieu méthanogène) dans le rumen, cet écosystème aura le potentiel de métaboliser ces composés.

En conséquence, les objectifs principaux de ce travail étaient :

- évaluer le potentiel des mono- et sesquiterpènes caractéristiques de régimes de printemps et d'hivers de la région du Basilicate (Italie) à être métabolisés par les microorganismes du rumen *in vitro*
- Caractériser certains facteurs de variation déterminant le métabolisme de terpènes *in vitro*
- évaluer le devenir des terpènes après l'ingestion chez la chèvre et étudier les facteurs déterminant leur métabolisme ruminal par la caractérisation des flux duodénaux de ces molécules
- étudier leur impact sur les bilans digestifs et zootechniques chez les chèvres laitières.

Pour ces objectifs, nous avons utilisé des terpènes purs de qualité chromatographique. Afin d'extraire ces molécules de différentes matrices (milieu fermentaire, sang), nous avons choisi la méthode Solide Phase Micro extraction (SPME) qui possède de nombreux avantages, comme la rapidité, la simplicité, le faible coût relatif et la précision par rapport à la méthode d'extraction classique liquide-liquide précédemment pratiquée dans notre laboratoire. Cependant il était préalablement nécessaire d'optimiser cette méthode dans ces matrices, ce qui a fait l'objet de deux premières expérimentations de notre travail.

Les terpènes choisis, sont des terpènes caractéristiques déterminés dans les herbes principalement ingérées par les chèvres au printemps dans la région du Basilicate en Italie (Fedele et al., 2004, 2005a). Le système d'élevage notamment caprin dans cette région est le plus souvent basé sur le pâturage, ce qui est typique du bassin Méditerranéen. Dans ces conditions, la tracabilité des produits caractéristiques du terroir renforce l'importance de terpènes comme éléments traceurs des systèmes d'alimentation.

2. Partie bibliographique

La partie bibliographique présente l'ensemble des connaissances associées aux tetrpénoïdes, regroupées dans 4 chapitres. La partie 1 présente la structure de base des terpènes et leur classification, des données sur les aspects analytiques de ces molécules ainsi que leurs fonctions biologiques dans le monde vivant. Il présente également les connaissances concernant l'activité antimicrobienne des terpènes ainsi que les facteurs de variation de cette activité. La partie 2 étudie le métabolisme des terpènes par différents groupes de microorganismes en condition d'aérobiose et plus spécifiquement en condition d'anaérobiose, en particulier dans les conditions d'anaérobiose ruminale. La partie 3 étudie l'utilisation des terpènes en tant qu'additif afin d'évaluer leurs impacts sur les processus fermentaires ruminaux. Dans la partie 4, les variations quantitatives et qualitatives (profil) des terpènes au pâturage en relation avec celles observées dans les produits animaux et la possibilité d'utilisation de cet aspect pour la traçabilité des produits animaux ont été étudiées.

2.1. Terpènes

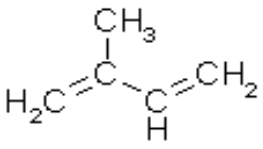
2.1.1. Structure et propriétés physico-chimiques

2.1.1.1. Définition

Les terpènes sont des hydrocarbones naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte : leur formule brute est (C5HX)n dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100(le caoutchouc). La molécule de base est l'isoprène de formule C5H8 (Fig.B1).

Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.)

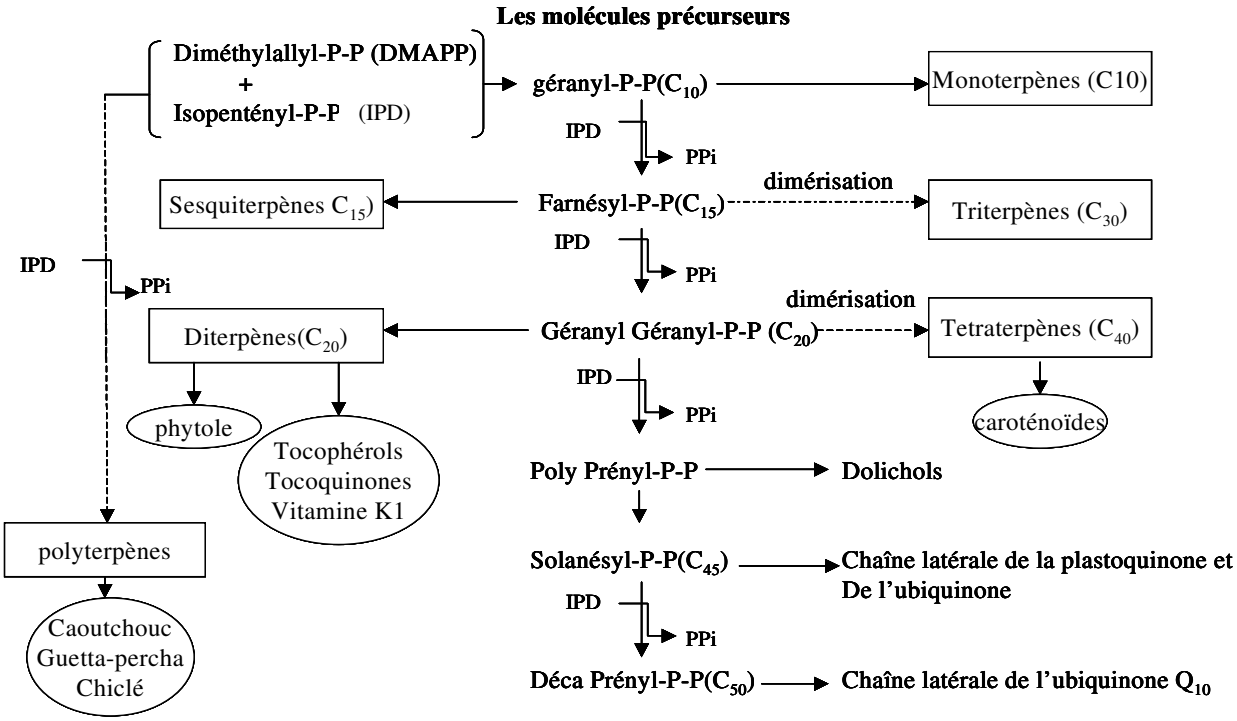
Figure B 1: La molécule d'isoprène



2.1.1.2. Classification

Dans le règne végétal, les tetrpénoïdes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires (avec les flavonoïdes et les alcaloïdes). Leur classification est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène : hémiterpènes (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30), tetraterpènes (C40) et polyterpènes (schéma B1).

Schéma B 1: La voie métabolique globale de la synthèse de différentes classes de terpènes



2.1.1.2.1. Hémiterpènes

Dans la nature, il existe peu de composés naturels ayant une formule de C5 ramifiée; parmi certains composés naturels trouvés chez les plantes qui peuvent être considérés comme hémyterpène, seul l'isoprène a toutes les caractéristiques biogénétiques des terpènes (Loomis et Croteau, 1980).

2.1.1.2.2. Monoterpènes

Plus de 900 monoterpènes connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurelles : les monoterpènes linéaires (acyclique), les monoterpènes avec un cycle unique (monocycliques) et ceux avec deux cycles (bicycliques) (fig.B2). Ils résultent d'une fusion typique tête-à-queue des unités d'isoprène (Allen et al., 1977).

Les monoterpènes acycliques

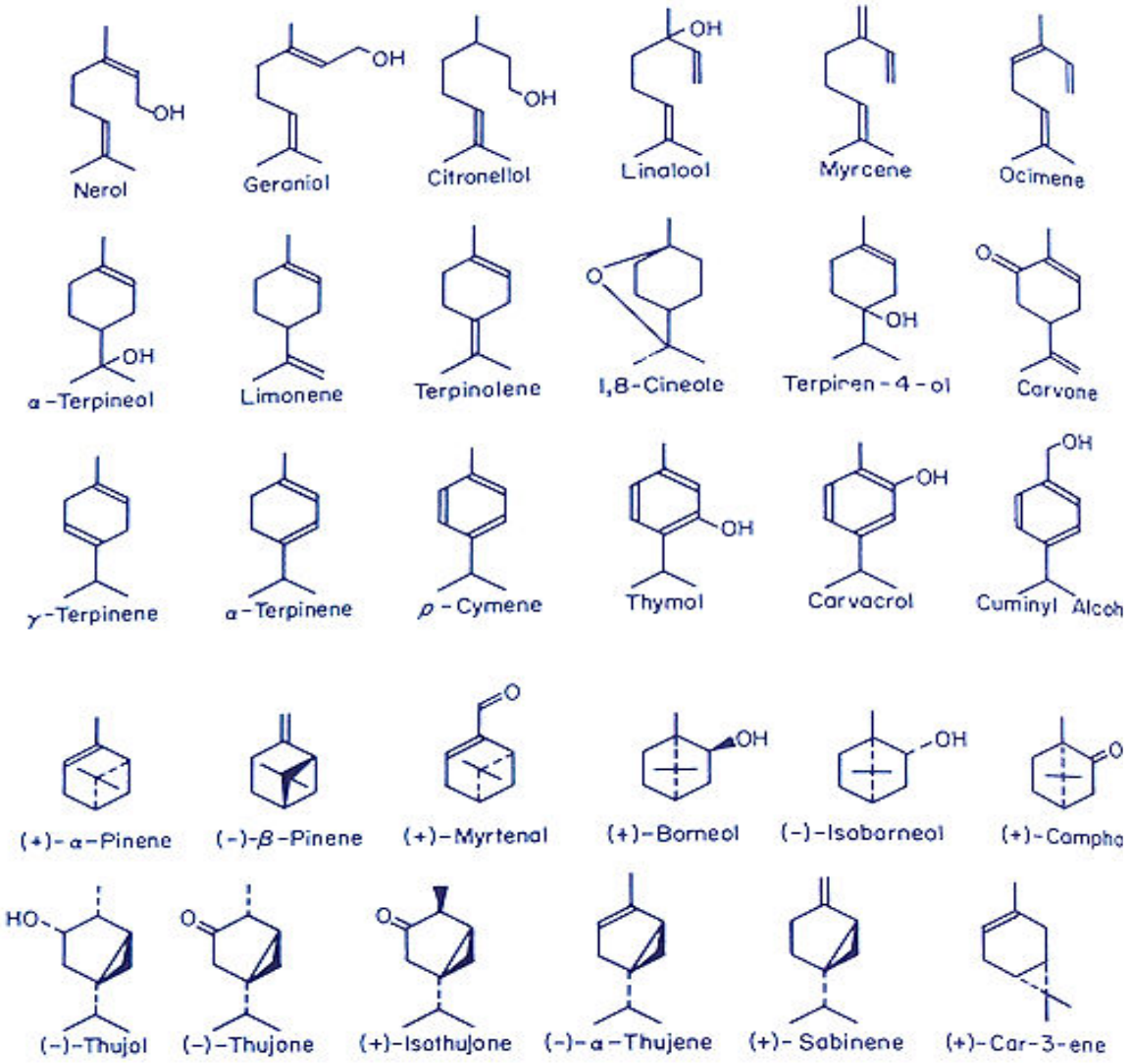
Le géranyl pyrophosphate (GPP), le premier composé issu du mévalonate est le précurseur de cette catégorie de monoterpènes. Dans ce groupe, le géraniol est le plus répandu dans le règne végétal.

Les monoterpènes monocycliques

Ces composés sont formés à partir du néryl pyrophosphate (NPP) ou du géranyl pyrophosphate (GPP) (Croteau et Kartp, 1977). Les composés aromatiques sont les plus importants dans cette catégorie, comme le p-cymène et ses dérivés hydroxyles qui se trouvent associés avec le γ-terpinène (Poulose et Croteau, 1978). On distingue 4 groupes dans cette catégorie:

1- Les hydrocarbones en C10H16 contenant deux doubles liaisons: D-limonène et les phellandrènes sont les représentants les plus connus de cette famille.
2- Les hydrocarbones en C10H18 contenant une double liaison: les terpinéols sont les plus fréquents dans cette famille
3- Les hydrocarbones en C10H20: les menthanes (hydrocarbures saturés) n'existent pas à l'état naturel, mais on trouve leurs dérivés alcool et cétone correspondants: le menthol et la menthone.
4- Les hydrocarbones en C10H20 contenant un oxyde: dans cette famille, le cinéole ou l'eucalyptol sont très abondants.

Figure B 2: Certaines molécules représentatives des monoterpènes acycliques et monocycliques (Loomis et Croteau, 1980)



Les monoterpènes bicycliques

Ces composés se trouvent dans un grand nombre d'huiles essentielles, surtout celles issus des conifères. La plupart de ces monoterpènes font partie des familles pinane, bornane ou thujane tandis que les familles fenchane et carane sont moins représentées. Les monoterpènes majeurs issus du pinane sont l'α-pinène et le β-pinène qui sont largement distribués dans les plantes (Croteau et Karp, 1977). Le bornéol, l'isobornéol et le camphre sont les terpènes les plus importants dans la famille bornane. Les terpènes les plus communs de thujane sont les cétones thujone et isothojone, les alcools et les hydrocarbones associés. Le

fenchone (cétone) et les alcools (α-fenchol et β-fenchol) sont des constituants majeurs de la famille fenchane. Enfin, le car-3-ene est le seul monoterpène commun de la famille carane.

2.1.1.2.3. Sesquiterpènes

Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes puisqu'elle contient plus de 3000 molécules dont les plus caractéristiques sont présentées à la figure B3. Les sesquiterpènes se divisent en plusieurs catégories structurelles, acyclique, monocyclique, bicyclique, tricyclique, polycyclique.

Les sesquiterpènes acycliques

Ils sont susceptibles d'être dérivés de *trans, trans-farnésyl pyrophosphate* (FPP) qui constitue l'analogue de la génération des monoterpènes acycliques à partir de GPP. Généralement tous les monoterpènes acycliques ont un analogue sesquiterpène direct.

Les sesquiterpènes monocyclique

Les sesquiterpènes monocycliques sont divisés principalement en 4 familles: Bisabolan, Germacran, Eleman et Humulan (figure B4). Le zingibérène est un exemple de la famille du Bisabolan, que l'on retrouve par exemple dans l'essence de Gingembre. Le periplanone dérivé du germacrane est une phéromone sexuelle chez la blatte.

Les sesquiterpènes polycycliques

Parmi les sesquiterpènes polycycliques, le caryophyllène est le plus important, que l'on retrouve principalement dans le poivre et certaines épices.

Figure B 3: Principaux sesquiterpènes (Loomis et Croteau, 1980)

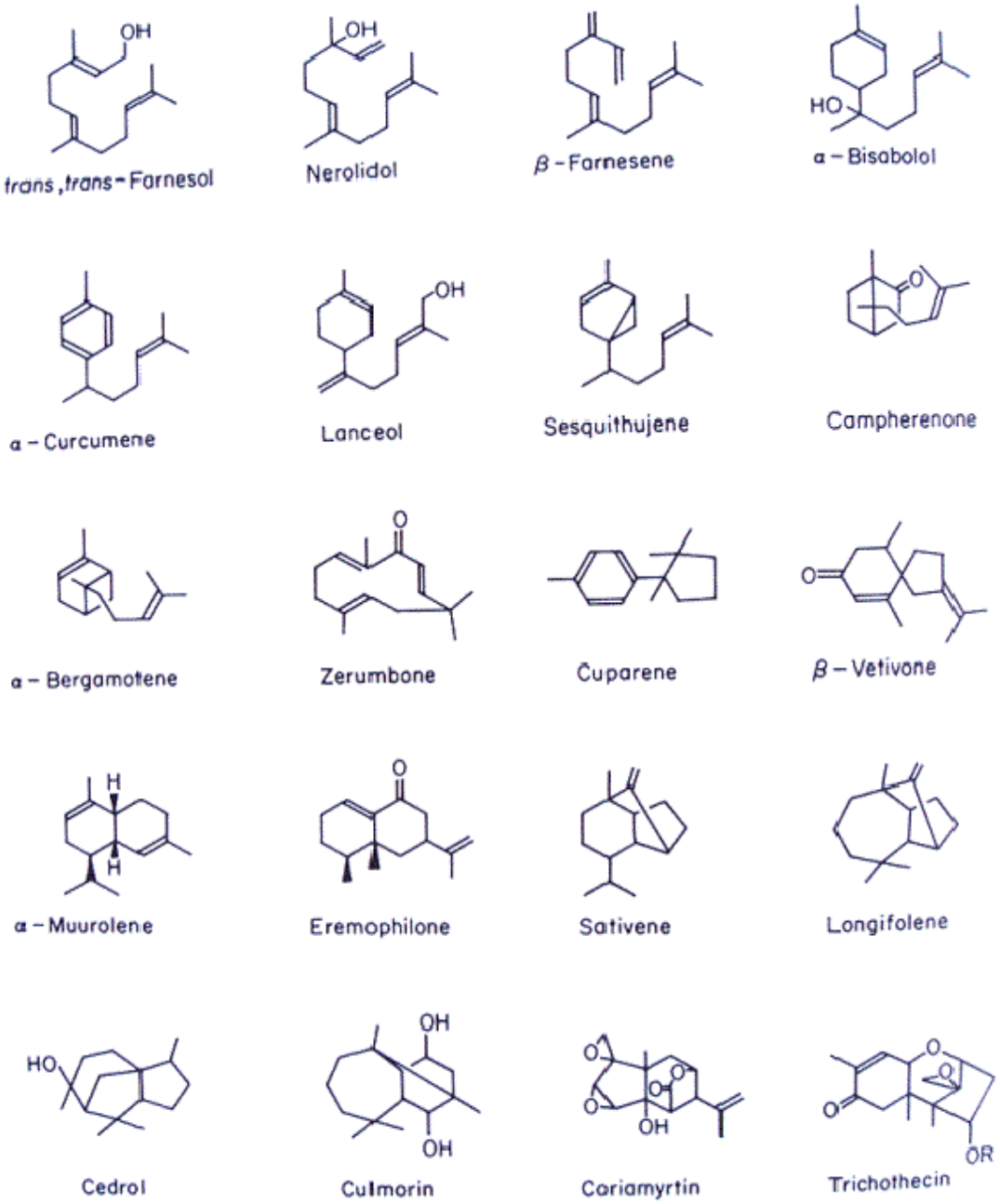
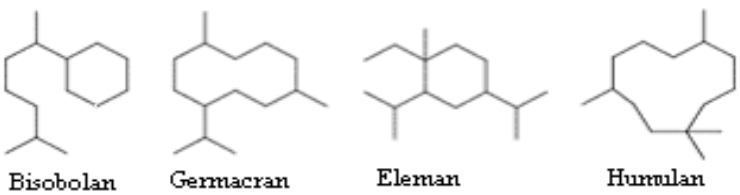


Figure B 4: 4 molécules représentatives des 4 familles principales de sesquiterpènes monocycliques



2.1.1.2.4. Diterpènes

Les diterpènes sont des substances avec 20 atomes de carbone (C20) élaborées à partir de 4 unités d'isoprène ; ils se forment à partir de leur précurseur, le géranylgéranyl-pyrophosphate (GGPP). Ces composés sont principalement présents dans les plantes supérieures dans les résines ou les gibbérellines, ainsi que dans les champignons. Il existe environ 2700 diterpènes dans la nature dont la majorité est sous forme cyclique. Parmi les diterpènes linéaires, on rencontre la famille Phytane (figure B5) dont le phytol est le représentant le plus connu dans la chlorophylle ou dans les vitamines K et E. Les diterpènes cycliques sont des dérivés de cyclophytane (figure B6). Le rétinol et le rétinal, deux formes de la vitamine A sont les plus connus dans cette famille.

Figure B 5: Phytane

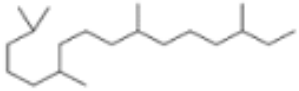
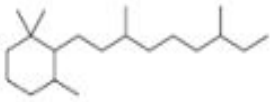


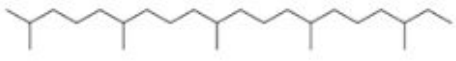
Figure B 6: Cyclophytane



2.1.1.2.5. Sesterpènes

Les sesterpènes sont des composés en C25, construits à partir de 5 unités d'isoprène. L'acide mévalonique (MVA) semble être le précurseur de cette classe. Ils ont été isolés des plantes, des champignons, des insectes, et des éponges. Il y a plus de 150 sesterpènes bien connus, parmi lesquels une trentaine a une structure de furfurane, dérivé du 3,7,11,15,19-Pentamethyleicosane (fig. B7).

Figure B 7: 3,7,11,15,19-Pentamethyleicosane

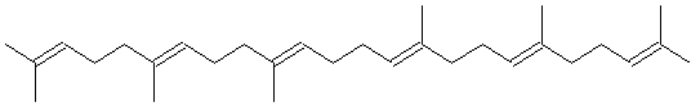


Les sesterterpènes sont plutôt rares dans la nature ; ils se trouvent soit sous forme linéaire soit cyclique, avec un, deux, trois ou quatre cycles.

2.1.1.2.6. Triterpènes

Les triterpènes en C30 sont produits à partir de deux molécules de farnésyl-pyrophosphate (FPP) par une fusion de tête-à tête. Il y a plus de 1700 triterpènes dans la nature dont la majorité est sous forme tétracyclique ou pentacyclique, la forme acyclique étant très rare. Parmi les triterpènes acycliques, le squalène (figure B8) est le précurseur des autres triterpènes, et aussi des stéroïdes végétaux. La plupart de triterpènes sont des alcools, sous forme libre ou glycoside (les saponines) ou ester (Robinson, 1975). Les triterpènes libres sont des composants principaux des résines ou du latex des végétaux. La vitamine D2 est un produit dérivé de triterpène.

Figure B 8: Structure moléculaire de squalène



2.1.1.2.7. Tetraterpènes

Les caroténoïdes sont des tetraterpènes, les plus typiques étant les apocaroténoïdes, les diapocaroténoïdes, les mégastigmanes.

2.1.1.2.8. Polyterpènes

En général, les polyterpènes ou polyisoprènes se composent de plus de 8 unités d'isoprène. Ces terpènes se trouvent souvent sous deux formes isomèriques cis- et trans. Le cis-polyisoprène se trouve dans le caoutchouc indien, alors que le polyisoprène-trans est la partie principale de gutta-percha. En plus Chicle représente un mélange de 1:2 de deux isomères cis- et trans-. Les prenylchoinones sont des polyterpènes comptant jusqu'à 10 unités d'isoprène, parmi eux, on rencontre les vitamines K_1 et K_2 et la vitamine E.

2.1.1.3. L'analyse des terpènes

En général, l'analyse de composés volatils est composée de deux phases: une phase d'échantillonnage (préparation et purification de l'échantillon) et une phase d'analyse chromatographique.

2.1.1.3.1. L'échantillonnage et la préparation

La phase d'échantillonnage est certainement une étape importante dans la définition des substances cibles dans une matrice. Cette phase de préparation a pour but d'éliminer les constituants gênants présents en quantités importantes. De plus cette étape a des effets déterminants sur le rendement d'extraction de certains produits en très faible quantité dans la matrice. Il y a plusieurs méthodes de préparation d'échantillon dont les plus importantes sont décrites ci-dessous brièvement.

2.1.1.3.1.1. Les méthodes d'extrcation classiques

La distillation est la première phase de la séparation des composés volatils de leur matrice. Il existe deux techniques principales : distillation avec entraînement à la vapeur d'eau et distillation moléculaire sous vide. Cette dernière méthode permet de travailler à une basse température mais elle nécessite une étape supplémentaire afin de séparer l'eau des composés volatils par une méthode d'extraction (Gallois et Langlois, 1990).

L'autre approche est l'extraction dont il existe deux techniques, l'extraction par solvant ou l'extraction liquide-liquide (LLE) qui utilise des solvants organiques pour extraire les composés cibles. La deuxième technique est l'extraction par fluide supercritique (SFE) qui utilise du gaz carbonique. La limite principale de LLE est son utilisation exclusivement réservée aux composés ayant une affinité pour le solvant ; de plus elle est surtout utilisée dans les matrices aqueuses obtenues après la distillation (Adda et Dumont, 1974). En ce qui concerne le SFE, une faible polarité du CO_2 ne permet que l'extraction des composés apolaires ou peu polaires.

Une autre approche d'échantillonnage est l'espace de tête (head-space). Deux types de techniques d'espace de tête coexistent: espace de tête statique et espace de tête dynamique. Ces deux techniques permettent d'analyser uniquement les constituants volatils d'un

échantillon. La base de ces deux techniques est similaire : en général un milieu duquel des substances volatiles doivent être extraites est placé dans une enceinte close suffisamment longtemps pour que les composés volatils puissent se partager entre l'échantillon et la phase gazeuse. L'espace de tête statique est principalement utilisé pour les substrats liquides et solides, un prélèvement de la phase gazeuse peut être analysé par CG après avoir atteint à l'équilibre thermodynamique entre la matrice et la phase gazeuse. Dans l'espace de tête dynamique un gaz inerte intervient et entraîne les composés volatils dans une piège froid (Barcarolo et al., 1992) ou une cartouche d'adsorbant (Vernat et Berdagué, 1995).

Purge et piégeage (purge and trap) est une approche initialement prévue pour l'extraction des composés volatils ou semi-volatils dans l'eau (Guinamant, 1992) et elle a été utilisée dans l'analyse d'effluves de produits laitiers (Imhof et Bosset, 1994). Le principe de fonctionnement de cette technique est le même que celui de la technique d'espace de tête dynamique mais le gaz inerte au lieu de passer sur l'échantillon passe au travers de l'échantillon et entraîne ainsi les molécules volatiles vers un piège.

Une autre approche analytique est l'adsorption. La technique classique d'adsorption est représentée par un tube en verre rempli d'un adsorbant en général hydrophobe. Il y a également deux techniques pratiquées dans cette approche : Extraction en Phase Solide (SPE) et Micro-extraction en Phase Solide (SPME). Dans la SPE, l'échantillon (liquide ou solide) est rincé avec le courant d'un gaz et des analytes libérés sont ensuite emprisonnés sur une cartouche d'adsorbant placé dans un tube de sorption. Le piège peut se composer d'un liquide approprié (polydimethylsiloxane) enduit sur un support (Baltussen et al, 1997). Dans cette technique, le solvant utilisé est considérablement réduit par rapport au LLE; par ailleurs, le nombre important des sites absorbants sur les phases stationnaires permet de capter une grande variété de produits. La SPME est décrite en détail dans les paragraphes suivants.

2.1.1.3.1.2. microextraction en phase solide (SPME)

Quatre-vingts pourcent du temps d'analyse environ est passé sur la collection et la préparation de l'échantillon. C'est nécessaire parce que dans la plupart des cas les instruments analytiques ne peuvent pas manipuler directement les matrices des échantillons. Les méthodes classiques utilisant des solvants sont des opérations longues consistant en plusieurs étapes. Chaque étape, particulièrement celle de concentration peut être la source d'erreurs et des pertes. L'utilisation des cartouches ou des disques dans la SPE a réduit fortement les limites de la méthode classique (LLE). Si la SPE a besoin de moins de solvant, néanmoins c'est une

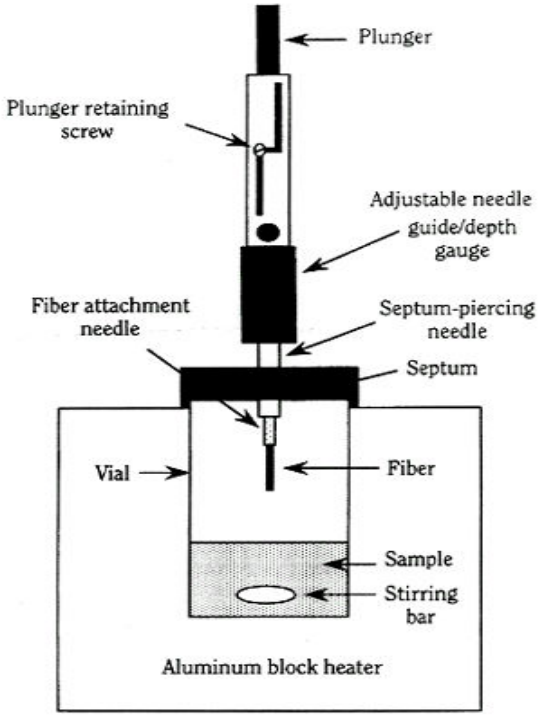
procédure présentant des phases multiples et longue et qui exige souvent une étape de concentration, qui peut avoir comme conséquence une perte des composants volatils.

La SPME (Arthur et Pawlyszin, 1990) permet d'éliminer les inconvénients de la SPE et de la LLE. La SPME intègre le prélèvement, l'extraction, la concentration et l'introduction de l'échantillon dans une étape unique sans utilisation de solvant. Cette méthode économise des coûts, du temps, et elle améliore aussi la limite de détection (Kataoka, 2000). Le tableau (B1) montre l'intérêt de la SPME en comparaison avec d'autres approches analytiques classiques. En général, la SPME a été employée associée à la chromatographie en phase gazeuse (GC) seule ou couplée à la spectrophotométrie de masse (GC-MS). Elle a été appliquée avec succès à une grande variété des composés, particulièrement pour l'extraction des composés organiques volatils et semi-volatils dans les domaines de l'environnement (Chai et Pawliszyn, 1995; Hageman, et al. , 1996; Havenga, 1999), de la pharmacie (Namera, et al. , 1998; Namera, et al. , 2000; Suzuki, et al. , 1996) ainsi que dans le domaine agroalimentaire. La SPME a été également associée à la chromatographie liquide à rendement élevé, Chromatographie Liquide sous Haut Performance (HPLC) et la HPLC-MS (Giuffrida et al. , 1999) afin d'analyser des composés à faible volatilité thermiquement labiles (défavorable à la GC ou GC-MS). Les terpènes, particulièrement les mono-et sesquiterpènes avec une forte volatilité et un faible poids moléculaire sont donc des molécules parfaitement adaptées à l'extraction par SPME. Les données publiées sur la SPME des terpènes concernent le plus souvent les matrices végétales (Kim et Lee, 2004; Chvilickova et Kuban, 2004; Cornu et al. 2001), ou certains produits d'origine végétale comme le vin et le jus de raisin (Begala et al., 2002; Pena et al., 2005). A l'inverse, des données expérimentales concernant l'analyse des terpènes par la SPME dans les matrices biologiques d'origine animale telles que les produits laitiers notamment le fromage sont rares (Ziino et al., 2005; Povolo et al., 2007).

Tableau B 1: La Comparaison entre certaines méthodes d'extraction classique et la SPME (Supelco, Bulletin 923, J.Pawliszyn)

La méthode d'analyse	Précision (%CV)	Coût	Temps d'extraction	Utilisation du solvant	Simplicité	Limite de détection
Extraction Liquide-Liquide	5-50	élevé	1 h	1000 ml	oui	ppt
Espace de tête (Head-Space)	-	bas	30 min	aucune	oui	ppm
Purge et Piegage	1-30	élevé	30 min	aucune	non	ppb
Extraction en Phase Solide (SPE)	7-15	moyenne	30 min	100 ml	oui	ppt
SPME	<1-12	bas	5 min	aucune	oui	ppt

Figure B 9: Dispositif de la SPME (Sansford, 1998)

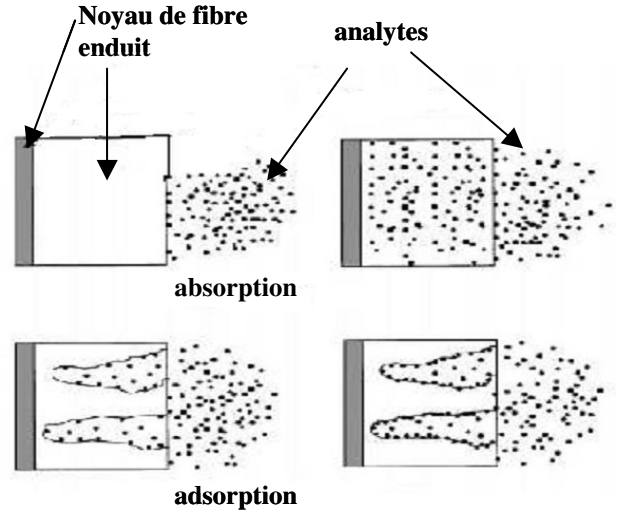


Les principes de la SPME

Le dispositif (figure. B9) est constitué d'une aiguille avec une fibre absorbante qui est introduite dans le flacon contenant l'échantillon par perçage du septum. La fibre qui se compose de silice fondue recouverte de l'absorbante coulisse dans l'aiguille sous l'action d'un piston. L'absorbant est un polymère qui agit en concentrant les analytes par des processus d'absorption/adsorption (fig.B10). L'extraction est basée sur un principe semblable

à la chromatographie, basé sur la partition des molécules entre les phases gazeuse-liquide ou liquide-liquide (Ulrich, 2000). Ce phénomène se traduit par un équilibre moléculaire entre la phase stationnaire de la fibre et le milieu dans lequel elle est plongée.

Figure B 10: Les processus absorption et adsorption (Gorecki et al., 1999)



Cette méthode peut être appliquée dans des matrices liquides, solides ou gazeuses. Dans les matrices solides ou gazeuses, la fibre est exposée dans l'espace de tête au-dessus de l'échantillon. Pour les échantillons solides et liquides, deux équilibres interviennent: l'équilibre échantillon-phase gazeuse et l'équilibre phase gazeuse-fibre. Les molécules doivent dans un premier temps passer en phase gazeuse puis elles se fixent sur la fibre (Chvílíèková et Kuban, 2004). Dans la matrice liquide, la fibre peut être immergée directement dans le liquide et les molécules se partagent entre la fibre et l'échantillon liquide (Röhring et Meisch, 2000). Après l'échantillonnage, la fibre est rétractée dans l'aiguille et la prochaine étape est le transfert des analytes extraits dans le chromatographe. Dans ce cas, la désorption thermique des analytes a lieu dans l'injecteur du GC. Pour les composés moins volatils, la désorption s'effectue par un lavage avec des solvants appropriés à la HPLC.

Les aspects techniques et la performance analytique

En général, les molécules polaires et non-volatiles sont extraites par un mode en immersion directe (DI) et les molécules volatiles et apolaires sont extraites par un mode head-

space (HS-SPME). Ce dernier mode est utilisé pour l'extraction des mono-et des sesquiterpènes.

La cinétique d'extraction est influencée par des facteurs liés au processus d'extraction (la température de matrice, le temps d'extraction, la quantité de l'échantillon, les paramètres de la fibre) et certains autres liés à la matrice comme la force ionique et le pH. La durée d'extraction augmente avec l'épaisseur de la fibre (Ulrich, 2000). La période d'extraction peut être réduite par différents types d'agitation (agitation, ultrasons, etc.). Les facteurs déterminant la performance de SPME sont donc le type et l'épaisseur de la fibre utilisée dont les plus communes sont détaillées dans le tableau (B2).

Tableau B 2: Les fibres de la SPME disponibles dans le commerce (Vas et Vékey, 2004)

Enduit de fibre	Epaisseur de film (µm)	polarité	Température opératoire maximale (°C)	technique	Composé à analyser
Polydimethylsiloxane (PDMS)	100	Apolaire	280	GC/HPLC	volatil
PDMS	30	Apolaire	280	GC/HPLC	Non-polaire semi-volatil
PDMS	7	Apolaire	340	GC/HPLC	Non-polaire semi-volatil
PDMS-divinilebenzène(DVB)	65	Bipolaire	270	GC	Polaire volatil
PDMS- DVB	60	Bipolaire	270	HPLC	Usage général
Polyacrylate(PA)	85	Polaire	320	GC/HPLC	Polaire semi-volatil (phénols)
Carboxen-PDMS	75	Bipolaire	320	GC	Gaz et volatil
Carboxen-DVB	65	Polaire	265	GC	Analytes polaires (alcools)
DVB-PDMS-Carboxen	50/30	Bipolaire	270	GC	Odeurs et flaveurs

PDMS et PA sont les fibres les plus souvent utilisées, l'extraction des substances par ces deux fibres s'effectue par l'intermédiaire du phénomène d'absorption. D'autres types de fibres (Carbowax-DVB, Carbowax-TPR, PDMS-Carboxen et PDMS-DVB) sont des polymères mélanges et l'extraction des analytes par ces fibres est effectuée par adsorption. Le type de fibre affecte la sélectivité de l'extraction (les fibres polaires sont employées pour les analytes polaires et les fibres non polaires pour les analytes non polaires comme avec des phases stationnaires de GC conventionnelle). L'utilisation d'une fibre plus épaisse augmente le temps d'extraction mais avec des rendements plus élevés. La durée d'extraction est indépendante de la concentration de l'analyte dans l'échantillon et le nombre relatif des molécules extraites à un temps donné est également indépendant de la concentration d'analyte

(Ulrich, 2000). Il existe très peu de données sur la SPME pour les terpènes dans les matrices complexes comme les matrices biologiques (rumen, sang).

2.1.1.3.1.2. Analyse chromatographique et identification

La séparation des terpènes s'effectue en général par CPG notamment pour les terpènes volatils (mono- et sesquiterpènes) et par HPLC pour les composés pas ou peu volatiles. Les colonnes utilisées sont souvent apolaires du fait des caractéristiques apolaires de la majorité des composés terpéniques.

La méthode couramment utilisée pour l'identification des terpènes est la CPG couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). En parallèle, une autre approche est souvent utilisée qui consiste à calculer les indices de Kovats de terpènes et comparer ces indices avec une base de données contenant les indices pour les terpènes identifiés. Les indices de Kovats sont les temps de rétention relatifs des substances analysées par rapport à celles des alcanes. La formule ci-dessous décrit le calcul des indices de Kovats à partir des temps de rétention des composés cibles et ceux des alcanes :

$$I = 100\left[\frac{t_{Ri} - t_{Rz}}{t_{R(z+1)} - t_{Rz}} + z\right]$$

avec I = indice de Kovats, tR = temps de rétention, i = molécule inconnue, z = nombre d'atomes de carbone de l'alcane qui sort avant le composé inconnu et (z +1) = nombre d'atomes de carbone de l'alcane qui a été élué après le composé inconnu.

2.1.2. La répartition des terpènes dans le monde vivant

Les terpènes ont été isolés chez les champignons (McCorkindale, 1976), des algues marines (Moore, 1977), des insectes (Silverstein et al., 1966) et des éponges, mais la plus grande partie des ces substances est retrouvée dans les plantes.

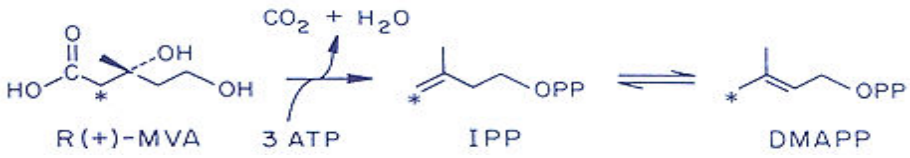
2.1.2.1. La biosynthèse des tetrpénoïdes dans le règne végétal

Comme vu ci-dessus, les terpènes sont des produits d'un enchaînement de leur unité de base, et la biosynthèse de terpènes se déclenche par activation de l'isoprène (activé par ATP). En 1956 un composé en C6 (acide mévalonique, MVA) a été découvert en tant que clé de la biosynthèse des tetrpénoïdes. Plus tard son intervention dans le métabolisme du cholestérol a été démontré et la voie métabolique, de l'*acétyl-CoA* jusqu'à l'isoprène actif par l'intermédiaire de MVA a été élucidée (Nes et Mckean, 1977).

2.1.2.1.1. La biosynthèse d'unité de base isoprène

Deux molécules d'*acétyl-CoA* réagissent ensemble en donnant la naissance à *l'acétoacétyl-CoA*, lequel en fixant une troisième molécule *d'acétyl-CoA* forme le *β-hydroxy β-méthylglutaryl-CoA* . Ensuite, la réduction en alcool du carboxyle combiné au CoA conduit à la formation de MVA. En éliminant une molécule de CO_2, le MVA est converti en isopentenyl pyrophosphate (IPP) ou isoprène actif (figure B11). C'est le IPP qui constitue l'unité isoprènique d'enchaînement, et il s'isomérise en diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP).

Figure B 11: Formation de l'isoprène actif (IPP) de l'acide mévalonique et isomérisation en DMAPP



2.1.2.1.2. Les organes végétaux synthétisant des tetrpénoïdes

La synthèse des tetrpénoïdes est généralement associée à la présence des structures histologiques spécialisées, souvent situées sur ou à proximité de la surface de tissus des plantes. Les principales structures cellulaires produisant les tetrpénoïdes sont soit des cellules à essence (Lauracées, Zingibéracées..), soit des poils sécréteurs stipités (Pelargonium) ou sessiles (Labiées), soit des poches sécrétrices schizogènes (Myrtacées) ou schizolysigènes (Rutacées, Burséracées), soit enfin des canaux sécréteurs (Térébinthacées, Ombellifères). Le réticulum endoplasmique et dans certains cas les plastes sont les organites dans lesquels les tetrpénoïdes sont synthétisés.

2.1.2.2. Les fonctions biologiques de tetrpénoïdes

Les plantes produisent une grande variété de produits formés à base d'isoprène, certains d'entre eux sont des métabolites primaires comme des stéroïdes et des groupes prosthétiques des enzymes et vitamines en chaînes latérales (vitamine K, E). Certains sont des hormones végétales comme l'acide abscisique ou les gibbérellines (diterpènes). Cependant la majorité des composés terpéniques sont des métabolites secondaires sans fonction directe dans la croissance des végétaux. Ces métabolites sont responsables de la couleur et l'odeur des plantes et des épices (piments, curies), certains d'entre eux ont des fonctions écologiques importantes mais la majorité (les mono- et sesquiterpènes) possèdent une activité anti-microbienne contre un large éventail des bactéries et champignons. Par ailleurs, un certain nombre de terpènes ont des propriétés toxiques, répulsives ou attractives pour d'autres organismes, ce qui a conduit à la conviction qu'ils ont des rôles écologiques dans les interactions antagonistes ou mutualistes entre les plantes et plantes-animaux (Langenheim, 1994). Ici nous avons évoqué deux rôles principaux des tetrpénoïdes connus dans la nature.

1- Défense contre les antagonistes :

Certains terpènes sont toxiques vis-à-vis de certains insectes (Justicia et al., 2005) ou nématodes (Lorimer et al., 1996), cette action pouvant s'effectuer par une action directe sur les récepteurs du goût (Messchendorp, et al., 2000). Chez les herbivores, les effets aversifs des terpènes peuvent être médiés par différentes voies. D'abord l'action des terpènes peut s'exercer comme dans le cas des insectes par des flaveurs indésirables qui conduisent à une aversion contre les plantes contenant ces substances. Par ailleurs, les terpènes peuvent influencer l'ingestion indirectement par des voies post-ingestives comme la réduction de la digestion (Robbins et al., 1987), la toxicité générale sur l'animal et l'acidose sanguine (Foley, 1992). Cette activité protectrice a été observée chez les plantes et aussi les insectes (Hinou et al., 1989) et certains organismes marins (Kalodera et al., 1997).

2- Messages pour les symbiotes :

Dans les écosystèmes naturels, les terpènes peuvent avoir un rôle déterminant en servant de moyens de communication entre les espèces. La plupart des monoterpènes et sesquiterpenes sont des bons vecteurs d'information à distance parce que ces molécules lipophiles ont un faible poids moléculaire et une pression de vapeur elevée à la température ordinaire. En plus une grande variabilité structurelle permet d'avoir un message plus précis. La plupart des communications médiées par les terpènes sont des interactions entre plantes et insectes (Dudareva et al., 2006). De plus les terpènes (phéromones) ont également des

fonctions importantes au sein des espèces animales comme les insectes pour lesquels ils représentent des indicateurs olfactifs servant par exemple à la reproduction.

Les plantes sont immobiles pour la plupart de leur cycle de vie et font souvent appel à d'autres organismes pour disperser le pollen et les graines. A cet effet, des composés volatils libérés des fleurs et des fruits (Knudsen et al., 2006) servent à attirer les pollinisateurs.

Depuis l'antiquité, certaines caractéristiques et fonctions biologiques de terpènes étaient connues pour l'homme et celles-ci ont été utilisés indirectement par l'exploitation des épices en tant que parfums et conservateurs (Bauer et al., 2001). Plus tard, la recherche sur les composés actifs a abouti à l'extraction des terpènes notamment volatils à partir des plantes. Ces extraits vegetaux dont les composants majeurs sont les mono- et sesquiterpènes s'appellent les huiles essentielles (HES).

2.1.3. Les huiles essentielles et leur activité anti-microbienne

L'objectif principal de cette partie est la présentation de l'action antimicrobienne des huiles essentielles, des mécanismes d'action de ces composés sur les microorganismes et de certains facteurs déterminant cette activité. Les HES ou les volatiles, sont des liquides aromatiques obtenus a partir de différentes parties de plantes (fleurs, bourgeons, graines, feuilles, brindilles, écorce, fruits, herbes et bois) le plus souvent par la méthode de distillation à la vapeur d'eau (Van de Braak et Leijten, 1999). Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes constituent les composants actifs les plus importants des HES, dont les mono- et sesquiterpénoïdes forment la majeure partie (Calsamiglia et al., 2007).

Les HES peuvent comporter plus de soixante composants différents dont le composant majeur peut constituer de plus de 85% de HES (Bauer et al., 2001). Le tableau (B3) montre les HES principales avec leurs composants majeurs qui ont montré une activité antimicrobienne *in vitro*.

Tableau B 3: Composants majeurs de certaines huiles essentielles présentant des propriétés antimicrobiennes

Nom commun	Nom latin de plante origine	Composant majeur	% approximatif de composant de l'HE
Cilantro	*Coriandrum sativum (les feuilles immature)*	Linalool	26%
		E-2-decenal	20%
Coriandre	*Coriandrum sativum (graine)*	Linalool	70%
Cannelle	*Cinnamomum zeylandicum*	Trans-cinnamaldéhyde	65%
Origan	*Origanum vulgare*	Carvacrol	Trace-80%
		Thymol	Trace-64%
		γ-Terpinène	2 –52%
		p-Cymène	Trace-52%
Romarin	*Rosmarinus officinalis*	α-pinène	2 –25%
		Bornyl acétate	0 –17%
		Camphre	2 –14%
		1,8-cinéole	3 –89%
Sauge	Salvia officinalis	Camphre	6 –15%
		α-pinène	4 – 5%
		β-pinène	2 –10%
		1,8-cinèole	6 –14%
		α-thujone	20–42%
girofle	*Syzygium aromaticum*	Eugénol	75–85%
		Eugényl acétate	8 –15%
Thyme	*Thymus vulgaris*	Thymol	10–64%
		Carvacrol	2 – 11%
		γ-Terpinène	2 –31%
		p-Cymène	10–56%

2.1.3.1. Les facteurs déterminant le degré d'activité antimicrobienne des HES

Plusieurs paramètres influencent la determination de l'activité antimicrobienne des HES ou de leurs composants actifs, tels que la méthode d'évaluation d'activité antimicrobienne, l'effet de la matrice biologique, le type et la structure moléculaire des composants actifs, la dose ajoutée, le type des microorganismes ciblés et leur éventuelle adaptation aux HES.

2.1.3.1.1. Les méthodes d'évaluation d'activité antimicrobienne

Les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des HES les plus couramment utilisées sont la 'méthode diffusion dans l'Agar'et la 'méthode de dilution'. Dans la première

méthode, les HES sont ajoutées sur des disques ou dans des puits creusés dans l'Agar : les composants actifs des HES peuvent diffuser dans l'Agar et agir sur les microorganismes. Dans la seconde méthode, les HES sont ajoutées dans des bouillons d'Agar ou d'autres liquides dans lesquelles les bactéries sont présentes. L'activité antimicrobienne des HES est différente selon la méthode. Parmi 52 HES examinées, l'activité antimicrobienne observée des huiles de citronnelle et d'origan était 2 fois plus élevée avec la méthode de dilution qu'avec la méthode de diffusion (Hammer et al., 1999).

2.1.3.1.2. L'effet de la matrice biologique

Les propriétés antimicrobiennes des HES différent en fonction de la matrice à laquelle elles sont ajoutées, ou du fait du contact avec les macromolécules comme les lipides ou les protéines qui protègent les bactéries de l'action des HES (Tassou et al., 1995). Ainsi les HES diluées dans la phase lipidique des aliments seront moins efficaces sur les bactéries de la phase aqueuse (Mejlholm et Dalgaard, 2002). Les aliments à faible teneur en eau empêchent également l'accès des HES aux sites cible sur la membrane des cellules bactériennes. Par ailleurs, une réaction chimique entre les protéines et les groupes fonctionnels des HES réduit la disponibilité des molécules actives : ceci a été observé pour le carvacrole, conduisant à une protection relative de *B. cereus* contre les HES dans le lait (Pol et al., 2001).

De plus, certains solvants ou détergents peuvent influencer l'activité antimicrobienne des HES. C'était le cas pour le Tween-80, solvant qui neutralise les groupes fonctionnels phénoliques et réduits leur activité antimicrobienne (Cremieux et al., 1981).

2.1.3.1.3. Le type et la structure moléculaire des terpénoïdes

Le principal facteur modifiant l'activité antimicrobienne des HES est le type et la structure moléculaire des composants actifs présents dans les HES. Ainsi *in vitro*, une activité antimicrobienne plus élevée des terpènes oxygénés en comparaison des terpènes hydrocarbures a été observée (Oh et al., 1967; Griffin et al., 1998; Dormans et Deans, 2000; Cox et al., 2001). Les composants oxygénés purs ont aussi montré une activité supérieure par rapport aux HES dans lesquelles ils se trouvent. Ceci a été observé pour la géraniol et citronéllol de l'huile de géranium (Didry et al., 1993) et également pour le thymol et le carvacrol des HES du poivron (Lis-Balchin et al., 1996).

La structure moléculaire semble présenter un rôle aussi important que la présence d'oxygène dans la molécule de terpène: la caractéristique lipophile du squelette hydrocarboné ainsi que la propriété hydrophile des groupes fonctionnels sont déterminants vis-à-vis de l'activité antimicrobienne des tetrpénoïdes (Kalemba et Kunicka , 2003). Sur cette base, l'ordre d'activité antimicrobienne de ces composés est le suivant:.

Phénols> aldéhydes>cétones>alcools>éthers>hydrocarbones

De façon plus précise, dans les phénols, la présence de groupe hydroxyle apparaît déterminante (Ultee et al., 2002); dans les composés non phénoliques, le type de groupe alkyl (alkenyl>alkyl) influence l'activité antimicrobienne (Dorman et Deans, 2000). Enfin, dans les hydrocarbones, la structure cyclique semble avoir un rôle important sur leur activité antimicrobienne (Amaral et al., 1998).

2.1.3.1.4. Le type des microorganismes cibles

Un autre paramètre important déterminant l'activité antimicrobienne des HES est le type des microorganismes ciblés. En général, les différents microorganismes n'ont pas une sensibilité similaire vis à vis des HES. Parmi les microorganismes, *Bacillus subtilis* et *Staphylocoque aureus* (Gram+), *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -), *Candida albicans* (Levures) et *Aspergillus niger* (champignons) ont été les plus étudiés. Les champignons montrent généralement une sensibilité supérieure par rapport aux bactéries et parmi les bactéries, les Gram – apparaissent plus résistants que les Gram + vis-à-vis des HES (Cox et al., 2000; Amaral et al., 1998). Inversement, *E.coli* est plus sensible vis à vis de l'huile de l'arbre à thé que *S.aureus* (Hayes et al., 1997). De même, certains champignons sont plus résistants vis-à-vis de l'huile de genévrier que les bactéries (Chao et al., 2000). Enfin, une sensibilité supérieure des bactéries anaérobies a été observée quelles que soient les HES par rapport à celles vivant en aérobiose (Amaral et al.,1998; Juven et al. , 1994).

Les effets de la dose ajoutée et l'éventuelle adaptation des microorganismes aux HES seront évoqués dans la partie 3 (l'impact des HES sur les microorganismes du rumen).

2.1.3.2. Le mode d'action antimicrobienne des huiles essentielles

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des HES, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (Carson et al., 2002). De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des HES sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules (Davidson, 1997).

Le mode d'action des HES dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions (K^+): ce mécanisme a été observé avec l'huile de l'arbre à thé sur les bactéries Gram+ (*Staphylococcus aureus*) et Gram -(*E. coli*) et levure (*Candida albicans*) *in vitro* (Cox et al., 2000; Carson et al., 2002).

Certains composés phénoliques des HES interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP (Knobloch et al., 1989; Sikkema et al., 1995). Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Entérobactér aèrogènes* a aussi été rapportée (Wendakoon et Sakaguchi, 1995). Les HES peuvent aussi inhiber la synthèse de DNA, RNA, des protéines et des polysaccharides (Zani et al., 1991).

Le mode d'action des HES dépend aussi du type de microorganismes: en général, les bactéries Gram - sont plus résistantes que les Gram + grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram - est plus riche en lipo-polysaccharides et en protéines que ceux de Gram- qui la rend plus hydrophile, ce qui empêche 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 leur groupes fonctionnels et atteindre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable (Dorman et Deans, 2000).

2.1.4. Stabilisation des effluents des ruminants par les huiles essentielles

Un des problèmes dans l'élevage des animaux domestiques est la production d'une grande quantité d'effluents, associés à une émission importante de gaz odoriférants. Les causes principales de ces odeurs sont une dégradation incomplète des hydrocarbones, des protéines et des lipides présents dans les effluents par certains types de coliformes qui conduit à la formation d'AGV, d'amines et de composés soufrés. Il semble que certaines HES peuvent contrôler ce processus fermentaire en agissant sur les microorganismes responsables. Dans un essai *in vitro* (Varel, 2001), l'association de thymol et de carvacrol a complètement inhibé la production des AGV pendant 23 jours, la population des coliformes et toutes les bactéries anaérobies ont été diminuées plus de 95% pendant 2 jours.

2.1.5. Conclusion

Parmi plusieurs méthodes d'échantillonnage appliquées dans l'extraction des terpènes, la SPME s'est substituée avec succès aux autres méthodes classiques durant ces dernières années. Cette technique a été caractérisée comme une méthode simple et rapide et bien adaptée aux substances volatiles comme les mono- et sesquiterpènes. Pourtant il manque des données expérimentales sur l'optimisation de la SPME dans les matrices biologiques, ce qui justifie les deux premières expérimentations que nous avons réalisées sur la mise au point de la SPME dans le jus du rumen et le sang.

Une des propriétés les plus connues des terpènes est leur activité antimicrobienne : cette caractéristique dépend de plusieurs facteurs, dont le type de microorganisme et le type de terpène sont parmi les plus importants. Sachant que cette activité n'est pas générale pour tous les types des microorganismes, certains d'entre eux peuvent même consommer les terpènes en tant que source de carbone, les dégrader ou les transformer, ce qui peut expliquer l'inefficacité de certaines de ces molécules vis à vis de certains microorganismes. Ce sujet a été discuté en détail dans le chapitre suivant.

2.2. Biotransformation des terpènes

Ce chapitre présente l'action des microorganismes sur les terpènes et la possibilité de dégradation de ces composés par différents types de microorganismes dans des conditions d'aérobiose. Il présente aussi quelques données expérimentales sur le métabolisme microbien

du limonène comme molécule modèle, les voies métaboliques et les produits principaux formés. Il présente également certaines données représentatives du métabolisme des terpènes en anaérobiose et les bactéries principales participant au métabolisme des terpènes.

2.2.1. Introduction

L'activité antimicrobienne des mono- et sesquiterpènes dépend de plusieurs facteurs dont le type de microorganismes et le type de la molécule. L'absence d'activité antimicrobienne d'une molécule sur un microorganisme peut avoir différentes explications. L'une d'entre elles est la biodégradation plus ou moins poussée de cette molécule, ce qui a été observé avec plusieurs microorganismes aérobies ou anaérobies (Heyen et Harder, 1995; Misra et al. , 1996; Foss et al., 1998).

L'importance des terpènes dans la nutrition des ruminants ou comme marqueurs dans les produits animaux nécessite une étude de leur devenir depuis leur ingestion jusqu'au produit, avec une attention particulière pour la flore microbienne du rumen.

2.2.2. Biodégradation d'origine microbienne

Les données expérimentales présentent divers organismes impliqués dans la biotransformation de terpènes. Toutefois la majeure partie de la biotransformation des terpènes a été attribuée aux bactéries, champignons et levures.

La plupart de ces microorganismes a été isolée à partir d'échantillons issus de sol de forêt de pin (Harder et Probian, 1995; Misra et al., 1996) ou de boue d'épuration (Foss, et al. , 1998). Ces microorganismes aérobies ainsi qu'anaérobies utilisent les terpènes comme une source de carbone et d'énergie. Certaines bactéries du genre *Pseudomonas* (*P. aeruginosa, P. mallei*) sont les plus résistantes à l'activité des terpènes : *P. aeruginosa* est la bactérie la plus résistante à 32 huiles essentielles différentes (Hinou et al.,1989). Plusieurs essais *in vitro* ont montré la dégradation de divers terpènes par *P. gladioli* (Cadwallader et al.,1989), *P. putida GS1* (Speelmans et al., 1998), *P. fluorescens* (Boontawan et Stuckey, 2006). Parmi les autres bactéries, *Bacillus stearothermophilus*, (Chang et Oriel, 1994); *Eschérichia coli* (Carter et al., 2003), et les coques comme *Rhodococcus erythropolis* (de Carvalho et al., 2000) ou *Rhodococcus opacus* (de Carvalho et da Fonseca, 2003) sont des espèces capables de contribuer à la biodégradation des terpènes.

Certains champignons et levures sont aussi capables de métaboliser les terpènes et de les dégrader en d'autres composés plus légers : *Pénicillium digitarum, Cladosporium* sp.T7,(Kieslich et al., 1986), *Hormonema* sp. UOFS Y-0067, (Van Dyk et al., 1998), *Aspergillus cellulosae*, (Noma et al., 1992), *Aspergilus niger,* (Demyttenaere et al., 2000; Aranda et al., 2001) sont parmi les plus actifs.

2.2.2.1. Biotransformation de terpènes en aérobiose

Une majeure partie des essais expérimentaux étudiant la bioconversion des terpènes sont réalisés dans des conditions d'aérobiose, puisque la présence d'oxygène moléculaire est un facteur déterminant des voies métaboliques chez les microorganismes. Dans ces voies, les molécules d'oxygène sont des substrats finaux accepteurs d'électrons, avec production de CO_2 à partir des carbones issus des terpènes. Néanmoins dans certains cas, les terpènes présents dans le milieu sont inaccessibles au métabolisme microbien à cause d'un faible nombre de groupements fonctionnels (hydroxyle et carbonyle). L'introduction de l'oxygène aboutissant à la formation de ces groupements fonctionnels peut donc déclencher le métabolisme de ces molécules par les microorganismes, ce qui a été démontré par Wilson et Hrutfiord (1975), où l'aération d'une lagune a conduit à une diminution de plus de 90% de la teneur en terpènes.

Cependant la dégradabilité des terpènes en aérobiose varie en fonction du type de molécule et dépend de la présence éventuelle d'un groupement: Wilson et Hrutfiord, (1975) ont rapporté différents taux de dégradation principalement associés au type moléculaire: les alcools sont dégradés à 99%, les hydrocarbones à 75% et les cétones à 12%. Ce métabolisme en aérobiose peut se composer de plusieurs réactions chimiques telles que l'hydroxylation des carbones allyliques, l'oxygénation des doubles liaisons carbone-carbone, ou l'oxydation des alcools en cétones ainsi que la rupture de certaines structures cycliques (Dhavalikar et Bhattacharyya, 1966; Trudgill, 1990). Ainsi la dégradabilité de 4 monoterpènes hydrocarbones (*d*-limonène, α-pinène, c-terpinène et terpinolène) ainsi que de 4 monoterpènes alcools (arbanol, linalool, plinol, et α -terpinéol) a été étudiée en culture aérobie à partir de sol de forêt de pin (Misra et al., 1996). Parmi les terpènes testés, tous les hydrocarbones et deux terpènes alcools (linalool et α -terpinéol) ont été totalement métabolisés par les microorganismes présents dans la culture.

Une des molécules les plus étudiées en aérobiose est le limonène qui peut être considéré comme une molécule modèle illustrant les voies métaboliques intervenant dans la dégradation aérobiose des terpènes.

2.2.2.2. Limonène comme molécule modèle

Il existe deux enantiomères du limonène, le D- et L-limonène. Le L-limonène se trouve principalement dans certaines variétés d'arbres et d'herbes comme *Mentha spp,* alors que le D-limonène est le composé majeur d'huiles extraites d'agrumes. En raison de la similarité entre le D-limonène et certains composés aromatiques et médicinaux (carvéol, carvone et alcool prillyl), cet isomère est plus important que son isomère (L) du point de vue de sa biotransformation microbienne. Les produits intéressants dérivés du D-limonène sont des composés oxygénés comme le carvéol, l'alcool perillyl, l'α- terpinéol, le carvone et le menthol.

Biotransformation microbienne du limonène

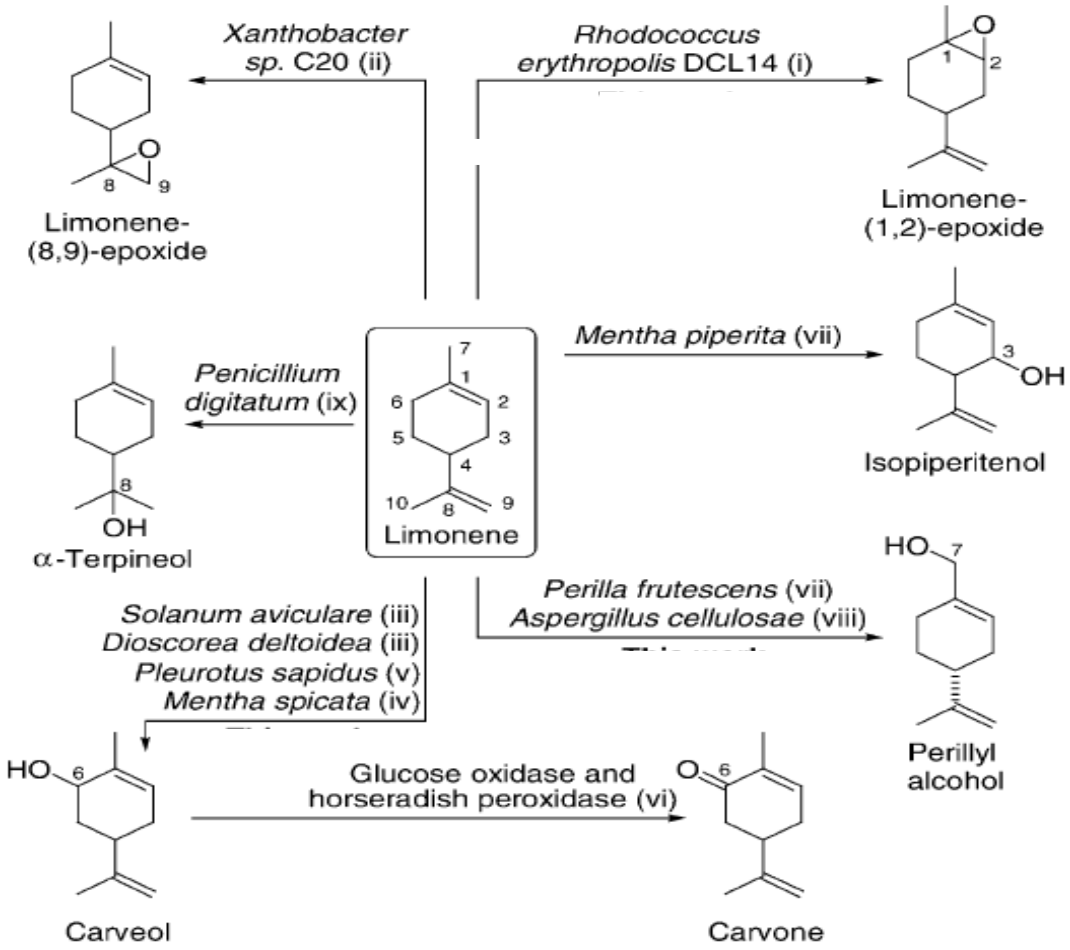
La biotransformation du limonène par différents microorganismes conduit à la formation de plusieurs produits intermédiaires et finaux (figure B12) bien que les voies métaboliques soient relativement similaires pour la plupart des microorganismes. Globalement deux voies métaboliques principales, l'hydroxylation et l'époxydation ont été observées dans la biotransformation du limonène. L'hydroxylation a été souvent observée sur les groupements méthyle et méthylène en différentes positions dont certaines sont mentionnées ci-dessous.
-hydroxylation en position 7 et formation de l'alcool perillyl (Duetz et al. ,2001).
-hydroxylation en position 3 et formation de l' isopiperitenol (Van Ddyk et al. ,1998).
-hydroxylation en position 6 et formation de carvéol (Duetz et al. , 2001).
-hydroxylation en position 8 et formation de l'α-terpinéol (Chang et al. , 1995).
La voie métabolique d'époxydation est observée sur les doubles liaisons.
-époxydation en position 1,2 et formation du limonène-1,2-époxyde (Abraham et al. ,1986).
-époxydation en position 8,9 et formation du limonène 8,9 époxyde (Van der Werf et al., 2000.

La gamme de microorganismes qui participe à la biotransformation du limonène est large. Parmi les bactéries, les *pseudomonas*, les *bacilles* et les *coques* transforment le limonène en alcool perillyl, en acide perillyl, en α-terpinéol, ou en limonène-6,8-diol

(Cadwallader et al., 1989; Chatterjee et Bhattacharyya, 2001; Dhavlikar et al., 1966; Speelmans et al.,1998). Parmi les bacilles, *B. stearothermophilus* BR388 métabolise le limonène en alcool perillyl, en aldéhyde perillyl, et en α-terpinéol (Chang et Oriel, 1994). *Rhodococcus erythropolis* DCL14 est la seule coque qui transforme le limonène par époxydation en position 1,2 formant du limonène 1,2 époxyde dont l'oxydation aboutit à la production des isomères diols correspondants qui sont probablement oxydés en hydroxyacétone (Van der Werf et al., 1999). *Xanthobacter* sp. C20 est une souche qui transforme le limonène par époxydation en position 8,9 (Van der werf., 1999).

Plusieurs champignons et levures participent aussi à la biotransformation du limonène. Il semble que toutes les biotransformations du limonène par les levures ou champignons commencent par les enzymes mono-oxygénases attachées au P-450.

Figure B 12: Quelques voies métaboliques de la biotransformation du limonène



(i) Van der Werf et al. (1999), (ii) Van der Werf et al. (2000), (iii) Vanek et al. (1999), (iv) McCaskill et Croteau (1997), (v) Onken et Berger (1999), (vi) Trytek et Fiedurek (2002), (vii) Karp et al. (1990), (viii) Noma et al. (1992), (ix) Demyttenaere et al. (2001).

La transformation du limonène en α-terpinéol par *Pénicillium digitarum* est initiée par l'époxydation de la double liaison en position 8,9 et suivie par la rupture réductive qui forme l'α-terpinéol. (Kieslich et al 1986). L'autre double liaison du limonène (1,2) est attaquée par les champignons *Cladosporium* sp.T7 , *Diplodia gossypin* ATCC10936 et deux variétés de *Corynespora cassiicola* (DSM 62474 et DSM 62475), (Kieslich et al., 1986). Le trans-isopiperitenol est aussi un produit hydroxylé du limonène formé par la levure noire *Hormonema* sp. UOFS Y-0067 (Van Dyk et al., 1998). Une autre hydroxylation régiospécifique a été observée chez le basidiomycète *Pleurotus sapidus* qui transforme le limonène en *cis*- et *trans*-carvéol (Onken et Berger 1999). Par contre, *Aspergillus cellulosae* n'a pas montré de dégradation régiospécifique, et les produits obtenus étaient un mélange de périllyle alcool (12%), cis-carvéol (5%), isopiperitenone (19%) et limonène 1,2 trans, diol (21%), (Noma et al., 1992).

2.2.2.3. Biotransformation en anaérobiose

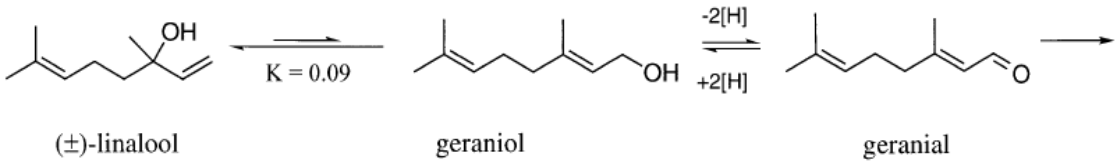
En anaérobiose, l'absence de l'oxygène rend les microbes théoriquement incapables d'utiliser des terpènes surtout ceux présentant un faible nombre des groupement fonctionnels. Néanmoins, l'isolement de certaines bactéries anaérobies (dénitrifiantes ou méthanogènes) consommant des alcanes (Aeckersberg et al., 1991; Rueter et al., 1994) ou des hydrocarbones aromatiques (Dolfing, 1990; Lovley et Lonergan**,** 1990) comme seule source de carbone et d'énergie a montré que la biodégradation anaérobie de nombreux composés naturels de faible poids moléculaire est ainsi possible.

2.2.2.3.1. Les bactéries dénitrifiantes

Certaines bactéries dénitrifiantes sont capables de se développer sur plusieurs monoterpènes. Pour les monoterpènes aliphatiques (linéaire), le groupement méthyle empêche le métabolisme des terpènes par la voie métabolique de β-oxydation des acides gras. Pour cela les études effectuées par Seubert et al. (1964) ont montré que le β-méthyle-α,β-en-acide CoA thioester est capable d'enlever ce groupement méthyle sous forme d'acétate par une carboxylation préalable. Puisque cette voie est indépendante de l'oxygène moléculaire, elle

peut également être présente dans les microorganismes anaérobies dégradant les terpènes. La transformation en anaérobiose du linalool (monoterpène aliphatique) en géraniol par *Thauera linaloolentis* (Foss et Harder, 1997) est une isomérisation qui peut être considérée comme une phase initiale dans le métabolisme anaérobie du linalool (Figure B13).

Figure B 13: Les initiales du métabolique du linalool



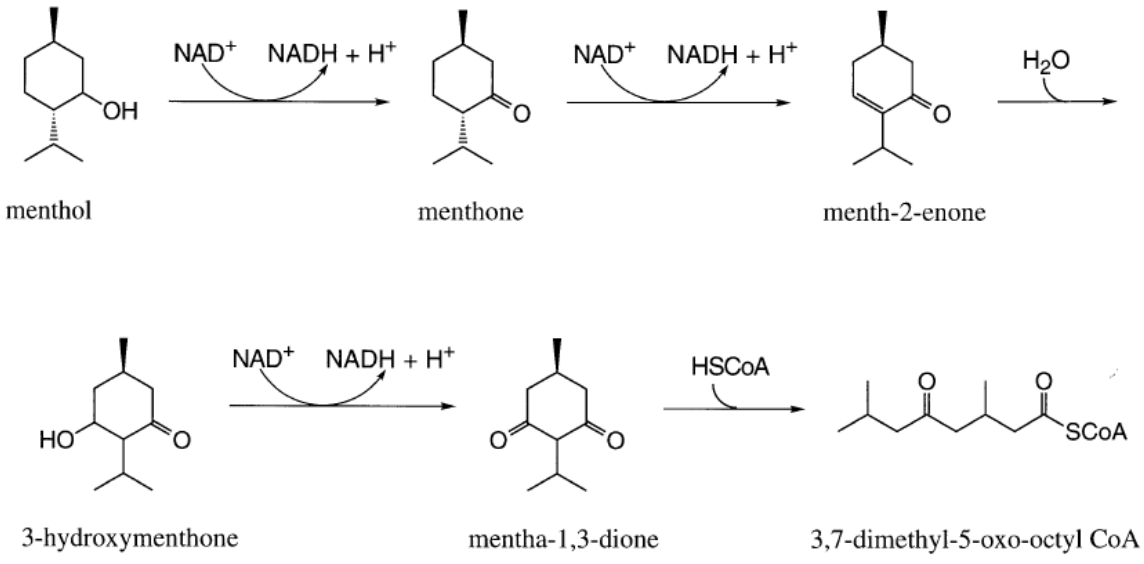
Pour les monoterpènes cycliques, les voies biochimiques connues suggèrent la nécessité de la rupture d'une liaison carbone-carbone dans la structure cyclique pour l'oxydation complète. Durante ces dernières années plusieurs voies métaboliques anaérobiose conduisant à l'ouverture du cycle carboné ont été déterminées. Certains substances aromatiques sont transformées en benzoate, qui subit ensuite une réduction de cycle carboné et la formation β-oxo-carboxylique-CoA ester, ce-dernier subissant une béta-oxydation analogue de celle des acides gras (Koch et al., 1993). La dégradation des monoterpènes monocycliques contenant un groupe hydroxyle (par exemple, le menthol, (fig. B14) peut être effectuée par une voie métabolique semblable, en supposant que la chaîne latérale d'isopropyle n'inhibe pas cette voie. La dégradation en anaérobie des composés contenant une double liaison (menthène, phellandrène) a été précédemment observée, quand l'hexadecène a été employé comme seul substrat pour les bactéries réductrices de sulfate et nitrate (Aeckersberg et al., 1991; Gilewicz et al., 1991). Pour ces dernières, la dégradation peut être initiée en ajoutant une molécule d'eau au double liaison, et l'alcool formé peut être ensuite orienté vers une voie de β-oxydation.

Un réarrangement du squelette carboné est la voie métabolique typique des monoterpènes bicycliques. Cependant, ces réactions ont besoin de lumière ou d'une activation par la chaleur. La catalyse enzymatique peut conduire à l'ouverture d'un cycle par l'intermédiaire de cations ou de radicaux libres, de façon semblable à la catalyse enzymatique des dérivés du cyclopropane (Suckling, 1988).

Plus récemment, il a été suggéré que les monoterpènes insaturés peuvent être transformés initialement en acides organiques dans les conditions d'anaérobiose, puisque les

intermédiaires dans les voies cataboliques sont habituellement les acides organiques, comme dans le cycle du citrate. C'est le cas avec β-proteobacterium *Alcaligenes defragrans,* une bactérie dénitrifiante produisant de l'acide géranique en présence de β-myrcène, d'α-phellandrène, de limonène, et de l'α-pinène en milieu contenant des nitrates en conditions d'anaérobiose (Heyen et Harder , 2000). Harder et Probian (1995) ont également observé que *Pseudomonas citronellolis* DSM 50332 isolé du sol de forêt de pin se développe en anaérobiose sur le citronellol et le 3,7 dimethyl-1-octanol tandis que sur d'autres monoterpènes comme le géraniol, le nérol ou les monoterpènes acycliques, aucune croissance n'est observée. Ces auteurs ont aussi remarqué une croissance même sur ces dernières (géraniol et nérol), mais dans une culture anaérobiose enrichie en nitrates. Ils ont constaté une dénitrification par cette bactérie en ajoutant des monoterpènes ((+)-trans iso limonène; (+) limonène; p- menth-1-ene; (-)-α- phellandrène; (+) -2- carène; (+)-3-carène; eucalyptol ; (-)-α-pinène et α+β-thujone. L'ion nitrate (accepteur d'électron) se réduit en nitrite, ce qui provoque la biotransformation de ces terpènes en d'autre composés, comme dans le cas du linalool qui se transforme en géraniol et géranial.

Figure B 14: La voie métabolique proposée à l'ouverture du cycle du menthol conduisant à une β-oxydation semblable à celle des acides gras



2.2.2.3.2. Les bactéries méthanogènes

Un milieu méthanogène peut aussi créer des conditions favorables à la dégradation des terpènes : dans ces conditions les équivalents redox provenant de l'oxydation des terpènes peuvent conduire à la production de CH_4. La formation du p-cymène à partir du 2-carène, du 3-carene et de l'α-pinène était le premier signe de leur métabolisme anaérobiose microbien (Harder et Probian, 1995). De même, une transformation du sabinène et de l'α-phellandrène en p-cymène dans un milieu méthanogène issu de boues d'épuration a également été rapportée. (Foss et al. , 1998).

Une nouvelle voie métabolique de la formation du p-cymène, et du mentha-1,3-dien-7-ol à partir de l'α-terpinène dans des conditions méthanogènes par des bactéries intestinales des larves de vers gris commun a été rapporté (Miyazawa et al. , 1996). En effet une grande partie des produits odorants isolés du tube digestif des insectes sont des produits terpéniques élaborés par les microorganismes à partir des terpènes ingérés : c'est le cas de l'α-terpinène qui a été transformé en p-cymène. Rutledge, (1981) a mis en évidence la transformation de certains aldéhydes (myrténal, citral, citronellal, benzaldéhyde, géranial et néral) par une souche de bactérie (*Serattia,X1*) isolée du tube digestif de *Phloeosinus armtus*, un insecte Scolytidae, parasite des conifères. Cette bactérie réduit ces aldéhydes en alcools correspondants comme le nérol, le citronellol, le géraniol, le myrténol et l'alcool benzylique. Les même résultats ont été observés avec une souche de champignon (*Candida tenuis*) isolé du tube digestif d'une larve (*Phoracantha semipunctata*) qui transforme certains aldéhydes (citral, myrténal, citronellal) en alcools correspondants; ce champignon est par ailleurs capable de transformer de quelques cétones comme le carvone et le verbénone en alcools (Cheynier, 1983).

2.2.2.3.3. Biotransformation des terpènes par la flore microbienne du rumen

Le rumen est un écosystème qui abrite plusieurs types de microorganismes qui majoritairement sont anaérobies ou anaérobies facultatifs. Le rumen est un milieu caractérisé par ses conditions d'anaérobiose et la méthanogènèse, qui peuvent favoriser la biodégradation des terpènes. Il n'existe néanmoins aucun essai expérimental *in vitro* ou *in vivo* concernant la biodégradation de ces molécules par la flore microbienne, ce qui était l'un des objectifs ce travail (Articles 3, 4).

2.2.4. Conclusion

Comme discuté dans le chapitre précédant, l'activité antimicrobienne des terpènes est une propriété relative qui peut être changé en fonction du type de terpène et du type de microorganisme. Il semble que les microbes résistants à un terpène donné soient dans certains cas capables de les consommer comme source de carbone, en effet c'est une action-réaction réciproque, les terpènes possédant une activité antimicrobienne moins forte comme les hydrocarbones, sont plus souvent dégradés par certains microorganismes.

La biodégradation de plusieurs terpènes par les microorganismes anaérobies notamment les méthanogènes signifie que la flore microbienne présente dans le rumen probablement aura la possibilité d'intervenir dans le métabolisme de ces substances, cela a été démontré par un essai *in vitro* récent (Broudiscou et al., 2007) les études supplémentaires que nous avons réalisées peuvent fournir des informations expliquant l'efficacité de certaines de ces composés comme additif pour moduler le métabolisme du rumen, ou expliquer la faisabilité d'utiliser les terpènes dans la traçabilité des produits animaux.

2.3. Les terpènes et la nutrition des ruminants

Ce chapitre rappelle dans sa première partie les phénomènes concernant la physiologie générale du rumen, les avantages et les limites de l'écosystème du rumen. Dans une seconde partie, l'application des composés terpéniques a été envisagée afin d'améliorer le fonctionnement de l'écosystème ruminal. Les données expérimentales le plus souvent *in vitro* ont enfin détaillé l'impact de terpènes sur le métabolisme microbien des glucides, des protéines et des lipides.

2.3.1. Rappels sur la physiologie du rumen

Dans le tube digestif des ruminants, le rumen est le premier compartiment qui joue un rôle dans la digestion des aliments notamment les fourrages. Ceci est permis grâce à un écosystème microbien complexe composé de plusieurs populations microbiennes en interaction au sein d'un milieu dont les conditions physico-chimiques sont maintenues dans une plage de variation limitée.

2.3.1.1. Condition de milieu

Le rumen est un milieu anaérobie et de potentiel redox bas (de -250 à -400 mV), présentant une température de 38.5 à 40°C et un pH à jeun voisin de la neutralité. Le volume du rumen varie de 5-10 litres chez les petits ruminants et de 100 à 150 litres chez les bovins. La teneur en MS du contenu ruminal est d'environ 10%, en partie grâce à la production de salive associée au phénomène de mastication (jusqu'à 100 litres.j^{-1} chez les vaches ingérant 20 à 25 kg MS).

Les fermentations microbiennes dans le rumen conduisent à la formation de plusieurs gaz, principalement CO2 et CH4.

2.3.1.2. Les microorganismes du rumen

Les microorganismes du rumen se composent de trois groupes: les bactéries, les protozoaires et les champignons. Les bactéries sont quantitativement le groupe le plus important, leur population est comprise entre 10^9-10^{11}.ml^{-1}. Les protozoaires avec une population moyenne de 10^6.ml^{-1} sont la deuxième population par leur effectif, cependant leur biomasse est équivalente à celle des bactéries du fait de leur grande taille. Les champignons constituent environ 8% de la population microbienne du rumen. Dans le rumen, au moins 200 espèces bactériennes, 100 espèces de protozoaires et 20 espèces de champignons ont été identifiées (Harfoot et Hazelwood, 1997).

Les bactéries du rumen ont une activité cellulolytique (*Bacteroides succinogènes*, *Rumincoccus flavefaciens, Ruminococcus albus*), hémicellulolytique (*Butyrivibrio fibrisolvens*), amilolytiques (*Bacterium amilophylus*, *Streptococcus bovis*), pectinolytique (*Lachrospira multiparus*, *Clostridium poly saccharolyticum*), lypolytiques (*Anaerovibrio lipolytica*), protéolytiques (*Prevotella ruminocula*), productrice de CH_4 (*Methanobrevi-bacter ruminantium, Methano sercina barkeri*). Le rumen contient aussi des lactobacilles ainsi que des espèces productrices ou utilisatrices de succinate ou de lactate (Hungate, 1966; Ogimoto et Imai, 1981). Du fait de cette diversité, toutes les relations interspécifiques importantes ont été observées dans cet écosystème: compétition, prédation, symbiose et commensalisme. Il y a un effet antagoniste entre la croissance des protozoaires et celle de plupart des bactéries du rumen par l'existence de relations de concurrence et de prédation, tandis que cet effet peut être synergique ou antagoniste entre les bactéries et les champignons. La relation entre les bactéries méthanogènes et les ciliés est un exemple de symbiose, les bactéries méthanogènes

consomment l'hydrogène issu du métabolisme des ciliés en se fixant sur leur paroi (Hobson, 1988).

2.3.1.3. Le métabolisme digestif des macromolécules dans le rumen

Les hydrocarbones (glucides) constituent la plus grande partie de la ration des ruminants : ils sont chimiquement composés de celluloses, hémicelluloses, amidons et des autres hydrocarbones solubles. La première phase de la dégradation des glucides dans le rumen est réalisée par des enzymes microbiennes extracellulaires et conduit à la formation de cellobiose issu de la cellulose, de maltose à partir de l'amidon, de pentoses à partir des hémicelluloses, et du fructose issu de la dégradation des autres glucides solubles dans l'eau. La deuxième phase est un processus fermentaire qui a lieu dans les cellules microbiennes aboutissant à la formation des acides gras volatils: acétate, propionate et butyrate et les autres acides gras mineurs. La voie de synthèse de l'acétate normalement est accompagnée de la production de méthane, qui représente de 4 à 8% de l'énergie brute ingérée.

La dégradation des protéines alimentaires se produit par étapes, produisant des peptides, des AA et de l'NH3 et des AGV (ramifiés ou non) à l'étape ultime. Seule une fraction de ces protéines subit ces phénomènes; l'autre fraction transite au travers du rumen sans modification majeure de son profil en AA (Rulquin, 2001). L'ammoniaque et plus minoritairement les acides aminés issus de la dégradation des protéines contribuent à la formation de protéines microbiennes, en fonction de facteurs comme la quantité de matière organique fermentée dans le rumen, la disponibilité en certains minéraux, le taux de dilution de la phase liquide du rumen, l'efficacité de la croissance microbienne (Hespell et Bryant, 1979).

Les microorganismes du rumen ont normalement un potentiel limité pour la digestion des lipides ; cependant les lipases bactériennes hydrolysent les tri-glycérides végétaux en AG libres et en glycérol (fermenté en AGV). Les AG majors sont polyinsaturés (linoléique et linolénique) et de forme géométrique *cis.* Les AG libérés subissent une biohydrogénation, conduisant pour certains à la formation d'acides linoléiques conjugués, d'isomères *trans* du 18:1; l'étape finale des biohydrogénation est généralement la formation d'acide stéarique. Les facteurs de variation de ces process et les conséquences sur les profils des AG obtenus ont été revus récemment (Glasser et al., 2008 ; Schmidely et al., 2008). Les microorganismes du rumen synthétisent également des AG à 16 et 18 C ainsi que certains AG ramifiés.

Plusieurs stratégies ont été appliquées dans le but de contrôler les processus digestifs des ruminants dans le but d'améliorer la capacité digestive et augmenter les performances fermentation du rumen :

1) réduire ou même tenter d'inhiber totalement la population des méthanogènes
2) protéger les protéines alimentaires par plusieurs types d'additifs comme les tanins (Jouany et Morgavi, 2007)
3) inhiber certains microbes par des antibiotiques ionophores

Ces stratégies se sont montrées en partie efficaces mais dans plupart des cas, elles ont provoqué des effets négatifs sur d'autres aspects du fonctionnement ruminal. Les extraits végétaux en tant que produits naturels avec certaines caractéristiques spécifiques ont été récemment proposés comme substance alternative aux autres additifs pour manipuler l'écosystème ruminal.

2.3.2. Application des terpènes dans la nutrition et l'alimentation des ruminants

2.3.2.1. Le rôle des terpènes dans l'ingestion et le comportement alimentaire des ruminants

Le comportement alimentaire des ruminants, face aux plantes riches en terpènes ne semble pas être simple. *In vivo*, la plupart des essais qui étudient l'effet des terpènes sous différentes formes (forme pure, huiles essentielles ou présents dans des parties végétales ajoutées dans l'alimentation) sur l'ingestion montrent une grande variabilité dans les résultats obtenus. Benchaar et al. (2006b, 2007) ont observé qu'un mélange de terpènes (750 mg à 2 g/kg MS) composé de thymol, d'eugénol, de limonène et de vanilline n'a aucun effet sur l'ingestion de MS chez les vaches laitières. Un effet similaire a été observé avec des monoterpènes (p-cymène, α-humulène, 1,8-cinèole, 3-carène) ou avec le γ-terpinène, terpinolène, α-copaène, et α-terpinène apportés individuellement chez l'agneau ingérant de la luzerne (Estell et al., 2000). Cependant, un effet négatif des terpènes issu de feuilles de tarbouch a été observé sur l'ingestion de MS chez le mouton, ce qui a été lié principalement à la concentration (effet dose) et au type de terpènes (oxygénés) utilisés (Estell et al., 1996). De même, le camphène et le caryophyllène oxyde ont réduit l'ingestion de luzerne chez les agneaux (Estell, et al. , 2002), et certains terpènes oxygénés présents dans le genévrier ont réduit l'ingestion de cette plante chez les cerfs sauvages (Schwartz, et al., 1980). Différents

mécanismes d'action des terpènes sur l'ingestion peuvent être évoqués, mais une explication principale peut être liée à leur degré d'activité antimicrobienne. Dans ce cas naturellement les facteurs déterminant l'activité antimicrobienne de ces molécules (mentionnés dans le chapitre 2) peuvent influencer les effets des terpènes sur l'ingestion.

Toutefois, en dépit d'une activité antimicrobienne forte de certains terpènes, il existe un pâturage important des plantes riches en ces composés par les ruminants et les herbivores spécialisés. Il semble donc qu'il y ait d'autres paramètres qui jouent un rôle dans l'ingestion de ces plantes. Dans le paragraphe suivant, les facteurs déterminant le niveau d'ingestion des plantes riches en terpènes et potentiellement toxiques qui possèdent une activité antimicrobienne forte sont décrits.

Les facteurs déterminant l'ingestion des plantes riches en terpènes

Les facteurs ayant un impact sur l'ingestion des plantes riches en terpènes (et autres métabolites secondaires) peuvent être hiérarchisés en deux groupes : les facteurs liés aux herbivores et les facteurs liés aux plantes ingérées.

1- Les facteurs liés aux animaux

Les herbivores en général et les ruminants spécialement disposent de plusieurs stratégies en face des plantes toxiques afin réduire leurs effets négatifs sur l'ingestion :

- éviter les plantes toxiques par sélection des plantes moins toxiques
- sélectionner un mélange de différentes plantes qui permet de diluer les toxines
- consommer les plantes toxiques de manière cyclique
- rejeter une plante toxique une fois qu'elle a été ingérée
- détoxication par dégradation ou conjugaison de la molécule
- une tolérance aux plantes toxiques ingérées

L'efficacité de ces stratégies peut donc expliquer le niveau d'ingestion de ces plantes. Les trois premières sont de nature comportementale et les trois dernières sont des approches physiologiques.

L'expérience antérieure permet de distinguer les plantes toxiques de celles non toxiques, ceci peut directement être acquis par le goût et de l'odeur des plantes (Sclafnie et al., 1991) ou indirectement par apprendissage. Une sélection mélangée de plantes peut diluer le taux des toxines dans la ration (Provenza et al., 1996). Une consommation cyclique permet de mieux gérer la détoxication plantes toxiques (Kingsbury et al., 1983). La formation des complexes

avec les toxines est une façon de les détoxiquer. Les ruminants présentent un grand avantage par rapport aux autres herbivores lors de l'ingestion des plantes toxiques : ils ont un écosystème microbien dans le rumen qui leur donne la possibilité de métaboliser une large variété de plantes toxiques (Smith, 1992). Toutefois les animaux ont d'autres moyens de détoxiquer les toxines après absorption. Les systèmes hépatique et rénal sont deux barrages à filtrer les toxines du sang. Dans ces systèmes, les composés toxiques notamment non polaires sont transformés en composés polaires qui sont excrétés dans l'urine (Cheeke, 1994).

2-les facteurs liés aux plantes:

La relation entre l'animal et les plantes toxiques pâturés n'est pas une action simple dominée par l'animal mais c'est une interaction complexe. En ce qui concerne les plantes pâturées, deux facteurs : le contexte nutritif et la teneur en métabolites secondaires jouent un rôle déterminant en interaction mutuelle qui influence leur ingestion par les herbivores. En général, les métabolites secondaires peuvent réduire l'ingestion et cela dépend de leur degré d'activité antimicrobienne. Contrairement aux métabolites secondaires, la teneur en matières nutritives peut augmenter l'ingestion de ces plantes et la teneur en ces deux types de composés détermine le niveau d'ingestion global (Provenza et al., 2002).

L'interaction entre le contexte nutritif et la teneur en métabolites secondaire peut être expliqué par la procédure de détoxication par les herbivores. Cette dernière épuise l'organisme en protéine et en glucose. Un contexte nutritif riche peut récompenser cette carence en énergie et en protéine (Shaw et al., 2006). En plus il semble que le rôle des protéines est beaucoup plus important que celui de l'énergie, ceci a été prouvé dans un essai réalisé par Villalba et al. (2002) dans lequel, des brebis et des chèvres préféraient une ration riche en protéines à celle riche en énergie en présence de sauge, une plante riche en terpène, dans la ration.

2.3.2.2. L'impact de terpènes sur le métabolisme du rumen

Les données expérimentales publiées dans la littérature concernant l'impact des terpènes sur le métabolisme du rumen sont majoritairement *in vitro* : elles sont focalisées sur l'effet des terpènes (le plus souvent sous forme huiles essentielles) sur le métabolisme digestif des

microorganismes du rumen notamment la digestion des parois végétales, sur les fermentations ruminales et sur la dégradation des protéines.

2.3.2.2.1. Les terpènes et leur impact sur les microorganismes du rumen

Il existe très peu de données expérimentales évaluant les effets des HES sur la flore microbienne du rumen *in vivo*, à l'inverse du grand nombre de données *in vitro*.

Les premiers essais ont évalué l'activité de certaines HES sur la population totale du rumen: Nagy et al., (1964). Plus tard Oh et al., (1967) ont rapporté une activité inhibitrice des HES extraites de grande Sauge (*Artemisia tridentata*) et de sapin de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) respectivement sur l'activité des microorganismes du rumen. Les extraits végétaux de *Equisetum arvense*, *Armoracia rusticana* et *Saivia officinalis* inhibent l'activité des bactéries méthanogènes (Broudiscou et al., 2000, 2002). Dans un essai *in vitro*, McIntosh et al., (2003) ont étudié en détail la sensibilité de plusieurs microorganismes à une HES composée du thymol, de l'eugénol, du limonène et de la vanilline. Parmi les bactéries, *Prevotella ruminicola*, *Clostridium sticklandii*, et *Peptostreptococcus anaerobius* ont été les plus sensibles, tandis que *Streptococcus bovis* était le plus résistant. Le champignon *N. frontalis* (producteur de H_2) était très sensible et a été totalement inhibé à la concentration de 40 ppm. Le faible nombre de données expérimentales évaluant l'impact des HES sur les protozoaires montre un effet négligeable des HES sur ces microorganismes (Wallace et al.,2002; McIntosh et al., 2003; Newbold et al., 2004; Benchaar et al., 2007).

Un des facteurs intervenant sur l'intensité de l'action antimicrobienne des HES est la dose appliquée : ceci a été généralement observé *in vitro* (Amaral et al., 1998; Evans et Martin, 2000; Castillejos et al., 2006). McIntosh et al. (2003) ont rapporté un effet négligeable du mélange thymol, eugénol, limonène et vanilline à la concentration de 40 ppm sur la plupart des populations microbiennes du rumen, tandis qu'à la concentration de 100 ppm la croissance de la plupart des microorganismes a été inhibée. Néanmoins, dans cet essai, certains micro-organismes, *Prevotella ruminicola* 23*, Butyrivibrio fibrisolvens* SH13*, Prevotella bryantii* B14*, Ruminococcus albus* SY3, *Ruminobacter amylophilus* WP109*, Lactobacillus casei* LB17*, Streptococcus bovis* ES1 et *Clostridium aminophilum* 49906 ont montré des capacités d' adaptation aux HES. Cardozo et al. (2004) ont également rapporté une adaptation des microorganismes du rumen aux HES de cannelle, d'ail, d'anis et d'origan à la concentration de 7.5 mg/kg MS *in vitro*. Le même résultat a été observé par Busquet et al. (2005[c]) avec les huiles essentielles de *Trigonella foenum graecum*, *Juniperus oxycedrus*,

Syzygium aromaticum, *Anethum graveolens*, *Zingiber officinale*, et *Melaleuca alternifolia,,* avec un apport de 75 mg/kg MS *in vitro*.

2.3.2.2.2. Les terpènes et le métabolisme ruminal des glucides

Les données expérimentales réalisées sur l'étude du métabolisme ruminal des glucides, se sont focalisées sur le métabolisme des parois végétales, et il existe très peu d'informations sur le métabolisme ruminal de l'amidon. Les résultats obtenus dans l'ensemble des essais *in vivo* et *in vitro* montrent des actions très variables des terpènes sur le métabolisme des glucides chez les ruminants (tableau B4). Ceci peut être expliqué principalement par une diversité importante des huiles essentielles, de leurs composants actifs et d'autres facteurs associés aux conditions expérimentales (Noirot et al., 2008). Les premiers essais *in vitro* montrent en général un effet négatif des huiles essentielles sur le métabolisme microbien: Nagy et al., (1964) ont rapporté une diminution de la digestibilité de la cellulose par l'apport de HES (4-8 g/l) d'extrait de grande sauge dans le jus de rumen de cerfs sauvages. Schwartz et al., (1980) ont obtenu des résultats semblables avec des HES extraites de différentes variétés de genévrier *(Juniperus* spp.). Les HES issues du peuplier de baume *(Populus balsamifera)* et du bouleau d'Alaska *(Betulapapyrifera)* ont diminué la digestibilité des parois végétales *in vitro* (Risenhoover et al.,1985), cependant l'effet de leurs composants actifs (alcool benzyle et cinéole) était plus intense que celui des huiles mères.

Toutefois certains essais *in vitro* ne montrent aucun effet négatif de terpènes sur digestibilité ruminale des parois végétales : Welch et al., (1981) ont montré que la teneur en monoterpènes totaux dans la grande Sauge n'a aucun effet négatif sur la digestibilité *in vitro* de cette plante dans des contenus digestifs de cerfs sauvages. Connolly et al., (1980) ont obtenu des résultats semblables avec des HES issues de sapins Douglas en utilisant des inoculum issus du rumen de cerfs communs. Dans une expérience similaire, Welch et al. (1983) ont observé les même résultats avec *Artemisia taxa.* Une concentration de 1.5 ml/l d'un mélange des terpènes purs (thymol, eugénol, limonène et vanilline) n'a eu aucun effet sur la digestibilité des fibres *in vitro* (Castillejos et al., 2005). Dans un autre essai *in vitro*, l'eugénol n'a pas influencé la digestion des parois végétales jusqu'à la concentration de 500 mg/l, mais à dose supérieure, il a réduit la digestibilité des parois végétales (Castillejos et al., 2006).

Le faible nombre de données *in vivo* concernant des effets de terpènes sur la digestibilité des glucides, ne permet pas de mettre en évidence de tendance significative sur la digestibilité

des fibres dans le rumen. L'huile essentielle extraite de menthe (composant majeur, le menthol) n'a pas affecté la digestibilité totale du rumen chez le bœuf (Ando et al., 2003). Benchaar et al.,(2007) ont observé le même résultat avec un mélange de terpènes (thymol, eugénol, limonène et vanilline, 750 mg /kg Ms), mais une amélioration de la digestibilité de l'ADF a été rapportée par Benchaar et al., (2006b) en ajoutant ce même mélange (2 g/kg MS) dans la ration de vaches laitières. De même, une amélioration de la digestibilité de la MS, du NDF et de l'ADF a été observé par Villalba et al., (2006) en ajoutant des terpènes extraits de la grande sauge dans la ration de brebis. Kim et al. (2006) ont aussi observé une amélioration linéaire de la digestibilité de matière organique, et de ADF, en remplaçant 7%, 14% et 21% de paille de riz par de l'Absinthe (*Artemisia montana*), une plante riche en terpènes dans l'alimentation des moutons.

Tableau B 4: Effet[a] des composés terpéniques sous différentes formes: Huiles essentielles (HES), terpènes purs (TP) et mélanges de terpènes purs (MT) sur le métabolisme digestif et les fermentations ruminales des glucides

Nom de composé terpénique	Forme	Condition	Dose	pH	Digestion des parois végétales	Fermentation du rumen				Référence
						(mM)	Proportions molaires			
						AGVT	C2	C3	C2/C3	
Huile de grande sauge	HE	In vitro	4-8 g/L	*	–	–	*	*	*	Nagy et al., 1964
Huile de cannelle	HE	In vitro	0.3-30 mg/L	7	*	+	+	–	+	Cardozo et al , 2005
				5.5	*	NS	NS	NS	–	
Huile d'anis	HE	In vitro	0.3-30 mg/L	7	*	–	+	–	+	Cardozo et al , 2005
				5.5	*	NS	–	+	–	
Huile d'anis	HE	In vivo	2 g/j	*	*	NS	–	+	–	Cardozo et al., 2006
Huile d'ail	HE	In vitro	0.3-30 mg/L	7	*	–	–	+	NS	Cardozo et al , 2005
				5.5	*	+	–	+	–	
Huile d'ail	HE	In vitro	300-3000 mg/L		NS	–	–	+	*	Busquet et al., 2006
Huile d'ail	HE	In vitro	312 mg/L		NS	NS	–	+	–	Busquet et al., 2005a
Huile de yucca	HE	In vitro	0.3-30 mg/L	7	*	–	+	–	+	Cardozo et al , 2005
				5.5	*	+	–	+	NS	
Huile de girofle	HE	In vitro	75 mg/kg Ms	*	*	NS	–	+	–	Busquet et al., 2005c
tTthymol	TP	In vitro	500 mg/L	*	–	–	+	–	+	Castillejos et al., 2006
			5000 mg/L	*	*	–	NS	+	NS	
Anéthol	TP	In vitro	300 mg/L	*	*	–	–	NS	*	Busquet et al., 2006
Eugénol	TP	In vitro	3000 mg/L	*	*	–	NS	+	*	Busquet et al., 2006
Eugénol	TP	In vitro	500 mg/L	*	*	NS	NS	–	NS	Castillejos et al., 2006
Eugénol	TP	In vitro	0.3-30 mg/L	7	*	+	+	–	NS	Cardozo et al , 2005
				5.5	*	+	NS	–	NS	

Tableau B4: (suite)

Nom de composé terpénique	Forme	Condition	Dose	pH	Digestion des parois végétales	Fermentation du rumen				Référence
						(Mm)	Proportions molaires			
						AGVT	C2	C3	C2/C3	
Vanilline	TP	In vitro	500 mg/L	*	*	NS	–	NS	NS	Castillejos et al., 2006
			5000 mg/L			–	–	+	–	
Limonène	TP	In vitro	50-500 mg/L	*	*	–	NS	NS	NS	Castillejos et al., 2006
			5000 mg/L			–	–	NS	–	
Cinnmaldéhyde	TP	In vitro	0.3-30 mg/L	7	*	–	NS	–	+	Cardozo et al , 2005
				5.5		+	–	+	–	
Cinnmaldéhyde	TP	In vitro	312 mg/L	*	NS	NS	–	+	NS	Busquet et al., 2005a
Cinéol	TP	In vitro	5-20 mg/g	*	–	*	*	*	*	Risenhoover et al.,1985
Crina	MT	In vitro	1.5mg/L	*	NS	+	NS	NS	NS	Castillejos et al., 2005
Crina	MT	In vivo	2-4 g/j	*	NS	NS	NS	NS	NS	Benchaar et al., 2006a
Crina	MT	In vivo	100 mg/j		NS	NS	NS	NS	NS	Wallace et al., 2002
Crina	MT	In vivo	110 mg/j		NS	+	NS	NS	NS	Newbold et al., 2004
Cinnamaldéjyde + Eugénol	MT	In vivo	600+300 mg/j resNSctivement	*	*	NS	–	+	NS	Cardozo et al., 2006

[a] effet négatif (-), effet positif (+) et pas d'effet (NS).
* non indiqué

Les composés terpéniques influencent aussi la deuxième phase du métabolisme de glucides qui est leur fermentation et la production des acides gras volatils. Parmi les HES examinées in vitro, celles issus de *Lavandula Officinalis, Solidago virgaurea , Achillea millefolium, Allium sativa, Capsicum annuum* et *Yucca schidigera* ont stimulé les fermentations microbiennes du rumen ; *Equisetum arvense, Armoracia rusticana* et *salivia officinalis* ont inhibé l'activité des méthanogènes dans le rumen (Broudiscou, et al., 2000,2002; Cardozo et al., 2005) et *Pimpinella anisum, Cinnamomum cassia, Allium Sativa, Syzygium aromaticum, Capsicum annuum* et *Yucca schidigera* ont modifié le profil en AGV (Cardozo et al , 2004, 2005 ; Busquet et al., 2005[c],2006). Il y a aussi des essais présentant des effets inhibiteurs forts de certains huiles essentielles, *Artemisia tridentata* (Nagy et al., 1964) et *Syzygium aromaticum* (Busquet et al., 2006), sur la production des AGV.

Parmi les terpènes purs, le thymol, l'eugénol (Castillejos et al., 2006), l'anéthol, et le carvone (Busquet et al., 2006) ont inhibé la production d'AGV *in vitro*. Un mélange de terpènes purs (thymol, eugénol, limonène et vanilline) a montré un effet positif sur la production des AGV *in vitro* (Castillejos et al., 2005).

Certaines HES et leurs composants actifs sont capables de modifier le profil en AGV du liquide ruminal de façon variable *in vitro*, en fonction de nombreux facteurs dont le pH, la dose de terpènes administrée et l'adaptation de la flore microbienne. *In vitro,* l'impact des six huiles essentielles: Anis, Origan, Cannelle, Ail, Capssicum et Yucca et de trois terpènes purs, l'anéthol, l'eugénol et le cinnamaldéhyde a été étudié sur les fermentations du rumen à deux pH (5.5 et 7) et pour deux doses (faible et forte), (Cardozo et al., 2005). A pH 7, la majorité des composés terpéniques ont réduit la concentration ruminale des AGV totaux, indépendamment de la dose, tandis qu'à pH 5.5, les HES ont montré des comportements différents en fonction de la dose : à faible dose, la majorité des HES étudiées ont augmenté la teneur en AGVT, mais pas à forte dose. Le pH a également influencé la concentration molaire de l'acétate et du propionate : à pH 7, l'acétate est accru et le propionate est diminué avec la plupart des huiles essentielles. Le pH 5.5 acide a montré un effet inverse, et il accroit le propionate avec la plupart des HES sauf avec l'anéthol et l'eugénol, Les effets du pH et de la dose avec ces huiles sur les proportions du butyrate étaient semblables à ceux observé pour le propionate. Dans un autre essai *in vitro*, l'efficacité de 12 huiles essentielles (anis, cade, poivron, cannelle, girofle, aneth, fenugrec, ail, gingembre, origan, théier, yucca) et de 5 composés purs (anéthol, carvacrol, carvone, cinnamaldehyde, et eugénol) à différentes doses (3, 30, 300, et 3,000 mg/L) a été évalué sur les fermentations ruminales en batch (Busquet et al., 2006). A la concentration la plus élevée, les HES ont inhibé la production d' AGV

totaux (à l'exception des huiles de cade, de poivron, d'aneth, de fenugrec, de gingembre et de yucca). Aux concentrations de 300 et 3000 mg/L, l'extrait d'ail a réduit la proportion molaire de l'acétate et a augmenté celles du propionate et du butyrate, suggérant d'après ces auteurs une inhibition des bactéries méthanogènes.

Un effet dose-réponse a été mis en évidence pour l'eugénol, le guaiacol, le limonène, le thymol et la vanilline (Castillejos et al., 2006). Dans la gamme de concentration entre 5 et 5000 mg/L *in vitro* (batch), tous les terpènes ont inhibé les fermentations à la dose la plus forte (5000mg/L). Avec les doses inférieures, la plupart des terpènes étaient inefficaces, sauf l'eugénol qui a réduit la proportion molaire de l'acétate et le ratio acétate/propionate à la dose de 5 mg/L. In vitro (culture continue), l'eugénol et le thymol ont inhibé la production des AGV totaux à la dose de 500 mg/L, tandis que le thymol a montré une tendance à réduire la proportion de l'acétate et à augmenter celle du butyrate sans influencer la concentration totale des AGV à la dose de 5 mg/L.

Un effet d'adaptation des microorganismes aux terpènes a été rapporté par Busquet et al. (2005c) en examinant l'effet de différentes HES sur les fermentations du rumen: une augmentation de la proportion molaire de propionate et une diminution molaire de l'acétate après ajout d'HES de girofle n'apparaît qu'après une période d'adaptation de 7 jours en culture continue *in vitro*.

L'ensemble des résultats obtenus *in vitro* montrent que certains composés terpéniques comme le thymol (composant actif des HES extrait de thym et d'origan), l'eugénol, (composant actif de l'huile de bourgeon de girofle), la capsaïcine (composant actif de l'huile de poivron), l'anéthol (composant actif de l'huile d'anis) et le cinnamaldéhyde (composant actif de l'huile de cannelle) ainsi que l'HES d'ail peuvent modifier les fermentations ruminales, en accroissant la production du propionate; cependant dans plupart des cas, leur effet positif est conditionné par les effets d'autres facteurs comme le pH, le type de ration et la dose ajoutée. Globalement un effet inhibiteur sur les fermentations du rumen a été observé pour le thymol, le plus souvent à doses fortes (>500mg/L), mais avec des doses modérées (100-400mg/L), il favorise la production d'acétate (Evans et Martin, 2000). Par ailleurs, avec les rations riches en concentré (90%) induisant un pH acide (5.5), il réduit le ratio acétate/propionate, (Cardozo et al., 2005). L'huile de girofle, riche en eugénol accroît la proportion molaire du propionate et réduit celle de l'acétate (Busquet et al., 2005c, 2006). Cependant, dans des rations riches en concentré, l'eugénol accroît la proportion de l'acétate et le ratio acétate/ propionate (Castillejos et al., 2006), donc il semble que d'autres composantes minoritaires présentes dans l'huile de girofle interagissent avec l'eugénol.

Le cinnamaldéhyde a montré des différents effets sur les fermentations ruminales en fonction du type de ration et du pH : tandis qu'il réduit la concentration d'AGVT et augmente la proportion de l'acétate/propionate à pH 7, il présente les effets inverses à pH 5.5.

L'anéthol et l'huile d'anis réduisent la teneur en AGVT *in vitro* (Busquet et al., 2005c) mais avec une ration riche en concentré (90%MS), l'huile d'anis a réduit la proportion d'acétate et le ratio acétate/propionate (Cardozo, et al., 2005, 2006).

Les effets favorables de l'huile de poivron (réduction de la proportion de l'acétate, du ratio acétate/propionate et augmentation de la proportion du propionate) ont été observés uniquement avec des rations riches en concentré ou à pH acide (5.5), (Cardozo et al., 2005).

Il existe très peu d'études *in vivo* sur les fermentations ruminales et la croissance microbienne lors d'apport de terpènes. Le mélange de thymol, eugénol, limonène et vanilline apporté à la dose de 110 mg/j chez le mouton a augmenté la concentration des AGVT dans le rumen (Newbold et al., 2004), tandis qu'à la dose de 750 et 2 g/j chez la vache laitière, aucun effet n' a été observé (Benchaar, et al. 2006b, 2007). Inversement, l'incorporation des terpènes issus de la grande sauge (*Artemisia tridentata*) dans deux types de rations basées sur l'orge vs la pulpe de betterave chez le mouton a réduit la teneur ruminale des AGV et de l'acétate, au profit du butyrate avec la ration basée sur l'orge.

2.3.2.2.3. Les terpènes et le métabolisme ruminal des matières azotées

Les terpènes, apportés individuellement ou en combinaison sous forme d'HES peuvent influencer le bilan ruminal ou digestif des matières azotées. La dégradation des protéines est parfois modifiée, avec une diminution plus ou moins importante du NH3 ruminal dans plusieurs expérimentations (tableau B5).

In vitro une réduction du NH_3 ruminal accompagné d'accroisement des AA issus de caséine par l'apport de thymol (1000 mg/l) a été rapportée (Borchers et al., 1965). Cardozo et al., (2004) ont étudié l'effet de six huiles essentielles (ail, cannelle, yucca, anis, origan et poivron) sur le métabolisme ruminal des matières azotées *in vitro*. Une activité protéolytique importante (une augmentation de 30% de la concentration en peptides par rapport au témoin) a été observée lors de l'apport d'un mélange de toutes les huiles (15 mg/kg MS). Parmi ces HES étudiées individuellement, l'HE d'anis a stimulé l'activité peptidolytique et la désamination des AA; par contre l'HE d'ail a inhibé la désamination terminale et celle de cannelle a inhibé la peptidolyse. Une diminution de la concentration en ammoniaque de 24% a été rapportée par McIntosh et al. (2003) *in vitro* avec des inoculums obtenus chez le mouton

recevant un mélange de thymol, eugénol, limonène et vanilline. Un effet dépressif de l'HES de cannelle et du cinnamaldéhyde (Busquet et al.,2006) et de l'HES de poivron a été observée sur la concentration ruminale de l'ammoniaque. Inversement, l'eugénol et le thymol n'ont pas modifié la production d'ammoniaque dans une gamme de concentration de 5-500mg/l *in vitro* (Castillejos et al.,2006). Il peut donc être conclu que l'effet des HES sur la dégradation des protéines, et la concentration ruminale de l'ammoniaque dépend de la dose ajoutée (Castillejos et al., 2006 ; Busquet et al., 2006), du type de ration et du pH associé (Cardozo et al., 2005, 2006). Le pH acide résultant d'une ration riche en concentré induit des conditions favorables pour une efficacité intense des HES aux doses les plus fortes pour réduire la dégradation protéique et la production d'NH_3 dans le rumen.

Les données *in vivo* ont confirmé plus ou moins les résultats obtenus *in vitro*: certaines HES ont des effets favorables sur le métabolisme ruminal des matières azotées en protégeant les protéines alimentaires de la dégradation microbienne. L'apport d'un mélange de thymol, eugénol, limonène et vanilline induit une diminution de la dégradation des protéines du tourteau de soja chez le mouton (Newbold et al., 2004), ou la génisse (Molero et al., 2004). Néanmoins, chez le mouton, aucun effet de ce mélange n'a été observé sur l'activité protéolytique ou la dégradation des peptides, en dépit d'une réduction de la concentration en ammoniaque (Losa et al., 2004). Ce même mélange d'HES n'a également pas affecté la dégradation des protéines totales de la ration ni la concentration de l'ammoniaque chez les vaches laitières (Benchaar et al. 2003, 2006b). Comme l'ont indiqué les données *in vitro*, ces différences entre essais *in vivo* peuvent résulter d'interactions entre l'apport des HES et le type de ration et de la nature des substrats protéiques. Molero et al., (2004) ont montré ainsi une réduction de la dégradation des protéines de la ration exclusivement au sein de rations riches en concentré. Les rations avec une faible teneur en protéine ont montré aussi une protection supérieure à celles riches en protéine vis à vis de la dégradation microbienne lors d'apport de terpènes (Wallace et al., 2002). En ce qui concerne la nature des sources protéiques, Newbold et al. ,(2004) ont rapporté une protection relative du tourteau de soja contre la dégradation microbienne du rumen par rapport au tourteau de colza et du foin en présence d' un mélange de thymol, eugénol, limonène et vanilline.

Toutefois il a été observé une stimulation de la dégradation des protéines alimentaires en présence de certains composés terpéniques ; Kim et al., (2006) ont rapporté une augmentation de la concentration ruminale de l'ammoniaque issu de la dégradation des protéines en ajoutant de l'*Artemisia montana* dans la ration des moutons. cela a été accompagné d'une amélioration de la synthèse de protéines microbiennes.

2.3.2.2.4. L'effet des terpènes sur métabolisme ruminal des lipides

Plusieurs espèces bactériennes du rumen, notamment les bactéries Gram+ sont responsables de la biohydrogénation des acides gras polyinsaturés alimentaires (Bauman et al., 1999). Considérant l'action antimicrobienne des composés terpéniques surtout contre les bactéries Gram +, ils sont théoriquement susceptibles d'avoir un impact sur le profil des acides gras au niveau duodénal. Toutefois, il n'existe pas de données rapportant l'effet des HES sur la biohydrogénation des AG alimentaires. Seules des données indirectes, sur le profil en AG du lait après apport d'HES ont été rapportées par Benchaar et al., (2006b) après ajout d'un mélange de thymol, d'eugénol, de limonène et de vanilline (2 g/kg MS) dans la ration des vaches laitières ; une réduction de la teneur en acide myristique et une augmentation du CLA (c9t11 18 :2) ont été observées, ce qui pourrait suggérer une réduction terminale de l'hydrogénation ruminale des AGPI (t11-18:1 en 18:0).

2.3.3. Application des huiles essentielles en lute contre les parasites intestinaux

Les nématodes gastro-intestinaux sont une des causes qui influencent l'efficacité de la production chez les petits ruminants. La résistance de nématodes aux anti-helminthiques synthétiques pendant ces dernières années a attiré l'intention des scientifiques vers les HES comme alternatives à ces substances chimiques. Certaines HES et leurs composants actifs ont été découverts qui possèdent une activité anti-helminthique (Hommond et al., 1997). Cette activité a été démontrée dans un essai *in vitro*, où l'huile *Ocimum gratissimum* et son composant actif majeur (eugénol) ont montré un effet inhibiteur à une concentration de 0.5% (dilué dans Tween 20), (Pessoa et al., 2002).

Tableau B 5: Effet[a] des composés terpéniques sous différentes formes: Huiles essentielles (HE), terpène pur (TP) et mélange de terpènes purs (MT) sur le métabolisme ruminal des matières azotées.

Nom de composé terpénique	Forme	Condition	Dose	Dégradation de protéine	Production du NH3	Référence
Huile d'anis	HE	In vitro	15 mg/kg Ms	+	+	Cardozo et al., 2004
Huile d'ail	HE	In vitro	15 mg/kg Ms	+	–	Cardozo et al., 2004
Eugénol	TP	In vitro	=>500 mg/L	*	–	Castillejos et al., 2006
Thymol	TP	In vitro	=>500 mg/L	*	–	Castillejos et al., 2006
Limonène	TP	In vitro	500 mg/L	*	–	Castillejos et al., 2006
Vaniline	TP	In vitro	5000 mg/L	*	–	Castillejos et al., 2006
Cinnamaldéhyde	TP	In vitro	3000 mg/L	*	–	Busquet[a] et al., 2005
Crina	TP	In vitro	5000mg/L	*	_	Castilléjos et al.,2005
Crina	MT	In vivo	110 mg/j	–	NS	Newbold et al., 2004
Crina	MT	In vivo	700 mg/j	–	NS	Molero et al., 2004
Crina	MT	In vivo	110 mg/j	NS	–	Losa et al., 2004
Cinnamaldéjyde + Eugénol	MT	In vivo	600+300 mg/j respectivement	+	–	Cardozo et al., 2006

[a] 'effet négatif (-), effet positif (+) et pas d'effet (NS).
* non indiqué

2.3.4. Conclusion

L'effet des terpènes, plus souvent sous forme des huiles essentielles sur la nutrition des ruminants a été majoritairement étudié *in vitro*. Aux doses fortes, les HES ont montré un effet inhibiteur plus souvent attribué aux composants actifs oxygénés sur les microorganismes du rumen. Cette activité antimicrobienne pourrait avoir influencé à son tour l'ingestion, le métabolisme digestif et les fermentations du rumen. Pour ces dernières, l'effet des terpènes dépend du pH, du type de ration et la dose ajoutée.

Malgré une exploration relativement large réalisée *in vitro* concernant l'effet de terpènes sur le métabolisme du rumen, il existe très peu d'information *in vivo*. Les rares essais *in vivo* effectués durant ces dernières années, se sont focalisés sur un mélange synthétique de quelques monotérpènes. En considérant la diversité considérable des huiles essentielles et de leurs composants actifs et les interactions antagoniques et synergiques entre ces composants, les études *in vivo* avec ces composés semblent être nécessaire notamment sur les aspects zootechniques et la qualité des produits.

2.4. Les terpènes dans la traçabilité des produits animaux

Ce chapitre concerne les possibilité d'identification et de traçabilité des produits animaux à partir de leur composition en terpènes issus de leur alimentation. Pour cela les facteurs de variation déterminant la composition et la teneur en terpènes dans les pâturages ont été explorés. Dans la deuxième étape les données expérimentales démontrant la possibilité d'exploitation des terpènes comme des marqueurs dans ces produits ont été évaluées. Finalement, quelques aspects concernant les spécificités de la région méditerranéenne et la diversité des produits laitiers qui en sont issus ont été discutés.

2.4.1. Introduction

La diversité accrue des produits animaux notamment les produits laitiers et la sensibilité du marché de consommation à distinguer les produits de qualités constituent des déterminants de l'importance de la traçabilité des ces produits. Le profil et la teneur en terpènes retrouvés dans ces produits ont montré qu'il existait une liaison avec ces mêmes caractéristiques évaluées dans la ration, principalement au niveau des fourrages. La recherche sur cet aspect de terpènes est encore dans sa phase d'initiation. Ces propriétés sont particulièrement

importantes dans certaines zones géographiques comme la région méditerranéenne, où une fraction importante de petits ruminants est élevée dans des systèmes extensifs à base de pâturage et une grande partie du lait produit est valorisée en produits typiques très divers.

2.4.2. Les prairies et leurs diversités

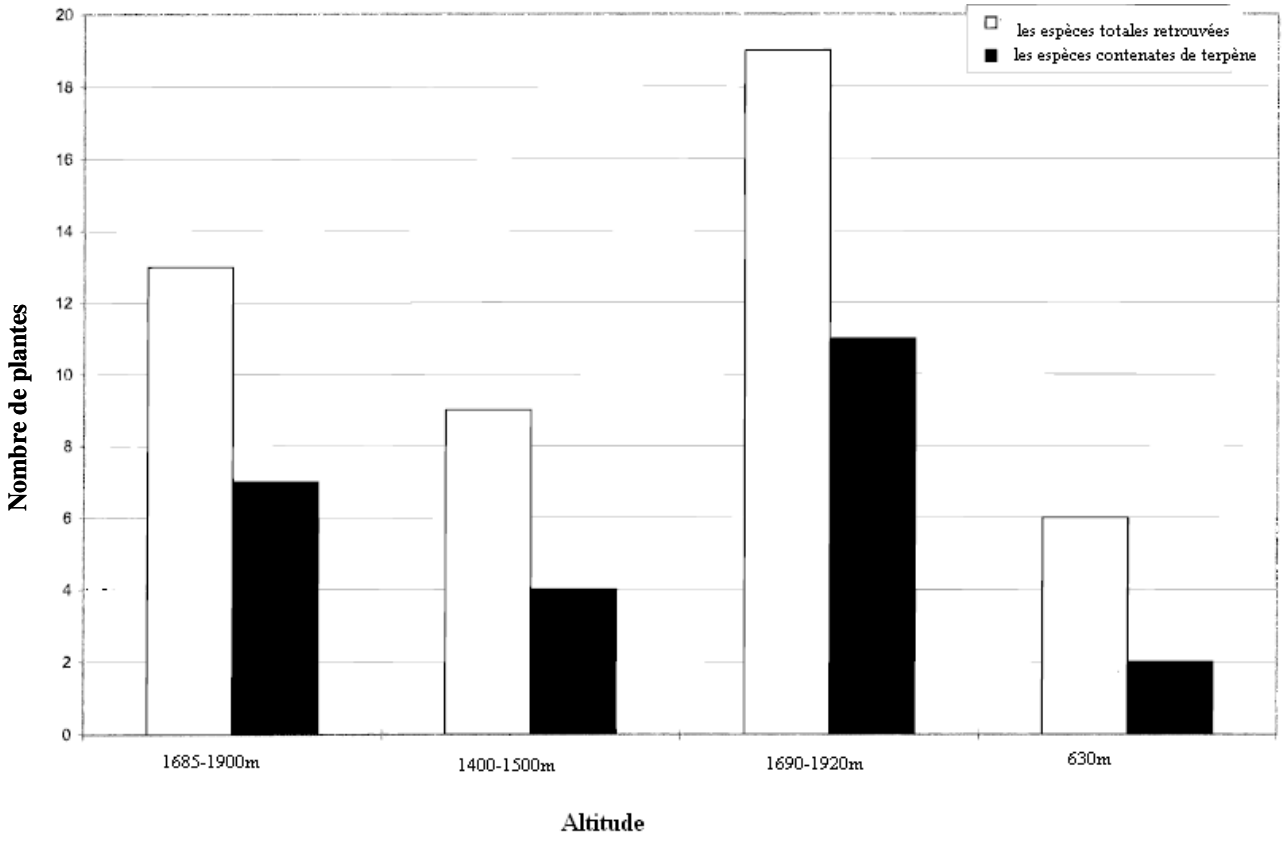
Une des caractéristiques importantes des prairies est leur diversité extrêmement large, cette diversité d'un point vue de composition chimique est aussi importante que la diversité botanique. Les terpènes en tant que des métabolites secondaires se trouvent dans plusieurs espèces végétales, arbres, arbustes et les herbes dans les pâturages, cependant leurs profils et leurs concentrations sont extrêmement divers.

Variation de la teneur en terpènes dans les pâturages

Selon les données expérimentales, la composition ainsi que la concentration des terpènes dans les pâturages peut varier selon plusieurs facteurs, comme la localisation, l'espèce végétale, l'état phénologique, la saison, et le climat qui ne sont néanmoins pas indépendants.

L'altitude est un facteur important qui influence la distribution des espèces végétales : les dicotylédones sont plus abondantes en zone de montagne qu'en plaine (Mariaca et al., 1997, Bugaud et al., 2001). Par ailleurs, elles sont plus riches en terpènes que les graminées. L'effet de l'altitude sur la teneur en terpènes est donc indirect en favorisant la croissance des dicotylédones. De plus la diversité botanique, augmente avec l'altitude qui est positivement reliée avec la teneur et la diversité des composés terpéniques (Mariaca et al., 1997, Viallon et al., 1999). (Figure 15).

Figure B 15: Comparaison de proportion des plantes contenants de terpènes en différentes altitudes (Mariaca et al., 1997)



La diversité des espèces végétales conditionne la quantité et la diversité des terpènes ingérés par les animaux. Viallon et al. (1999) ont étudié le profil en terpènes de 4 groupes de fourrages provenant de différentes sources botaniques et géographiques. Le premier groupe était composé principalement de *Dactylis glomerata*, le deuxième était composé de 16 espèces et le troisième était d'un mélange composé de 27 espèces végétales. Ces trois groupes ont été récoltés dans une zone géographique de 1000 m altitude de la région Auvergne et le dernier groupe, composé de 34 espèces a été récolté dans des prairies de haute altitude (1500 m dans les Alpes du nord). Une relation significative et positive a été mise en évidence entre la diversité des terpènes retrouvés dans ces fourrages et la diversité botanique des fourrages (33 terpènes dans les fourrages des prairies de haute altitude par rapport aux 16 observés dans les fourrages du premier groupe). Ainsi les dicotylédones étaient plus abondantes dans les fourrages provenant de haute altitude.

L'espèce végétale est la source la plus importante de variation de la teneur et de la composition en terpènes dans les pâturages. Alors que les graminées présentent une faible

teneur en terpènes, les dicotylédones, notamment les familles: *Apiaceae*, *Asteraceae, Plantaginaceae, et Lamiaceae* sont plus riches en ces composés (Bugaud et al., 2001, Mariaca et al., 1997). L'origine de cette différence entre groups provient de deux stratégies différentes appliquées par ces plantes contre les agents agressifs Les monocotylédones comme les graminées agissent contre les prédateurs comme les herbivores par une repousse rapide grâce à leur méristème basale qui leur permet de survivre dans des conditions extrêmes (McNaughton, 1983). Chez les dicotylédones, le rôle de défense a été attribué principalement aux substances chimiques, notamment les métabolites secondaires dont la diversité et la teneur sont plus élevées (Bryant et al., 1991).

Le stade de développement de plantes est un autre facteur qui influence la teneur en terpènes dans les pâturages. En tenant compte de la production et de la sécrétion de ces substances qui a lieu dans des organes spécialisés, il semble que leur teneur est plus élevée dans les plantes plus matures que dans celles plus jeunes (Mariaca et al., 1997). Schantz et Ek (1971) ont rapporté une variation de la composition en terpènes associée du stade phénologieque dans le cumin. Ils ont observé que pendant le développement de plante jusqu'à l'étape de floraison, le limonène est le dominant, ensuite il est remplacé par le carvone.

Les données expérimentales montrent que la teneur et le profil des terpènes dans les pâturages varient au cours du temps. Une partie de cette variation a été attribuée à la variation de composition botanique pendant la saison (Fedele et al., 2004). Cependant la concentration et le profil en terpènes dans une espèce donnée change aussi à travers les saisons (Mariaca et al., 1997, Fedele et al., 2005a). La concentration en monoterpènes et sesquiterpènes est plus élevée au printemps, alors qu'en été, les sesquitetrpènes sont les plus abondants (Fedele et al. , 2005a). De même, des données rapportent une forte variabilité de la teneur en terpènes, liée aux conditions climatiques. Dans un climat chaud et sec leur teneur est plus élevée (Sangwan et al. , 2001).

2.4.3. Les pâturages et les caractéristiques des produits laitiers

Plusieurs études montrent un impact de la ration ingérée sur la qualité de produit animal qui peut être direct ou indirect.

2.4.3.1. L'origine des caractéristiques sensorielles des produits laitiers

Les modifications des caractéristiques sensorielles des produits laitiers peuvent être effectuées par différents mécanismes: 1) transfert dans le lait et le fromage, sans modification des molécules à partir de l'alimentation, 2) modifications sur les protéines et lipides (teneur, structure et composition) des produits, 3) transfert d'enzymes endogènes du sang ou du lait qui modifient la protéolyse ou la lipolyse pendant la maturation du fromage et 4) modifications de l'écosystème microbiennes des produits (composition, dynamique et activité).

2.4.3.2. L'impact du pâturage sur la caractéristique sensorielle des produits animaux

Un effet direct de la ration sur les propriétés sensorielles des produits animaux peut être attribué aux terpènes, du fait de leur transfert rapide de la ration dans le lait (Viallon et al., 2000). Néanmoins, la variation de leur teneur dans la ration ne semble pas avoir d'effet significatif direct sur la saveur des produits (Bugaud et al., 2002). Cependant il semble que leur présence dans les produits laitiers peut agir sur l'activité des microorganismes contribuant à la maturation de ces produits. Martin et al.(2005a) ont suggéré que les terpènes peuvent influencer la qualité des produits indirectement par une action sur la flore microbienne du rumen: en observant une différence de saveur de fromage fabriqué avec du lait produit à différentes altitudes. Les fromages fabriqués en haute altitude (2200 m) étaient plus salés, plus pointus et plus acides que ceux d'altitude moyenne.

Les recherches effectuées sur les prairies montrent que la variation temporelle de la composition botanique des pâturages influence la composition des plantes consommées par les herbivores et par conséquent la composition en substances volatiles des produits élaborés à partir de ces plantes. Dans un essai réalisé par Fedele et al. (2005b) au pâturage local (Basilicate, Italie), la variabilité des espèces végétales pendant les saisons et son impact sur les préférences de chèvre a été étudiée en relation avec la variation des composés volatils dans les produits. Une forte variabilité a été observée sur les espèces végétales du pâturage au cours de l'année. Parallèlement les chèvres ont modifié leurs rations ingérées en fonction les espèces disponibles à chaque saison. Pendant l'hiver, les graminées étaient les plus abondantes (85–88%). Les espèces *Lolium perenne* et *Dactylis glomerata* constituaient 92% de la ration consommée par les chèvres. Au printemps, proportions de légumineuses et de

forbs (herbe à feuilles larges et plates) ont augmenté et les chèvres ont changé les proportions des plantes consommées (39.5% d'herbes, 24% de légumineuses et 36.5% de forbs). En été les herbes et les légumineuses ont été moins consommées au profit des forbs (71%). Une liaison forte a été observée entre la composition des substances volatiles des fourrages, du lait et du fromage, que ce soit l'hiver ou l'été. Pour les fourrages, la teneur en terpènes a fortement augmenté au printemps et surtout en été (0.832 mg/100g MS en hiver jusqu'au 7.2mg/100g MS en été). La teneur en terpènes du lait a suivi la même évolution que celle du fourrage. Cette augmentation a été tellement marquée que la saveur du lait et du fromage d'été a été fortement liée à la présence des terpènes notamment α-phellandrène, limonène, linalool, β-phellandrène, terpinolène et terpinéol.

Dumont et al. (1981) et Bosset et al. (1994) ont émis l'hypothèse que l'arôme du fromage de montagne (Gruyère et Etivaz) est influencé par la présence des mono- et sesquiterpènes. Parmi les 42 espèces végétales d'altitude, 22 ont présenté plus de 54 composés terpéniques.

2.4.4. La traçabilité des produits animaux par les terpènes

Plusieurs études ont mis en évidence que certains composés terpéniques peuvent traverser différentes barrières physiques et métaboliques après l'ingestion et peuvent se retrouver dans les produits animaux.

Bosset et al. (1994) et Dumont et al. (1981) ont mis en évidence qu'une teneur élevée en α-terpinène, limonène, α- et β-pinène et α- thujène dans les pâturages de haute altitude peut expliquer leur présence dans les fromages fabriqués en montagne. Viallon et al. (2000) ont étudié l'évolution des mono- et sesquiterpènes dans le lait, après l'ingestion de deux types de fourrages. Après une période de 24 jours d'alimentation à base de foin de dactyle (un fourrage pauvre en terpènes), la substitution d'une partie par de l'Achillée plante a augmenté la teneur en monoterpènes et sesquiterpènes dans le lait après 8 et 32 h respectivement.

Cornu et al. (2005) n'ont rapporté aucun effet de la pasteurisation sur la teneur et profil en terpène du lait. Néanmoins, une différence significative a été observée sur le profil en terpènes de deux types du fromages AOP (Cantal et Saint-Nectaire, origine Auvergne) fabriqués à partir du même lait. Un effet physico-chimique provenant du processus de transformation fromagère a donc été proposé. Ainsi une différence en composition de microorganismes présents dans le produit d'ensemencement a été susceptible d'être la cause de cette variabilité observée. Le profil en terpènes dans le lait a également été étudié dans une

étude comparative entre deux groupes de collecte laitières issues de deux régions géographiques différentes avec leurs propre systèmes d'élevages (Fernandez et al., 2003). Le première collecte provenant de Auvergne (pâturage de haute altitude pendant l'été et alimentation en fermé durant l'hiver) et la deuxième de la Bretagne (pâturage de basse altitude dominé par les graminées en été et alimentation hivernale à base du maïs). Parmi les terpènes retrouvés dans les laits, plus de 60% de la variation de l'α-pinène, α- terpinène, (T1337, T1368, inconnus) α-copaène, β-bourbonène, β-caryophyllène et plus de 90% de la variation du β-guaiène et un autre composé non identifié a été attribuée à l'origine géographique. De même, les sesquiterpènes (β-gurjunène et δ-élémène ont varié fortement (65-85% respectivement) avec le système d'élevage qui distingue les laits collectés pendant la période de pâturage de ceux collectés pendant la stabulation.

Dans une étude comparative effectuée dans une zone productrice de fromage (Haute-Savoie), le profil en terpènes des fourrages dominants issus de deux altitudes (montagne et vallée) et celui retrouvé dans le lait ont été analysés. Les graminées étaient les plus abondantes dans la vallée avec un faible teneur en terpènes, alors qu'en montage les *Apiaceae*, *Asteraceae* et *Plantaginaceae* étaient les plantes dominantes avec une teneur élevé en terpènes. Dans les deux zones, une corrélation étroite a été observé entre le profil en terpènes dans les fourrages avec et dans le lait correspondant (Bugaud et al., 2001). L'analyse du profil en terpènes dans les fromages correspondants a démontré que 71% de la variabilité observée de la teneur en terpènes dans ces fromages est associé à celle observée dans les fourrages. Les terpènes les plus abondants dans les fourrages étaient aussi les molécules dominantes dans les fromages, cependant les proportions de terpènes observés dans les fourrages étaient différentes de celle des fromages. En plus la quantité de terpène trouvée dans les fromages était seulement 5.4% de celles trouvé dans les fourrages.

Tornambé et al. (2006) ont étudié l'effet du mode de pâturage sur la variation du profil en terpènes dans le lait. Dans cette étude, deux systèmes de gestion du pâturage (Strip grazing (SG) et Paddock grazing (PG)) pendant 2 périodes (l'été et l'automne) ont été étudiés. Dans le système SG, une augmentation de 8 fois de la teneur en terpènes dans le pâturage pendant l'été a conduit à une multiplication par 4 des monoterpènes et par 2 des sesquiterpènes dans le lait. Dans ce système, cet accroissement de la teneur en terpènes dans le lait a été mis en relation avec une augmentation de 17% à 31% des dicotylédones dans ces pâturages et une limite du choix des plantes pour les animaux. Dans le système PG, la teneur en monoterpènes dans le lait est restée relativement constante alors que les sesquiterpènes ont été doublés. Une faible variabilité de la teneur en terpènes dans le système PG a été mis en liaison avec la

possibilité de sélectionner des plantes par les animaux dans ce système. En automne, la teneur en terpènes du lait était basse et la variabilité faible dans les deux systèmes.

Un effet de la saison a été rapporté par Fedele et al. (2004) sur la teneur et le profil en terpène du lait. Un changement de la préférence des plantes pâturées par les chèvres a été observé en relation avec la modification de la composition botanique pendant les saisons dans une prairie locale (Basilicate, Italie). Un apport direct des plantes les plus consommées (*Lolium et Dactylis* en hiver, *geranium molle* et *Asperula odorusa* en printemps, *Cichorium intybus* et *Galium verum,* en été) dans le rumen a changé la composition et la concentration des terpènes dans le lait. Dans la plupart des cas la composition en terpènes retrouvée dans le lait a reflété celle de la plante préférée.

Priolo et al. (2004) ont comparé les effets de 4 systèmes d'alimentations (pâturage permanent, une longe période de pâturage au début et une courte période de stabulation à la fin, une courte période de pâturage au début et une longe période de stabulation à la fin et le système en totale stabulation) sur la teneur en terpènes dans le tissu adipeux des moutons. Parmi les monoterpenes, seul le p-cymène a été affecté, avec un accroissement dans les systèmes pâturage par rapport aux autres systèmes. Parmi les 11 sesquiterpènes identifiés, plusieurs d'entre eux ont été influencés par le système d'alimentation, ils étaient plus abondants dans le système basé sur le pâturage. Parmi eux, le β-caryophyllène était le plus affecté par le système alimentaire : il était absent dans le systeme stabulation, et plus riche dans le système pâturage. Sa présence dans plusieurs familles (*Apiaceae, Asteraceae, Campanulaceae, Geraniaceae, Lamiaceae et Rubiaceae*) fait de ce terpène un biomarqueur puissant dans les produits carnés ainsi que dans les produits laitiers.

2.4.5. Les animaux et leurs productions dans la région Méditerranéenne

L'élevage des petits ruminants (lait, viande, laine et peaux) dans les régions méditerranéennes joue un rôle très important, puisqu'il permet l'exploitation des zones agricoles à faible potentiel et des terres incultes. Alors que la vache a toujours été la principale ressource animale de l'Europe du nord et de l'Europe centrale, la chèvre et la brebis sont les animaux méditerranéens par excellence, avec une production de lait transformée traditionnellement en fromages typiques et en d'autres produits fermentés (par exemple, le yaourt). Cette partie du monde est un des plus grands consommateurs de produits laitiers fermentés (fromages, yaourt, etc.) essentiellement d'origine ovine et caprine (Boyazoglu et Flamant , 1988).

En ce qui concerne la production laitière, plus de trois quarts de la production mondiale de lait de brebis et plus d'un tiers de la production de lait de chèvre sont concentrés dans cette région. Environ 90% du lait de brebis et de chèvre est transformé en produits laitiers de qualité (exemple du fromage: Roquefort, Pécorino Romano, Fiore Sardo, Manchego, Serrade Estrela, Feta, Niolo, Manouri, Veneco, etc.) (Bourbouze et Donadieu, 1987).

Dans le contexte actuel de la mise sur le marché de ces produits spécifiques, la valeur d'un fromage typique dépend de l'espèce animale, de la qualité du lait (matières grasses et protéines), du sol, du climat, du milieu et du savoir-faire traditionnel du fromager. Il est de première importance de mettre en évidence la «régionalité»de ces produits. Les Appellations d'Origine Protégée (AOP) et Indication Géographique Protégée (IGP) donnent au consommateur, non seulement l'assurance de l'origine, mais aussi généralement celle d'une qualité. Ainsi, ces produits (par exemple : les fromages régionaux) sont étroitement liés au terroir, à l'animal et à ceux qui les produisent.

2.4.6. Conclusion

Les études expérimentales ont démontré une liaison assez forte entre la variabilité des composés terpéniques dans les pâturages avec celles présentes dans les produits animaux. Leur teneur dans les produits animaux a été associée principalement aux dicotylédones qui se trouvent en abondance dans les pâturages de la montagne. Toutes ces données montrent une possibilité d'utilisation des terpènes dans la traçabilité des produits animaux. Ceci présent un intérêt accru dans la région méditerranéenne, où les produits typiques à base de lait de brebis et chèvre sont très divers.

Malgré une liaison observée entre les terpènes dans la ration ingérée et ceux de retrouvés dans les produits, il existe une corrélation plus ou moins faible entre les deux, notamment au niveau de la concentration et du profil. Certains facteurs sont susceptibles d' intervenir, comme les effets physico-chimiques provenant du processus de fabrication des produits (les fromages). L'intervention des microorganismes après l'ingestion des plantes jusqu'au produit final, est un facteur potentiellement plus important dans ce contexte, ce qui n'a pas été étudié jusqu'à présent.

2.5. Conclusion générale

Le terme terpénoïde, est attribué à l'ensemble des composés construit à partir de l'unité de base isoprène, qui sont classés d'après leur nombre d'isoprènes constitutifs. Parmi les méthodes d'appliquées pour l'extraction des terpènes, la SPME est l'une des plus efficaces, grâce à sa simplicité, sa rapidité, son potentiel d'application dans plusieurs types de matrices et une précision comparable aux autres méthodes classiques. Toutefois, une optimisation préalable pour les matrices spécifiques, comme le jus du rumen et le sang est nécessaire.

Malgré l'activité antimicrobienne des terpènes, les études *in vitro* ont démontré que certains microorganismes sont capables de dégrader ces composés notamment ceux qui possèdent une activité antimicrobienne moins intense comme les hydrocarbones, ceci a été observé avec les microbes aérobies ainsi que les microbes anaérobies. L'impact des terpènes chez les ruminants a été très souvent étudié *in vitro* et les résultats obtenus ne peuvent pas être généralisés à *l'in vivo*. *In vivo*, il existe peu de données sur les composés terpéniques. Les études *in vivo* ont évalué l'effet de quelques huiles essentielles seulement sur l'ingestion et

certaines données récentes sont strictement focalisé sur un mélange de quelques terpènes purs (Crina). Toutefois il n'y a pas de données expérimentales concernant le métabolisme des terpènes par les microorganismes du rumen. Ceci nous a mené à faire des expérimentations en *in vitro* et *in vivo* afin d'étudier l'impact des microorganismes du rumen sur ces molécules, et leur devenir. Par ailleurs, il convenait de repréciser l'impact de ces molécules sur les performances des animaux, la qualité des produits et également le métabolisme ruminal des macromolécules.

2.6. Les questionnements scientifiques et les objectifs expérimentaux

A l'égard des données expérimentales sur les deux intérêts de terpènes en tant que modifiant du métabolisme du rumen et marqueur des produits animaux, les terpènes sont supposés prioritairement comme des composés non métabolisables notamment dans le rumen. Sachant que les terpènes en tant que modifiant doivent rester assez stables en milieu du rumen pour avoir une action sur certaines populations microbiennes du rumen. De la même manière, les terpènes en tant que marqueur doivent rester intacts pour atteindre jusqu'au produit et donner des informations sur la nature de l'alimentation. Toutefois l'absence des données expérimentale sur le métabolisme de ces composés après l'ingestion, surtout dans le rumen provoque cette question, les terpènes sont-ils métabolisés dans le rumen ?

Dans le cas ou la réponse à cette question sera positive, la deuxième question sera quels sont les facteurs de variation principaux déterminant ce métabolisme dans le rumen ?

Comme évoqué dans la partie bibliographique, certaines études expérimentales ont démontré la dégradation de plusieurs mono- et sesquiterpènes en anaérobiose et dans les cultures pures de quelques microorganismes provenant du sol des forêts de pin, des stations d'épuration et les microorganismes intestinaux des insectes. Dans ces études, deux conditions : dénitrification et la formation de méthane favorisent la dégradation de terpènes en consommant des équivalents redox issus de l'oxydation de terpènes. L'existence de deuxième condition (la formation de méthane) dans le rumen, renforce l'hypothèse de la dégradation de terpènes dans ce milieu en considérant la présence d'une large gamme d'espèces microbienne. En supposant cette hypothèse, la troisième question sera quels sont les facteurs de variation caractérisant cette dégradation microbienne ?

En ce qui concerne l'impact de terpènes sur les ruminants comme discuté dans la partie bibliographique, en tenant du compte d'une grande variabilité des HES et leurs composants, nous somme au début dans ce contexte. La question générale qui se pose avec un nouveau produit (HE) ou un mélange de terpènes ou un terpène individuel est que quel-est l'impact de ces composés sur les paramètres ruminaux et surtout sur les performances de production des ruminants ?

Une phase importante dans les études de composés terpéniques est l'extraction de ces substances dans différents types de matrice. Selon l'étude bibliographique, une méthode récente qui peut être substituée les méthodes classiques, est la SPME. Cette méthode est

applicable dans plusieurs types de matrice, il existe très peu d'information sur l'aspect méthodologique de la SPME notamment dans les matrices biologiques complexes. Les questions posées sur ce sujet seront : est-ce que la SPME peut être considérée comme alternative aux méthodes classiques appliquées sur l'extraction des terpènes dans les matrices biologiques ? Et quel sera l'effet des facteurs de variation sur l'efficacité de cette méthode dans ces matrices ?

En se fixant sur ces questions, nos objectifs expérimentaux étaient :

- Etudier *in vitro* le métabolisme des terpènes typiques de la région méditerranéenne (Basilicate, Italie) en milieu du rumen
- Caractériser l'effet de certains facteurs de variation comme le type d'inoculum (inoculum riche en fibre vs inoculum riche en amidon), le type de bactéries (Gram+ vs Gram-) et le potentiel redox (avec et sans cystéine-HCl) sur le métabolisme ruminal des terpènes
- Eprouver les résultats obtenus *in vitro* par une étude *in vivo* et caractériser les facteurs déterminant les flux des terpènes après l'ingestion notamment dans le tube digestif
- Etudier *in vivo* l'impact d'un mélange des terpènes sur le métabolisme ruminal et les performances de production des chèvres laitières à deux doses (50 et 500 µl/kg MSI)

Le premier objectif a été choisi, pour répondre à la première question qui était déterminant pour répondre aux questions suivantes.

En raison de la nouveauté du sujet et une large gamme de composés terpéniques, nous avons choisi un profil de terpènes qui présent dans les régimes hivernal et printemps caprins en Basilicate. Les raisons pour ce choix en premier est que nos collègues italiens avaient bien étudié la teneur et la composition en terpènes des plantes ingérés par les chèvres dont les graminées et légumineuses constituent la partie majore. Ces plantes en proportions variables sont en générale des végétaux dominant dans plupart des pâturages naturels. Par ailleurs Basilicate est une région typique du bassin méditerranéen dans lequel une grande partie de la production de lait à base de brebis et chèvre est transformée en produits typiques de différente qualité. En conséquence la traçabilité de ces produits est en première importance en tenant du compte de l'exigence du marché de consommation à discriminer ces produits.

Au deuxième objectif, nous avons essayé de répondre à la troisième question. En ce qui concerne le type des bactéries (Gram+, Gram-), nous avons des données expérimentales démontrant une liaison entre l'activité antimicrobienne de terpènes et le type des bactéries. Sachant que les bactéries Gram- sont plus résistant grâce à leur paroi extérieure. Selon notre hypothèse la relation entre les terpènes et les microorganismes semble être réciproque donc

cette caractéristique peut jouer un rôle sur le métabolisme de terpènes par les microorganismes.

Dans une étude réalisée par Villalba et al. (2006), les agneaux ont préféré la ration à base de l'orge à la place d'une ration à base de pulpe betterave, cependant en ajoutant des terpènes dans la ration ou après l'ingestion de sauge (une plante riche en terpènes) le niveau d'ingestion est diminué et les agneaux ont ingéré plus de la pulpe de betterave à la place de l'orge. Selon ces auteurs, il y a une liaison entre la préférence des agneaux et le type de ration ingéré : les hydrates de carbone structurels (pulpe de betterave) ou non (l'orge) et les microorganismes adaptés à ces rations, ce qui nous avons essayé de tester dans ce travail. D'après l'étude bibliographique, en condition anaérobiose théoriquement le facteur principal provocant l'oxydation (libération de l'électron) de terpènes est enlèvement des équivalentes redox issus de terpènes, ce que nous volions tester par l'ajoute de cystéine dans cette étude.

En ce qui concerne l'étude *in vivo*, l'objectif principal était d'étudier le métabolisme des terpènes et déterminer les facteurs qui influencent leur flux dans le tube digestif. Toutefois, la manque de données *in vivo,* nous a mené de tester leur impact sur les chèvres laitières mais à deux doses en tenant du compte l'existence d'un effet de dose sur l'impact des HES sur les ruminants.

Pour cette étude nous avons choisi la méthode d'extraction SPME puisque c'est une méthode bine avantageuse par rapport aux autres méthodes classiques comme discuté précédemment. Malgré sa potentiel à appliquer dans plusieurs types de matrice, il n'existe que très peu d'information méthodologique sur la SPME dans le sang et aucune donnée sur la SPME en milieu fermentaire. Ces matrices sont lesquelles, nous voulions poursuivre le métabolisme des terpènes. Donc l'optimisation de la SPME des terpènes dans ces deux matrices ont devenu comme des objectifs préliminaires dans cette étude.

3. Partie expérimentale

3.1. Matériels et Méthodes

La partie expérimentale de cette étude est composée de deux types d'essais: *in vitro* (EXP. 1 et EXP. 2) et *in vivo* (EXP. 3) ainsi que de deux expérimentations de mise au point de la SPME en milieu fermentaire et dans le sang.

L'objectif principal dans les EXP *in vitro* était d'étudier le métabolisme de certains terpènes par les microorganismes du rumen et d'en caractériser les facteurs de variations. Dans l'EXP *in vivo*, le but était de valider les résultats obtenus *in vitro*, et en parallèle d'évaluer en retour l'impact des terpènes sur les microorganismes du rumen, en mesurant les flux duodénaux de parois végétales et d'azote ainsi que les bilans digestifs de ces éléments et finalement les performances zootechniques chez la chèvre laitière.

Cela nécessitait une mise au point méthodologique préliminaire d'optimisation de la SPME pour analyser les terpènes dans les matrices issues du milieu fermentaire et du sang. Les conditions opératoires optimales ont été déterminé pour les facteurs de variations de l'efficacité de la SPME suivants : Température, Durée d'extraction et pH de la matrice pour le milieu fermentaire; la température, la durée et la force ionique de la matrice (concentration en sel) pour le sang.

3.1.1. Expérimentations in vitro

3.1.1.1. Les terpènes

Les terpènes étudiés dans ces études sont caractéristiques des régimes de printemps et hiver dans les élevages caprins de la région Basilicate (Italie) decrit par Fedele et al. (2004, 2005a). Ils ont été utilisés sous forme pure de qualité chromatographique (Roth-Sochiel Sarl, Lauterbourg, France et Extrasynthèse SA, Genay, France). Dans le premier essai *in vitro* (EXP1), l'objectif était d'etudier la dégradabilité de 16 monoterpènes (α-terpinène, β-ocimène E, β-ocimène Z, 4-terpinéol, β-myrcène, p-cymène, oxyde de linalool E, oxyde de linalool Z, α-phellandrène, limonène, linalool, δ-carène, α-terpinolène, α+γ-terpinéol, 1,8-cinéole, γ-terpinène) et un sesquiterpène (β-cedrène), répartis dans 5 mélanges sur la base de leur indice de Kovats. Dans le deuxième essai in vitro (EXP2), nous avons étudié l'effet de certains facteurs de variation sur le métabolisme des terpènes qui avaient montré une forte disparition

dans en milieu fermentaire: (β-ocimène E, β-ocimène Z, α-phellandrène, α-terpinène, linalool, sabinène, α-pinène (+),α-pinène (-), β-pinène). Les facteurs de variations étudiés sont les suivants :

- Le type d'inoculum, caractérisé par deux types de rations, soit riche en fibre (N55) soit riche en amidon (N25) afin d'obtenir des inoculums caractéristiques des bactéries cellulolytiques ou amilolytiques
- Le potentiel redox, caractérisé par l'addition de Cystéine-HCl
- Les bactéries Gram+ et Gram- discriminés par l'addition d'antibiotique (vancomycine) connu pour son action sélective sur les Gram+

De façon générale, les études *in vitro* sont composées de deux étapes consécutives : maintenir des fermenteurs continus puis incubation en batch. La première étape a permis de fournir les inoculums nécessaires à l'incubation des terpènes en batch.

3.1.1.2. Maintenance des fermenteurs continus en double effluent

Quatre fermenteurs à double effluent indépendants ont été utilisés pour fournir les inoculums (jus de rumen) frais pour l'incubation en batch. Le premier jour d'expérimentation, ils ont été ensemencés par 200 ml de contenu de rumen prélevé sur 4 chèvres (ingérant un régime composé de 48% fourrage, 21% concentré et 31% de pulpe de betterave) après un traitement de filtration suivi par une congélation de 48 h à –30°C sous atmosphère de CO_2, afin d'éliminer les protozoaires. Nous avons choisi de créer des conditions de développement préférentiel pour les bactéries et champignons puisque ces microorganismes parmi les autres sont considérés probablement comme responsables majeurs du métabolisme des terpènes dans le rumen.

Pour l'EXP1, une ration assurant une fermentation optimale (les proportions classiquement observées des AGV) dans le rumen composée de 65% (matière fraiche) de foin de dactyle, 20% de grain maïs, 15% de tourteau de soja 48 et des compléments minéraux a été utilisée. Pour l'EXP2, une ration riche en fibres (N55) et une autre riche en amidon (N25) dont les compositions sont présentées dans le tableau (M1) ont été utilisées. Dans les 2 essais, les rations ont été distribuées 2 fois par jour avec un écart de 12 heures (11 :30 et 23 :30) avec un apport de 30 g MF par fermenteur et par jour.

Chaque fermenteur maintenu à 39°C a été continuellement infusé avec de la salive artificielle de composition suivante : Na_2HPO_4 $12H_2O$, 6.082g.l^{-1} ; $NaHCO_3$, 5.357 gr.$^{-1}$;

$KHCo_3$, 0.491 $g.l^{-1}$; NaCl, 0.363 $g.l^{-1}$; L-Cystéine HCl $1H_2O$, 0.152 $g.l^{-1}$. Le débit d'infusion a été de 1.1 ml/min. Le taux de renouvellement de la phase liquide des fermenteurs a été réglé à 0.06 h^{-1}. Le temps de séjour moyen de la phase solide a été de 33 h.

Tableau M 1: Ingrédients et composition chimique des rations incubées dans les fermenteurs

Rations	N 25	N 55
Ingrédients		
Blé gMF/j	20	0
Foin dactyle gMF/j	0	25
Foin luzerne gMF/j	11	5
Composition chimique		
MS g/j	28,12	28,12
MO %MS	95.59	91.79
NDF %MS	25,52	55,90
N g/j %MS	2.08	2.13

3.1.1.3. Incubation en batch

Une période de 7 jours a été considérée suffisante pour l'équilibration fermenteurs continus. Ensuite, les terpènes ont été incubés en présence d'inoculum (8 ml, Exp1), (5 ml, EXP2) issus des fermenteurs pendant 24 h dans des tubes de cultures de 20 ml (EXP1) et 10 ml (Exp2) placés dans un bain-marie à agitation (100 rpm) à la température de 39°C. Pendant cette étape, l'activité microbienne a été entretenue par l'apport de 2 ml (Exp1) et 1.25 ml (Exp2) d'une solution nutritive tamponnée à pH 6.8 dont la composition est présentée dans le tableau (M. 2). A la fin de l'incubation, les tubes de culture ont été congelés à –30°C pour les analyses de terpènes par CPG.

Tableau M 2: Composition de la solution tampon nutritive des incubations en batch

Constituant	Concentration (g/l)
$(NH_4)_2SO_4$	2.360
$(NH_4)H_2pO_4$	8.216
cellobiose	51.345
maltose	54.045
tryptone	6.25

3.1.1.4. Les analyses chimiques

L'extraction par SPME a été réalisée en mélangeant 0.5 ml de milieu fermentaire et 5.5 ml de solution phosphate 0.3 M (pH 6.75 et de force ionique 4.5 M) dans un flacon SPME de 10 ml, qui a ensuite été scellé et agité pendant 10 secondes. Les résultats des essais d'optimisation ont conduit aux conditions opératoires optimales suivantes : l'extraction a consisté à exposer la fibre dans l'espace de tête du flacon à la température de 45°C, pendant 18 min 40 sec (en raison de la sensibilité de la performance de la SMPE à ces paramètres), puis dans l'injecteur du chromatographe à 240°C pour l'étape de désorption.

L'extraction des terpènes du sang a consisté à ajouter 2 ml de sang dans les flacons contenant 2 ml de solution de tampon, puis à agiter pendant 10 sec. L'extraction a duré 22 min avec une température de matrice de 35°C.

Les analyses de terpènes ont été effectuées sur un CPG Varian 3400 équipé d'un injecteur avec insert SPME en verre de DI 0.75 mm, d'une colonne capillaire CP-Sil 5 CB (25 m, ID 0.25 mm, film 0.25 μm) et d'un détecteur FID à 300°C . L'analyse a duré 20 min, avec une température initiale de la colonne de 50°C maintenue pendant 2 min, puis augmentée de 5°C/min jusqu'à 100°C puis de 40°C/min jusqu'à la température finale de 250°C maintenue pendant 2 min. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un débit de 1 ml/min. Dans le détecteur, le débit de l'hydrogène a été réglé à 30 ml/min, celui d l'air à 300 ml/min et l'azote à 30ml/min.

3.1.2. Expérimentation in vivo

3.1.2.1. Les animaux et leur régime

26 chèvres laitières multipares ou primipares, de race Saanen ou Alpine, en milieu de lactation dont 12 portant des fistules au niveau ruminal et duodénal ont été allotées selon leur production laitière et la composition du lait, en 3 groupes correspondant à 3 niveaux d'apport d'un mélange de terpènes (TERP). Ce mélange était composé de linalool (48.50%), p-cymène (34.26%), α-pinène (15.16%) et β-pinène (2.08%). Il a été distribué à un niveau bas d'apport (0.05 g/kg MSI, (LOW), n=10 chèvres) ou à un niveau haut (0.5 g/kg MS, (HIGH), n=10 chèvres). Six chèvres supplémentaires ne recevant aucun terpène ont été considérées comme

témoins. Les chèvres fistulées en cases individuelles et en cages à digestibilité pour la détermination des bilans duodénaux et les chèvres non fistulées en cases individuelles ont été alimentées *ad libitum* deux fois par jour à 9h00 et 16h00. Les terpènes ont été administrés directement par la canule ruminale dans le cas des chèvres fistulées ou ils ont été mélangés avec la ration dans le cas des chèvres non fistulées.

Pour les mesures de bilan, une période expérimentale de 6 semaines a été répartie entre une semaine prise comme facteur de covariance (S1), 4 semaines d'adaptation aux régimes expérimentaux (S2 à S5) et une semaine d'échantillonnage (mesure des bilans ruminaux et duodénaux).

3.1.2.2. Aliments et mode d'alimentation

Les chèvres ont reçu une ration composée de 50% (%MS) de foin de graminées, de 25-30% de pulpes de betteraves, de 20% d'un concentré commercial standard (blé, maïs, tourteau de soja), de 4% de mélasse et de bicarbonate. L'alimentation a été faite en ration complète *ad libitum* en 2 repas égaux par jour.

L'oxyde de chrome a servi de marqueur pour mesurer les bilans digestifs de MS, MO, de l'N et des parois végétales. Une quantité de 2.4 g.jour^{-1} d'oxyde de chrome en deux parties égales de 1.2 g a été introduite directement dans le rumen pendant 3 semaines en considérant une semaine d'adaptation (S4), une semaine de récolte fécale (S5) et 3 jours consécutifs (S6) de récolte du chrome au niveau duodénal.

3.1.2.3. Mesures et prélèvements

- Composition des rations et ingestion : trois échantillons représentatifs de la ration complète ont été prélevés pour dosage des principaux constituants (MS, MO, NDF, ADF, ADL, N) en début d'expérimentation, puis au début de la période de prélèvement duodénal qui correspond au début de la 6ème semaine expérimentale, et en fin d'expérimentation. Les quantités d'aliments distribués et les refus ont été déterminées quotidiennement.
- Production et composition du lait : la production et la composition du lait ont été déterminées chaque semaine sur 3 jours consécutifs pour la production laitière, et sur 2 traites consécutives pour la composition chimique du lait (TB, TP, cellules). Des

échantillons supplémentaires de lait ont été prélevés sur deux traites séparées durant la semaine de récolte fécale (S5) pour la détermination du profil en AG de la matière grasse laitière.

- Prélèvements sanguins : le dernier jour de l'essai, deux échantillons par chèvre ont été prélevés 8 h après le repas matinal pour mesurer les concentrations en terpènes au niveau sanguin.
- Paramètres fermentaires - bilans digestifs ruminaux: Pour les déterminations des flux duodénaux, 12 prélèvements individuels séparés de 6 h et décalés de 2 h tous les jours ont été effectués durant les 3 derniers jours de l'essai, afin de reconstituer un échantillon moyen par chèvre représentatif du nycthémère pour analyser les contenues de MS NDF, ADF, ADL, matière azoté, et matière organique. Le volume moyen de contenu duodénal était de 60 ml environ. Le dernier jour, après le dernier des prélèvements duodénaux, 3 échantillons de contenu ruminal (0, 3, 6 h après le repas matinal) ont été récupérés pour déterminer les caractéristiques fermentaires ruminales (pH, NH3, AGV et protozoaires).

3.1.2.4. Les analyses réalisées

Les dosages des composants chimiques des aliments, et des contenus de duodénum (NDF, ADF, ADL) ont été réalisés au laboratoire de l'UMR INRA INA-PG Physiologie de la Nutrition et Alimentation selon la méthode Van Soest et al. (1991). Les teneurs en NH_3 et AGV du jus de rumen ont été déterminé au laboratoire de l'UMR INRA INA-PG par colorimétrie (Wheatherburn, 1967) et GC (Kristensen, 2000) respectivement. La composition du lait (TB, TP, cellules) a été analysée au laboratoire du Contrôle Laitier (Syndicat Interdépartemental de L'Elevage, Le Mee). Les dosages de terpènes dans les contenus duodénaux et le sang ont été réalisés selon la méthode décrite ci-dessus (partie *in vitro*). Les AG du lait, ont été analysés par CPG au laboratoire de l'UMR, selon la méthode décrite dans l'article 5. Le dosage du marqueur des flux digestifs (Chrome) a été réalisé au Laboratoire d'Alimentation du Département Elevage et Produits de l'ENV de Toulouse selon la méthode décrite par Kozloski (1998).

3.2. Aspects méthodologiques (Articles 1 et 2)

3.2.1. Optimisation de la SPME en milieu fermentaire (Article 1)

Optimisation de l'extraction par HS-SPME des terpènes en milieu fermentaire par la méthode des surfaces de réponse[1]

3.2.1.1. Introduction

Dans le domaine de l'analyse chromatographique, la micro-extraction en phase solide (SPME) est une technique récente d'extraction sans solvant (Arthur et Pawlyszin, 1990) qui a abouti au développement de nombreuses méthodes d'extraction de composés volatils et semi-volatils. Cette technique présente de nombreux avantages : rapidité, faible coût et sûreté par absence de solvants, conditions opératoires très variées. Au départ considérée comme qualitative, elle a été aussi utilisée avec succès pour quantifier des analytes. Le but de cette mise au point a été d'évaluer la capacité de la SPME à extraire quantitativement les monoterpènes après incubation *in vitro* avec des microorganismes du rumen.

La SPME utilise une fibre de silice fondue, imprégnée sur 1 cm d'un film de phase (polydiméthylsiloxane ou PDMS, polyacrylate etc.) et rétractable dans une aiguille servant à percer les septa. L'ensemble «aiguille + fibre» est installé sur un piston en acier inox permettant la manœuvre de la fibre lors de l'étape de récupération des analytes dans l'échantillon contenu dans un flacon scellé, et celle de l'injection par désorption thermique en CPG ou par des solvants en HPLC. La phase de concentration des analytes sur la fibre peut se faire en immergeant la fibre dans l'échantillon liquide, les solutés sont adsorbés à la phase. Elle peut se faire en exposant la fibre au dessus de l'échantillon liquide ou solide (espace de tête), les analytes volatilisés sont absorbés dans la phase. Nous avons choisi cette dernière technique, couramment utilisée pour l'extraction des terpènes de matrices variées.

[1] Le format de l'article (titres, tableaux) ont été modifiés pour correspondre au format de la thèse. Aucune modification de texte n'a été introduite.

3.2.1.2. Matériel et méthodes

Consommables

Les 7 terpènes choisis pour cette mise au point sont caractéristiques des régimes de printemps et d'hiver dans les élevages caprins de la région de Potenza (Basilicate, Italie). Ils sont listés tableau 1, et sont de qualité chromatographique (pur). Les consommables étaient identiques à ceux utilisés lors de l'optimisation de l'extraction des terpènes dans le sang des chèvres laitières.

Tableau 1: Mélanges de terpènes avec leur indice de Kovats sur deux types de phase

Mélange de terpène	DB1	CW20M
Mélange 1		
α-Terpinène	1006	1152
(E)-β-ocimène	1038	1234
(Z)-β-ocimène	1026	1205
4-Terpinéol	1161	1554
Mélange 2		
α-Phellandrène	996	1152
Limonène	1020	1188
Linalool	1084	1519

Stratégie expérimentale

Plusieurs conditions opératoires influentes ont été fixées d'après la bibliographie : film de PDMS 100µm, flacons SPME de 10 ml avec septum silicone /téflon de 1,5 mm, rapport espace de tête /volume du flacon de 0,4, pas d'agitation permanente de l'échantillon en cours d'absorption, force ionique élevée de l'échantillon (4,5 M par ajout de NaCl), ou à partir d'essais préliminaires : profondeur d'injection de 30 mm, température de désorption de 240°C, durée de désorption de 3 min. Nous avons donc cherché à optimiser les performances de la SPME en considérant trois facteurs importants : la température et la durée d'exposition de la fibre dans l'espace de tête, ainsi que le pH de l'échantillon. Nous avons choisi les domaines de variation suivants: la température de 25°C à 45°C (variable codée T), la durée de 10 à 30 min (variable codée D), et le pH de 5 à 8,5 (variable codée P).

Une matrice de Hoke D6 en 13 expériences a permis d'explorer avec précision ce domaine expérimental cubique. La matrice et le plan d'expérience correspondant sont donnés tableau 2. Le pH a été contrôlé par l'emploi de tampons 0,3 M (acétate à pH 5, phosphate à pH 6,75 et Tris à pH 8,5). La température était régulée par un bloc chauffant en aluminium. Pour limiter le nombre d'incubations et d'analyses, les 7 terpènes ont été regroupés en deux mélanges en fonction de leur temps de rétention, comme indiqué dans le tableau1 qui présente les temps de rétention relatifs aux alcanes ou indices de Kovats sur les types de phase utilisées au laboratoire (DB1 et CW20M).

A chaque essai, 5µl d'un mélange terpénique donné, 5 ml de tampon, 1 ml de milieu fermentaire (matrice) étaient mélangés dans un flacon SPME : la concentration finale de chaque terpène était de 556 ppb, égale à celle obtenue avec un échantillon de tube de culture au temps zéro dans l'EXP1. Le flacon SPME était immédiatement scellé, homogénéisé et soumis à la SPME.

Tableau 2: Matrice de Hoke D6 et plan d'expérience associé

facteurs codés				facteurs		
essai	P	T	D	pH	Température	Durée (min)
1	-1	-1	-1	5	25°C	10
2	1	1	-1	8,5	45°C	10
3	1	-1	1	8,5	25°C	30
4	-1	1	1	5	45°C	30
5	-1	0	0	5	35°C	20
6	0	-1	0	6,75	25°C	20
7	0	0	-1	6,75	35°C	10
8	1	-1	-1	8,5	25°C	10
9	-1	1	-1	5	45°C	10
10	-1	-1	1	5	25°C	30
11	0	1	1	6,75	45°C	30
12	1	0	1	8,5	35°C	30
13	1	1	0	8,5	45°C	20

Les analyses ont été menées sur un CPG Varian 3400 équipé d'un injecteur à 240°C avec insert SPME en verre de DI 0,75 mm, d'une colonne capillaire CP-Sil 5 CB (25 m, ID 0,25 mm, film 0,25µm) et d'un détecteur FID à 300°C. La désorption durait 3 minutes, purge

de septum fermée. L'analyse durait 17,75 min, avec une température initiale de 50°C maintenue pendant 2 min, puis une pente de 5°C /min jusqu'à 100°C puis une pente de 40 °C/min jusqu'à 250°C pendant 2 min. les débits de gaz ont été : gaz vecteur, hélium 1 ml/min ; hydrogène 30 ml/min ; air 300 ml/min et azote gaz make-up 30 ml/min.

Analyses statistiques

Les réponses suivies étaient les surfaces de pics de terpènes lors d'analyse par GC-FID. Ceci possède des avantages par rapport à la quantité (mole, etc.) ou taux de récupération clalculés à partir d'étalonnage, puisqu'en utilisant des surfaces de pic directement mesurés, nous pouvon éviter des variabilités à partir des calcules. De plus les quantités initial pour tous les terpèns testés étaient identiques (55.6 ppb).

Le modèle polynomial suivant a été ajusté aux données par régression linéaire, à l'aide d'une procédure SAS :

$Y = b_0 + b_1 P + b_2 T + b_3 D + b_{11} P^2 + b_{22} T^2 + b_{33} D^2 + b_{12} P*T + b_{13} P*D + b_{23} T*D$

Les régressions linéaires ont été faites sur les variables codées : de –1 (valeur minimale) à +1 (valeur maximale) pour permettre la comparaison des effets des facteurs sans perturbation due aux différences d'ordre de grandeur.

3.2.1.3. Résultats et discussion

L'extraction des terpènes du mélange 2 a été modifiée par nos trois variables expérimentales de façon importante. L'α-phellandrène et le limonène ont été influencés de façon très semblable par les variables, avec un coefficient de corrélation de 0,99 entre les deux réponses. Le facteur le plus actif a été le pH, la récupération de l'α-phellandrène, du limonène et du linalool a été maximisée dans la zone de neutralité, selon un effet quadratique (tableau 3). Les effets de la durée et de la température d'exposition sur les réponses«α-phellandrène» et «limonène» ont été de type curvilinéaire (figure 1). On peut noter deux interactions ; entre pH et température d'une part, entre pH et durée d'exposition d'autre part. Une analyse canonique fait apparaître que pour maximiser les réponses de l'α-phellandrène et du limonène il faut une température basse avec un pH et une durée proches des valeurs centrales tandis que pour maximiser la réponse du linalool, il faut un pH proche de la neutralité, une température basse et une durée d'exposition maximale (figure 2).

Figure 1: Effet de la durée (DU) et de la température (TR) sur la réponse de l'α-phellandrène à pH 6,75

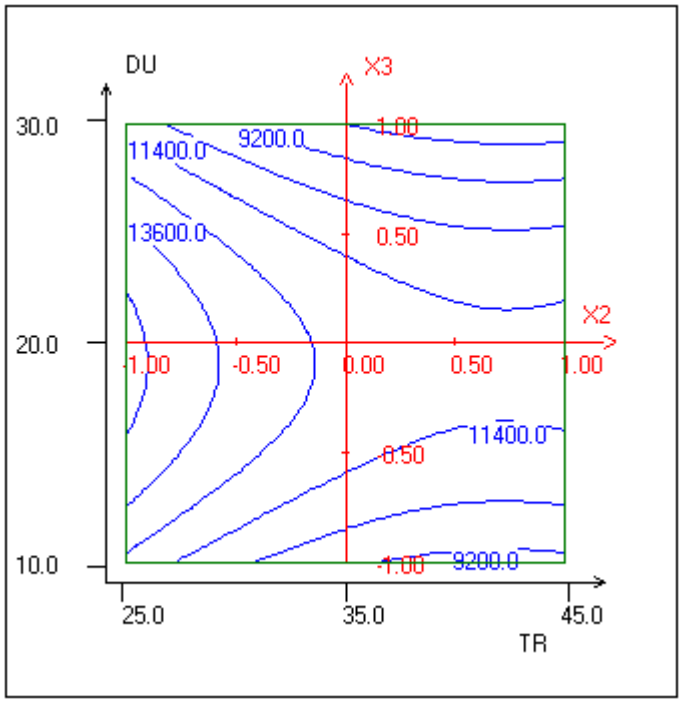
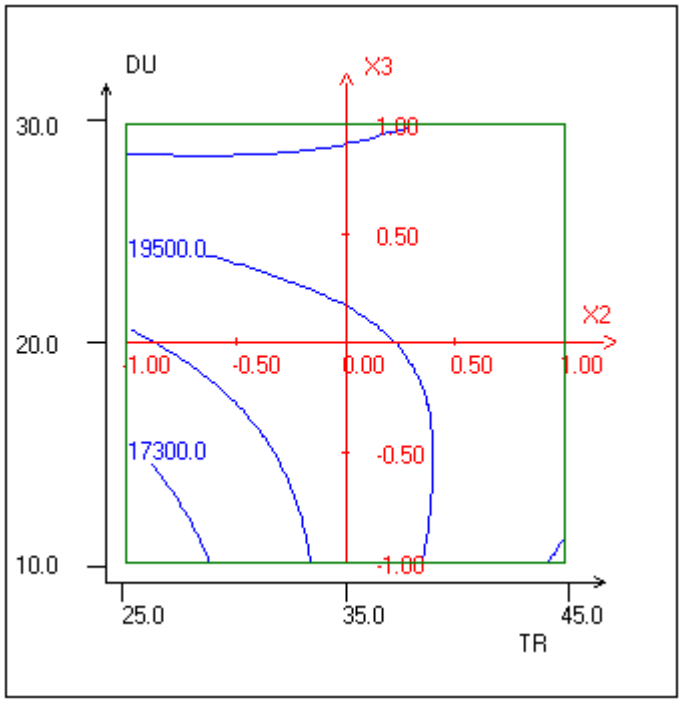


Figure 2: Effet de la durée (DU) de la température (TR) sur la réponse du linalool à pH 6,75



Pour le mélange 1, les réponses de l' α-terpinène et du β-ocimène n'ont pas significativement été modifiées par les facteurs expérimentaux (tableau 3). Le modèle

explique une part très faible de leur variabilité. Le pic de 4-terpinéol est mieux modélisé, avec un effet quadratique significatif du pH (la réponse maximale au pH neutre), une influence curvilinéaire significative de la température et une interaction entre les deux variables (tableau 3 et figure 3). La durée d'exposition n'a pas beaucoup d'influence sur cette réponse.

L'action bénéfique d'un pH neutre sur la performance de la SPME a donc été clairement été établie pour 4 molécules, mais cet effet ne peut être clairement relié à une de leurs propriétés structurelles, il semble que l'action du pH est en relation avec la solubilité des terpènes dans la matrice. L'action de la température sur la SPME est un compromis entre l'augmentation avec la température de la volatilisation des composés dans l'espace de tête et la baisse de la capacité d'absorption par la fibre, aboutissant à des déplacements inverses des équilibres échantillon /phase gazeuse et phase gazeuse /fibre. La durée d'exposition agit par le biais du temps d'équilibration des terpènes entre l'échantillon et la fibre.

La recherche d'une combinaison optimale des variables de l'étape d'extraction pour le mélange 2, conduite par maximisation d'une fonction désirabilité, a abouti à définir deux zones favorables 1) pH de 6,80, température de 25°C, durée de 24 min 40 sec ; 2) pH de 6,75, température de 45°C, durée de 18 min 40 sec. La deuxième combinaison, moins favorable selon le seul critère de la surface des pics, a été néanmoins été retenue, parce qu'elle présente des avantages pratiques (durée proche des temps d'analyse par CPG, température permettant de travailler en salle non climatisée) tout en étant adaptée aussi au traitement du mélange 1, comme le montre la figure 3.

Linéarité et répétabilité à l'optimum

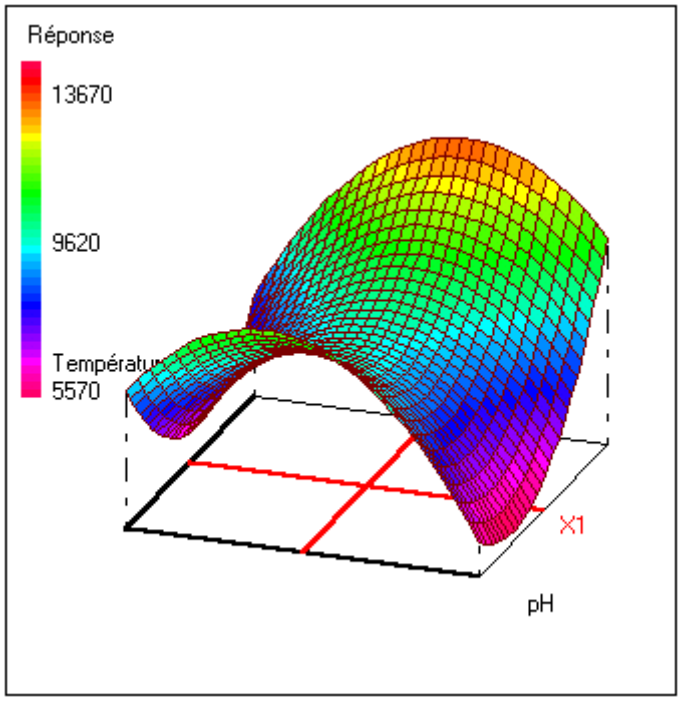
Des essais préliminaires sur la répétabilité de la méthode ont montré qu'il faut réduire le volume d'échantillon de milieu fermentaire de 1 ml à 0,5 ml, sans changer le rapport espace de tête / volume du flacon, ce qui est appliqué aux analyses suivantes. Avec ce passage nous avons obtenu une répétabilité plus satisfaisante peut-être grâce à une homogénéisation encore plus de la matrice. L'extraction par SPME a donc été faite en mélangeant 0,5 ml de milieu fermentaire et 5,5 de solution tampon phosphate 0,3 M à pH 6,75 et de force ionique 4,5 M dans un flacon SPME scellé et agité pendant 10 sec. L'exposition de la fibre a été faite à la température de 45°C, pendant 18 min 40 sec. Immédiatement après, la désorption et l'analyse chromatographique ont été conduites comme décrit précédemment.

Tableau 3: Optimisation de la SPME, résultats des régressions linéaires

	Mélange 2			Mélange 1			
	α-phéllandrène	limonène	linalool	α-terpinène	(Z)-β-ocimène	(E)-β-ocimène	4-terpinénol
R^2 ajusté	0,92	0,94	0,70	0,18	0,32	0,30	0,85
E.T.R.	320	332	1654	2934	407	1020	903
Paramètres							
constante	12214	18925	19315	9506	1834	4989	9257
P	-49	-210	663	741	96	244	-2
T	-1687 ***	-2574 ***	860	-614	-36	-119	933 *
D	-667 **	-760 **	1007	-460	-68	-77	604
P^2	-3489 ***	-5355 ***	-4827 **	1236	70	51	-3400 *
T^2	1140 *	2000 **	-225	1353	322	761	2420 *
D^2	-3443 ***	-5066 ***	446	20	-10	-23	1360
P x T	925 **	1583 **	-158	467	85	311	1402 *
P x D	1088 **	1513 **	812	-1494	-184	-487	856
T x D	-39	-223	-1340	-2549	-427	-1047	612

(N=13, signification du test H=0, * : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

Figure 3: Effet du pH et de la température sur la réponse du 4-terpinéol à une durée de 20 minutes



Pour les mélanges 1 et 2, quatre répétitions ont été faites aux concentrations 55,6 ppb, 278 ppb et 556 ppb. La concentration 278 ppb correspond aux quantités de terpènes présentes dans une incubation au temps zéro dans les études in vitro suivantes (EXP1) et dans les nouvelles conditions de dilution. En ce qui concerne la linéarité, pour tous les composés, l'ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage n'a pas été significativement différente de zéro (P>0,27 à P>0,82 selon les terpènes) et les R^2 ajustés compris entre 98 et 94% (tatbleau 4). Il a été observé une répétabilité élevée aux faibles concentrations. Cependant, pour les terpènes les plus volatils, elle se dégradait lorsque les concentrations augmentaient.

Tableau 4: Linéarité et répétabilité de la SPME des terpènes testés

Terpène	Répétabilité (n=4)		Linéarité
	C.V. concentration basse (55.6 ppb)	C.V. concentration haute (555.6 ppb)	R_2 ajusté
α-terpinène	4.2	10	0.95
β-ocimène E	4.9	10.5	0.95
β-ocimène Z	3.4	10.6	0.96
4-terpinéol	3.6	2.8	0.99
α-phellandrène	8.1	13.4	0.94
limonène	7.8	12.6	0.95
linalool	4.9	4.9	0.97

Effet de la matrice sur les taux de récupération des terpènes

L'effet de la matrice sur les quantités de monoterpènes extraites par SPME a été estimé en comparant les aires de pics mesurées après extraction de la même surcharge de terpène dans des échantillons de 8 matrices différentes. Ces matrices étaient la solution tampon et nutritive utilisée pour les incubations (ST), la fraction liquide du milieu fermentaire obtenue par centrifugation à 15.000 g pendant 20' et récupération du surnageant (SN), les milieux fermentaires après incubation de 24 (C-24h), 6 (C-6h) ou 3 h (C-3h) avec un inoculum adapté à un régime riche en parois végétales; ou un inoculum adapté un régime riche en amidon (A24h, A6h, A3h). Les incubations ont été réalisées selon la procédure décrite dans la partie 3.3.3. (Article 5).

Les terpènes modèles avaient des structures variées, linéaires, (E)- et (Z)-β-ocimène, monocycliques (α-phellandrène et α-terpinène) et bicycliques (α- et β-pinène et sabinène). La

même procédure que ci-dessus a été suivie pour l'analyse par SPME-GC. Les surcharges étaient faites par ajout de 5µL d'une solution éthanolique de terpènes, individuellement à la concentration de 25 ppm. Pour chaque matrice, la surcharge était quantifiée en double, soit un total de 16 valeurs par terpène. Les données, aires de pics exprimées relativement au résultat moyen dans la matrice ST, ont été soumises à une analyse de variance à un facteur, la matrice. Les taux de récupération relatifs étaient comparés à l'aide d'un test de Tukey.

Tableau 5: Effet des matrices fermentaires sur les taux de récupération par SPME de 8 monoterpenes, exprimés relativement aux aires de pics mesurées en solution tampon.

Terpene	Matrices[1]								SEM
	ST	SN	C-24h	C-6h	C-3h	A-24h	A-6h	A-3h	(N=2)
(E)-β-ocimene	1.00^{a}	0.99^{a}	0.59^{b}	0.62^{b}	0.66^{b}	0.65^{b}	0.76^{ab}	0.51^{b}	0.056
(Z)-β-ocimene	1.00^{a}	0.98^{ab}	0.61^{c}	0.63^{c}	0.66^{bc}	0.67^{abc}	0.72^{abc}	0.52^{c}	0.060
α-phellandrene	1.00^{ab}	1.21^{a}	0.67^{bcd}	0.78^{abcd}	0.71^{bcd}	0.95^{abc}	0.53^{cd}	0.43^{d}	0.079
(-)-α-pinene	1.00^{a}	0.93^{ab}	0.67^{bc}	0.71^{abc}	0.69^{abc}	0.73^{abc}	0.81^{ab}	0.48^{c}	0.055
(+)-α-pinene	1.00	1.04	0.70	0.64	0.69	0.96	0.77	0.60	0.095
(-)-β-pinene	1.00^{a}	0.95^{ab}	0.66^{c}	0.65^{c}	0.67^{c}	0.76^{abc}	0.70^{bc}	0.52^{c}	0.048
sabinene	1.00^{ab}	1.17^{a}	0.71^{b}	0.67^{b}	0.65^{b}	0.90^{ab}	0.79^{b}	0.64^{b}	0.067
α-terpinene	1.00	0.92	0.77	0.82	0.70	0.80	0.77	0.79	0.090

[1]: ST : solution tampon; SN: surnageant de milieu fermentaire ; C-24h, C-6h and C-3h : milieux fermentaires après incubation de 24, 6 ou 3 h avec un inoculum adapté un régime riche en parois végétales; A-24h, A-6h and A-3h : milieux fermentaires après incubation de 24, 6 ou 3 h avec un inoculum adapté un régime riche en amidon. Les valeurs dans une même ligne avec des indices différents différent significativement (test de Tukey, $P<0.05$).

Les résultats sont présentés dans le tableau 4. Quel que soit le terpène, l'effet «matrice» sur les analyses SPME-GC est très net à l'exception de α-terpinène et (+)-α-pinène . Le taux de récupération est diminué dès que la matrice contient une phase particulaire. Lorsque l'on considère l'effet du temps d'incubation, la nature de l'inoculum est à prendre en compte. Avec l'inoculum adapté à un régime riche en parois végétales, il n'y pas de différence significative entre les trois temps d'incubation. Au contraire, avec l'inoculum adapté au régime riche en amidon, le milieu d'incubation après 3 h tend à diminuer le taux de récupération plus qu'aux durées de 6 et 24 h. La conclusion principale de cet essai est que les études futures portant sur la cinétique de dégradation des terpènes, avec des incubations de durée variable, et sur l'influence comparée des fractions bactériennes, du milieu

extracellulaire et des conditions physico-chimiques sur la disparition des terpènes dans le rumen, devront estimer les taux de récupération dans chacune des matrices étudiées par la méthode des surcharges et corriger pour leurs variations entre matrices avant toute comparaison.

3.2.1.4. Conclusion

L'étude du métabolisme des terpènes de plantes méditerranéennes par les bactéries du rumen caprin nécessitait de tester l'analyse quantitative de ces molécules dans les milieux fermentaires à des concentrations vraisemblables d'un point de vue physiologique.

La technique d'extraction SPME a pu être appliquée avec succès et offre une alternative réaliste à la méthode plus classique appliquant une technique d'extraction liquide-liquide sur des incubations de terpènes à concentration élevée. Dans notre cas, elle a permis une réduction d'un facteur 150 des concentrations en terpènes des tubes de culture par rapport à la méthode liquide-liquide grâce à sa basse limite de détection. Par conséquent, elle offre la possibilité de les tester par groupe, sans craindre d'effet interaction entre les terpènes soit au niveau d'absorption à la fibre soit leurs effets inhibiteur sur les microorganismes.

3.2.2. Optimisation de la SPME dans le sang (Article 2)

Malecky, M., Broudiscou, A., Sauvant, D., Broudiscou, P.L., 2007. Multivariate optimisation of head-space solid phase micro-extraction for the analysis of monoterpenes in the blood of dairy goats, *Submitted to Journal of chromatography A*

Abstract

In order to follow the metabolic fate of α-pinene, β-pinene, p-cymene and linalool, four monoterpenes characteristic of the spring diet of dairy goats in the Basilicata region (Southern Italy), we optimised an analytical method based on headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) from blood on a 100 µm polydimethylsiloxane coated fiber and gas chromatographic separation. Using a 13-run Hoke D6 design, of high D-efficiency and G-efficiency, we investigated the effects of sample ionic strength, exposure time and temperature on terpenes recovery yields. The response surfaces provided by the second order polynomial models fit to terpene peak areas were explored by means of a Derringer's desirability function in order to find overall optimum extraction conditions. The extraction parameters leading to the best response were an exposure temperature of 35°C, an exposure time of 22 min and a sodium chloride concentration of 250 g/L. A second experiment assessed the reliability of the method in the quantitative analysis of the four compounds in blood using the limonene as internal standard. Linearities, intra-assay precisions and quantification limits were determined for all terpenes.

Keywords: Optimization ; Headspace solid-phase micro-extraction ; Hoke D6 design ; Monoterpenes ; Caprine blood

3.2.2.1. Introduction

In the northern Mediterranean basin, milking goats are kept from spring to autumn on perennial pastures of high botanical diversity. There, they usually graze plants of the class Magnolopsida characterized by high contents in essential oils, as observed in the Basilicata region (Southern Italy) (Fedele et al., 2005a). The partial transfer of mono- and sesquiterpenes of plant origin or of their derivatives to milk is thought to affect microbial proteolysis in

cheese and therefore modify the development of its flavour (Buchin et al., 2003; Fedele et al., 2004; Fedele et al., 2005b; Morand-Fehr et al., 2007). In this context, the metabolic fate of these compounds in ruminants is still a matter of speculation while it plays a key role in their differential transfer to dairy products. Significant variations in terpene contents between the diet and final animal products may indeed occur as ingested terpenes transit through several anatomical compartments of high metabolic activity, in particular the rumen and the liver. As a preliminary study to a research program on α-pinene, β-pinene, p-cymene and linalool metabolism in dairy goats, a quantitative method had to be developed for the analysis of these monoterpenes characteristic of spring diets in caprine whole blood.

Only a small number of methods have been described for the extraction of low-molecular-weight terpenes from blood. Conventional solid phase extraction (SPE) has been successfully applied to follow the kinetics of sagebrush (*Artemisia tridentata*) terpenes in the serum of lambs (Kimball et al., 2004). A recent development of SPE, solid phase microextraction (SPME) was chosen to measure 1,8-cineole concentrations in blood from the common brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) fed on Eucalyptus leaves (Boyle et al., 2002). SPME, initially developed at the University of Waterloo (Ontario) (Arthur and Pawliszyn, 1990), has been widely used to identify and eventually quantify mono- and sesquiterpenes in plant samples (Rohloff, 2004; Cornu et al, 2001), herbal extracts (Huie, 2002) and milk (Zeppa et al.,2004). We chose this sample preparation technique among SPE, liquid-liquid extraction or purge-and-trap technique for its simplicity, low cost, fastness and high sensitivity toward terpenes, all these properties being essential to the handling of a large number of samples with low concentrations of terpenoids as expected in our experimental conditions.

Quantitative whole blood sampling with SPME required at first to estimate the effects of the factors potentially active on terpene extraction, even though the setting of several parameters, e.g. the type of silica fiber coating, was already well documented. Several factors being continuous and subjected to interact with one another, the statistical technique best suited to empirically model their influence was Response Surface Methodology (RSM) (Box et al., 1951; Box et al., 1978). We therefore used the sequential approach of RSM: (1) creation of polynomial models relating HS-SPME parameters to α-pinene, β-pinene, p-cymene, and linalool recoveries from caprine blood, (2) validation with an additional experimental dataset, (3) determination of optimum operational conditions by maximizing an overall desirability function (Box et al., 1951). Then, the optimised procedure was evaluated for quantitative analysis, by assessing linearity of the calibration curve and intra-assay

precision for each terpene in the concentration range of interest as well as limits of detection. We focused the study on the effects of three potentially active factors, the temperature, absorption time and ionic strength of the sample during the extraction step. Headspace extraction was selected because it was supposed to be cleaner than immersion sampling and thus extend the lifetime of the fiber.

3.2.2.2. Experimental

Materials:

Linalool [CAS 78-70-6], β-pinene [CAS 127-91-3], limonene [CAS 7705-14-8] and p-cymene [CAS 99-87-6] were supplied by Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany) and α-pinene [CAS 7785-26-4] by Interchim (Montluçon, France). Their purity was above 95%. Ethanol, of ACS reagent grade, was purchased from Carlo Erba (Modano, italy). Sodium Chloride and potassium hydrogen phosphate were purchased from Acros (Belgium) and were of analytical grade. Blood samples of 8 ml were collected into heparinated tubes by accredited personnel from dairy goats housed in the laboratory husbandry, and they were stored at -20°C until used as biological matrix for HS-SPME. Animal care and use procedures were approved by the French Ministry of Agriculture in agreement with French regulations for animal experimentation (guideline 19/04/1988). The SPME holder for manual sampling, 100 mμ polydimethylsiloxane (PDMS) SPME fiber assemblies and splitless inlet liners, were obtained from Supelco (Bellefonte, USA). The 10-mL crimp top wide mouth vials with silicon-Teflon septa used for HS-SPME were purchased from Grace Davison Alltech S.A. (Templemars, France).

GC operating conditions:

SPME Fibers were periodically (each day, before first injection) conditioned for at least 1 h at 250°C in the GC injector. The volatile components were separated in a 25-m DB-1 capillary column (0.32 mm internal diameter, film thickness of 0.25 μm, Chrompack), on a GC-FID Varian 3400 (Varian) with an injection port fitted with a splitless glass inlet liner adapted to SPME. Injector and detector temperatures were 250°C and 300°C respectively. The oven temperature, initially at 50°C for 2 min, increased to 100°C at 5°C min^{-1} then up to 250°C at 40°C min^{-1} and the final temperature was held for 2 min. The carrier gas was Helium N55 at a linear velocity of 1 mL min^{-1}.

Experiment A : Multifactorial optimisation of HS-SPME

Consistent and linear analytical results can be expected from HS-SPME once the parameters known to determine its efficiency have been adjusted at absorption as well as desorption steps, if not the varabilitie from theses parameters will reduce the reproducibility of extraction. We optimised the latter step only by simple one-factor-at-a-time tests ending with an exposition depth set at 30 mm and a desorption time in the injector of 3 minutes. Improving the absorption step in the extraction vial motivated a deeper investigation of the influence of key operational parameters through chemometrics. Some operational conditions, such as the nature and thickness of the fiber coating, the vial and headspace volumes, could be univocally deduced from literature in relation with the biochemical characteristics of our samples and of our analytes of interest. We focused our attention on three factors commonly marked as crucial in maximizing recovery yields of analytes: 1) the absorption temperature within a range of 25 to 45°C, 2) the absorption duration within a range of 10 to 30 min, 3) the ionic strength of the medium, controlled with NaCl concentration varying from 0 to 250 g/L. The way these factors affect the behaviour of SPME sampling led us to postulate that full second order polynomials may be used to model their effect on terpene recovery yields. We selected a Hoke D6 design of 13 distinct experiments (Hoke, 1974), to explore the cubic domain defined by the three experimental factors. Two centre replicated points were added to estimate the variability of the experimental results (Table 1). The multiple linear regressions were performed using the coded variables reflected in table 1. An experimental factor F, varying from F_{min} to F_{max}, was related to its coded variable C according to the following equation:

$$C = (2.F - F_{min} - F_{max}) / (F_{max} - F_{min}) \quad (1)$$

Therefore, all coded variables varied from –1 to +1. Data were fitted, in accordance to the experimental design, to the following full second-order polynomial model:

$$Y = b_0 + b_1.T + b_2.D + b_3.S + b_{11}.T^2 + b_{22}.D^2 + b_{33}S^2 + b_{12}.T.D + b_{13}.T.S + b_{23}.D.S \quad (2)$$

where Y was the peak area, T, D and S the three coded variables, and b_0, b_1, b_2, b_3, b_{11}, b_{22}, b_{33}, b_{12}, b_{13} and b_{23} the 10 regression weights to be estimated.

Four additional runs were carried out to validate the polynomial models (Table 1). These test runs were not located in the experimental domain at random but at points distant from experimental runs and characterized by a high accuracy in the prediction of response variables owing to low variance function values.

A stock mixture of terpenes was prepared in ethanol at the following concentrations:

linalool 1.352 mol/L, p-cymene 1.098 mol/L, α-pinene 0.478 mol/L and β-pinene 66 mmol/L. The resulting molar proportions were similar to those observed in the diet of goats grazing on Basilicata rangelands in spring (Fedele et al., 2005a). Prior to use, glass vials and Silicon-Teflon septa were placed at 80°C for 24 H and SPME fibers were kept in the GC injection port at 250°C for at least 1 H in order to eliminate eventual impurities. Each HS-SPME was implemented as follows. A working solution of terpenes was obtained by diluting the stock mixture with ethanol in a proportion of 1/1000 (vol/vol). The blood sample used as a matrix was thawed at ambient temperature and kept at +4°C. 2 mL of blood and 1.995 mL of pH 7.0, 0.1M phosphate buffer at the NaCl concentration set by the experimental design were pipetted into an extraction vial. Then, 5 µL of terpene working solution was added. The extraction vial was immediately capped, vortexed for 10 sec and heated in an aluminum bloc at the temperature set by the experimental design. The SPME fiber was exposed in the vial head-space for the time set by the experimental design and was then subjected to desorption in the GC injection port. The concentrations in the final volume of 4 ml were 260.6, 182.0, 81.5 and 11.3 ng/mL for linalool, p-cymene, α-pinene and β-pinene.

Quadratic response surfaces were fitted to data by least-squares regression and an optimisation was subsequently conducted using with NemrodW software (Mathieu et al., 2000). When calculating the overall desirability, defined as the geometric means of individual desirability functions (Derringer and Suich, 1980), we weighed individual desirability functions proportionally to the corresponding adjusted R^2 so as to increase the influence of best modeled responses in the determination of the overall optimum.

Experiment B: Validation of the optimised method

The validation of the analytical procedure was carried out according to the International Conference on Harmonisation (ICH) guideline Q2(R1). Because of the high matrix complexity of blood samples, we investigated the necessity of an internal standard, limonene which was well resolved in our chromatographic conditions, for quantification of our analytes. The working solution of limonene (100 mg/L) was prepared in ethanol. Calibration solutions were prepared by diluting the terpene stock solution in ethanol at 4 levels (1/15000, 1/10000, 1/5000, 1/1000). SPME was performed at the optimized set of conditions resulting from experiment 1, on a mixture of 5 µL of standard solution, 5 µL of limonene solution, 2 mL of blood and 1.99 mL of buffer solution. The calibration curves were determined by the analysis of the 4 calibration solutions in triplicate, at the final concentrations of 5.4-81.5 µg/L

for α-pinene, 0.75-11.2 µg/L for β-pinene, 12.1-184.2 µg/L for p-cymene and 17.4-260.7 µg/L for linalool. We used the limonene as an internal standard to correct daily variations by repeating the calibration procedure at an interval of 1 fortnight and by fitting both analyte peak areas and analyte/limonene peak area ratios to the following linear regression model.

$$Y = b_0 + b_1.C + b_2.D + b_{11}.C^2 \quad (3)$$

where Y was the peak area or the peak area ratio, b_i coefficients, $_C$ the analyte concentration (coded between –1 and +1 within the calibration range), D the day of analysis (coded as +1 or –1) and b_0, b_1, b_2, and b_{11} the 4 regression weights linked to main and quadratic effects. It is always necessary to code factor values to enable the direct comparison of regression weights among themselves. Models were fitted to data by least-squares regression using a SAS routine (SAS, 1990).

Since then, quantification was performed using the internal standard method. In the absence of authentic samples, the intra-assay precision of the analytical procedure was investigated using homogenous mixtures of 2 mL of caprine blood and 5 µL of terpene stock solution diluted in ethanol at two levels (high: 1/10 and low: 1/5000). For each level, the precision was expressed as the relative standard deviation of a series of measurements on five independent samples. The limit of detection (LOD) was calculated for each analyte according to the following expression:

$$LOD = (3.Sy - a)/b \quad (4)$$

where Sy is the standard error of estimate from calibration, a the intercept and b the slope of the calibration equation. The recovery yield was estimated for each analyte from the external calibration curves of standards with 4 levels measured in triplicate.

3.2.2.3. Results

Multivariate optimisation

Gas chromatographic results are in table 1. Checking the adjustment of polynomial models to each observation by the examination of Studentised deviance residuals raised a problem: the residuals attached to run 2 were 2.4, 2.2 and 2.0 for α-pinene, β–pinene and p-cymene, slightly above the commonly accepted limit of 2.0. However the experimental design resulting from the suppression of run 2 from our dataset still allowed a satisfactory estimation of all effects (maximum inflation factor of 1.96). Furthermore, this modified design enabled a correct prediction of the responses, since the variance function remained lower than 1 within

the whole experimental domain excepted in the immediate vicinity of the point [T=1, D=1, S=1] where it reached the maximum of 1.42. Multiple linear regressions were thus performed without taking into account the observations of run 2.

Table 1: Natural and coded variables, levels, design responses

Natural variable	Coded variable	Levels (low, medium, high)		
Temperature (°C)	T	25	35	45
Extraction time (min)	D	5	15	25
Salt concentration (g/l)	S	0	125	250

	Coded levels			Responses (arbitrary area units)			
Run	T	D	S	α-pinene	β-pinene	p-cymene	linalool
1	-1	-1	-1	7162	812	4422	1257
2	-1	0	0	8092	1110	11103	3263
3	0	-1	0	5967	794	5465	2011
4	0	0	-1	5063	850	11700	4410
5	1	-1	-1	3865	585	7081	2266
6	-1	1	-1	4125	790	12696	3473
7	-1	-1	1	5476	919	6502	1508
8	1	1	-1	3752	689	13742	5702
9	1	-1	1	3318	514	5266	2803
10	-1	1	1	5219	702	9942	4561
11	1	1	0	3100	509	9096	5797
12	1	0	1	3994	753	11324	5099
13	0	1	1	4142	718	11028	5866
14	0	0	0	5256	769	9082	5122
15	0	0	0	4542	670	8073	4758
Test runs							
16	-0.41	-0.24	-0.17	3490	461	7419	3566
17	0.41	-0.24	-0.17	5034	705	8682	4844
18	0	0.47	-0.17	3422	525	8289	5394
19	0	0	0.5	4302	599	8172	4631

The results of regression analysis are in table 2. Linalool and p-cymene were best modeled, with significance reaching 0.027 and 0.0016. Since many interaction terms were negligible, investigating the shapes of response surfaces was straightforward and did not require the use of canonical analysis. The experimental factors acted differently on terpene extraction yields. The SPME of α- and β-pinene were mostly favored by low temperatures

and, to a lesser extent, by short extraction times in a linear way. The model fitted to p-cymene data was characterized by significant curvilinear effect of extraction time and quadratic effect of salting. This led to a Saddle-surface response as shown by figure 1 where temperature was set at 35°C. Peak areas of p-cymene were lowered by intermediate NaCl concentrations and short extraction times. For linalool, all main effects and the quadratic effect of extraction time were significant. As illustrated by figure 2 where NaCl concentration was set at 250 g/L, the corresponding response surface was shaped like a hill with largest linalool peaks resulting from relatively short extraction times and high temperatures.

Table 2: Effect of extraction duration and temperature and sample ionic strength on the peak areas of α- pinene, β-pinene, p-cymene and linalool (arbitrary surface units).

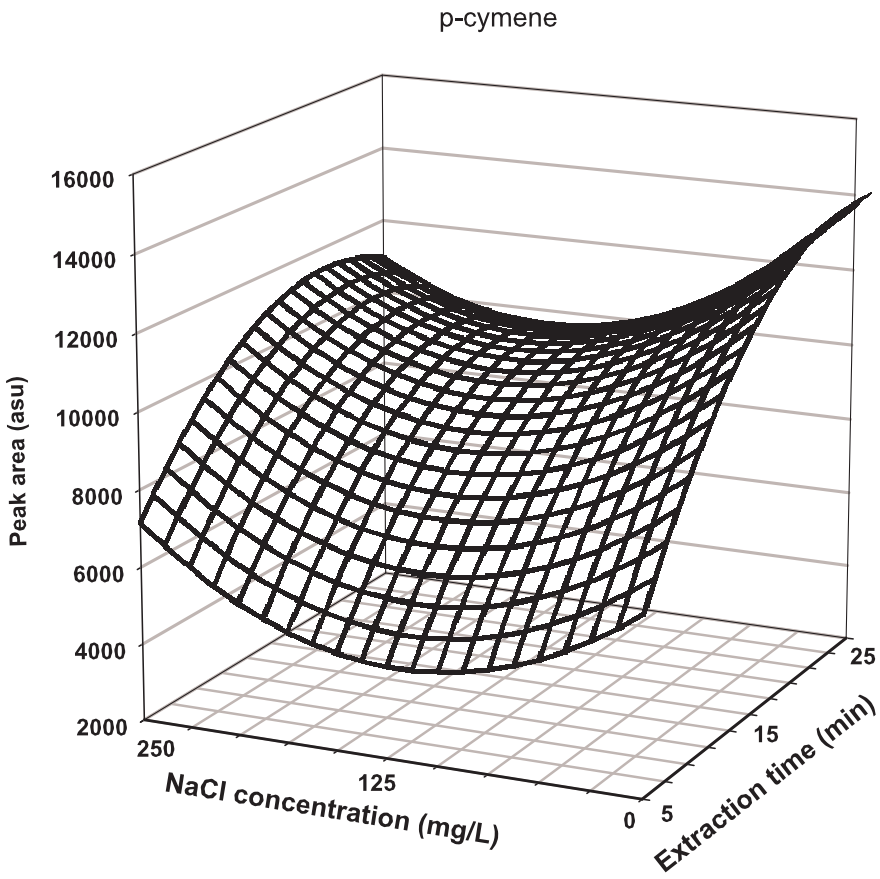
	α-pinene	β-pinene	p-cymene	linalool
Analysis of variance				
Pr > F Model	0.13	0.25	0.027	0.0016
Pr > F Lack of fit	0.45	0.48	0.38	0.50
Adjusted R^2	0.61	0.43	0.84	0.96
RSD	693	90.5	1178	318
Term	Regression weights (Pr > F)			
Intercept	4999	755	8973	4764
T	-927.(0.019)	-98.(0.038)	429. (0.36)	740. (0.003)
D	-541.(0.07)	-23.(0.48)	2731. (0.002)	1549. (0.0001)
S	-141.(0.56)	-7. (0.81)	-574. (0.20)	292. (0.045)
T^2	-231.(0.69)	-75. (0.35)	-810. (0.43)	-442. (0.15)
D^2	-188.(0.73)	-76. (0.31)	-1862. (0.097)	-930. (0.016)
S^2	-12.(0.98)	104. (0.19)	2519. (0.043)	47. (0.85)
T x D	403.(019)	49. (0.22)	-71. (0.88)	194. (0.18)
T x S	42.(0.88)	-13. (0.73)	-460. (0.36)	-60. (0.64)
D x S	376.(022)	-29. (0.44)	-831. (0.13)	112. (0.40)

RSD: residual standard deviation. Pr > F: significance probability value for the Fisher's test null hypothesis.
Terms: see Materials and methods for symbols.

The results of test runs led us to validate all the models since all residuals but one -

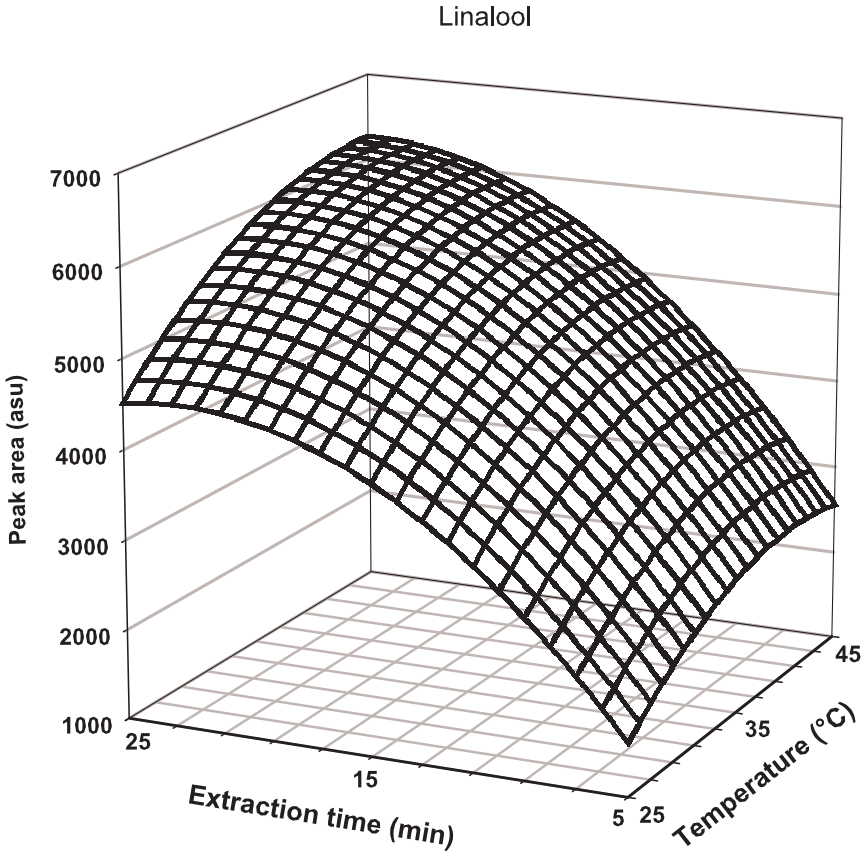
associated to β-pinene in run 16 and presenting a P value of 0.038 - were not significantly different from null (P>0.05). Such an occurrence was in fact highly probable (figures 1 and 2).

Figure 1: p-cymene peak area as a function of extraction time and sample NaCl concentration, at a sample temperature of 35°C.



When implementing the desirability technique, we aimed at maximizing the four terpene peak areas. One-sided transformations generated individual desirability scales varying linearly from 0 to +1 when analyte peak areas varied from completely undesirable to totally desired values, set at 3100 and 5600 asu for α-pinene, 460 and 790 asu for β-pinene, 4400 and 9100 asu for p-cymene and 1300 and 5900 asu for linalool. The overall desirability reached 0.98. The selected optimum conditions were an extraction temperature of 35°C, an extraction time of 22 min. and a NaCl concentration of 250 g/l in buffer. This set of optimized parameters can easily be located on the two response surfaces in figures 1 and 2.

Figure 2: Linalool peak area as a function of extraction time and temperature, at a NaCl concentration of 250 g/L.



Validation of the method

At first, we had to estimate how beneficial it was to add limonene as internal standard since this step complicates the method of quantification. The comparison with the straightforward peak area method was clearly in favour of the IS method (table 3,4). Both quantification methods revealed a good linearity, with no significant quadratic effect for any terpene, and acceptable Pearson's regression coefficients. Nevertheless, basing quantification on analyte:limonene peak ratio led to negligible effects of day on intercept values and to strikingly non significant lack-of-fit tests. The lacks of fit observed with the peak area method were due to an additional effect of day on calibration slopes since they were suppressed by inclusion of a day x concentration interaction term into linear regression models. The statistical properties of calibration coefficients confirmed the adequacy of the IS quantification method. For all analytes, calibration slopes were estimated with satisfactory

standard deviations. Intercepts were non significantly different from null, except for β-pinene. Intra-essay precisions, limits of detection, and recovery yields are in table 5. The method showed relatively low detection limit for these compounds compared with other extraction methods such as liquid-liquid extraction. The recovery percentages as an index from the volatility of terpenes, recorded in blood were within the values reported in the literature (Kimball et al., 2004;.Boyle et al., 2002).

Table 3: External standard calibration method, analysis of variance and significance levels of effects

Analysis of variance	α-pinene	β-pinene	p-cymene	linalool
Source	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F
Regression	0.001	0.001	0.001	0.001
Lack of fit	0.001	0.001	0.001	0.001
Adjusted R^2	0.84	0.83	0.84	0.81
Effect	Pr > |t|	Pr > |t|	Pr > |t|	Pr > |t|
C	0.001	0.001	0.001	0.001
C^2	0.38	0.71	0.62	0.59
D	0.003	0.002	0.001	0.001

Pr > F: significance probability value for the Fisher's test null hypothesis. Pr > |t|: significance probability value for the Student t test null hypothesis.

Table 4: Internal standard calibration method, analysis of variance, significance levels of effects and calibration coefficients.

Analysis of variance	α-pinene	β-pinene	p-cymene	linalool
Source	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F
Regression	0.001	0.001	0.001	0.001
Lack of fit	0.53	0.48	0.27	0.84
Adjusted R^2	0.979	0.968	0.986	0.986
Effect	Pr > |t|	Pr > |t|	Pr > |t|	Pr > |t|
C	0.001	0.001	0.001	0.001
C^2	0.17	0.93	0.84	0.60
D	0.96	0.20	0.07	0.89
Intercept (Pr > |t|)	-2.74 (0.77)	-7.31 (0.001)	12.0 (0.50)	12.3 (0.32)
Slope ±SD	7.64 ±0.23	9.47 ±0.35	7.76 ±0.19	3.77 ±0.09

Pr > F: significance probability value for the Fisher's test null hypothesis. Pr > |t|: significance probability value for the Student t test null hypothesis. SD: standard deviation.

3.2.2.4. Discussion

Simultaneous HS-SPME of several analytes can be regarded as a multivariate system in which effective exploration for optimal configuration requires an appropriate experimental strategy. Though simple to apply, the one-factor-at-a-time approach (Bole et al., 2002; Gaines et al., 1998; Achten et al., 2001) cannot take into account interactions between factors and is likely to misguide the search for optimum conditions. Our data, showing several interactions terms close to significance, offered a post-hoc rationalisation of our multifactorial strategy. The first stage was to identify the continuous factors most likely to modify terpene recovery yields among those described as active during fiber exposure (Supelco, Bulletin 923, 1998). Sample pH was not selected because blood pH in healthy ruminants is tightly regulated between 7.35 and 7.45 (Mathieu et al., 2000). Unlikely, the influences of three factors - sample ionic strength, exposure temperature and time during the absorption stage - needed to be explored as ways to increase terpene extraction from whole blood. The extraction temperature is known to act on two opposite ways on analyte distribution constants and finally on analyte recovery. When temperature increases, analytes dissociate from the sample and reach the head-space more readily but their adsorption on the fiber coating is reduced in relation with a decrease in their coating/headspace distribution coefficients. Time of exposure is, as well, very important to optimise under non-equilibrium extraction conditions. SPME relies, in principle, on an equilibrium partitioning process. However, it has been shown that a sensitive and accurate analysis is made possible with the extraction time kept constant, even though the overall equilibrium of analytes between sample, headspace and fiber coating compartments is not reached (Zhang and Pawliszyn, 1993). Besides, changing the sample ionic strength, e.g. by adding sodium chloride, can reduce the solubility of some analytes and thus increase their extraction efficiency (Supelco, Bulletin 923, 1998).

An experimental design with resolution V was requested to obtain independent estimates of main, quadratic effects and two-factor interactions. We chose the Hoke D6 design because it was positively compared with other classical designs by several key criteria. Within the class of 10- to 13-run designs, it provides a much better precision in the estimation of regression coefficients than other Hoke, 11-run Hartley (Hartley, 1959) and 13-run Box-Behnken (Box and Behnken, 1960) designs, due to lower variance inflation factors and higher D-efficiency. Besides, the precision of the predicted response, estimated with the maximum variance function and G-efficiency criteria, is clearly higher with the Hoke D6 design than with the best 10-run (Box and Draper, 1975), 11-run (Lucas, 1974) and 12-run (Mitchell and

Byne, 1978) designs. At last, a near-saturated design, it requires less experiments (13 vs. 15) than the widely used central-composite design for similar performances. As a result of residuals analysis, we removed one run (#2) from the dataset subjected to linear regression. This decision was made possible by the updating of main evaluation criteria using Nemrod software on the modified design. For instance, we could assess that the new highest variance inflation factor was well under the value of 4 usually taken as the maximum acceptable (Snee, 1973; Hahn et al., 1976).

In the course of the HS-SPME procedure development, samples were prepared with mixtures of the four monoterpenes in the proportions observed in field conditions (Fedele et al., 2005), rather than in equimolar concentrations. In doing so, we aimed at exploring the possible interactions between terpenes in similar conditions as those expected in forthcoming essays, owing to the lack of data on individual terpene *in vivo* disappearance yields, and even though the concentration ranges under study differed markedly between analytes and thus might result in unequal precisions. The responses to extraction parameters differed markedly between terpenes. Opposite to both structural isomers of pinene, the extraction rate of linalool was strongly affected by our experimental factors, well in agreement with the observations of Boyle and colleagues on SPME extraction of linalool and of another alcohol terpene, 1-8 cineole, from possum whole blood (Boyle et al., 2002). These discrepancies are likely to relate to physicochemical properties of our analytes, and in the first place to molecular weights (MW) and boiling points (BP) which both contribute to their volatilities. Both α-pinene and β-pinene, with equal MW of 136 and comparable BP (155°C and 165°C), had practically the same behavior during the extraction stage, and were transferred to fiber coating preferentially at low temperatures and short exposure times. Yet, the recovery yields of p-cymene (with a MW of 134 and a BP of 176°C) and furthermore linalool, characterized by higher MW and BP of 154 and 199°C, responded to variations of our experimental factors in a much complex way. As has been repeatedly pointed out (Cornu et al., 2001; Lord and Pawlyszyn, 2000; DeBruin et al., 1998; Guan et al., 1998; Schafer et al., 1995; Zygmunt and Namiesnik, 2001), setting the extraction temperature is of paramount importance in the process of SPME optimization. An increase of temperature accelerates the dissociation of analytes from the matrix and their transfer to the headspace, but also lowers the fiber coating / headspace distribution coefficients, which may be detrimental to the overall sensitivity by driving the analytes out of the fiber. Within the temperature range of variation tested, our observations suggested that the latter effect prevailed for α and β-pinene, two highly volatile compounds with short equilibration times at low temperature. On the contrary, the drop in

absorption capacity of the fiber was probably limited for p-cymene and linalool, of lower volatility, and the polynomial models accounted for the positive effect of temperature on the release of both compounds. Besides, linalool solubility was changed by an increase of the ionic strength of the blood sample, which further improved its sample / headspace distribution coefficient and led to higher amounts extracted.

Table 5: Intra-assay precisions, relative standard deviation (RSD) at high and low levels, recovery rates and limits of detection (LOD)

Terpene	RSD (%)		Recovery (%)	LOD
	high level	low level	Mean ±SD	(µg/L)
α -pinene	5.88	5.14	44.2 ±4.71	4.02
β -pinene	6.77	14.34	59.4 ±6.13	1.41
p-cymene	10.53	13.77	45.0 ±4.54	5.19
linalool	4.94	7.47	21.4 ±2.56	6.27

Finally, the extraction parameters selected are a sodium chloride concentration of 250 g/L, an exposure temperature of 35°C which can be easily controlled with a precision of ±0.2°C whatever the room temperature, and an exposure time of 22 min which is similar to the GC analysis time so that the sample throughput is maximized at 2 samples per hour. Our exposure stage is almost two-times longer than that observed by Boyle et al. (2002) whereas both exposure temperatures are identical. Therefore, it could be inferred from their report that we conducted the fiber loading in near-equilibrium conditions, with more than 90% of the equilibrium reached. Besides, as illustrated by response surfaces, the selected optimum values are in regions where small changes in factor values should not have a dramatic effect on detector response, thus improving the repeatability and robustness to the HS-SPME procedure. Setting the other factors affecting HS-SPME was readily derived from the technical literature or simple tests. The choice of PDMS fiber was based on the lipophilicity and low molecular weights of terpenes (Chvilickova and Kuban, 2004). Their volatility, from which a short equilibration time between liquid sample, headspace and fiber could be expected (Boyle et al., 2002) and the eventuality of matrix-derived interactions made them more suited for head-space extraction. Blood samples were diluted by an equivalent volume of phosphate solution to lower blood viscosity, as recommended by Guan et al. (1998). The optimisation of desorption conditions was also straightforward as it was well documented (Langenfeld et al., 1996a). The use of an insert with low internal volume, in particular, is

highly recommended to minimise band broadening and get an efficient focusing of analytes at the head of the column.

The internal standard method is recommended, along with the standard addition method, by the SPME device manufacturer in the case of HS-SPME of complex liquid samples when quantitative analysis is requested. However, it was advisable to assess its usefulness since adopting it means complexifying the analytical procedure. As a matter of fact, the determination of terpene concentrations in blood was strikingly more precise with the IS method compared to the external standard method. Our internal standard, limonene, was purposed to account for uncontrolled interactions with blood components and with fiber coatings proportionate to those affecting the sample during the extraction and desorption stages, and therefore to reduce the variability in quantification caused by these disturbances. Its physicochemical properties were to be as near as possible to our four analytes of interest and yet show an acceptable resolution during the chromatographic separation. The use of limonene as internal standard proved to be equally beneficial to the determination of α- and β-pinene, which are bicyclic terpenes, and of linalool, a linear terpene alcohol, in spite of these structural dissimilarities.

Though performed in optimised conditions, the recovery yield of linalool was two-times lower than for other analytes. Besides a lower volatility, this discrepancy may stem from the fact that PDMS phase is apolar and thus shows a lower affinity for polar components than for alkenes. The low spiked terpene recovery yields observed in the present study may also partially be due to interactions with blood components. Similar matrix interferences have been observed in complex environmental samples (Langenfeld et al., 1996b; Potter and Pawliszyn 1994). It further justifies headspace extraction since the partition coefficients of analytes between the fiber coating and biological matrixes could be dramatically reduced by the adsorption of macromolecules (DeBruin et al., 1998; Snow, 2000).

Application

The proposed HS-SPME method allowed fast, simple and sensitive determination of terpenes in goat blood samples, using the conventional equipment available in animal physiology departments. Knowledge of terpene levels simultaneously in blood and duodenum digesta provided a basis for studies of their fractional distribution when these plant compounds leave the rumen. For instance, in a series of experiments currently in progress, linalool is shown to be exclusively present in blood while the three other terpenes are mostly

detected in duodenum digesta.

3.3. Métabolisme de terpènes (In vitro)

3.3.1. Expérimentation 1 (Article 3)

Malecky, M., Albarello, H., Broudiscou, L.P. 2007. IN VITRO rumen bacteria Degradation OF TERPENOIDS ingested by goats foraging on Basilicata rangelands (Southern Italy). *Journal of Chemical Ecology (admitted)*

Abstract

A trial was carried out to estimate the disappearance rates, after 24-h incubation with mixed rumen bacteria from dairy goats, of nine monoterpene hydrocarbons (δ-3-carene, p-cymene, β-myrcene, (E)- and (Z)-β-ocimene, α-phellandrene, α-terpinene, γ-terpinene and α-terpinolene), four oxygenated monoterpenes ((E)- and (Z)-linalool oxide, 4-terpineol, α + γ terpineol) and one sesquiterpene hydrocarbon (β-cedrene). The molecules tested were identified in the plants grazed during spring by small ruminants in the Basilicata region (Southern Italy). All terpenes were tested at 0.5 ml/l. Oxygen-containing compounds were the least degraded, 100 % of (*E*)-linalool oxide, 95% of (*Z*)-linalool oxide, 91% of 4-terpineol and 75% of terpineol remained intact after 24-h incubation. On the opposite end, α-terpinolene concentration in fermentation broth extracts was below quantification limit thus indicating an extensive, if not complete, degradation by rumen bacteria. Only 2% of the initials amounts of α-phellandrene were recovered. The other monoterpenes and β-cedrene were partly degraded, with losses ranging from 67% for δ-3-carene to 90% for (E)-β-ocimene. The corresponding rates of disappearance were comprised between 2.67 and 4.08 µmol /ml inoculum /day.

*Key Words***:** Monoterpenes, sesquiterpenes, rumen bacteria, *in vitro* degradation, Basilicata.

3.3.1.1. Introduction

The dairy goat livestock system in Basilicata (southern Appennine range, Italy) is typical of West-Mediterranean grazing systems as it relies on the use of rangelands of wide botanical diversity associated with a marked seasonality in plant resources (Fedele et al., 2005a). Grazing plants of the class Magnolopsida (formerly dicotyledons), with high contents of essential oils, supplies milk goats with variable amounts of mono- and sesquiterpenes, a major class of plant secondary metabolites derived from isoprene (Richter, 1993). Once ingested, the terpenes or their derivatives are transferred from plant to milk and are thought to affect microbial proteolysis in cheese, therefore modifying the development of its flavor (Buchin et al., 2003). Terpene transfer rates vary with grazing conditions, in possible relation with the nutritional value of grazed herbage (Fedele et al., 2004), but the factors controlling these transfers are not fully identified. Previous research on terpene consumption by ruminants has mostly focused on their effect on feeding preferences (Kronberg et al., 1995; Estell et al., 1998; Estell et al., 2002; Dziba et al., 2006; Mote et al., 2007) or on ruminant digestive physiology (Olson and Kelsey, 1997), and information is needed on the metabolic fate of terpenes in the rumen, in particular on their individual degradation rates.

In the present study, nine monoterpene hydrocarbons (δ-3-carene, p-cymene, β-myrcene, (E)- and (Z)-β-ocimene, α-phellandrene, α-terpinene, γ-terpinene and α-terpinolene), four oxygenated monoterpenes ((E)- and (Z)-linalool oxide, 4-terpineol, α + γ terpineol) and one sesquiterpene hydrocarbon (β-cedrene) were examined on their susceptibility to degradation by the rumen microflora *in vitro*. These molecules were identified as dominant terpenes in the plants grazed by lactating goats during winter and spring in Basilicata (Fedele et al., 2005a). We attempted to estimate the maximum capacity of rumen microflora to degrade these plant terpenes. For this reason, the study was focused on anaerobic bacteria associated with rumen contents, as most of the terpenes tested are poorly soluble in water (Weidenhamer et al., 1993) and are supposed to adsorb on particulate matter, beyond reach of ciliate protozoa and bacteria adherent to the rumen wall, and terpenes were incubated at a high input concentration.

3.3.1.2. Materials and Methods

Incubation Procedure.

Animal care and use procedures were approved by the French Ministry of Agriculture in agreement with French regulations for animal experimentation (guideline 19/04/1988). All terpenes were of chromatographic grade (Roth-Sochiel Sarl, Lauterbourg, France and Extrasynthèse SA, Genay, France). Their characteristics are in Table 1. They were individually tested at the input rate of 0.5 ml/l in 24h-incubations with mixed rumen bacteria (TERP) during three contiguous days. Therefore, initial molar concentrations were similar among monoterpenoids, from 2.64 to 3.27 mmol/l. The lowest value was 2.64 mmol/l for β-cedrene. On each incubation day, 5 culture tubes were inoculated without addition of terpene and used as controls (CTRL). Culture tubes of 70 ml sealed with rubber/PTFE lined screw caps were used for batch incubations. CTRL and TERP tubes were inoculated with defaunated dual flow fermenter contents.

Ten days prior to batch incubations, 1.5 l of rumen contents pooled from 4 goats of Saanen and French-Alpine breeds was anaerobically frozen and stored air-tight at –20°C for 3 days in order to eliminate ciliate protozoa (Jouany and Senaud, 1979; Broudiscou et al., 1994) and maximize bacterial biomass prior to terpene incubations. This technique appeared to be the most appropriate to meet our experimental needs since it does not alter rumen microflora in a permanent way as shown by the lack of difference between untreated and refaunated animals (Jouany et al., 1988) while chemicals or extreme diets can have significant antibacterial action (Eadie and Shand, 1981; Van Nevel and Demeyer, 1981; Ikwuegbu and Sutton, 1982). Rumen contents were then thawed and warmed at 39°C under anaerobic conditions before being introduced into 4 dual flow continuous culture fermenters (working volume of 1.1 l). The dual flow continuous culture fermenters, were run for 9 days at 39°C. They received, at 11:00 and 23:00, 15 g of a pelleted diet (orchardgrass hay 650 g/kg, maize grains 200 g/kg, soya bean meal 150 g/kg). They were continuously infused with a mineral buffer (artificial saliva) solution, whose mineral composition is detailed in (Broudiscou et al., 1999). The artificial saliva contained 0.15 g/l HCl-Cysteine as a reducing agent. The dilution rates of particle and liquid phases were set at 0.03 hr^{-1} and 0.06 hr^{-1}. The absence of protozoa in fermentation media was regularly checked by microscopic observation as described in (Broudiscou et al., 1997)

All compounds were batch incubated on each of three consecutive days (n = 3 independent replicates). Every day of incubation, cellobiose 0.15 mol/l, maltose 0.15 mol/l, tryptone 6.25 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 2.36 g/l and $(NH_4)H_2PO_4$ 8.216 g/l were solubilised in artificial saliva (Broudiscou et al., 1999) at pH 6.8. The resulting nutrient solution met the nutritional requirements of rumen micro-organisms (Durand and Kawashima, 1980; Broudiscou and Jouany, 1995) by providing 0.6 mmole hexoses, 5 mg N and 1.14 mg S per tube. Fresh contents (300 g per fermenter) were anaerobically taken at 11:30 from the 4 dual flow continuous culture fermenters, pooled and filtered through a 250 µm mesh nylon gauze. Each culture tube was then inoculated under CO_2 atmosphere with 2 ml of nutrient solution and 8 ml of microbial inoculum. Terpenes were immediately added and the tubes were tightly sealed with rubber/PTFE lined screw caps, and kept in a stirring water bath (100 rpm, 39°C ± 0.5). After 24 hr of incubation, they were cooled at +4°C for 1 hr in order to condense the terpenes before opening. The fermentation broths resulting from CTRL culture tubes were used as control matrices in the determination of initial terpene contents in culture tubes, in order to correct terpene disappearances rates for the actual recovery rates during liquid-liquid extraction.

Analytical Methods

The tube contents were processed through a three-step liquid-liquid extraction procedure derived from (Rutledge, 1981). Immediately before extraction, terpenes were added to the culture tubes used as controls in identical amounts as in TERP culture tubes. The extraction of known amounts of terpenes from similar matrices was indeed necessary in order for comparisons to be made without bias. Each 10-ml sample was thoroughly mixed with 4 ml dichloromethane/methanol 2/1 (v/v), centrifuged at 2000 x g for 7 min, and the organic phase collected. The extraction step was repeated once with 4 ml dichloromethane/methanol 2/1 (v/v), then with 2 ml dichloromethane. The organic extracts were pooled, washed with 4 ml NaCl-saturated water, dried by filtration through a phase-separation filter paper and the volume adjusted to 10 ml with dichloromethane. The extracts were stored air-tight at –20°C until analysis.

We separated the terpenes using a gas chromatograph Varian GC 3400 CX equipped with a flame ionisation detector, and CP-Sil 5 CB column (25 m length, 0.25 mm internal diameter, 0.25 µm film thickness, Varian SA, Les Ulis, France) with helium N55 as the carrier gas. The oven temperature, initially at 60°C for 1 min., was raised at the rate of

10°C./min up to 160°C then at the rate of 40°C./min up to 200°C, and finally held at 200°C for 1 min. The injector and detector temperatures were set at 200°C and 300°C respectively.

Statistical analyses. Chromatographic results were subjected to analysis of variance using a GLM procedure (Minitab, 1998). The response variables were peak area values, expressed in arbitrary units. The fixed factors were the type of incubation (TERP vs CRTL) and day. We performed mean comparisons using the Fisher's least-significance-difference test.

Table1: The characteristic of tested molecules.

Terpene	Formula	CAS #	MW	Structure	Density ($g\ cm^{-3}$)
δ-3-carene	$C_{10}H_{16}$	13466-78-9	136.24	2 cycles	0.87
β-cedrene	$C_{15}H_{24}$	546-28-1	204.35	3 cycles	0.93
p-cymene	$C_{10}H_{14}$	99-87-6	134.21	1 cycle	0.86
(*E*)-linalool oxide	$C_{10}H_{18}O_2$	34995-77-2	170.24	1 cycle	0.90
(*Z*)-linalool oxide	$C_{10}H_{18}O_2$	5989-33-3	170.24	1 cycle	0.90
β-myrcene	$C_{10}H_{16}$	123-35-3	136.23	linear	0.79
(E)-β-ocimene	$C_{10}H_{16}$	3779-61-1	136.24	linear	0.79
(Z)-β-ocimene	$C_{10}H_{16}$	3338-55-4	136.24	linear	0.79
α-phellandrene	$C_{10}H_{16}$	4221-98-1	136.24	1 cycle	0.85
α-terpinene	$C_{10}H_{16}$	99-86-5	136.24	1 cycle	0.84
γ -terpinene	$C_{10}H_{16}$	99-85-4	136.24	1 cycle	0.84
4-terpineol	$C_{10}H_{18}O$	562-74-3	154.25	1 cycle	0.93
α +γ terpineol	$C_{10}H_{18}O$	98-55-5	154.24	1 cycle	0.93
α-terpinolene	$C_{10}H_{16}$	586-62-9	136.23	1 cycle	0.89

CAS: Chemical number; MW: molecular weight

3.3.1.3. Results

The supply of terpenes in culture tubes at levels as high as 3.27 mmol /ml was required to screen these molecules on their degradabilities by mixed rumen bacteria from dairy goat and approximate the maximal disappearance rates possible in the rumen ecosystem. Our supply rates were within the limits of published *in vitro* essays on rumen microbial fermentation in the presence of terpenes (Rutledge, 1981; Castillejos et al., 2006) and matched the highest experimental conditions reported *in vivo*, 3 g day^{-1} in goats and sheep (Narjisse, 1982), 1 g /kg dry matter ingested by lambs (Estell et al., 2002).

Incubation data are in Table 2. The amounts of individual terpene recovered after 24hr-incubations varied from 0 to 100% of the initial amounts. Oxygen-containing compounds were the least degraded: (*E*)-linalool oxide remained intact while 91%, 95% and 75% of the initial amounts of 4-terpineol, (*Z*)-linalool oxide and α+γ terpineol were recovered at the end of incubation. On the opposite end, α-terpinolene concentration in fermentation broth extracts was below quantification limit thus indicating an extensive, if not complete, degradation by rumen bacteria. Only 2% of the initials amounts of α-phellandrene were recovered. The other monoterpenes and β-cedrene were partly degraded, with losses ranging from 67% for δ-3-carene to 90% for (E)-β-ocimene. The corresponding rates of disappearance were comprised between 2.67 and 4.08 µmol /ml inoculum /day.

3.31.4. Discussion

In Basilicata, the species mostly grazed by dairy goats during spring are *Lolium perenne L.*, *Poa pratensis L.*, *Medicago polymorpha L.*, *Medicago lupulina L.*, *Asperula odorata L.* and *Geranium molle* L. which contribute to the diet by 10, 6, 13, 8, 12 and 8 % respectively (Fedele et al., 2005a), and the plants belonging to the class Magnolopsida (formerly dicotyledons) account for 36.5 % of the biomass ingested. The winter diet is dominated by Graminacea, mostly Lolium perenne L. and Dactylis glomerata L., Magnolopsida contributing to the ingested plants only for 8%. Among the compounds that we tested, p-cymene, α-phellandrene were detected in large amounts in both diets as well as, to a lesser extent, 4-terpineol and α-terpinolene. β-cedrene, α+γ terpineol, linalool oxides are at highest concentrations in the spring diet while δ-3-carene, β-ocimene and α-terpinene were only found in the winter diet. The monoterpenes hydrocarbons and oxygenated monoterpenes

tested exhibited various structures, from linear to bicyclic molecules while the sole sesquiterpene, β-cedrene, was a tricyclic molecule.

Table 2: Analysis of variance of chromatographic results in TERP and CTRL incubations, relative amounts recovered after 24hr-incubations (RAR) and disappearance rates (DR) of individual terpenes (µmol /ml inoculum /day).

Terpene	CTRL (aau)	TERP (aau)	SEM (aau)	P<F Inc	RAR (%)	DR
δ-3-carene	426.2	141.5	50.4	0.057	33.2	2.67
β-cedrene	279.3	62.7	1.4	0.001	22.4	2.21
p-cymene	844.0	204.5	19.1	0.002	24.2	3.04
(*E*)-linalool oxide	326.3	328.7	2.1	0.50	100.7	-0.02
(*Z*)-linalool oxide	357.3	337.5	2.3	0.027	94.5	0.18
β-myrcene	558.5	84.2	14.5	0.002	15.1	3.08
(E)-β-ocimene	394.8	39.3	28.6	0.07	9.9	3.27
(Z)-β-ocimene	182.8	28.3	13.8	0.08	15.5	3.06
α-phellandrene	239.0	5.5	3.9	0.015	2.3	3.81
α-terpinene	156.0	33.0	29.0	0.21	21.2	3.04
γ -terpinene	692.0	115.7	23.8	0.003	16.7	3.21
4-terpineol	846.5	773.3	111.9	0.72	91.3	0.33
α +γ terpineol	508.8	383.2	54.2	0.24	75.3	0.93
α-terpinolene	164.8	0	1.7	0.001	0.0	4.08

Aau: arbitrary area units; SEM standard error of the mean

P<F Inc : significance level of the differences for the factor Incubation (TERP vs CTRL)

Our incubation results are consistent with a previous experiment, where 10 terpenes were incubated at 2 ml/l, a concentration four-time higher than in the present series (Broudiscou et al., 2007). We measured similar rates of disappearance, from 1.42 to 5.24

µmol /ml inoculum /day, for 6 readily degradable terpenes. β-myrcene, in particular, was degraded at a rate of 4.46 µmol /ml inoculum /day. This backs up our hypothesis that terpene input concentrations in the present study were high enough to support maximum terpene disappearance rates. These are therefore acceptable estimates of potential degradation of terpenes in the rumen. Little research has been done on ruminal degradation of terpenes. Incubating *Heracleum sphondylium* with rumen microbes for 12 hours led to the partial degradation of all the monoterpenes and GC-MS analysis suggested that β-myrcene and (*E*)-β-ocimene had been subjected to biohydrogenation (Schlichtherle-Cerny et al., 2004). Most of the time, only indirect evidence of ruminal degradation of terpenes can be deduced, from pharmacokinetic analyses of 1,8 cineole plasma concentration after rumen dosing (Dziba et al., 2006) or from the comparison of dietary and milk terpenes compositions (Viallon et al., 2000; De Feo et al., 2006). For instance, poor correlations have been reported between ocimene and myrcene contents in pasture samples and in the corresponding milk (Bugaud et al., 2001).

The incubation technique was run with protozoa-free inocula because ciliate protoza prey on bacteria, thereby lowering their total number (Jouany et al., 1988). From our observations, we attempted to estimate the maximum capacity of the goat rumen ecosystem to degrade individual terpenes. From the feed input per unit of volume, three times lower in dual outflow fermenters than in the rumen, and the feed constituent degradabilities and biomass synthesis efficiencies that are comparable in both cases, one can approximate that biomass contents in our inoculums were three times lower than in the original rumen fluid. Since the inoculum accounted for 0.8 of the total incubation volume, we can thus extrapolate the maximum disappearance rates of the most degradable terpenes in a 10-litre goat rumen, that is 11, 14, 12, 13, 13 and 17 g /day for δ-3-carene, β-cedrene, p-cymene, β-myrcene, γ-terpinene and α-terpinolene respectively. The values calculated for (E)-β-ocimene, (Z)-β-ocimene, α-phellandrene and α-terpinene were 13, 12, 16 and 12 g /day. Yet, the impact of repeated exposure of rumen microorganisms to terpenes on the bioconversion of the latter is still to be assessed. Properly addressing this issue will require comparing unexposed animals to those kept on Mediterranean rangelands and therefore to carefully adapt the experimental protocol to the local agrometeorological variability and to the subsequent terpene availabilities from the plants consumed.

In conclusion, our observations clearly differentiated the terpenes in terms of rumen microbial degradation *in vitro*. Extrapolated from our results, the rumen microbial ecosystem

appears to have the capacity to degrade large amounts of δ-3-carene, β-cedrene, p-cymene, β-myrcene, β-ocimene, α-phellandrene, α- and γ-terpinene and α-terpinolene. Consequently, dietary terpene profiles are subject to significant changes following rumen digestion.

3.3.2. Expérimentation 1 (Article 4)

Malecky, M., Fedele, V., Broudiscou, L.P. 2008. In vitro degradation by rumen bacteria of seventeen mono- and sesquiterpenes typical of winter and spring diets of goats in Basilitica rangelands (Southern Italy). *Submitted to Journal of the Science of Food and Agriculture*

Abstract

Nine monoterpenes (δ-3-carene, p-cymene, limonene, β-myrcene, (E) and (Z)- β-ocimene, α-phellandrene, α-terpinene, γ-terpinene), seven oxygenated monoterpenoids (1,8-cineole, linalool, (E) and (Z)-linalool oxide, 4-terpineol, α-terpineol, α-terpinolene) and one sesquiterpene (β-cedrene) were investigated on their degradability in the rumen microbial ecosystem. These molecules were identified as dominant terpenes in the winter and spring diets of milking goats in Basilicata (Southern Italy).

All terpenes were tested at 3.33 μL L^{-1} during 24-hr in vitro incubations with mixed rumen bacteria from dairy goats. Except for linalool, which disappeared almost completely, oxygen-containing compounds were the most recovered (89% of (*E*)-linalool oxide, 93% of (*Z*)-linalool oxide, 91% of 1,8-cineol, 82% of α-terpineol and 72% of 4-terpineol). On the contrary, the linear alkenes β-myrcene and β-ocimene almost completely disappeared. Results were more variable among cyclic alkenes, with recovery rates ranging from 50% in the case of limonene to less than 1% for α-phellandrene. 17% of the only sesquiterpene of the group, β-cedrene, was recovered.

Recovery rates differed markedly among terpenes, partly in relation with the presence of oxygen and/or of cycles in the molecule. These observations provide a clue to the cause of changes in terpene composition from diets to milks.

Keywords: Monoterpene, sesquiterpene, rumen, bacteria, degradation, fermenter

3.3.2.1. Introduction

In recent years, sensory properties of dairy products have been at least partly attributed to the nature of forage and moreover to the botanical composition of grasslands (Martin et al., 2005). Assessing this relation is of utmost importance in the case of cheeses with Protected designation of Origin (PDO) or Protected Geographic Indications (PGI), because it helps

reinforce consumers willingness to pay for these certified quality food products. In Europe, PDO/PGI protected regional cheeses provide a substantial part of farmers' incomes in alpine highland swards as well as in Mediterranean rangelands, which hosts 7% of the world caprine livestock and account for a third of the world milk production, 80 % of which being processed into farmhouse traditional cheeses (Jaouen, 1990). From this viewpoint, the dairy goat livestock system in Basilicata (southern Appennine range, Italy) is a good model of West-Mediterranean grazing systems as it exploits natural pastures whose botanical composition is complex and varies markedly with agrometeorological conditions (Fedele et al., 2005a,b). Hence, the winter diet in Basilicata is composed of Graminacea 92%, mostly Lolium perenne L. and Dactylis glomerata L., and Magnolopsida 8%, whose 1% are Fabaceae. In contrast, the spring diet is dominated by a wider botanical diversity. Lolium perenne L., Dactylis glomerata L., Poa pratensis L., Medicago polymorpha L., Medicago lupulina L., Asperula odorata L. and Geranium molle L. contribute to the diet by 10, 8, 6, 13, 8, 12 and 8 % respectively (Fedele et al., 2005a), and the plants belonging to the class Magnolopsida account for 36.5 % of the biomass ingested in spring. Grazing plants of the class Magnolopsida, rich in essential oils, supplies milking goats with mono- and sesquiterpenes, a major class of plant secondary metabolites deriving from isoprene (Richter, 1993). Plant terpenes or their derivatives are transferred in variable amounts from plant to milk and are thought to affect the development of cheese flavour (Buchin et al., 2003) probably through changes in microbial proteolysis taking place during cheese maturing. Research interest on terpene consumption by ruminants has mostly focused on their effect on ruminant digestive physiology (Olson et al., 1997) and on feeding preferences (Estell et al., 1998, 2002; Kronberg et al., 1995; Mote et al., 2007; Dziba et la., 2006) and information on their metabolism in the rumen is scarce, in particular on their individual degradation rates.

The present trial aimed at comparing the degree of disappearance of 17 terpenes and terpenoids typical of winter and spring diets resulting from exposure to mixed rumen bacteria from dairy goats. Each compound was tested at a concentration of 3.33 $\mu L\ L^{-1}$, close to that expected in the rumen of goats grazing Basilicata native pastures (Fedele et al., 2005a). Besides, this concentration was low enough to ensure both their complete solubilisation in fermentation broths (Weidenhamer et al., 1993; Li et al., 1998) and absence of toxic effects on microorganisms (Naigre et al., 1996; Dorman and Deans, 2000; Griffin et al., 1999; McIntosh et al., 2003). The low terpene concentrations which might be expected in incubation broths required the use of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME), (Arthur and Pawliszyn, 1990; Coleman and Lawrence, 2000; Cornu et al., 2001), a recent extraction

method of high sensitivity that proved to be effective in quantitative analysis. Inocula were free of protozoa thanks to a defaunation technique with proven lack of toxicity to bacteria and adapted to continuous culture systems. Some of the results described in this study have been published in abstract form (Malecky et al., 2006).

3.3.2.2. Experimental

Materials:

Nine monoterpenes (δ-3-carene, p-cymene, limonene, β-myrcene, (E) and (Z) β-ocimene, α-phellandrene, α-terpinene, γ-terpinene), seven monoterpenoids (1,8-cineol, linalool, (E) and (Z)-linalool oxide, 4-terpineol, α-terpineol, α-terpinolene) and one sesquiterpene (β-cedrene) were tested. They were of chromatographic grade, except 4-terpineol which was only available at a purity of 95%. δ-3-carene [CAS 13466-78-9], 1,8-cineol [CAS 470-82-6], p-cymene [CAS 99-87-6], linalool [CAS 78-70-6], (+)-limonene [CAS 5989-27-5], (E) and (Z)-linalool oxide [CAS 34995-77-2 and 5989-33-3], α-terpinene [CAS 99-86-5], γ-terpinene [CAS 99-85-4], 4-terpineol [CAS 562-74-3], α-terpineol [CAS 98-55-5], α--terpinolene [CAS 586-62-9] were supplied by Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany). β-cedrene [CAS 546-28-1 β-myrcene [CAS 123-35-3], R-(-)- α-phellandrene [CAS 4221-98-1] were supplied by Extrasynthèse (Genay, France). (E) and (Z)- β-ocimene [CAS 3779-61-1 and 3338-55-4] was supplied by Interchim (Montluçon, France). Their main characteristics are in Table 1.

Ethanol, of ACS reagent grade, was purchased from Carlo Erba (Modano, italy). NaCl $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)H_2PO_4$ and K_2HPO_4 were purchased from Acros (Belgium) and were of analytical grade. Cellobiose and maltose were supplied by Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau Chenes, France), tryptone was purchased from Biokar Diagnostics (Beauvais, France). The SPME holder for manual sampling, 100 mμ polydimethylsiloxane (PDMS) SPME fibre assemblies and splitless inlet liners were obtained from Supelco (Bellefonte, USA).The 10-mL crimp top wide mouth vials with silicon-Teflon septa used for HS-SPME were purchased from Grace Davison Alltech S.A. (Templemars, France).

Incubation Procedure:

Culture tubes of 70 mL sealed with rubber/PTFE lined screw caps were used for batch incubations. During three contiguous days, terpenes were incubated for 24 hours with mixed

rumen bacteria (TERP) in duplicate. They were tested at individual input levels of 3.33 µL L^{-1} that set initial molar concentrations at 15.8 - 19.6 µmol L^{-1} depending on the density and molecular weight of the terpene. As stated before, such low concentrations permitted to regard the toxicity of terpenes on mixed rumen bacteria as negligible and therefore to test them in combinations so as to limit the number of test tubes per batch. As a consequence, we arranged the terpenes into groups according to their ability to be well resolved by capillary gas chromatography on two standard phases DB1- and Carbowax 20M-like, which meant making relative retention indices (Van den Dool and Kratz, 1963), generally called Kovats indices, compatible within each group of terpenes. It followed from this criterion five mixtures of terpenes : 1) limonene + linalool + α-phellandrene, 2) p-cymene + (E) and (Z)-linalool oxide + β-myrcene, 3) (E) and (Z)- β-ocimene + α-terpinene + 4-terpineol, 4) δ-3-carene + α-terpineol + α-terpinolene, 5) β-cedrene + 1,8-cineol + γ-terpinene. Stock solutions were prepared by mixing 50 µL of each terpene. Working solutions of terpenes were obtained by diluting the stock mixtures with ethanol in a proportion of 1/50 (vol/vol). On each incubation day, 5 culture tubes were also inoculated without terpene and used as controls (CTRL).

CTRL and TERP tubes were inoculated with defaunated rumen contents. For this purpose, 10 days prior to batch incubations, 1.5 L of rumen contents pooled from 4 goats of Saanen and French-Alpine breeds was frozen under anaerobic conditions and stored air-tight at –20°C for 3 days in order to eliminate ciliate protozoa (Broudiscou et al., 1994; Jouany and Senaud, 1979). Animal care and use procedures were approved by the French Ministry of Agriculture in agreement with French regulations for animal experimentation (guideline 19/04/1988). Then, rumen contents were anaerobically warmed at 39°C before being introduced into 4 dual flow continuous culture systems. The dual flow continuous culture systems (working volume of 1.1 L) were run for 9 days at 39°C. They were continuously infused with a mineral buffer (artificial saliva) solution, whose mineral composition is detailed by Broudiscou et al.(1999). The artificial saliva contained 0.15 g L^{-1} HCl-Cysteine as a reducing agent. At 11:00 and 23:00, 15 g of a standard pelleted diet (orchard grass hay 650 g kg^{-1}, maize grains 200 g kg^{-1}, soya bean meal 150 g kg^{-1}) was introduced in each culture system. The dilution rates of particle and liquid phases were set at 0.03 hr^{-1} and 0.06 hr^{-1}. The absence of protozoa in fermentation media was regularly checked by microscopic observation as described by Broudiscou et al. (1997). The normal course of fermentation in continuous culture systems was checked by measuring the daily amounts of hexoses fermented and the

fermentation pattern. Whole effluents were purposely sampled for VFA analysis, mixed with 0.25 volume of H_3PO_4 (410 g L^{-1}) and stored at -20°C until analysis.

Table 1: The characteristics of tested molecules

Terpene	Formula	MW	Structure	Density (g cm^{-3})	KI DB1	KI CW-20M
δ-3-carene	$C_{10}H_{16}$	136.24	2 cycles	0.87	1009	1134
β-cedrene	$C_{15}H_{24}$	204.35	3 cycles	0.93	1409	1574
1,8-cineol	$C_{10}H_{18}O$	154.25	2 cycles	0.92	1006	1188
p-cymene	$C_{10}H_{14}$	134.21	1 cycle	0.86	1012	1248
limonene	$C_{10}H_{16}$	136.24	1 cycle	0.84	1020	1188
linalool	$C_{10}H_{18}O$	154.25	linear	0.86	1084	1519
(E)-linalool oxide	$C_{10}H_{18}O_2$	170.25	1 cycle	0.90	1055	1440
(Z)-linalool oxide	$C_{10}H_{18}O_2$	170.25	1 cycle	0.90	1071	1426
β-myrcene	$C_{10}H_{16}$	136.24	linear	0.79	981	1148
(E)-β-ocimene	$C_{10}H_{16}$	136.24	linear	0.79	1038	1234
(Z)-β-ocimene	$C_{10}H_{16}$	136.24	linear	0.79	1026	1205
α-phellandrene	$C_{10}H_{16}$	136.24	1 cycle	0.85	996	1152
α-terpinene	$C_{10}H_{16}$	136.24	1 cycle	0.84	1006	1152
γ-terpinene	$C_{10}H_{16}$	136.24	1 cycle	0.85	1050	1221
4-terpineol	$C_{10}H_{18}O$	154.25	1 cycle	0.93	1161	1554
α terpineol	$C_{10}H_{18}O$	154.25	1 cycle	0.93	1171	1650
α-terpinolene	$C_{10}H_{16}$	136.23	1 cycle	0.89	1077	1268

MW: molecular weight, KI: Kovats indice

Batch incubations were performed as follows. On each day of incubation, cellobiose 0.15 mol L^{-1}, maltose 0.15 mol L^{-1}, tryptone 6.25 g L^{-1}, $(NH_4)_2SO_4$ 2.36 g L^{-1} and $(NH_4)H_2PO_4$ 8.216 g L^{-1} were solubilised in artificial saliva (Broudiscou et al., 1999) at pH 6.8. The resulting nutrient solution met the nutritional requirements of rumen micro-organisms (Durand and Kawashima, 1980 ; Broudiscou and Jouany, 1995). by providing 1.2

mmole hexoses, 5 mg N and 1.14 mg S per tube. Fresh contents (300 g per fermenter) were anaerobically taken at 11:30 from the 4 dual flow continuous culture systems, pooled and filtered through a 250 µm mesh nylon gauze. Each culture tube was then inoculated under CO_2 atmosphere with 2 ml of nutrient solution and 8 ml of microbial inoculum. Five µL of one of the 5 terpene working solutions were immediately added and the tube was tightly sealed with rubber/PTFE lined screw caps, gently stirred and kept in a stirring water bath (100 rpm, 39°C ± 0.5). After 24 hr of incubation, the tubes were cooled at +4°C for 1-hr in order to condensate terpenes before opening and sampling. Two mL samples of fermentation broths were stored at –30°C until analysis. The fermentation broths resulting from CTRL culture tubes were also stored at –30°C until used in the determination of initial terpene contents in culture tubes, in order to account for matrix interferences during HS-SPME in the determination of terpene disappearance yields.

Analytical Methods:

The culture tube contents were processed through a HS-SPME method specifically optimised for the treatment of fermentation media. Prior to use, glass vials and Silicon-Teflon septa were placed at 80°C for 24 hours and SPME fibers were periodically conditioned in the GC injection port at 240°C for at least 1 hour in order to eliminate eventual impurities. The terpenes contents of each TERP culture tube was determined at least in triplicate. The samples of a given terpene mixture were grouped in one analytical batch. The daily number of samples to be processed were thawed at ambient temperature and kept at +4-6°C. Each HS-SPME was implemented as follows. 0.5 mL of sample and 5.5 mL of 0.3M sodium phosphate buffer, adjusted at pH 6.75 and containing 250 g L^{-1} NaCl, were pipetted into an extraction vial. When a CTRL sample was processed, 5µL of the corresponding terpene working solution diluted 20 folds in ethanol were also added in order to determine the control values – four independent determinations - providing estimates of terpene disappearance yields. The extraction vial was capped, vortexed for 10 sec and heated in an aluminum bloc at 45°C. The SPME fiber was exposed in the vial headspace for 18 min 40 s then it was immediately subjected to desorption in the GC injection port at an exposition depth of 30 mm for 3 minutes. The volatile compounds desorbed were separated in a 25-m DB-1 capillary column (0.32 mm internal diameter, film thickness of 0.25 µm, Chrompack), on a GC-FID Varian 3400 (Varian SA, Les Ulis, France) with an injection port fitted with a splitless glass inlet liner adapted to SPME. Injector and detector temperatures were 240°C and 300°C

respectively. The oven temperature, initially at 50°C for 2 min, increased to 100°C at 5°C min^{-1} then up to 250°C at 40°C min^{-1} and the final temperature was held for 2 min. The carrier gas was Helium N55 at a linear velocity of 1 mL min^{-1}. In order to estimate fermentation yields in dual flow continuous culture systems, VFA were determined by capillary GC after derivatization with 2-chloroethyl chloroformate by a method adapted from (Kristensen, 2000). The amount of hexoses theoretically fermented (HF) was calculated from the relation given by (Demeyer and Van Nevel, 1975) relating HF to VFA production yields

$$HF\ (mmol) = (C2 + C3)/2 + C4 + C5 + C6 \quad (1)$$

Where C2, C3, C4, C5 and C6 are acetate, propionate, butyrate, valerate and caproate productions (mmol) respectively.

Statistical analyses:

Chromatographic results were subjected to analysis of variance using a Minitab ANOVA procedure (Minitab, 1998). The response variables were peak area values, expressed as arbitrary area units. A preliminary test consisted in assessing the significance of differences between incubation days in TERP samples. The data set was then subjected to a one-way ANOVA, with Incubation (TERP vs CRTL) as the fixed factor. We performed mean comparisons using Fisher's Least Significant Difference Test. Terpene peak area values were also expressed relative to CTRL values and provided estimations of recovery rates after 24hr incubation with rumen bacteria. Multiple comparisons of these relative amounts recovered (RAR) were performed using a Duncan test ($P \leq 0.05$), so as to test for differences in recovery rates among terpenes.

3.3.2.3. Results

In protozoa-free continuous culture systems, an average of 77.6 mmoles (S.D. = 4.44) of hexoses were fermented every day into 86.1 mmoles of C2 (S.D.= 5.10), 33.9 mmoles of C3 (S.D.= 3.98) and 15.0 mmoles of C4 (S.D.= 2.98), which gave a C2/C3 ratio of 2.75. The corresponding organic matter fermented was 12.71 g d^{-1}.

Chromatographic data are presented in Table 2, along with related ANOVA analyses. We did not use the day of incubation as a block factor, since its effect was far from significance for all terpenes ($P>0.10$). The differences in peak surfaces among terpenes of similar atomic composition may surprise at the first sight but they are to be linked to the

nature of HS-SPME, whose efficiency relies on the partitioning of analytes between the aqueous sample, headspace and apolar fibre coating and then is under the control of both extraction conditions, e.g. duration and temperature, and analyte properties such as hydrophobicity and volatility. The proportions of terpene recovered after 24-hr incubations differed markedly between the compounds tested. Except for limonene recovered at 50%, the amounts of monoterpene alkenes remaining at the end of incubations were very low, in particular α-phellandrene extracted at only 0.34% of initial amounts. The three linear alkenes tested, β-myrcene, (E) and (Z)- β-ocimene, were poorly recovered as well, at 6.7%, 2% and 0.89%. Once incubated, monoterpenoids were extracted to much higher extents, with recovery rates varying from 72% to 92% of initial amounts. In particular, (Z)-linalool oxide and 1,8-cineol amounts did not significantly differ in CTRL and in TERP samples. On the contrary, linalool which was the only linear terpene alcohol tested was below detection threshold in TERP fermentation broths. Finally, the only sesquiterpene tested, β-cedrene, was extracted from fermentation broths in low proportions, with a recovery rate of 17%.

3.3.2.4. Discussion

Two methods were successfully adapted for the experimental needs specific to this study. Firstly, to obtain protozoa-free inocula, a freezing technique (Jouany and Senaud, 1979) was selected against the use of chemicals (Orpin, 1977; Bird and Leng, 1978,1979; Demeyer, 1982) or extreme diets (Eadie et al., 1970; Ikwuegbu and Sutton, 1982; Van Nevel and Demeyer,1981) since they can have significant antibacterial action (Ikwuegbu and Sutton, 1982; Van Nevel and Demeyer,1981; Eadie and Shand, 1981) and since preliminary freezing does not alter rumen microflora in a permanent way as shown by the lack of difference between untreated and refaunated animals (Jouany et al., 1988). Fermentation data in our study indicate clearly that the microbial metabolism in protozoa-free continuous culture systems stayed within normal limits (Nagajara et al., 1997). Secondly, testing terpenes at low input levels made it necessary to substitute usual liquid/liquid extraction methods (Rutledge, 1981; Chizzola et al., 2004) by a recent development of solid-phase extraction, HS-SPME (Arthur and Pawliszin, 1990; Lord and Pawliszyn, 2000), more adapted for the recovery from biological samples of terpenes in low concentrations (Schafer et al., 1995). In order to meet minimum specifications in terms of sensitivity and linearity for a correct quantitative analysis of terpenes we ran, in a first time, an optimisation study of HS-SPME (unpublished) which ended up with a set of operative conditions allowing also a high throughput of samples with

conventional GC equipment. Yet, strong analyte/matrix interactions were observed which obliged to establish calibration curves using a fermentation broth free of terpenes as a matrix. Likewise, to reduce this difficulty when different matrices, e.g. whole fermentation medium, centrifuged or filtered medium and buffer solution, are to be compared, one should estimate individual extraction rates through the HS-SPME and analysis of all matrices spiked with standard solutions.

Table 2: Analysis of variance of chromatographic results in TERP and CTRL incubations, relative amounts recovered (RAR) after 24hr-incubations

Terpene	CTRL (asu)	TERP (asu)	SE (N=10)	P<F Inc	RAR (%)
δ-3-carene	58750	7963	5499	0.0001	13.6^{ab}
β-cedrene	14733	2535	1210	0.0001	17.2^{a}
1,8-cineol	107818	97668	10842	0.19	90.6^{c}
p-cymene	95679	33784	5094	0.0001	35.3^{d}
limonene	7875	3936	657	0.0001	50.0^{e}
linalool	4487	0	1227	0.001	0.0^{f}
(E)-linalool oxide	5599	4987	249	0.005	89.1^{c}
(Z)-linalool oxide	6430	5957	360	0.08	92.6^{c}
β-myrcene	41295	2751	1644	0.0001	6.7^{bf}
(E)-β-ocimene	5683	114	427	0.0001	2.0^{f}
(Z)-β-ocimene	2124	19	164	0.0001	0.89^{f}
α-phellandrene	1734	6	796	0.01	0.34^{f}
α-terpinene	11616	83	856	0.0001	0.71^{f}
γ-terpinene	87354	18377	8499	0.0001	21.0^{a}
4-terpineol	8559	6196	935	0.004	72.4^{h}
α terpineol	50941	42036	3424	0.004	82.5^{g}
α-terpinolene	87831	6607	5113	0.0001	7.5^{bf}

Asu: arbitrary surface units; SE: standard error; Different superscripts mean that the RAR are significantly different (P<0.05)

Among the compounds put under test, δ-3-carene, β-ocimene, α-terpinene were reported as specific to the winter diet whilẹ β-cedrene, α -+ γ-terpineol, linalool and linalool oxides were at highest concentrations in the spring diet (Fedele et al., 2005a). Three compounds, p-cymene, 4-terpineol, α-terpinolene, were present in large amounts in both diets. The structures of the monoterpenes and terpenoids tested were quite diverse, from linear to bicyclic molecules while the sole sesquiterpene, β-cedrene, was a tricyclic molecule and the variations in disappearance rates among terpenes might be due at least in part to these structural differences. Our results strongly suggest that one (or more) cycle(s) in the monoterpene decrease its apparent degradability when exposed to mixed rumen bacteria and that oxygen tend to enhance this effect, particularly if it is in a heterocycle. Hence, linalool, a linear alcohol terpene, β-myrcene and the two isomeric forms of β-ocimene, which are linear alkenes, almost completely disappeared, followed in terms of recovery rates by cyclic alkenes and, last, by cyclic oxygen-containing compounds. It appears also that the position of cyclic carbon-carbon double bonds induced a strong difference of degradability between α- and γ-terpinene.

The above-mentioned classification of terpenes based on apparent degradability was highly consistent with observations made in a very different context. In a sister study (Malecky et al. submitted to publication) 14 out of the present terpenes were incubated with mixed rumen bacteria at a concentration 167-fold higher (0.5 mL L^{-1}) than in the present work to assess the bacterial activity on plant terpenes supplied in large amounts. At the end of incubations, we processed fermentation broths using a liquid/liquid extraction procedure with a solvent mixture of methanol/dichloromethane adapted from (Rutledge, 1981), since these samples were supposed to have significantly larger concentrations of terpenes. In these samples in dichloromethane, we measured terpene recovery rates ranging from 0% for α-terpinolene to 100% for (E)-linalool oxide. Theses relative recovery rates (X) correlated very well with the data of the present trial, at lower terpene concentrations, (Y) according to the following regression equation $Y = X * 0.952 (\pm 0.083) - 3.9 (\pm 4.3)$ (S.D. in brackets, N=14, adjusted R^2=0.91), in spite of completely different extraction procedures and terpene test levels. This classification is also in good agreement with indirect evidences from milk terpene composition of different terpene degradabilities in the ruminant. Hence, limonene and p-cymene have been reported to be dominant terpenes in milk, particularly during summer whilst β-cedrene was in low concentrations (Fedele, et al., 2004; Fernandez et al., 2003; Cornu et al., 2005).

The mechanisms underlying terpene disappearance from the rumen are far from being identified. In our conditions, bacterial toxicity should not account for differences between terpene degradabilities since McIntosh et al. (2003) estimated in vivo that monoterpenes became eventually toxic to a large group of rumen microbes only above concentrations of 20-40 ppm. Enrichment culture studies devoted to soil microbiology have elucidated the metabolism of a number of monoterpenes both under aerobic (Britton, 1984; Trudgill, 1994; Misra et al., 1996) and anaerobic conditions (Hylemon and Harder, 1998; Harder and Probian, 1995; Foss et al., 1998) and may provide some hypotheses for terpene metabolism both within anaerobic rumen contents and in the vicinity of rumen wall susceptible to contain dissolved oxygen. For instance, the anaerobic formation of geraniol and geranial from linalool and of geranic acid from limonene has been observed in denitrifying *Alcaligenes defragrans* (Harder and Probian, 1995; Heyen and Harder, 2000). At last, possible interactions between terpenes and molecular structures presenting hydrophobic surfaces, such as bindings to proteins, might also be considered.

In conclusion, recovery rates differed markedly among terpenes, partly in relation with the presence of oxygen and/or of cycles in the molecule. These observations provide a clue to the cause of changes in terpene composition from diets to milks.

3.3.3. Expérimentation 2 (article5)

Malecky, M., Broudiscou, L.P. 2008. Disappearance yields of 9 monoterpenes exposed *in vitro* to rumen microflora: effects of inoculum source, redox potential and vancomycin.

3.3.3.1. Introduction

In the Mediterranean basin, dairy ruminants kept on natural pastures and rangelands ingest significant amounts of monoterpenes and monoterpenoids found in essential oils of shrubs and plants of the class Magnolopsidae (Morand-Fehr et al., 2007; Fedele et al., 2004; Fedele et al., 2005a). These plant secondary metabolites or their derivatives have also been detected in the raw milk and dairy products from these agropastoral systems and are thought to affect the development of cheese flavour, directly (Carpino et al., 2004) or more probably through changes in the microbial proteolysis taking place during cheese maturing (Buchin et al., 2003). Thus, the link between the botanical composition of pastures and rangelands and the sensory properties of dairy products is viewed as a fact that can positively influence consumers' perceptions and purchase intentions. Hence, the presence of terpenes in ruminant diets and in dairy products has fuelled a growing interest among nutritionists in the post-ingestion metabolism of these compounds and, to begin with, in their interaction with rumen microflora. Although the wide differences among monoterpenes in terms of apparent degradability following exposure to rumen microbes are now well established (Broudiscou et al., 2007; Schlichtherle-Cerny et al., 2007), the effects of rumen biotic and environmental variables on terpene degradation are still poorly understood.

The present *in vitro* study aimed at estimating the roles of microbial and physicochemical factors in the apparent degradation of eight monoterpene hydrocarbons and one oxygenated monoterpene when incubated with rumen microflora, and at providing information on their kinetics of disappearance. These compounds were found, at least in one isomeric form, in the winter and spring diets of dairy goats foraging in Basilicate (Southern Apennine range Italy), which provides a good model of West-Mediterranean grazing systems (Fedele et al., 2005a,b). The terpenes tested were also thought to be readily degraded by the rumen microflora on account of the very low recovery rates observed *in vitro* from 24h-incubations (Broudiscou et al., 2007). The main environmental factor studied was redox

potential due to the key role played by hydrogenation in the rumen ecosystem. Besides, the effect of microbial profile was studied by comparing starch-adapted and fibre-adapted microflora and by assessing the role of gram-positive and gram-negative bacteria thanks to addition of vancomycin hydrochloride to the culture medium.

3.3.3.2. Materials and Methods

The 9 terpenes exposed to rumen microorganisms belong to different structural groups. The two diastereoisomers of β-ocimene, E and Z are linear alkenes. α-terpinene and α-phellandrene are monocyclic alkenes, both with endocyclic double bonds. Bicyclic alkenes are represented by three isomers of pinene, (-)-β-pinene and both enantiomers of α-pinene, and by sabinene. Linalool is the only linear terpene alcohol undergoing test.

Linalool [CAS 78-70-6], *(E)*-β ocimene: [3779-61-1], *(Z)*-β-ocimene [CAS 3338-55-4], (-)-α-pinene [CAS 7785-26-4], (+)-α-pinene [CAS 7785-70-8], (-)-β-pinene [CAS 127-91-3], and α-terpinene [CAS 99-86-5] were purchased from Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany), (±) sabinene [CAS 3387-41-5] and R-(-)-α-phellandrene [CAS 99-83-2] from Extrasynthèse SA (Genay, France), Their purity was above 99%. Ethanol, of ACS reagent grade, was purchased from Carlo Erba (Modano, Italy). Sodium Chloride , potassium hydrogen phosphate, ammonium dihydrogen phosphate, di-ammonium sulfate and L-Cysteine hydrochloride were supplied by Acros (Belgium) and were of analytical grade. D-(+)-cellobiose, maltose monohydrate, tryptone and vancomycin hydrochlorate were purchased from Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l. (St Quentin Fallavier, France).

Terpenes were quantitatively extracted from fermentation broths using a headspace solid-phase microextraction method (HS-SPME) (Arthur and Pawlliszyn, 1990; Coleman and Lawrence, 2000; Cornu et al., 2001). The SPME holder for manual sampling, 100 mμ polydimethylsiloxane (PDMS) SPME fibre assemblies and splitless inlet liners, were supplied by Supelco (Bellefonte, USA).The 10-mL crimp top wide mouth vials with silicon-teflon septa used for HS-SPME were purchased from Grace Davison Alltech S.A. (Templemars, France).

Experiment A: Effect of Vancomycin and Inoculum source

Experimental design:

In a first series of 3h-incubations, we focused on biotic factors by assessing the changes in terpene recovery yields relative to inoculum microbial profiles. We combined two factors: a) the use of inocula adapted to two diets differing in the source of energy - wheat grains vs. orchard grass hay - b) the addition to culture medium of 10 mg L^{-1} vancomycin hydrochloride, bactericidal against gram-positive bacteria. By doing so, we compared gram-positive and -negative bacteria in rumen microflora preferentially growing either on fibre or on starch. Treatments were arranged in a 2 x 2 x 4 full factorial design. Main factors were inoculum source (starch- vs. fibre-adapted), vancomycin (V-: 0 vs. V+:10 mg L^{-1}) and day (four replications). Terpenes were exposed to rumen microflora in culture tubes of 17 mL sealed with rubber/PTFE lined screw caps. They were individually tested at an input level of 4 µL L^{-1} that provided initial molar concentrations of 22.30 – 25.25 µmol L^{-1}. β-ocimene was also tested at 4µL L^{-1} but it was only available as a mixture of *(E)*-β ocimene and *(Z)*-β-ocimene in the molar proportions 0.738 : 0.262.

Incubations:

The tubes were inoculated with rumen contents cultivated in dual flow continuous culture systems, in an effort to characterise and standardise microbial inocula. For this purpose, 7 days prior to batch incubations, 1.5 L of rumen contents were collected by accredited personnel from 4 goats of Saanen and French-Alpine breeds housed in the laboratory husbandry. Animal care and use procedures were approved by the French Ministry of Agriculture in agreement with French regulations for animal experimentation (guideline 19/04/1988). Then, rumen contents were pooled, coarsely filtered under CO_2 atmosphere and introduced into 2 dual flow continuous culture systems. The dual flow continuous culture systems (working volume of 1.1 L) were permanently infused with a mineral buffer (MB) solution (Broudiscou et al., 1999) so as to set particle and liquid phases dilution rates at 0.03 hr^{-1} and 0.06 hr^{-1}. Each day at 11:00 and 23:00, one continuous culture system was supplied with 15.5 g of a low-NDF pelleted diet (wheat grains 645 g kg^{-1}, alfalfa hay 355 g kg^{-1}), while the other culture system was provided with 15 g of a high-NDF pelleted diet (orchard grass hay 833 g kg^{-1}, alfalfa hay 167 g kg^{-1}). The low- and high-NDF diets contained 250 and 550 g kg^{-1} neutral detergent fibre (NDF) and they provided 26.9 and 25.8 g organic matter (OM) and 3.66 and 3.75 g crude protein (CP) per day. The normal course of fermentation in

continuous culture systems was checked by measuring the daily amounts of hexoses fermented and the fermentation pattern. Whole effluents were purposely sampled for VFA analysis, mixed with 0.25 volume of H_3PO_4 (410 g L^{-1}) and stored at -20°C until analysis.

Terpenes were individually exposed to rumen microflora as follows. Prior to incubations, 5 mL L^{-1} individual terpene working solutions were prepared in ethanol and kept at +4°C in sealed 1.5 mL glass vials. A nutrient solution (BS) was prepared as well by solubilising cellobiose 37.5 mmol L^{-1}, maltose 37.5 mmol L^{-1}, tryptone 1.562 g L^{-1}, $(NH_4)_2SO_4$ 0.59 g L^{-1} and $(NH_4)H_2PO_4$ 2.054 g L^{-1} at pH 6.8. It met the nutritional requirements of rumen micro-organisms (Durand and Kawashima, 1980; Broudiscou and Jouany, 1995) by providing 0.1875 mmole hexoses, 0.781 mg N and 0.179 mg S per tube. Every day of incubation, fresh contents (300 g per fermenter) were anaerobically taken at 11:30 from the 2 dual flow continuous culture systems. They were filtered through a 250 µm mesh nylon gauze and the filtrates were kept at 39°C under CO_2 atmosphere during inoculation. Each culture tube was anaerobically filled with 1.25 ml of nutrient solution, 5 ml of one out of two microbial inocula and, when planned in the experimental design, with 10 µL of a solution of 6.35 mg L^{-1} vancomycin in HCl 0.01N. 5 µL of one terpene working solution were immediately added and the tube was tightly sealed with rubber/PTFE lined screw caps, gently stirred and kept in a stirring water bath (100 rpm, 39°C ± 0.5). Every incubation day, 2 culture tubes were inoculated with each inoculum and no terpene. These four control culture tubes provided the matrices for the calibration points in the subsequent HS-SPME extraction stage. Common to all three experiments, they were incubated for 24 h according to the procedure followed in experiment 3. .After 3 h of incubation, all terpene-containing tubes were cooled at +4°C for 1h in order to condensate volatile components before opening and sampling. Two mL samples of fermentation broths were stored in triplicate at –30°C until analysis. The fermentation broths resulting from control culture tubes were also stored at –30°C until used in the determination of initial terpene contents in culture tubes, in order to account for matrix interferences during HS-SPME in the determination of terpene disappearance yields.

Analytical methods:

The culture tube contents were processed through a HS-SPME method adapted to fermentation media. Prior to use, glass vials and Silicon-Teflon septa were baked at 80°C for 24 h and SPME fibers were periodically conditioned in the GC injection port at 240°C for at

least 1 h in order to eliminate eventual impurities. The terpene contents of each culture tube were determined in duplicate. The samples of a given terpene were grouped in one analytical batch. The daily number of samples to be processed were thawed at ambient temperature and kept at +4-6°C. Each HS-SPME was implemented as follows. 0.5 mL of sample and 5.5 mL of 0.3M sodium phosphate buffer, adjusted at pH 6.75 and containing 250 g L^{-1} NaCl, were pipetted into an extraction vial. When a calibration point was processed, 5µL of the corresponding terpene working solution diluted 20 folds in ethanol were also added in order to determine the control values – four independent determinations - providing estimates of terpene recovery yields. The extraction vial was capped, vortexed for 10 sec and heated in an aluminum bloc at 45°C. The SPME fibre was then exposed in the vial headspace for 18 min 40 sec. Immediately after exposure, the SPME fibre was subjected to desorption for 3 minutes in the GC injection port of a GC-FID Varian 3400 (Varian SA, Les Ulis, France). The injection port was fitted with a splitless glass inlet liner adapted to SPME and maintained at 240°C. Terpene separation was performed on a 25 m x 0.32 mm, d_f 0.25 µm DB-1 capillary column (Chrompack, Varian, Les Ulis, France). The oven temperature, initially at 50°C for 2 min, increased to 100°C at 5°C min^{-1} then up to 250°C at 40°C min^{-1} and the final temperature was held for 2 min. The FID detector was at a temperature of 300°C The carrier gas was Helium N55 at a linear velocity of 1 mL min^{-1}. In order to estimate fermentation yields in dual flow continuous culture systems, VFA were determined by capillary GC after derivatization with 2-chloroethyl chloroformate by a method adapted from Kristensen, (2000).

Calculations and Statistical analyses:

The amount of hexoses theoretically fermented (HF) was calculated from the relation given by Demeyer and Van Nevel, (1975) relating HF to VFA production yields

$$HF\ (mmol) = (C2 + C3)/2 + C4 + C5 + C6 \quad (1)$$

Where C2, C3, C4, C5 and C6 are acetate, propionate, butyrate, valerate and caproate productions (mmol) respectively.

Chromatographic results were subjected to analysis of variance using a SAS GLM procedure (SAS, 1990), with inoculum (starch- vs. fibre-adapted), vancomycin (V-: 0 vs. V+: 10 mg L^{-1}), inoculum x vancomycin interaction and day (four replications) as sources of variation. The response variables were terpenes recovery yields expressed in nmoles. The calibration of GC analysis proceeded from the quantitative analysis of spiked control samples in the same chromatographic batch, in order to correct for day variations. An additional

correction was made to account for possible variations in recovery yields between spiked 24-h incubation broths used for calibration points and samples of 3-h incubation broths, using the ratio of corresponding HS-SPME recovery rates. We performed mean comparisons using Fisher's Least Significant Difference Test.

Experiment B: Effect of L-Cystein and Inoculum source

In a second series of 3h incubations with mixed rumen microbes, we assessed the effects of abiotic factors on terpene apparent degradability by measuring the changes in terpene recovery yields relative to redox potential and inoculum acidogenic capacity. We combined the following two-level factors : a) the addition to culture medium of L-cysteine hydrochloride monohydrate which lowered redox potential by approximately 50 mV, b) the use of two microbial inocula adapted to the same diets as in experiment 1. Treatments were arranged in a 2 x 2 x 4 full factorial design. Main factors were inoculum source (starch- vs. fibre adapted), L-cysteine (C-: 0 vs. C+: presence) and day (four replications).

The same incubation procedure as in experiment 1 was followed. The only difference was the use of a nutrient solution containing 1 g L^{-1} L-Cysteine when planned in the experimental design. Analytical methods, calculations and statistical analyses were identical to experiment 1. The ANOVA model included the three main factors and the inoculum x L-cysteine interaction term.

Experiment C: Kinetics of Terpene Disappearance

The objective of experiment 3 was to compare the time-course of terpene disappearance when exposed to a rumen microflora adapted either to starch or to plant cell-wall utilisation. Incubations were stopped after periods of 3, 6 and 24h. The incubation procedure was the same as in experiments 1 and 2, except for two operative conditions. Firstly, the buffer solution used in 24h-incubations was fourfold more concentrated in nutrients than in 3h- and 6h-incubations, in order to meet microbes requirements all along the incubation period. This solution contained cellobiose 37.5 mmol L^{-1}, maltose 37.5 mmol L^{-1}, tryptone 1.562 g L^{-1}, $(NH_4)_2SO_4$ 2.36 g L^{-1} and $(NH_4)H_2PO_4$ 8.216 g L^{-1} at pH 6.8, which provided 0.75 mmole hexoses, 3.125 mg N and 0.714 mg S per tube. Secondly, in 6h and 24h incubations, terpenes were tested in combinations so as to limit batch size to a reasonable number of 56 culture tubes. We arranged terpenes into three groups ensuring their good resolution by capillary gas chromatography on DB1- and Carbowax 20M-like phases, which meant making their relative

retention indices (Van den Dool and Kratz, 1963), compatible within each group. It followed from this criterion three mixtures of terpenes : 1) (E) and (Z)-β-ocimene + α-pinene (-) + β-pinene (-), 2) sabinene + α-phellandrene + α-pinene (+), 3) + α-terpinene + linalool.

Terpene initial concentrations were identical, at 4 µL L^{-1}, whatever the molecule and incubation period. This concentration was low enough to regard the toxicity of terpenes on rumen bacteria as negligible (Naigre et al., 1996; Dorman and Deans, 2000; Griffin et al., 1999; McIntosh et al., 2003). Individual terpene disappearance rates were fitted by the SAS/NLIN non-linear regression procedure (SAS, 1990), using the Gauss-Newton method, to the exponential equation:

$$P = a.(1 - e^{-b.t}) \qquad (2)$$

where P is the terpene degradation after time t, a is the potentially degradable fraction and b the rate constant for fraction a. Data sets of 20 observations were subjected to non-linear regression for each combination of terpene and inoculum, except for linalool and α-phellandrene where only 16 observations were available.

3.3.3.3. Results

Microbial fermentations in continuous cultures systems were characterised as follows. The continuous culture system on the high-NDF diet fermented 42.5 mmoles d^{-1} of hexoses into 47.6 mmoles d^{-1} C2, 15.5 mmoles d^{-1} C3, 8.4 mmoles d^{-1} C4, 1.5 mmoles d^{-1} C5 and 1.2 mmoles d^{-1} C6, which led to a C2/C3 ratio of 3.08. The corresponding fermented organic matter was 6.95 g d^{-1}. The average pH of the fibre-adapted inoculum collected from this fermenter was 6.88. Its average redox potential Eh, calculated with the normal hydrogen electrode as the reference, was –154 mV. The continuous culture system on the low-NDF diet fermented 54.6 mmoles d^{-1} of hexoses into 50.1 mmoles d^{-1} C2, 19.9 mmoles d^{-1} C3, 15.3 mmoles d^{-1} C4, 2.4 mmoles d^{-1} C5 and 1.9 mmoles d^{-1} C6, which led to a C2/C3 ratio of 2.52. The corresponding organic matter fermented was 8.93 g d^{-1}. The average pH of the starch-adapted inoculum collected from this fermenter was 6.60, its average redox potential Eh was –151 mV.

Effect of vancomycin and inoculum source:

During chromatographic analyses, an unknown compound produced a large peak poorly resolved with α-phellandrene, thus interfering with its quantification in 6 samples out

of 16. Nevertheless, the 10 remaining samples still allowed the estimation by ANOVA of all effects, including the interaction term. Sabinene was the most recovered terpene after 3h-exposure to rumen microflora, at 66%, followed by α-phellandrene and β-pinene, recovered at 50% and 56% (table 1). The lowest recovery yields were observed with the enantiomers of β-ocimene and linalool. The inoculum source was the only significant treatment, although not active on α-terpinene (Table 1). The effects of vancomycin and of the interaction term were far from significance for all terpenes. Exposure to starch-adapted microflora rather than fibre-adapted microflora resulted in recovery yields twofold higher for (E)-β-ocimene (5.2 vs. 10.8 nmoles), (Z)-β-ocimene (3.3 vs. 5.7 nmoles), α-pinene (+) (21.1 vs. 36.0 nmoles) and α-pinene (-) (23.9 vs. 42.7 nmoles). In the same way, shifting from fibre-adapted to starch-adapted inocula significantly increased recovery yields of β-pinene, from 43 to 69 nmoles, and sabinene, from 56 to 77 nmoles.

Table 1: Effect of inoculum source (I) and vancomycin (V) on the amounts of terpene recovered after 3-h incubation with mixed rumen microorganisms.

Terpene	Input	Amount recovered (nmoles)				Contrasts			SEM
	(nmoles)	Fibre-adapted I		Starch-adapted I		I	V	I x V	
		V-	V+	V-	V+	Pr > F	Pr > F	Pr > F	
linalool	139.9	13.7	19.1	11.4	7.0	0.34	0.95	0.51	7.09
(*E*)-β-ocimene	108.3	5.31	4.96	11.12	10.56	0.001	0.73	0.94	1.26
(*Z*)-β-ocimene	38.5	3.55	3.03	5.77	5.53	0.005	0.56	0.83	0.63
α-phellandrene	155.3	34.4	40.8	63.7	59.2	0.22	0.95	0.75	12.3
(-)-α-pinene	157.5	19.6	28.2	40.5	44.8	0.001	0.11	0.57	3.68
(+)-α-pinene	157.5	20.9	21.3	33.1	38.9	0.009	0.51	0.56	4.47
(-)-β-pinene	157.5	41.9	44.7	63.7	73.6	0.001	0.17	0.43	4.24
sabinene	154.9	49.7	62.3	73.2	80.4	0.007	0.13	0.66	5.97
α-terpinene	153.8	28.5	27.8	29.0	23.7	0.71	0.54	0.64	4.68

N=16, except for α-phellandrene (N=10). Pr > F: significance probability value for the Fisher's test null hypothesis. SEM standard error of the mean (N=4)

Effect of L-cysteine and inoculum source:

Terpenes were ranked with respect to recovery yields in the same order as in experiment 1 (Table 2). In this experiment also, 6 and 1 observations out of 16 were withdrawn from α-phellandrene and linalool degradation datasets since their chromatographic peaks were poorly resolved from large unidentified peaks. The ANOVA summarised in table 2 indicate that terpenes reacted in quite different ways to experimental treatments. Hence, the statistical analysis resulted into significant interaction terms for α-phellandrene as well as for (E) and (Z)-β-ocimene. For these three terpenes exposure to the starch-adapted microflora in absence of L-cysteine led to significantly higher recovery yields than with fibre-adapted inoculum. In contrast, linalool disappearance was unaffected by any treatment. Besides, sabinene, α-pinene (+), α-pinene (-) and β-pinene recovery yields were modified only by inoculum source. They were increased by the use of starch-adapted microflora instead of the fibre-adapted one by 37%, 67%, 81% and 57% respectively. Finally, L-cysteine significantly lowered α-terpinene recovery yield from 29 to 12 nmoles.

Table 2: Effect of inoculum source (I) and L-cysteine hydrochloride (C) on the amounts of terpene recovered after 3-h incubation with mixed rumen microorganisms.

Terpene	Input	Amount recovered (nmoles)				Contrasts			SEM
	(nmoles)	Fibre-adapted I		Starch-adapted I		I	C	I x C	
		C-	C+	C-	C+	Pr > F	Pr > F	Pr > F	
linalool	139.9	13.7	15.2	11.4	6.7	0.50	0.85	0.84	6.96
(*E*)-b-ocimene	108.3	5.31	5.05	11.12	4.99	0.028	0.017	0.026	1.10
(*Z*)-b-ocimene	38.5	3.55	2.22	5.77	1.57	0.16	0.001	0.020	0.51
a-phellandrene	155.3	34.4	40.8	63.7	34.6	0.001	0.002	0.027	1.56
(-)-a-pinene	157.5	19.6	25.5	40.5	41.1	0.001	0.41	0.49	3.69
(+)-a-pinene	157.5	20.9	22.3	33.1	39.0	0.004	0.36	0.56	3.75
(-)-b-pinene	157.5	41.9	43.3	63.7	70.1	0.001	0.32	0.53	3.74
sabinene	154.9	49.7	57.4	73.2	73.3	0.004	0.47	0.48	5.17
a-terpinene	153.8	28.5	16.6	29.0	11.5	0.46	0.001	0.38	3.05

N=16, except for linalool (N=15) and α-phellandrene (N=9). Pr > F : significance probability value for the Fisher's test null hypothesis. SEM standard error of the mean (N=4).

Kinetics of terpene disappearance:

The convergence criterion was always met in non-linear regressions, but in several cases the absence of very short incubation periods in the exploration of what revealed to be a high paced biological process did not allow a correct estimate of disappearance rate b. Since the incubation timetable at this stage could not be changed to overcome this difficulty, b was not taken into consideration. The potentially degradable fraction a was quite variable among terpenes, from 0.70 with β-pinene-(-) to 0.97 with linalool (Table 3). It did not vary significantly with inoculum source except eventually for (E)-β-ocimene.

Table 3: Terpene degraded fraction after a period of 6 h (±SEM, n=8) and potentially degradable fraction a (± confidence interval at P>95%) when exposed to starch- and fibre-adapted inocula.

Terpene	Fibre-adapted inoculum		Starch-adapted inoculum	
	6 h (%)	a (%)	6 h (%)	a (%)
linalool	97.5 (±1.2)	96.6 (±4.7)	98.9 (±0.3)	98.4 (±5.2)
(*E*)-β-ocimene	95.6 (±0.8)	95.2 (±0.9)	93.9 (±1.1)	93.2 (±1.7)
(*Z*)-β-ocimene	91.5 (±1.2)	90.8 (±1.8)	91.5 (±1.7)	90.1 (±2.6)
α-phellandrene	83.7 (±2.8)	78.8 (±7.4)	80.9 (±2.8)	83.8 (±9.6)
(-)-α-pinene	83.3 (±0.8)	83.6 (±1.7)	84.4 (±2.9)	83.0 (±5.1)
(+)-α-pinene	81.3 (±2.0)	83.5 (±3.3)	78.4 (±3.1)	79.1 (±7.2)
(-)-β-pinene	70.3 (±1.2)	71.6 (±2.0)	67.2 (±4.8)	69.6 (±8.9)
sabinene	63.9 (±3.9)	86.7 (±13.6)	63.6 (±3.6)	86.9 (±10.8)
α-terpinene	84.4 (±2.5)	85.4 (±4.3)	81.5 (±5.1)	83.2 (±6.9)

3.3.3.4. Discussion

The test concentration of terpenes was the same order of magnitude as that expected in the rumen of goats grazing Basilicata native pastures (Fedele et al., 2005a). The winter diet in Basilicata is composed of Graminacea 92%, mostly Lolium perenne L. and Dactylis glomerata L., and Magnolopsida (formely dicotyledons) 8%, whose 1% are Fabaceae. The spring diet provides a wider botanical diversity. Lolium perenne L., Dactylis glomerata L.,

Poa pratensis L., Medicago polymorpha L., Medicago lupulina L., Asperula odorata L. and Geranium molle L. contribute to the diet by 10, 8, 6, 13, 8, 12 and 8 % respectively (Fedele et al., 2005a), and the plants from the class Magnolopsida account for 36.5 % of the biomass ingested. α-phellandrene, α-pinene followed by β-pinene and sabinene are common to both seasons. Linalool predominates in spring while β-ocimene and α-terpinene are minor compounds only detected in winter diets. The terpene test concentration was also low enough to allow their complete solubilisation in aqueous media (Weidenhamer et al., 1993; Li et al., 1998).

The problems encountered in α-phellandrene and, to a lesser extent, in linalool quantifications were unexpected since the existence of large interfering peaks had not been reported yet. The related retention times and the pattern of variation in peak surface, both negatively linked to incubation period and positively linked to disaccharide initial amounts in the nutrient solution, suggest that the interfering compounds were intermediate metabolites of maltose microbial degradation, such as isomaltol. To overcome this problem in future studies, it might be necessary to supply microorganisms with glucose rather than maltose whenever DB1-like phases must be used at the GC-analytical stage.

Effect of vancomycin and inoculum source:

The fermentation balances in continuous culture systems indicated a satisfactory adaptation of microflora to the diets with, in particular, typical differences in C2:C3 ratios according to the nature of dietary sources of energy. It is clear from the lack of effect of vancomycin-HCl in experiment 1 that no Gram-positive bacterial group was significantly involved in the biotransformation of any of the monoterpenes tested. The antibiotic was introduced at a concentration much higher than 7.5 mg L^{-1}, a concentration shown to completely inhibit rumen bacterial cultures (Comfort and Ragheb, 1968). As far as the inoculum microbial profile is considered from the viewpoint of specific composition of the microbial community, the monoterpenes that we tested were transformed mostly by Gram-negative bacteria belonging to the fibrolytic functional group. The widely adapted species *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Fibrobacter succinogenes* both meet these criteria. However incubating terpenes in pure strain cultures or enrichment cultures is the only way to confirm our observations. The higher efficiency in monoterpene apparent degradation of a fibre-adapted microflora compared to a starch-adapted one has not been reported yet. The sole studies related to our results in some respects aimed at assessing the influence of terpenes

from big sagebrush (*Artemisia tridentata*) on sheep and lambs dietary preferences. Lambs preferred a sugar beet pulp-based diet, rich in structural carbohydrates, to a barley grain-based diet with terpenes while their preference reversed with terpene-free diets. They preferred the sugar beet pulp-based diet after eating sagebrush as well (Villalba et al., 2006). In another trial, ruminally-infused terpenes lowered the preference of sheep for starch-based diets in favour of protein based diets (Villalba et al., 2002). The authors favoured the hypothesis that terpenes altered fermentation products and apparent digestibility of each class of carbohydrates, thus inducing behavioural and physiological strategies for regulating these effects. However, another behavioural strategy suggested by these preference tests would be to limit the negative effects of terpenes by increasing the extent or the rate of their degradation in the rumen.

Effect of L-cysteine and inoculum source:

Incubation results from experiment 2 showed a contrasted situation in monoterpene sensitivity to changes in redox potential. To begin with, the bicyclic alkenes, sabinene and pinene isomers, had their apparent degradation yields only altered by the inoculum source, thus indicating that the metabolic pathways involved were not controlled by redox potential, at least within the range of variation commonly observed in the rumen. In contrast, the addition of L-cysteine in starch-adapted culture tubes lowered recovery yields of both isomeric forms of β-ocimene and of α-phellandrene down to values similar to those obtained after exposure to fibre-adapted inoculum. Our observations are consistent with data on monoterpenes fate in 24h-incubations of *Heracleum sphondylium L.* with rumen fluid (Schlichtherle-Cerny et al., 2007). In this report, the formation of new compounds, such as 3,7-dimethyl-l,6-octadiene, 3,7-dimethyl-2-octene, 2,6-dimethyl-2,6-octadiene and menth-1-ene was related to the degradation of terpenes, specially (E)- and (Z)-β-ocimene, most probably by hydrogenation. Besides, the apparent degradation of α-terpinene increased strikingly with L-cysteine, whatever the inoculum type. Therefore, redox potential appeared to be a key parameter in the disappearance of all the linear and monocyclic terpenes in 3h-incubations with rumen microflora. However, the analysis of kinetic data emphasised how specific the response of α-terpinene was. Furthermore, it allowed an assessment of the effect on monoterpene disappearance of the pH decrease due to volatile fatty acid production from maltose and sucrose consumption by the two microflora.

Kinetics of terpene disappearance:

Once pipetted into culture tubes, terpenes were not only solubilised in the aqueous phase (Weidenhamer et al., 1993) and subjected to bioconversion by the rumen microflora. In all likelihood, they were also partly engaged into hydrophobic interactions with pocket sites in macromolecules and feed particles, and partly volatilised in the gas volume above, so-called headspace. In discussing our observations, we must take into account this terpene partionning in a dynamic way, even if the soluble fraction can be seen as dominant. Firstly, headspace should be considered as a compartment where monoterpenes avoided exposure to microflora. We limited to a minimum the headspace volume and, as a consequence, the amounts of monoterpenes volatilised. Moreover, in the absence of microbial activity, the partitioning of monoterpenes between the fermentation medium and headspace would quickly reach an equilibrium, within 20-30 minutes as in the HS-SPME sampling process. The microbial consumption of monoterpenes was then expected to continuously displace this equilibrium in favour of the aqueous phase. In contrast, the analysis of kinetic data showed that potentially degradable fractions were attained within 3h for α-phellandrene and all the isomers of β-ocimene and pinene when exposed to fibre-adapted microflora and, strikingly, for α-terpinene with both inocula. Otherwise, this steady-state was reached within 6h of incubation in starch-adapted incubations. Sabinene was the only compound still disappearing after an incubation period of 6h. In short-term batch cultures, a decline in microbial metabolic activity is not expected before 12 h of incubation, as confirmed by data on sabinene. Thus, these observations raise the question of the mechanism by which other terpenes did not undergo further microbial transformation in our essay. Both incubation media were complex, indeed, and it appears that they might have provided a variety of sites to hydrophobic interactions where terpenes would be out of reach from rumen microflora, at least for a while. An additional information deduced from the lack of difference between microflora in most terpene potential degradable fractions is that the pH drop expected to be stiffer with starch-adapted microflora cannot explain the inoculum effect on monoterpene apparent degradation in 3h-incubations. It can also be inferred from kinetic data that redox potential increased β-ocimene and α-phellandrene apparent degradation rates by starch-adapted microflora without modifying potentially degradable fractions while it was able to increase this potential fraction in the case of α-terpinene.

In conclusion, the apparent degradations of the nine terpenes incubated for 3 h were increased by the preliminary adaptation of rumen microflora to a diet rich in structural

carbohydrates rather than starch. This effect is likely to stem from the specific composition of the microbial community rather than from its acidogenic capacity. Lowering culture redox potential enhanced only linear and monocyclic terpenes apparent degradation.

3.4. Métabolisme de terpènes (in vivo), expérimentation 3 (Article 6)

Malecky, M., Schmidely, P., Broudiscou, L.P. 2008. Effects of Two Levels of Monoterpene Blend on Rumen Fermentation Characteristics, Duodenal Terpene and Nutrient Flows, Milk Yield and Composition in Dairy Goats

Abstract

Twenty six Alpine and Saanen goats, 12 fitted with a rumen cannula and a T-type cannula in the duodenum, were used in an experiment on the effect of a blend of monoterpenes on rumen fermentation characteristics, duodenal terpene and nutrient flows, milk yield and composition. The monoterpene blend consisted of 45.2 mol/100 mol linalool, 36.7 mol/100 mol p-cymene, 16.0 mol/100 mol α-pinene and 2.2 mol/100 mol β-pinene, four compounds taken as models of Mediterranean sward terpenes and used in the same proportions as in the spring diet of dairy goats in the Basilicata (Southern Apennine range, Italy). During 6 weeks, the goats were fed a total mixed ration with no terpene or supplemented with the monoterpene blend at two levels, 50 and 500 µL/kg DMI ingested. Ruminal fermentation characteristics remained unchanged by monoterpenes. The mean terpene composition of duodenal digesta was 11.7 mol/100 mol p-cymene, 9.2 mol/100 mol α-pinene and 79.1 mol/100 mol β-pinene and differed markedly from the ingested blend in both supplemented groups with, in particular, the disappearance of linalool. In average, 2.7, 3.5 and 23.5 % of the ingested amounts of α-pinene, p-cymene and β-pinene were recovered in the duodenum. Apparent rumen degradabilities of DM, NDF, ADF, apparent and corrected rumen degradabilities of nitrogen and organic matter were not significantly affected by either level of terpene supplementation. Intake and production variables were measured on all the goats. Dry matter intake milk and 4% fat-corrected milk productions were not significantly affected by terpenes. At the high supply level, they merely increase the milk protein content ($p=0.01$), with no effect on milk fatty acid composition.

Key Words: Monoterpene, Milk composition, Duodenal flow, Dairy Goat

3.4.1. Introduction

Low-molecular-weight terpenes, a class of plant secondary metabolites largely ignored in animal feed until recently, are gaining interest in ruminant feeding because of claims of improved rumen function and dairy products characteristics. The latter effect was supported by comparisons of cheeses from natural pastures and from conventional feeding systems on the basis of their sensory characteristics (Coulon, et al., 2005, Morand-Fehr, et al., 2007, Noni and Battelli, 2008). At the same time, the lack of data on terpene metabolism in ruminants has prompted studies on the susceptibility to degradation of the most common monoterpenes when exposed to the rumen microflora (Broudiscou, et al., 2007, Schlichtherle-Cerny, et al., 2007). However, these screening trials were conducted *in vitro*, in batch incubation systems, and the results need to be confirmed by further studies in ruminants.

In the present trial, we aimed at estimating the susceptibility of four monoterpenes to degradation in the rumen as well as their effects on digestion processes and production performances in dairy goats. The compounds (linalool, p-cymene, α- and β-pinene) were characteristic of the winter and spring diets of goats grazing natural pastures in Basilicata (Southern Apennine range, Italy) (Fedele, et al., 2004, Fedele, et al., 2005a). They differed both in structure and *in vitro* apparent rumen degradability. They were also available in bulk quantities, which allowed adapting animals to the monoterpene blend for several weeks before any experimental measurement and sampling. In absence of data on terpene recovery from duodenal digesta, we introduced the monoterpene blend at two levels: one of the order of magnitude observed in normal grazing conditions and one 10-fold higher. By doing so, we wanted also to estimate the maximum effects of the monoterpene blend, of mild toxicity to microorganisms, on the degradation of dietary constituents, fermentation and microbial synthesis in the rumen and on milk yield and composition. Some of the results described in this study have been published in abstract form (Malecky, et al., 2006)

3.4.2. Materials and Methods

Animals and Experimental Design.

Animal care and used procedures were approved by the French Ministry of Agriculture in agreement with French regulations for animal experimentation (guideline 19/04/1988). Twenty-six Saanen and Alpine goats (BW = 71 ± 10 kg) in early lactation (73 ± 8 DIM) were

used in a 6-week trial. Twelve animals were fitted with a ruminal and a T-type duodenal cannula and were housed in individual metabolic crates with wooden floor. At the start of the trial, the average milk yield was 3.41 ± 0.98 kg, with a milk fat content of 32.0 ± 6.6 g/L and a milk protein content of 32.1 ± 2.8 g/L. At 08:00 and 17:00 , the goats were fed an *ad libitum* total mixed ration (TMR) based on dehydrated alfalfa, beet pulp silage and hay, and whose composition is in Table 1. The animals had free access to water and to trace-mineralized salt blocs.

The goats were randomly assigned to receive one of three treatments: 1) a monoterpene blend at 50 µL/ kg dry matter ingested (LOW, 4 cannulated and 6 conventional animals); 2) the same blend at 500 µL/ kg DMI (HIGH, 4 cannulated and 6 conventional animals); 3) no blend (CTRL, 2 cannulated and 4 conventional animals). The monoterpene blend consisted of 45.2 mol/100 mol linalool, 36.7 mol/100 mol p-cymene, 16.0 mol/100 mol and 2.2 mol/100 mol α and β-pinene. Linalool, p-cymene and β-pinene were purchased from Roth-Sochiel sarl (Lauterbourg, France), α-pinene was supplied by Interchim (Montluçon, France). They were at a minimum purity of 95%. At each meal, the monoterpene blend was directly poured into the rumen of cannulated goats, in order to obtain precise intake estimates for terpene balance calculations in the rumen, while it was mixed with the TMR of conventional animals.

Dry Matter Intake and Duodenal Nutrient flows

Feed intake was recorded daily by weighting feeds offered to and refused by the goats. Samples of TMR were collected at the beginning of the trial, during the duodenal sample collection period (Weeks 5 and 6) and at the end of the trial. They were then dried at 55°C for 48 h and ground (1 mm) for subsequent analysis of DM, total N, NDF, ADF and ADL. Goats were weighted weekly after the morning milking.

Chromium oxide (Cr_2O_3, Prolabo, Paris, France) in gelatine capsules (Company LGA, Bandol, France) was used as a marker to determine duodenal flows of nutrients and ruminal. It was introduced at every meal time directly in the rumen at a dosage of 2.4 g/ goat per day. Chromium oxide was administrated during 3 weeks, which 18 days were considered as adaptation period to Cr_2O_3, duodenal sampling was carried out during 3 last days.

Table 1: Ingredient and chemical composition of the TMR

Item	Amount, %
Ingredient	
Dehydrated grinded alfalfa	34
Grass hay	14
Beet pulp silage	31
Special blend concentrate [1]	21
Chemical composition	
DM, %	49.7
OM, % of DM	91.7
CP, % of DM	13.0
NDF, % of DM	44.2
ADF, % of DM	23.4
ADL, % of DM	3.9
NE_L,[2] Mcal/kg	1.35

[1] Including a mixture of corn, wheat, barley, cane molasses, wheat gluten, beet pulp, soybean meal and sunflower meal contained 1481 kcal/kg of NE_L , 17.5% of CP, 1.8% Ether Extract, 35% starch, 6.4% mineral matter , 9 g/kg Ca, and 6g/kg P, 10,000 IU of vitamin A/kg, 1,000 IU of vitamin D3/kg , 20 mg of vitamin E/kg and 10 mg of vitamin B1/kg.

[2] Calculated using published values of feed ingredients (INRA, 2004)

Duodenal samples (approximately 60 ml) were collected on week 6 during 3 consecutive days at intervals of 6 h each day in order to have 12 representative samples taken at 2- h intervals. They were kept at –20°C, until freeze-drying and analysis of Cr_2O_3, total N, microbial N, ammonia N, NDF, ADF and ADL contents. In order to analyze duodenal terpene contents, samples of 5 ml were kept at –20°C until analysis through headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography (GC). Besides, blood samples of 10 ml were taken 8h after morning feeding in heparinated tubes and kept frozen for determination of blood terpene contents.

Ruminal Fermentation Characteristics

Ruminal fluid (20 ml) was collected 1h, 3h, and 7 h after the morning meal. Following immediate determination of pH, ruminal fluid was filtrated through a 150 µm mesh nylon gauze and 4 mL of filtered rumen fluid were acidified with 1 mL of H_3PO_4 25% (vol/vol). The samples were kept at –20°C until analysis of VFA and NH_3 contents. 1 mL of rumen

fluid was also mixed with 4 mL of a conservator (glycerine, 66%; glutar-aldehyde, 1.33% and distilled water, 32.67%) and kept at +4°C for enumeration of protozoa.

Milk Production and Milk Composition

Goats were milked twice daily at 07.00 and 16.00h, milk yield was recorded every day. Milk samples were taken from morning and evening milking on two consecutive days each week, they were stored at 4°C with bronopol (Trillard, Surgères, France) until analysis for fat, protein and somatic cells contents. Milk samples were taken on week 5 without preservative and were frozen at –20°C for analysis of milk FA profile.

Chemical Analyses

DM content of TMR was determined by oven drying at 105°C for 48h. Duodenal DM and nutrient flows as well as their ruminal digestibilities were calculated as described by Kozloski (1998). Total nitrogen was determined by Dumas technique (LECO model FP-428 Nitrogen Determinator, LECO, St, Josef, MI). Crude protein was calculated as N*6.25. The concentrations of NDF and ADF in TMR and duodenal samples were determined as described by Van Soest (1991) with the inclusion of heat-stable α-amylase (0.2 mL/g DM). Microbial nucleic bases in duodenal contents were analyzed by HPLC (Lassalas et al., 1993). Concentrations of NH_3-N and VFA in ruminal fluid were analysed by colorimetry (Wheatherburn, 1967) and by GC (Kristensen, 2000) respectively. Fat and protein contents of milk samples were analyzed (AOAC, 1990) by infrared spectrophotometry (Syndicat Interdepartemental de l'Elevage, Le Mee, France). To analysis of milk FA profiles, milk fat was extracted twice from freeze-dried milk solids with ethanol/12N-HCl/hexane and tricosanoic acid (0.5 mg/mL, Supelco France, Saint Quentin, Fallavier Cedex) was added as internal standard to the solution. The FA were methylated at room temperature with a methanolic BF3 solution (14 %, wt/vol). Methyl-esters of FA were then recuperated in hexane. Determination was carried out under following conditions: Varian Chromopack CP 3800 gas chromatograph (Varian SA, Les Ulis, France), 100 m × 0.32-mm, capillary column (CP-Sil 88, Interchim, Montluçon, France), 0.25 mm film thickness, H2 carrier gas, 1 mL/min volumetric flow rate, injector split ratio 1/20 at 250°C, FID at 250°C. The initial column temperature was 50°C, it increased at a rate of 10°C/min up to 170°C (held for 78 min) and rose 5°C/min up to 220°C (held for 15 min). Individual FA was identified by comparison of retention time to those of pure FA methyl-esters standards (Supelco Inc, Bellefonte, USA).

The extraction and analysis of terpenes in duodenal and blood samples were conducted as follows. On the day of analysis, duodenal samples were thawed at ambient temperature and kept at 4°C until extraction. Solid-Phase Microextraction (SPME) with a Polydimethylsiloxane (PDMS) fiber (Kim et al., 2006) was used to extract terpenes from duodenal samples. Two preliminary optimization trials permitted the determination of optimum operative conditions for blood and digesta. 0.5 ml of duodenal sample was mixed with 5.5 ml of a buffer phosphate solution at pH 7 in vials of 10 ml. Vials were immediately capped and placed in an aluminum heater bloc at 45°C. The fiber was then exposed to volatiles for 18 min 40 sec. For extraction of terpenes from blood, 2 ml of sample were mixed with 2 ml of buffer phosphate at pH 7, the extraction lasted 22 min at 35°C. The analysis of terpenes was performed by gas chromatography on a Varian 3400 with a DB-1 capillary column (25m×0.32 mm I.D., 0.25 µm of film thickness). Injector temperature was 250°C and detector temperature was 300°C. Programming the oven temperature was 50°C for 2 min, then increased 5°C/min to 100°C, after 40°C/min to 250°C and held for 2 min. Carrier gas was Helium with a flow of 1 mL min^{-1} (at a pressure of 15.5 psi of pre column). The calibration was conducted by addition of terpene standard solutions to duodenum contents used as matrix, at final concentrations of 1, 5, 10 and 100 ppm, then by HS-SPME and GC analysis of these spiked samples and linear regression. The results subjected to statistical analysis in LOW and HIGH groups were obtained by subtraction of the mean peak areas measured in CTRL samples.

Statistical Analysis

The data obtained for milk production and composition, DMI and those for rumen fermentation characteristics were analyzed using the MIXED procedure of SAS (SAS Institute, 2000) for repeated measurements according to the following statistical model:

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + c_k + ab_{ij} + e_{ijk}$$

where Y_{ijk} is the response variable, μ is the overall mean, a_i is the fixed effect of monoterpene blend (CTRL vs LOW vs HIGH), b_j is the effect of time (weeks 3-6), c_k is the appropriated covariate (data from the first week), ab_{ij} is the interaction between monoterpene blend and time and e_{ijk} is the random residual error. Data for rumen parameters were analyzed without covariate in the model. For these analyses, first autoregressive [AR(1)] was used as variance-covariance structure. The interaction between monoterpene blend and time never reached significance, so we presented only the effects of monoterpene blend. Data for duodenal flows

and ruminal digestibilities were analyzed using the GLM procedure of SAS, according to following model:

$Y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij}$

where Y_{ij} is the response variable, μ is the overall mean, a_i is the fixed effect of monoterpene blend (CTRL vs LOW vs HIGH), e_{ij} is the random residual error. The effect of distributing pattern (ruminal or diet) of monoterpene blend was removed from the models because preliminary analysis indicated that this factor did not affect any of measured variables. The means of groups (HIGH and LOW) were compared with Control by a Dunnett test. For these analyses, two goats were removed from LOW group because of a problem of duodenal cannula and an anomaly duodenal over flow.

Table 2: Ruminal fermentation characteristics in dairy goats fed a TMR with 0 (CTRL), 50 (LOW) or 500 µL/kg DM (HIGH) of a terpene blend

Item	Treatment			SEM	P <
	CTRL (N =2)	LOW (N =4)	HIGH (N =5)		
pH	6.43[1]	6.39	6.46	0.05	0.86
Total VFA, mM	90.48	87.54	89.66	2.67	0.92
VFA, mol/100 mol					
Acetate (A)	65.86	65.81	67.03	0.40	0.36
Propionate (P)	21.46	21.81	20.36	0.40	0.27
Butyrate	10.19	10.19	9.90	0.40	0.97
Isobutyrate	0.46	0.47	0.55	0.07	0.60
Valerate	0.95	0.87	1.01	0.03	0.07
Isovalerate	0.77	0.69	0.75	0.07	0.94
Caproate	0.32	0.16	0.40	0.05	0.11
A:P	3.10	3.05	3.34	0.07	0.14
Protozoa (/µL)	622	967	1039	77	0.49

[1] Data presented are least square means

3.4.3. Results

Ruminal Fermentation Characteristics, Duodenal Flows and Degradabilities

Total VFA concentration in the rumen fluid as well as individual VFA concentrations or molar proportions (Table 2) were not significantly affected by the monoterpene blend. One can only notice a trend to a decrease (p=0.07) in the LOW group for the molar proportion of valerate. Ammonia nitrogen ruminal concentration and protozoa numbers were not modified by monoterpene blend, neither. Alimentary and duodenal flows of the DM and OM (Table 3) were not affected by monoterpene blend. The same results were observed for NDF and ADF. Correspondingly, the ruminal digestion of DM, OM, NDF and ADF were not affected significantly by monoterpene blend. In this trial, the monoterpene blend did not affect the ruminal metabolism of CP, however a lower value of ruminal digestion of CP was observed in HIGH group. The efficiency of microbial protein synthesis (EMPS) and microbial nitrogen (Nmic) entering in the duodenum were not significantly affected by monoterpene blend.

Terpene Distribution

The goats in the LOW group ingested 364.4 (SE = 21.0) µmol/ day of linalool, 295.9 (SE = 17.0) µmol/ day of p-cymene, 129.0 (SE = 7.4) µmol/ day of α-pinene and 17.8 (SE = 1.0) µmol/ day of β-pinene, which provided duodenal flows of 0.32 (SE = 0.58) µmol/ day of linalool 9.69 (SE = 2.33) µmol/ day of p-cymene, 2.99 (SE = 0.62) µmol/ day of α-pinene and 3.70 (SE = 1.35) µmol/ day of β-pinene. The goats in the HIGH group ingested 3.23 (SE = 0.59) mmol/ day of linalool, 2.62 (SE = 0.48) mmol/ day of p-cymene, 1.14 (SE = 0.21) mmol/ day of α-pinene and 157.5 (SE = 28.7) µmol/ day of β-pinene, which provided duodenal flows of -0.01 (SE = 0.39) µmol/ day of linalool 98.9 (SE = 57.8) µmol/ day of p-cymene, 36.0 (SE = 22.1) µmol/ day of α-pinene and 40.9 (SE = 24.2) µmol/ day of β-pinene. Analysis of duodenal content showed a clear modification of dietary terpene composition (Table 4) in both LOW and HIGH groups, due to the total disappearance of linalool and the relatively high recovery rate of β-pinene, 7-fold higher than for α-pinene and p-cymene. In addition, two unknown compounds, with Kovats indices of 942 and 1022, were detected in the duodenal digesta of both LOW and HIGH groups. The analysis of blood samples indicate only the presence of linalool in trace amounts.

Table 3: Nutrient daily flows and digestibilities in dairy goats fed a TMR with 0 (CTRL), 50 (LOW) or 500 µL/kg DM (HIGH) of a terpene blend

Item	Treatment			SEM	P <
	CTRL (N =2)	LOW (N =3)	HIGH (N =5)		
DM					
Intake, g/d	2595.50[1]	2695.70	2389.00	105.42	0.48
Duodenal flow, g/d	1423.70	1552.80	1524.50	71.56	0.85
Ruminal digestibility, %	45.04	42.39	36.26	1.84	0.12
OM					
Intake, g/d	2381.90	2473.30	2193.40	96.61	0.48
Duodenal flow, g/d	1123.70	1224.70	1147.80	55.08	0.81
Ruminal digestibility, %	52.73	50.48	47.70	1.38	0.39
NDF					
Intake, g/d	1136.50	1193.00	1038.90	46.77	0.38
Duodenal flow, g/d	492.32	548.25	490.40	20.03	0.48
Ruminal digestibility, %	56.60	53.99	52.11	1.90	0.72
ADF					
Intake, g/d	602.85	632.97	546.43	24.68	0.33
Duodenal flow, g/d	306.98	347.63	303.69	13.38	0.38
Ruminal digestibility, %	48.99	45.02	43.50	0.88	0.75
CP					
Intake, g/d	337.67	347.86	308.35	14.06	0.49
Ruminal degradability, %	45.03	45.72	40.77	2.44	0.68
N total, duodenal flow, g/d	57.37	62.26	61.23	3.26	0.89
Nmic [2], duodenal flow, g/d	27.05	31.29	31.07	2.12	0.78
NH3, duodenal flow, g/d	0.62	0.66	0.81	0.07	0.54
N alimentary [3]	29.70	30.31	29.35	1.80	0.98
EMPS [4]	23.62	25.58	26.99	1.10	0.56

[1] Data presented are least square means

[2] Microbial nitrogen

[3] Estimated from subtraction of duodenal total N from duodenal ammonia and microbial nitrogen

[4] Efficiency of microbial protein synthesis as expressed (g microbial nitrogen /kg OM apparently degraded in the rumen)

Table 4: Molar composition of dietary and duodenal terpenes in dairy goats fed a TMR with 50 (LOW) or 500 µL/kg DM (HIGH) of a terpene blend

Composition	linalool	p-cymene	α-pinene	β-pinene
Dietary	45.15	36.67	15.98	2.20
Duodenal, LOW	0	12.44	8.82	78.74
Duodenal, HIGH	0	11.32	9.41	79.27

Dry Matter intake, Milk Performance and Milk Composition

The DMI and its percentage to BW were not affected significantly by monoterpene blend (table 5). The supplement of diets with monoterpene blend did not affect significantly the milk production and 4% FCM yield. However milk protein content was modified by monoterpene blend (P=0.01), the highest milk protein content was observed in HIGH group (table 5). Milk fat content and milk yield as well as milk protein yield remained similar in HIGH and LOW groups comparing to CTRL. Somatic cells content of milk tended to be slightly higher in HIGH group. FA proportion in milk fat was not affected significantly by monoterpene blend (table 6), except for C16:0 and $_{C9}$-C16:1 that exhibited a trend to be lowered in both groups receiving monoterpene blend.

3.4.4. Discussion

The high incorporation level of monoterpene blend in this trial resulted in a daily amount of terpenes ingested of 1154 mg/ day, which is much higher than the dose of 110 mg/ day used by Newbold et al.(2004) in sheep and the doses of 750-4000 mg/ day used by Benchaar et al., (2006a,b, 2007) in dairy cows. Nevertheless, such comparisons are hampered by the differences in terpene structure between our blend and the essential oils or commercial terpenes blends studied *in vivo* which contain large amounts of monoterpenes with a phenolic hydroxyl group, carvacrol and thymol in particular.

Table 5: Dry matter intake and production parameters of dairy goats fed a TMR with 0 (CTRL), 50 (LOW) or 500 µL/kg DM (HIGH) of a terpene blend

Item	Treatment			SEM	P <
	CTRL (N=6)	LOW (N=10)	HIGH (N =10)		
DMI, g/d	2684 [1]	2742	2683	46	0.86
DMI, % of BW	3.83	3.90	3.93	0.07	0.89
Milk production, kg/d	3159	3347	3122	98	0.46
4% FCM, kg/d	2807	3075	3007	99	0.58
Milk Composition, g/L					
Fat	34.63	34.18	35.40	0.55	0.74
Protein	33.37 [ab2]	32.05 [b]	33.90 [a]	0.24	0.01
SCC, 10^3/mL	905	585	1337	123	0.06
Milk yield, g/d					
Fat	103.6	115.4	116.1	4.04	0.56
Protein	105.2	105.8	106.4	3.12	0.97

[1] Data presented are least square means.

[2] Means within a row with different superscripts differ (P < 0.05).

Rumen Fermentation

Most rumen fermentation parameters were not affected by the monoterpene blend though the group with the HIGH treatment had a trend to an increase in acetate molar concentration and acetate: propionate ratio, especially 3 and 7h after the morning meal (fig. 1). Individual VFA concentrations tended to be lower 1h after the morning meal in the goats fed the high level of terpenes than in control goats and this trend reversed 7h after the meal, suggesting that terpenes slowed DM degradation and subsequent VFA production and, by so doing, flattened the curves of VFA concentrations against time. However, our results are quite in agreement with most published studies in which no significant effect of EO on VFA production or VFA molar proportions was reported in sheep, growing beef steers and dairy cattle (Benchaar, et al., 2006a,b, 2007, Wallace, et al., 2002, Newbold, et al., 2004).

Table 6: Milk fatty acids composition in dairy goats fed a TMR with 0 (CTRL), 50 (LOW) or 500 µL/kg DM (HIGH) of a terpene blend

Fatty acid	Treatment			SEM	P<
	CTRL, (n=6)	LOW, (n=10)	HIGH, (n=10)		
$C_{4:0}$	1.30 [1]	1.12	1.28	0.051	0.29
$C_{6:0}$	1.90	1.84	1.86	0.039	0.86
$C_{8:0}$	2.58	2.68	2.55	0.049	0.49
$C_{10:0}$	10.76	11.14	10.76	0.170	0.57
$C_{11:0}$	0.40	0.35	0.38	0.013	0.29
$C_{12:0}$	5.55	5.70	6.08	0.169	0.45
$C_{13:0}$	0.25	0.23	0.28	0.013	0.34
$C_{14:0}$	12.02	12.29	12.74	0.156	0.19
$iC_{14:0}$	0.17	0.21	0.22	0.012	0.22
c9-$C_{14:1}$	0.19	0.20	0.21	0.010	0.81
$C_{15:0}$	1.54	1.54	1.60	0.039	0.81
ai $C_{15:0}$	0.45	0.52	0.52	0.022	0.43
$C_{16:0}$	34.19	32.52	31.20	0.537	0.10
i $C_{16:0}$	0.44	0.46	0.47	0.012	0.92
c9-$C_{16:1}$	0.73	0.60	0.67	0.022	0.06
$C_{17:0}$	1.07	1.09	1.06	0.015	0.90
ai $C_{17:0}$	0.49	0.53	0.51	0.017	0.61
$C_{18:0}$	4.69	5.31	5.38	0.162	0.23
c9-$C_{18:1}$	12.68	12.94	13.43	0.296	0.61
c11-$C_{18:1}$	0.43	0.46	0.48	0.012	0.27
c12-$C_{18:1}$	0.17	0.14	0.15	0.006	0.34
t6+t7+t8-$C_{18:1}$	0.09	0.08	0.09	0.003	0.83
t9-$C_{18:1}$	0.12	0.12	0.12	0.002	0.89
t10-$C_{18:1}$	0.15	0.15	0.17	0.007	0.33
t11-$C_{18:1}$	0.63	0.69	0.70	0.029	0.71
t12-$C_{18:1}$	0.15	0.15	0.15	0.006	0.97
C6+t13-$C_{18:1}$	0.21	0.23	0.22	0.009	0.85
t15- $C_{18:1}$	0.46	0.48	0.48	0.016	0.81
t16- $C_{18:1}$	0.13	0.14	0.13	0.004	0.79
c9, t11-$C_{18:2}$	0.38	0.37	0.37	0.010	0.94
w-6, $C_{18:2}$	2.41	2.43	2.35	0.054	0.84
w-3, $C_{18:3}$	0.61	0.62	0.60	0.018	0.94
w-6, $C_{18:3}$	0.0	0.0	0.01	0.002	0.81
$C_{19:0}$	0.12	0.11	0.11	0.003	0.85
$C_{20:0}$	0.12	0.12	0.12	0.004	0.79
c11-$C_{20:1}$	0.04	0.03	0.03	0.002	0.67
c5-$C_{20:4}$	0.10	0.12	0.12	0.007	0.69
C21:0	0.05	0.06	0.05	0.004	0.58
C22:0	0.06	0.06	0.05	0.004	0.59
Sum (SATFA[2])	78.14	77.90	77.20	0.344	0.53
Sum (MUFA[3]-cis)	14.22	14.38	14.97	0.313	0.61
Sum(MUFA-trans)	1.73	1.84	1.85	0.049	0.61
Sum (PUFA[4])	3.50	3.53	3.46	0.075	0.91
Unknown	2.20	2.11	2.30	0.058	0.37

[1] Data presented are least square means, in % total fatty acids
[2] Saturated fatty acids
[3] Monounsaturated fatty acids
[4] Polyunsaturated fatty acids

Duodenum Nutrient Flows and Degradabilities

Feed DM Intake was not modified by the monoterpene blend, whatever the incorporation level. The literature (Benchaar et al., 2006a; Dziba and Provenza, 2008; Estell, et al., 1996, 2000, 2002; Schwartz et al., 1980) shows no clear relationship between essential oils and feed intake, though the type of terpenes, in particular oxygenated compounds, and their incorporation level to the diet appear to be influential. In our study, there was no significant effect of added terpenes on rumen degradability of any dietary constituent as well. The published studies on the effect of dietary terpenes or essential oils claimed to be biologically active on rumen digestion have given inconsistent results (Benchaar et al.2006b, 2007; Welch, 1981; Connolly et al., 1980).

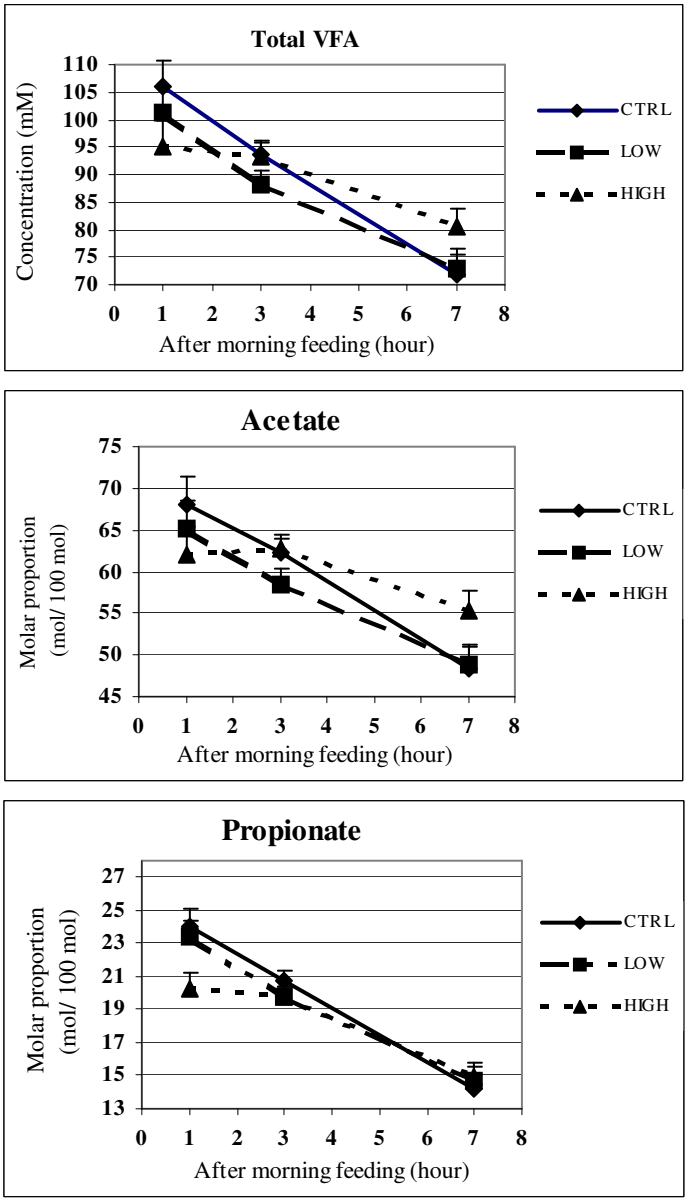
In spite of a lower CP ruminal degradability, the trend for a higher duodenal microbial nitrogen flow in HIGH group might be due to a more efficient utilization of nitrogen in the rumen, as suggested by the higher EMPS in this group compared to other ones. This observation is in agreement with those observed on the pattern of VFA production in the rumen. As mentioned above, high dose of monoterpene blend induced a slowing in the production rate of VFA resulting in their longer persistence in the rumen (fig.1). This could be led to a better balance between the energy and the nitrogen for the bacteria leading to a higher EMPS in HIGH groups compared to other ones. No effect of essential oils has been reported on EMPS *in vivo* (Benchaar et al., 2007; Newbold et al., 2004). Only a improved microbial protein synthesis followed by a higher duodenal microbial nitrogen flow has been reported by (Kim et al., 2006) in sheep when rice straw was replaced with wormwood, a plant rich in terpene.

Milk Composition and Fatty Acid Profiles

The monoterpene blend did not significantly alter milk production or milk composition, even at the high input level. The greater milk protein content with treatment HIGH may be related to the greater duodenum microbial nitrogen flow while the decrease in milk protein content with treatment LOW came through dilution in a higher milk yield. The influence of essential oils on milk yield and composition is poorly documented. In two recent studies (Benchaar et al, 2006b; Benchaar, 2007) supplementing the diet of dairy cows with terpenes did not affect the milk production and composition. The lack of significant differences in milk FA profile between treatments was consistent with the absence of effect on rumen parameters,

suggesting that the rumen metabolism of FA, especially biohydrogenation, was unchanged by our monoterpenes blend.

Figure 1: Molar concentration of total VFA and molar proportions of acetate and propionate 1h, 3h, and 7h after morning meal in dairy goats fed a TMR with 0 (CTRL), 50 (LOW) or 500 µL/kg DM (HIGH) of a terpene blend



Milk Composition and Fatty Acid Profiles

The monoterpene blend did not significantly alter milk production or milk composition, even at the high input level. The greater milk protein content with treatment HIGH may be related to the greater duodenum microbial nitrogen flow while the decrease in milk protein content with treatment LOW came through dilution in a higher milk yield. The influence of essential oils on milk yield and composition is poorly documented. In two recent studies (Benchaar et al, 2006b; Benchaar, 2007) supplementing the diet of dairy cows with terpenes did not affect the milk production and composition. The lack of significant differences in milk FA profile between treatments was consistent with the absence of effect on rumen parameters, suggesting that the rumen metabolism of FA, especially biohydrogenation, was unchanged by our monoterpenes blend.

Duodenal Terpene Flows

A very small fraction of the terpenes ingested was recovered in duodenal digesta, 2.1% and 2.5% in average in the LOW and HIGH groups. In addition, the terpene molar composition changed strikingly from the entrance into the rumen to the passage through the duodenum, in a similar way in both supplemented groups. The disappearance of linalool and the increase in β-pinene proportion were the major changes and the resulting hierarchy among terpenes in terms of apparent degradabilities in the rumen was well in agreement with previous *in vitro* trials, where 24h-incubations with mixed rumen microorganisms at initial concentrations of 3.33 or 4 ppm resulted into the loss of 98% of linalool, 65% of p-cymene, 80% of α-pinene, and 70% of β-pinene. In the present trial, the major discrepancy with these *in vitro* experiments was the higher rates of disappearance observed for linalool, p-cymene and α-pinene.

In these preliminary batch incubations, terpenes were partly solubilised in the aqueous phase and subjected to bioconversion by the rumen microflora but also partly engaged into hydrophobic interactions in macromolecules and feed particles, or volatilized in the gas volume above. In discussing our *in vivo* observations, we must take into account further partionning. Terpene volatility allowed their transfer to the gas phase within minutes, thus favored losses during rumination and eructation, as noticed in wild mule deers kept on big sagebrush (*Artemisia ridentate, L*) (Cluff et al., 1982). Linalool data illustrated a additional way for soluble compounds, the passage through the rumen wall into the blood system, with a possible exposure to the anaerobe facultative microflora colonizing rumen papillae. These

escape routes may account for part of the differences between *in vivo* and *in vitro* results. However, the extensive adaptation of rumen microflora to terpene ingestion was, in all likelihood, the main reason for the very low recovery rates observed at the duodenum, compared to in vitro batch incubations. The new compounds might be ethyl-hexanoate and 2-methyl heptane-1-ol, two compounds produced through the biodegradation of linalool.

3.4.5. Conclusion

The long-term adaptation of dairy goats to the monoterpene blend resulted into an absence of effect on rumen function, dietary constituent degradabilities and production performances in all supplemented groups. The milk fatty acid composition remained unchanged as well. All four terpenes appeared to undergo an extensive degradation in the rumen. However, the differences of apparent degradability between them induced significant changes in the dietary terpene profile.

Discussion générale

L'objectif de cette thèse était d'étudier dans une première étape, le métabolisme des mono- et sesquiterpènes en milieu du rumen *in vitro*, ainsi que l'effet de certains facteurs de variations (le type d'inoculum (riche en fibre vs riche en amidon) ; deux groupes majeurs de bactéries ruminales (Gram +, Gram -) et le potentiel redox) sur le métabolisme des terpènes en milieu fermentaire. Dans une deuxième étape, nous avons effectué un essai sur chèvres laitières pour étudier le devenir ruminal de certains terpènes, leur impact sur le métabolisme ruminal, en particulier sur la digestion des parois végétales, et finalement leurs effets sur la production et la composition du lait.

Optimisation de l'extraction des terpènes par SPME

La première difficulté rencontrée dans l'étude de terpènes, était leur extraction des différentes matrices biologiques. La méthode initialement utilisée comporte une extraction par un mélange de solvants organiques suivie d'une analyse en CPG, et est une opération longue et coûteuse. De plus, la limite de détection de cette méthode est élevée du fait d'une récupération incomplète des composés volatils et de leur dilution dans un volume important de solvant. Ceci nécessite d'utiliser une concentration élevée de terpènes dans les différents milieux *in vitro* qui pourrait induire certains problèmes importants comme un effet toxique sur les microorganismes. Dans les études de la dégradation de terpènes en groupe (plusieurs terpènes dans une culture commune) par les microbes, une concentration élevée de terpènes peut compliquer encore plus l'interprétation des résultats obtenus en raison de différentes activités toxiques de terpènes sur les microbes. Ces problèmes nous ont amenés à utiliser la technique de la SPME nécessitant une optimisation préliminaire des facteurs de variation déterminant l'efficacité d'extraction.

Les facteurs de variation de l'efficacité de la SPME

Quatre facteurs de variation, le pH, la température de la matrice, la durée d'extraction et la force ionique (la concentration de NaCl dans la matrice) de l'efficacité de la SPME dans deux matrices (milieu de fermentation et le sang) ont été étudiés au travers de 2 essais. Nous avons montré une efficacité supérieure de la SPME pour des pH voisins de la neutralité. La fonction du pH de la matrice sur l'efficacité de la SPME n'est pas bien connue, cependant il semble qu'aux pH acides les groupes fonctionnels des terpènes deviennent plus hydrophobes, favorisant l'affinité des terpènes pour les groupes hydrophobes de la matrice, ce qui réduit

leur disponibilité dans la matrice (Juven et al., 1994; Skandamis et Nychas, 2000). Par ailleurs, nous avons observé une interaction entre la nature des terpènes et la température, indépendamment de la matrice biologique considérée : une température élevée a favorisé l'efficacité d'extraction des terpènes oxygénés mais a réduit celle des terpènes hydrocarbones. Le même type d'interaction entre la nature des terpènes et la durée d'extraction a aussi observé, les durées d'extraction longues favorisant l'efficacité d'extraction des terpènes oxygénés, au contraire des hydrocarbones pour lesquels une période courte d'extraction est préférable. Dans la SPME, l'extraction maximale est autour du point d'équilibre de la concentration du composé cible entre la matrice à extraire d'un côté (liquide, gaz, solide-gaz, liquide-gaz) et la fibre de la SPME de l'autre coté. Les valeurs inférieurs à ce point definissent la zone critique sensibles à la température et à la durée d'extraction.

La température intervient sur l'extraction par SPME tout d'abord par accroissement de l'énergie de mouvement des molécules qui permet de se rapprocher du point d'équilibre (extraction maximale). Inversement, une température élevée réduit la capacité de la fibre de SPME à absorber les composés les plus volatils, ce qui conduit à réduire la quantité de terpènes extrait. La température optimale pour chaque molécule est donc un compromis entre ces deux phénomènes en fonction du degré de volatilité du terpène considéré. Dans les mélanges composés des deux groupes de terpènes (hydrocarbones et alcools), le point optimal pour chacun des paramètres à appliquer dans la SPME était donc un compromis entre les points optimaux de chacun de terpènes.

La différence de comportement des terpènes hydrocarbones et des ceux oxygénés en fonction du temps et de la température dans la SPME provient de leurs caractéristiques physico-chimiques. Le facteur le plus discriminant est la solubilité supérieure des terpènes oxygénés dans l'eau. Ceci réduit la disponibilité de ces molécules dans l'espace de tête et ralentit la vitesse d'équilibre entre la matrice liquide et l'espace de tête. Dans ces conditions, le point d'équilibre pour ces terpènes se déplace vers la droite du graphique sur l'axe de température ou de durée d'extraction, à l'inverse des hydrocarboness faiblement solubles dans l'eau. Par ailleurs, des différences individuelles intragroupes de terpènes peuvent être expliquées par le degré de volatilité de chacune de ces molécules, qui est en fonction de leur poids moléculaire, de leur point d'ébullition etc. : les molécules les plus volatiles arrivent au point d'équilibre à une température inférieure et en un temps plus court.

La SPME-GC comme méthode d'analyse quantitative

La SPME-GC testée sur 7 monoterpènes s'est avérée linéaire dans une gamme de concentration de 55.6 jusqu'à 555.8 ppb en milieu fermentaire (article 1) avec un R^2 ajusté moyen de 0.98. Dans le sang, la linéarité de la SPME-GC d'un mélange de 4 terpènes (α-pinène: 0.48, β-pinène:0.07, p-cymène: 1.10 et linalool: 1.35 mol/L) a été étudiée en comparant étalonnage externe et interne dans une gamme de concentration de 1/15000 à 1/1000 de la concentration initiale. Un simple étalonnage externe a conduit à une faible linéarité avec un R^2 ajusté moyen de 0.83 du fait de la complexité du sang. Au contraire, l'utilisation du limonène comme étalon interne a amélioré nettement la linéarité (R^2 ajusté de 0.98).

La répétabilité de la SPME-GC avec un écart-type moyen observé (7.7 et 7.9%) en concentrations basse et haute (55.6 et 555.8 ppb) respectivement en milieu fermentaire, et de 7.0 et 10.2% pour les concentrations basse et haute (1/5000 et 1/10) dans le sang, montre que la SPME-GC peut être utilisée pour des analyses quantitatives. Toutefois, il faut souligner que le milieu fermentaire est aussi considéré comme une matrice complexe contenant des macromolécules ou particules (milieu non homogène), cequi peut créer des variations inter-échantillon. Nous avons démontré cette variabilité de la matrice (milieu fermentaire) en récupérant des taux variables des terpènes dans différentes matrices par des surcharges. Nous avons également constaté une variabilité significative provenant de la matrice (le sang) par l'étalonnage interne. Cet effet de la matrice peut être considéré sous deux types : un effet immédiat dont la viscosité de la matrice pourrait être représentative de cet effet et un effet à long terme comme l'interaction hydrophobe entre les terpènes et les groups hydrophobes de la matrice. Dans les analyses quantitatives, les comparaisons doivent donc être entre les matrices identiques pour éviter ces types de variations. Dans le cas d'utilisation des standards pour l'étalonnage, il faut utiliser l'étalonnage interne ou des surcharges, toutefois l'étalonnage par des surcharges ne prend pas en compte la variabilité de la matrice en long terme. Utilisation d'étalonne interne peut ajuster les deux types de variabilité matricielle seulement dans le cas où la propriété physico-chimique d'étalonne soit beaucoup plus proche de celle de la molécule cible.

Une fois optimisée, la SPME a présenté un seuil de quantification très inférieur à celui de la méthode d'extraction liquide-liquide. Elle a permis de réduire la concentration initiale des terpènes dans les matrices d'un facteur 150 par rapport à la méthode d'extraction liquide-

liquide. Ceci a permis de grouper les terpènes sans risque d'effet toxique sur les microbes ou d'interactions compétitives entre terpènes lors de la fixation sur la fibre de SPME.

Le métabolisme ruminal des terpènes

Nous avons étudié le métabolisme de plusieurs terpènes *in vitro* et *in vivo* au travers de trois expérimentations (deux *in vitro* et une *in vivo*). *In vitro*, nous avons observé des différences importantes entre les taux de disparition des terpènes oxygénés et ceux des terpènes non-oxygénés. Ces derniers ont apparemment été largement dégradés tandis que les terpènes oxygénés ont présenté des taux de récupération importants (>80%), à l'exception du linalool qui a complètement disparu. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Broudiscou et al. (2007). Pour la plupart des terpènes testés, les taux de récupération ont été semblable dans les incubations à 500 ppm extraites à l'aide de solvants et celles à 3.33 ppm traitées par SPME. *In vivo* (EXP3), le classement des 4 terpènes selon leur dégradabilité ruminale apparente était semblable à celui observé *in vitro*. Par ailleurs, pour un terpène donné, les taux de récupération sont restés semblables aux deux doses d'apport (50 et 500 µl/kg MSI).

Facteurs de variation de la dégradabilité apparente des terpènes dans le jus de rumen

Plusieurs facteurs de variation sont susceptibles d'avoir influencé le métabolisme des terpènes dont les plus importants sont l'interaction avec la matrice, la dégradation d'origine microbienne, l'absorption et l'évaporation, les deux derniers ne pouvant se produire qu*'in vivo.*

La première explication pour une interaction entre la matrice et les terpènes est la disparition de ces terpènes proportionnelle aux quantités apportées. Ce phénomène ne semble pas être en relation avec la dégradation microbienne puisque la dégradation proportionnelle est indépendante de la concentration de terpènes administrée (EXP 1 et EXP3), tandis que l'action des microorganismes est toujours differente en apport de differentes doses des terpènes. Hormis la capacité limitée des microorganismes pour la dégradation de terpènes, leur activité (la dégradation de terpènes) dépend de la concentration de terpènes avec lesquels ils sont en contact (études bibliographiques). Un autre élement justifiant d'effet de la matrice sur la disparition des terpènes est la différence significative entre terpènes oxygénés et terpènes hydrocarbones en terme de dégradabilité, ce que nous avons démontré dans la

première expérience *in vitro*. En effet, cette différence peut être en partie attribuée à la nature chimique des molécules qui provoque d'action différente de la matrice. Les terpènes oxygénés étudiés dans nos essais sont des alcools ou des alcools oxyds, qui sont beaucoup plus solubles dans l'eau que les terpènes hydrocarbones, ce qui peut provoquer l'accumulation de ces derniers autour des groupes hydrophobes des macromolécules, des bactéries (Cox et al., 2000; Carson et al. , 2002) et des particules présentes dans la matrice et faire des liaisons hydrophobes avec ces groupes. Ceci peut expliquer en partie une faible récupération de terpènes hydrocarbones comparée à celle des terpènes oxygénés. Ainsi, *in vitro* (EXP2), nous avons démontré un effet direct de la matrice sur la disparition des terpènes en incubant des terpènes dans trois types d'inoculum (inoculum complet, inoculum centrifugé et solution tampon). Les deux derniers étaient des cultures sans microorganismes pourtant environs 60-70% de terpènes ajoutés dans ces matrices sont disparu après 24 h d'incubation, ce qui confirme une interaction entre la matrice et les terpènes. Dans la solution tampon dont la composition est présenté dans les EXP1 et EXP1, Les cellobiose et triptone sont susceptible de d'avoir interaction avec les terpènes.

Selon les résultats observés dans nos études, les microorganismes du rumen jouent un rôle important dans le métabolisme des terpènes testés et certainement une partie de la disparition de terpènes en milieu fermentaire est due aux microorganismes du rumen. Ceci peut être prouvé par l'apparition des nouveaux pics observés dans l'ensemble des essais *in vitro* et *in vivo*. Dans l'EXP2 (*in vitro*), une comparaison entre trois matrices (inoculum complet, surnageant et solution tampon, mentionné ci-dessus) en terme de disparition de terpènes a démontré une différence significative entre l'inoculum complet et les deux autres matrices sans microbes. En effet, une disparition plus importante a été enregistrée dans l'inoculum complet pour la plupart des terpènes testés par rapport aux autres, ce qui signifie une dégradation microbienne de ces terpènes. En plus, cette dégradation microbienne correspond bien à l'apparition des nouveaux pics quel que soit le terpène testé dans l'inoculum complète. *In vivo* également une modification du profil des terpènes ingérés dans le rumen prouve une intervention microbienne puisque nous avons observé des taux de disparition complètement différents des terpènes ayant des propriétés physico-chimiques assez proches (α-pinène et β-pinène).

Cependant le degré de la dégradation microbienne des terpènes est différent, ceci étant au moins très marqué entre deux types de terpènes (les terpènes oxygénés et les terpènes hydrocarbones). Il apparaît que les terpènes oxygénés sont plus résistant à la dégradation microbienne par rapport aux hydrocarbones. Jusqu'à présent, la biodégradation de plusieurs

monoterpènes hydrocarbones a été démontrée en anaérobiose (Foss et al.,1998; Harder et Probian, 1995; Harms et al., 2000; Heyen et Harder, 1998, 2000; Miyazawa et al., 1996). Ces données sont cohérentes avec nos résultats. En effet, la disparition plus importante des hydrocarbones par rapport aux terpènes oxygénés (*in vitro*, EXP1) peut être en partie expliquée par la dégradation du premier groupe par les microorganismes du rumen. Parmi les terpènes oxygénés, seule la biotransformation du linalool a été rapportée en anaérobiose (Harder et Probian, 1995; Pavlostathis et Misra, 1999). Ceci est également en accord avec nos résultats dans l'ensemble des essais *in vitro* et *in vivo*. L'absence de biodégradation des terpènes oxygénés, à l'exception du linalool, peut être liée à leur activité antimicrobienne plus intense que celle des terpènes non oxygénés (Kalemba et Kunica, 2003). Toutefois, nos données montrent l'intervention d'un autre facteur sur la biodégradation de terpènes qui est la structure moléculaire de ces molécules. Il semble que la structure moléculaire linéaire favorise la dégradation microbienne, expliquant le cas du linalool qui est le seul terpène complètement dégradé parmi les terpènes oxygénés.

L'absorption (dans le sang) et l'évaporation sont deux facteurs de variation renforçant la disparition des terpènes dans le contenu de rumen. Ces deux facteurs sont uniquement valables *in vivo*, c'est pourquoi nous avons enregistré une disparition plus importante des terpènes testés *in vivo* qu'*in vitro*. Nous avons récupéré des taux inférieurs *in vivo* (au niveau duodénal) notamment dans le cas de l'α-pinène et du p-cymène (2.5, 3.4 % de la quantité ingérée respectivement), par rapport à ceux observés *in vitro* (EXP1) (19.6, 29.7 %), (articles 6,3). Cette valeur pour β-pinène était 22.2% *in vivo* et 29% *in vitro*. Néanmoins, dans l'essai *in vivo*, l'analyse par SPME-GC du sang prélevé 8 h après le repas matinal, afin suivre leur transfert après l'absorption, n'a montré que des traces de linalool. Ceci peut être simplement expliqué par leur concentration basse dans le sang, inférieure à la limite de détection par notre méthode de SPME-GC, à cause de la viscosité élevée du sang. La quantité très faible de linalool retrouvée dans le sang, qui constituait la plus grande partie (proportion molaire) du mélange ingéré, confirme cette hypothèse. Toutefois l'absence des terpènes hydrocarbones peut avoir d'autres explications, comme la formation de complexes avec certains acides uroniques (glucuronique) afin faciliter leur excrétion sous forme conjuguée (Boyle et al., 1999). Ces complexes peuvent donc réduire exclusivement la disponibilité de terpènes à l'état libre dans le sang. En ce qui concerne l'évaporation des terpènes, ceci peut être provoqué par la rumination, la mastication et l'éructation (Cluff, et al., 1982). Ces processus peuvent être l'origine d'une perte importante des terpènes après l'ingestion, quelle que soit la volatilité de ces derniers.

Les facteurs de variation du métabolisme microbien des terpènes

Dans le deuxième essai *in vitro* (EXP2), nous avons étudié l'intervention de trois facteurs : le type d'inoculum (riche en fibre «N55») et riche en amidon «N25»), le type de microbe (Gram+ et Gram-) par l'ajout de l'antibiotique vancomycine (C, +VCO) et le potentiel redox, par l'ajout de cystéine (C, +CYS) sur le métabolisme des terpènes en milieu fermentaire. Ces facteurs ont été analysés en combinaison deux par deux (le type d'inoculum × le type de bactérie et le type d'inoculum × le potentiel redox).

En ce qui concerne l'effet du type d'inoculum sur la disparition de terpènes, nous avons observé une intensification de la disparition de la plupart des terpènes testés dans l'inoculum riche en parois végétales (N55), par rapport à l'inoculum riche en amidon (N25). Cette différence en terme de disparition des terpènes entre les deux types d'inoculum peut avoir deux origines: l'interaction avec la matrice et la dégradation microbienne. Comme discuté précédemment, une partie de la disparition des terpènes est liée à une interaction avec la matrice. Dans cette expérimentation nous avons ajusté l'effet immédiat de la matrice par des surcharges, cependant l'effet à long terme de la matrice (l'interaction hydrophobe entre les terpènes et la matrice) ne peut pas être corrigé par cet ajustement. Néanmoins, il faut noter que le nombre de groupements hydrophobes provoquant cette interaction (les protéines, les lipides et les glucides) est comparable entre les deux types d'inoculum. Par ailleurs, dans littératures, le facteur déterminant l'interaction entre la matrice et les terpènes est la richesse de la matrice en macromolécules. Par conséquent, nous pouvons conclure que la différence entre les deux types d'inoculum en terme de la disparition des terpènes est à forte probabilité d'origine microbienne. Sachant que les microorganismes adaptés au régime riche en fibre sont responsables principaux de la dégradation des terpènes aboutissant à une disparition intense dans l'inoculum N55. Ces résultats semblent être explicatifs aux résultats obtenus par Villalba et al. (2006) dont ils ont observé que les agneaux préfèrent la ration à base de pulpe de betterave (riche en hydrates de carbone structurels) à la place de la ration à base de l'orge (riche en hydrates de carbone solubles) en apport des terpènes dans la ration.

L'addition de l'antibiotique vancomycine n'a pas influencé la disparition des terpènes dans aucun des deux inoculums. Cela signifie que les bactéries impliquées dans le métabolisme de ces molécules sont plutôt des bactéries Gram -. En considérant l'élimination des bactéries Gram+ par la vancomycine, nous pouvons conclure que le rôle des bactéries Gram+ dans la dégradation des terpènes est négligeable est ce sont les bactéries Gram- qui

sont les responsables principaux du métabolisme des terpènes. Ceci peut être en relation avec leur résistance contre l'action antimicrobienne de terpènes grâce à leur paroi extérieure. De plus l'absence d'effet interaction entre le type d'inoculum et l'ajout de vancomycine signifie que l'action de cette dernière est indépendante de l'effet de la matrice.

Concernant l'effet du potentiel redox du milieu fermentaire, l'addition de cystéine a accru la disparition du β-ocimène (Z et E), de l'α-phellandrène et de l'α-terpinène par rapport au témoin. Le mécanisme d'action du potentiel redox sur le métabolisme du rumen n'est pas bien connu pourtant, il semble que le potentiel redox peut avoir un rôle important dans le métabolisme des terpènes notamment dans une condition anaérobiose. Comme discuté dans le chapitre 3, en absence de l'oxygène en anaérobiose, l'accumulation des équivalents redox issus de l'oxydation (libération de l'électron) de terpènes peut théoriquement réduire la dégradation de ces composés. En conséquence chaque modification au niveau d'équivalentes redox pourrait influencer la dégradation de ces molécules. Ceci peut être extrapolé en ajout de la cystéine qui a réduit le potentiel redox (50 mv). Cependant ces résultats montrent le potentiel redox jout un rôle important seulement sur le métabolisme des terpènes linéaires et monocycliques. Un effet d'interaction entre le type d'inoculum et le potentiel redox présent une intensification de la disparition des deux isomère de l'ocuménie et α-phellandrène par l'ajout de la cystéine dans l'inoculum N25. Ce résultat peut être expliqué par une diminution du potentiel redox avec la ration riche en amidon.

La cinétique de la disparition des terpènes mesurée à 3, 6 et 24h après l'incubation (EXP2), présente une disparition rapide pendent 3h après l'incubation qui rende difficile de mieux modéliser la cinétique à cause du faible nombre des points mesurés pendent cette période. Ce type de cinétique reste plus ou moins identique pour tous les terpènes testés et dans les deux types d'inoculum. Une disparition rapide au début de l'incubation peut être expliquée par une intervention de la matrice, puisque au but de 3h, cette disparition se ralenti rapidement et on arrive dans un niveau relativement plateau. Nous pouvons donc suggérer d'arriver à un équilibre entre les terpènes piégés dans la matrice par les liens hydrophobes et ceux libres au but de 3h. En supposant le rôle de deux facteurs sur la disparition des terpènes dans le milieu du rumen (effet matriciel et microbien), il semble qu'au début de l'incubation, l'effet de la matrice est dominant tandis qu'au but de 3 ou 6 h, la dégradation microbienne est la cause principale de la disparition des terpènes.

Les résultats obtenus de l'ensemble des données *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence que les microorganismes du rumen sont capables de métaboliser les monoterpènes et sesquiterpènes notamment les terpènes hydrocarbones. Nos observations sont en accord avec

celles observés dans les études *in vitro* concernant la biotransformation des terpènes souvent des hydrocarbones et aussi du linalool parmi les terpènes oxygénés dans les cultures d'enrichissement anaérobies. Cependant les analyses effectuées sur les échantillons de lait recueilli dans différentes zones géographiques ont révélé que les terpènes hydrocarbones sont dominants et que les terpènes oxygénés sont soit absents soit à l'état de traces. Dans la plupart des cas, l'α-pinène, le β-pinène, le p-cymène, le limonène (Viallon et al., 1999; Fernandez et al., 2003 ; Fedele et al., 2004 ; Tornambé et al., 2006), l'α-phellandrène, l'α-tujène, l'α-terpinène , le terpinolène (Tornambé et al., 2006), le β-myrcène et le γ-terpinène (Viallon et al., 1999) étaient les terpènes dominants dans le lait. Ces observations peuvent être en partie expliquées par la présence d'une faible proportion de terpènes oxygénés dans les pâturages ou une efficacité moindre des méthodes d'extraction appliquées envers les terpènes plus polaires (Mariaca et al., 1997).

Toutefois, les résultats obtenus dans nos études *in vitro* et *in vivo* peuvent aussi fournir une explication pour ces observations, comme discuté auparavant, une grande partie des terpènes hydrocarbones semble avoir disparu sans subir de dégradation microbienne dans le rumen. Il semble que ce type de terpènes échappe à la dégradation microbienne du rumen, en formant des complexes avec les macromolécules. Ces terpènes auront probablement la possibilité d'être libérés dans l'intestin par hydrolyse enzymatique, absorbés dans le sang et enfin transférés dans le lait. Par contre, les terpènes oxygénés semblent suivre un autre chemin. En général, ces terpènes sont beaucoup plus hydrophiles et naturellement solubles dans l'eau, donc ils auront plus de chance d'être absorbés dans le rumen. Dans l'essai *in vivo* nous avons retrouvé des traces de linalool dans le sang qui confirment cette hypothèse. Cependant, en dehors des explications ci-dessus, leur présence en faible quantité dans le lait peut avoir d'autres causes. Comme discuté dans la partie bibliographique, la plupart des terpènes oxygénés possèdent une activité antimicrobienne plus intense que les hydrocarboness et ils peuvent également être toxiques pour l'animal. Un processus de détoxification peut être la conjugaison de certains terpènes absorbés avec des acides, comme l'acide glucuronique, excrétés dans la bile (Boyle et al., 1999). Certains terpènes sont détoxifiés via l'oxydation par des enzymes à cytochrome P450 et deviennent encore plus solubles et susceptibles d'excrétion dans l'urine (Pass et al., 2001). Il existe également certaines lipoprotéines attachées à la paroi intestinale qui empêchent l'absorption des molécules toxiques (Sorensen et al., 2004).

Au vu de l'ensemble de résultats de nos essais, l'utilisation des monoterpènes en tant que biomarqueurs dans les produits animaux semble trouver certaines limites: les terpènes

oxygénés ne peuvent pas apporter beaucoup d'informations sur la ration, puisqu'une grande partie de ces molécules n'a pas la possibilité d'entrer directement dans le lait. En ce qui concerne les terpènes hydrocarbones, malgré leur transfert en quantité importante dans le lait, leur utilisation individuelle ne permettra pas de discriminer les laits selon l'origine géographique, puisque certains parmi les plus abondants, comme l'α-pinène, le β-pinène et le limonène, se trouvent en quantités relativement comparables dans différentes zones géographiques d'altitude et de plaine. Donc, la seule possibilité est d'utiliser le profil complet comprenant les molécules en fortes et faibles quantités et leurs proportions, sachant qu'une petite intervention microbienne dans le rumen pourra conduire à un profil complètement différent soit par la disparition de certaines molécules ou l'apparition d'autres, ce que nous avons démontré *in vivo*. En conséquence, la corrélation relativement faible entre profils observés dans la ration et dans le lait (Fedele et al., 2005b) peut être attribuée au métabolisme microbien dans le rumen ou un métabolisme hépatique variable selon le type de terpènes.

L'impact des terpènes sur le métabolisme des ruminants

Dans l'EXP *in vivo* (article 5), nous avons étudié l'effet d'un mélange de terpènes (TERP), apporté à deux doses (50 (LOW) et 500 (HIGH) µl/kg MSI), et composé d'α-pinène (15.16%), β-pinène (2.08%), p-cymène (34.26%), et linalool (48.5%) sur les bilans digestifs, et zootechniques chez des chèvres laitières en milieu de lactation. Les terpènes présents dans le mélange sont les principaux terpènes retrouvés dans le régime de printemps et d'hiver de l'élevage caprin dans le Basilicate qui setrouvent sous forme pur dans le commerce. De même, la dose faible (LOW) est comparable à celle ingérée par les chèvres dans les prairies naturelles du Basilicate. La raison du choix de ces doses était d'étudier le métabolisme de ces terpènes après ingestion, notamment dans le rumen, à dose comparable avec leur dose naturellement ingérée (LOW) et aussi d'évaluer la capacité du rumen à métaboliser ces terpènes à une dose plus élevée et son effet sur le bilan digestif du rumen et les performances des chèvres laitières.

Effet de TERP sur le métabolisme du rumen

Dans cette étude, aucun paramètre caractérisant les fermentations ruminales et aucun flux duodénal de parois, matière organique ou d'azote n'a été modifié. Néanmoins, une légère amélioration de l'efficacité de la synthèse de protéines microbiennes à dose forte (HIGH) de TERP a été observée, accompagnée d'une augmentation du flux duodénal d'azote d'origine

microbienne. Kim et al. (2006) ont rapporté une amélioration de l'efficacité de la synthèse de protéines microbiennes indirectement liée aux terpènes, en remplaçant de la paille de riz par l'armoise (plante riche en terpènes). Une amélioration de la synthèse de protéines microbiennes a également été rapporté par Yang et al., (2007) après apport de 5 et 2 g/ j d'huiles d'ail et de genévrier respectivement dans la ration des vaches laitières. En théorie, l'augmentation de la synthèse de protéines microbiennes dans le rumen est fonction de la disponibilité assez élevée de matière azotée sous forme d'acides aminés ou d'ammoniaque d'une part et la disponibilité de l'énergie d'autre part, ainsi que de l'équilibre entre les deux. Dans cette étude, Une concentration élevée de l'ammoniaque dans le rumen ainsi qu'un flux duodénal supérieur observé à la dose HIGH, pourrait confirmer la disponibilité élevée en azote. Toutefois, la concentration d'AGVT ne montre pas un effet bénéfique de la dose HIGH. Par conséquent, la réponse peut être liée à l'équilibre entre ces deux facteurs. En regardant l'évolution de la concentration d'AGVT à la dose HIGH, on peut conclure qu'une diminution relativement lente de cette concentration à la dose HIGH d'1 h à 7 h après le repas matinal par rapport aux animaux témoins peut entraîner un meilleur équilibre entre l'énergie et les matières azotées et par conséquent peut augmenter l'efficacité de la synthèse de protéines microbiennes.

Effet de TERP sur la production et la composition du lait

En ce qui concerne la production de lait, aucun effet significatif de TERP n'a pas été observé. Pourtant une production supérieure de lait dans le groupe LOW (+6%) par rapport aux autres groups est assez cohérent avec la MSI dans ce groupe. En conséquence, il apparaît que le TERP à dose modérée a provoqué une légère augmentation de la MSI conduisant à une amélioration de la production de lait. Concernant la composition du lait, la teneur en protéines a été affectée par l'addition de TERP dans la ration des chèvres laitières. Yang et al., (2007) ont enregistré une augmentation de TB et de la production journalière de matière grasse du lait mais aucun effet sur le TP après apport d'huiles essentielles d'ail et genévrier (5 et 2 g/ j) chez les vaches laitières. Cependant, Benchaar et al. (2007) n'ont rapporté aucun effet sur la composition du lait après incorporation de 750 mg/j de Crina dans la ration des vaches laitières. Malgré une augmentation numérique du flux duodénal des protéines microbiennes par TERP, une teneur inférieure en protéines du lait à la dose LOW peut être expliquée par un effet de dilution issue de l'augmentation de la production de lait dans ce groupe. Cependant une augmentation numérique du TP à la dose HIGH, est probablement en relation avec une

synthèse numériquement supérieure de protéines microbiennes dans le rumen dans à cette dose. Il existe des relations positives entre les protéines et les acides aminées arrivant dans l'intestin grêle et la teneur en protéines du lait, ceci a été démontré par des perfusions de protéines (Thomas, 1984) ou d'acides aminés (Girdler et al., 1976) dans la caillette.

En résumé, l'absence d'effet significatif du mélange de terpènes incorporé dans l'étude *in vivo* peut être expliquée par la faible activité antimicrobienne de ces molécules. Les trois terpènes présents dans le mélange (α-pinène, β-pinène, p-cymène) sont des monoterpènes hydrocarbones. Comme discuté auparavant (études bibliographiques), ces molécules n'ont qu'une activité antimicrobienne faible (Kalemba and Kunicka, 2003). De plus, le linalool, ainsi que les autres, a subi une dégradation microbienne qui peut protéger les microorganismes d'éventuels effets inhibiteurs. Une autre possibilité est l'adaptation de microflore du rumen au TERP. Dans l'essai *in vivo*, pour certains paramètres mesurés comme la MSI, la production de lait et sa composition, nous avons considéré une semaine d'adaptation. Cette période d'adaptation était plus longue pour les paramètres ruminaux et duodénaux (4 semaines). Une augmentation du nombre de cellules somatiques dans le lait dans le groupe HIGH pourrait représenter la concentration seuil pour d'éventuels effets toxiques sur l'animal.

Conclusion et perspectives

***** Ce travail est le premier du genre qui a étudié le métabolisme des terpènes par la microflore du rumen en utilisant des terpènes purs *in vitro* ainsi qu'*in vivo*, par la mesure du flux duodénal. Cependant, l'emploi de terpènes purs présente des contraintes telles que la disponibilité dans le commerce et le degré de pureté de ces produits.

* Les EXP d'optimisation ont bien prouvé que la SPME peut être considéré comme une méthode alternative à la méthode classique d'extraction liquide-liquide, pour les analyses de terpènes dans les milieux fermentaire et le sang. Toutefois, la complexité de ces matrices nécessite toujours d'appliquer les approches d'étalonnage interne ou de surcharges pour éviter les variations entre échantillons dans les analyses quantitatives.

* Dans cette étude, l'ensemble des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les microorganismes du rumen sont capables de dégrader les terpènes, notamment ceux de type hydrocarbones. Cette biodégradation a été prouvée par l'apparition des nouveaux pics dérivés de certains d'entre eux et considérés comme les produits du métabolisme microbien des terpènes. Par conséquent, ces résultats mettent en question la possibilité d'utiliser les terpènes en tant que marqueurs de l'origine des produits animaux.

* Une grand part de la disparition des terpènes, surtout les hydrocarbones dans le contenu de rumen, semble être liée à une interaction avec la matrice. Cette interaction probablement sous forme de liens hydrophobes entre les terpènes et les groupes hydrophobes dans le contenu de rumen, rend difficile l'étude du métabolisme de ces molécules, lequel étant purement attribué aux microorganismes.

* Parmi les facteurs déterminants du métabolisme microbien des terpènes, le type d'inoculum (considéré comme représentatif des bactéries cellulolytiques et amylolytiques) et le potentiel redox semblent s'associer à l'effet de la matrice. Par contre, l'effet de l'antibiotique est indépendant. En général, ces résultats suggèrent que les bactéries participant au métabolisme des terpènes sont principalement des bactéries Gram-. Parmi les bactéries adaptés au rigime riche en fibre et celui riche en amidon, les premiers semblent jouer le rôle principale du métabolisme microbien des terpènes.

- En ce qui concerne l'impact des terpènes sur le métabolisme du rumen, aucun effet inhibiteur n'a pas été enregistré *in vivo*, ce qui signifie l'absence d'effet toxique du mélange appliqué même à une concentration 10 fois supérieure à celle obtenue en situation de pâturage. Par contre, une modification de la teneur en protéines du lait peut être liée plutôt à un effet de dilution dû à la production de lait.

Les perspectives de cette étude sont les suivantes :

- Ce travail faisait partie d'une étude du métabolisme des terpènes ingérés par les petits ruminants sur prairies naturelles dans le Basilicate (Italie). Ces terpènes sont caractéristiques des régimes d'hiver et de printemps. Dans le régime d'été, selon les données de Fedele et al., le profil en terpènes est plus riche en sesquiterpènes. En conséquence, ce travail pourra être prolongé par l'étude du devenir métabolique de ces molécules et de leur impact sur la qualité des produits animaux.
- Malgré une période d'adaptation de 1-4 semaines considérée dans l'essai *in vivo*, le métabolisme de ces molécules ne peut être identique à celui dans la condition naturelle, puisque la microflore présente dans le rumen diffère de celle native en Basilicate. L'étude du devenir de ces composés lorsqu'ils sont incubés avec des microflores ruminales issues de cette région, peut-être plus spécialisées pour ces terpènes, pourra donner une image de leur métabolisme naturel chez ces animaux.
- Les résultats obtenus dans ces études ont montré l'intervention de deux facteurs principaux (matrice et dégradation microbienne) dans le métabolisme des terpènes en milieu fermentaire. Dissocier les effets de ces deux facteurs pourra donner une image claire de métabolisme microbien de ces molécules.
- Ce travail n'était qu'un début, limité à l'écosystème du rumen, dans l'étude du métabolisme de ces molécules durant leur transfert de l'aliment jusqu'au produit, chez les ruminants. Pour avoir une image plus précise de leur métabolisme global, il sera nécessaire d'analyser leur distribution dans les flux d'urine, fèces et de lait et d'identifier les métabolites éventuellement formés.

Références bibliographiques

Abraham, W. R., B. Stumpf, and K. Kieslich. 1986. Microbial transformation of terpenoids with 1-p-menthene skeleton. Applied Microbiology and Biotechnology 24: 24-30.

Abou Akkada, A. R., and K. El-Shazly. 1964. Effect of absence of ciliate protozoa from the rumen on microbial activity and growth of lambs. Applied Microbiology 12: 384-390.

Achten, C., A. Kolb, and W. Puttmann. 2001. Sensitive method for determination of methyl tert-butyl ether (mtbe) in water by use of headspace-spme/gc-ms. Fresenius Journal of Analytical Chemistry 371: 519-525.

Adda, J., and J. P. Dumont. 1974. Les substances responsables de l'arôme de fromage à pâte molle. Le Lait 54: 531-532.

Aeckersberg, F., F. Bak, and F. Widdel. 1991. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO2 by a new type of sulfate-reducing bacterium. Archives of Microbiology 156: 5-14.

Allen, K. G., D. V. Banthorpe, and B. V. Charlwood. 1977. Metabolic pools associated with monoterpene biosynthesis in higher plants. Phytochemistry 16: 79-83.

Amaral , J. A., A. Ekins, S. R. Richards, and R. Knowles 1998. Effect of Selected Monoterpenes on Methane Oxidation, Denitrification, and Aerobic Metabolism by Bacteria in Pure Culture. Applied and Environmental Microbiology 64: 520-525.

Ando, S., T. Nishidab, M. Ishidab, K. Hosodab, and E. Bayarub. 2003. Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. Livestock Production Science 82: 245-248.

Aranda, G., L. Moreno, M. Cortés, T. Prangé, M. Maurs, and R. Azerard. 2001. A new example of 1a-hydroxylation of drimanic terpenes through combined microbial and chemical processes. Tetrahedron 57: 6051-6056.

Arthur, C. L., and J. Pawliszyn. 1990. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. Analytical Chemistry 62: 2145-2148.

Baltussen, H. G., P. Janssen, and C. A. Sandra. 1997. A New Method for Sorptive Enrichment of Gaseous Samples: Application in air analysis and natural gas characterization. Journal of High Resolution Chromatography 20: 385-393.

Barcarolo , R., P. Casson , and C. Tutta 1992. Analysis of the volatile constituents of food by headspace GC-MS with reversal of carrier gas flow during sampling. Journal of High Resolution Chromatography 15: 307-311.

Bauer, K., D. Garbe, and H. Surburg. 2001. Common Fragrance and Flavour Materials: Preparation, Properties and Uses Wiley-VCH,, Weinheim.

Begala, M., L. Corda, G. Podda, M. A. Fedrigo , and P. Traldi. 2002. Headspace Solid-Phase Microextraction gas chromatography/mass spectrometry in the analysis of the constituents of Cannonau of Jerzu wine. Rapid Communication in Mass Spectrometry. 16: 1086-1091.

Benchaar, C., J. L. Duynisveld, and E. Charmley. 2006a. Effects of monensin and increasing dose levels of a mixture of essential oil compounds on intake, digestion and growth performance of beef cattle. Canadian Journal of Animal Science 86: 91-96.

Benchaar, C., H.V. Petit, R. Berthiaume, D. R. Ouellet, and J. Chiquette. 2003. Effects of Essential oil supplement on ruminal fermentation, rumen microbial population and in sacco degradation of dry matter and nitrogen in the rumen of lactating dairy cows. Canadian Journal of Animal Science 83: 637 (abstract).

Benchaar, C., H. V. Petit, R. Berthiaume, D. R. Ouellet, J. Chiquette, and P. Y. Chouinard. 2007. Effects of Essential Oils on Digestion, Ruminal Fermentation, Rumen Microbial Population, and Milk Composition in Dairy Cows Fed Alfalfa Silage or Corn Silage. Journal of Dairy Science 90: 886-897.

Benchaar, C., H. V. Petit, R. Berthiaume, T. D. Whyte, and P. Y. Chouinard. 2006b. 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: 4352-4364.

Bird, S. H., M. K. Hill, and R. A. Leng. 1979. The effects of defaunation of the rumen on the growth of lambs on low-protein-high-energy diets. British Journal of Nutrition 42: 81-87.

Bird, S. H., and R. A. Leng. 1978. The effects of defaunation of the rumen on the growth of cattle on low-protein high-energy diets. British Journal of Nutrition 40: 163-167.

Boontawan, A., and D. C. Stuckey. 2006. A membrane bioreactor for the biotransformation of alpha-pinene oxide to isonovalal by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671. Applied Microbiology and Biotechnology 69: 643-649.

Borchers, R. 1965. Proteolytic Activity of Rumen Fluid In Vitro. Journal of Animal Science 24: 1033-1038.

Bosset, J. O., U. Butikofer, R. Gauch, and R. Sieber. 1994. Caractérisation de fromages d'alpages subalpins suisses: mise en évidence par GC-MS de terpènes et d'hydrocarbures aliphatiques lors de l'analyse par ''Purge and Trap'' des arômes volatils de ces fromages. Schweiz Milchwirtsch Forsch 23: 37–41.

Bourbouze, A., and P. Donadieu. 1987. L'élevage sur parcours en régions méditerranéennes. In: A. Bourbouze and P. Donadieu (eds.) Options Méditerranéenne No. Série Etudes. p 11-100. CIHEAM-IAMM, Montpellier.

Box, G. E. P., and D. W. Behnken. 1960. Some new three level designs for the study of quantitative variables. Technometrics 2: 455-475.

Box, G. E. P., and N. R. Draper. 1975. Robust designs. Biometrika 62: 347-352.

Box, G. E. P., W. G. Hunter, and J. S. Hunter. 1978. Statistics for experimenters: An introduction to design, data analysis and model building. John Wiley, New York.

Box, G. E. P., and K. B. Wilson. 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. Journal of the Royal Statistical Society, Series B 13: 1-45.

Boyazoglu , J. G., and J. C. Flamant 1988. A note on the Mediterranean systems of animal production. In: Johnson (ed.) pastorals system. Guilford Press, New York.

Boyle, R., S. McLean, W. J. Foley, and N. W. Davies. 1999. Comparative metabolism of dietary terpene, p-cymene, in generalist and specialist folivorous marsupials. Journal of Chemical Ecology 25: 2109-2126.

Boyle, R., S. McLean, S. Brandon, G. J. Pass, and N. W. Davies 2002. Application of solid-phase microextraction to the quantitative analysis of 1,8-cineole in blood and expired air in a eucalyptus herbivore, the brushtail possum (trichosurus vulpecula). Journal of Chromatography B 780: 397–406.

Brand, J. M., J. W. Bracke, A. J. Markovetz, D. L. Wood, and L. E. Browne. 1975. Production of verbenol pheromone by a bacterium isolated from bark beetles. Nature 254: 136-137.

Britton, L. 1984. Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In: D. Gibson (ed.) Microbial degradation of organic compounds. p 89-129. Marcel Dekker, New York.

Broudiscou, L., and B. Lassalas. 2000. Effects of *Lavandula officinalis* and *Equisetum arvense* dry extracts and isoquercitrin on the fermentation of diets varying in forage contents by rumen microorganisms in batch culture. Reproduction Nutrition Developpement 40: 431-440.

Broudiscou, L., Y. Papon, and A. F. Broudiscou. 2002. Effects of dry plant extracts on feed degradation and the production of rumen microbial biomass in a dual outflow fermenter. Animal Feed Science and Technology 110: 183-189.

Broudiscou, L., A. Cornu, and A. Rouzeau. 2007. In vitro degradation of 10 mono-and sesquiterpenes of plant origin by caprine rumen micro-organisms. Journal of the Science of Food and Agriculture 87: 1653-1658.

Broudiscou, L., and J. P. Jouany. 1995. Reassessing the manipulation of protein synthesis by rumen microbes. Reproduction Nutrition Development 35: 517-535.

Broudiscou, L., S. Pochet, and C. Poncet. 1994. Effect of linseed oil supplementation on feed degradation and microbial synthesis in the rumen of ciliate-free and refaunated sheep. Animal Feed Science and Technology 49: 189-202.

Broudiscou, L. P., Y. Papon, and A. F. Broudiscou. 1999. Optimal mineral composition of artificial saliva for fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microorganisms. Animal Feed Science and Technology 79: 43-55.

Broudiscou, L. P., Y. Papon, M. Fabre, and A. F. Broudiscou. 1997. Maintenance of rumen protozoa populations in a dual outflow continuous fermenter. Journal of the Science of Food and Agriculture 75: 273-280.

Bryant, J. P., K. Danell, F. Provenza, P. B. Reichardt, T. A. Clausen, and R. A. Werner. 1991. Effects of mammal browsing on the chemistry of deciduous woody plants. In: D. W. Tallamy and M. J. Raupp (eds.) Phytochemical induction by herbivores. p 135-154. Wiley, New York.

Buchin, S., B. Martin, and A. Hauwuy. 2003. Do terpenes influence the flavour of cheeses? In: Flavour Research at the Dawn of the Twenty-first Century - Proceedings of the 10th Weurman Flavour Research Symposium, Beaune, France, 25-28 June, 2002.

Bugaud, C., S. Buchin, J. B. Coulon, A. Hauwuy, and D. Dupont. 2001. Influence of the nature of alpine pastures on plasmin activity, fatty acid and volatile compound composition of milk. Lait 81: 401-414.

Bugaud, C., S. Buchin, A. Hauwuy, and J. B. Coulon. 2002. Flavour and texture of cheeses according to grazing type: the Abundance cheese. INRA Productions Animales 15: 31-36.

Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. E. Kamel. 2004. Effects of different doses of plant extracts on rumen microbial fermentation. Journal of Dairy Science 87: 213 (abstract)

Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, P. W. Cardozo, and C. Kamel. 2005a. Effects of Cinnamaldehyde and Garlic Oil on Rumen Microbial Fermentation in a Dual Flow Continuous Culture. Journal of Dairy Science 88: 2508-2516.

Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, M. D. Carro, and C. Kamel. 2005b. Effect of Garlic Oil and Four of its Compounds on Rumen Microbial Fermentation. Journal of Dairy Science 88: 4393-4404.

Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2006. Plant Extracts Affect In Vitro Rumen Microbial Fermentation. Journal of Dairy Science 89: 761-771.

Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamelb. 2005c. Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. Animal Feed Science and Technology 123: 597-613.

Cadwallader, K. R., R. J. Braddock, M. E. Parish, and D. P. Higgins. 1989. Bioconversion of dextro limonene by *Pseudomonas gladioli*. Journal of Food Science 54: 1241-1245.

Calsamiglia, S., M. Busquet, P. V. Cardozo, L. Castillejos, and A. Ferret. 2007. Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. Journal of Dairy Science 90: 2580-2595.

Cane, D. E., and M. Shiao. 1978. Biosynthesis of Cyclonerodiol. Journal of the American Chemical Society 100: 3203-3207.

Cardozo, P. W., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2004. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. Journal of Animal Science 82: 3230-3236.

Cardozo, P. W., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. Journal of Animal Science 83: 2572-2579.

Cardozo, P. W., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2006. Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. Journal of Animal Science 84: 2801-2808.

Carpino, S., S. Mallia, S. La Terra, C. Melilli, G. Licitra, T.E. Acree, D.M. Barbano and P.J. Van Soest. 2004. Composition and aroma compounds of Ragusano cheese: Native pasture and total mixed rations. Journal of Dairy Science 87: 816-830.

Carson, C. F., B. J. Mee, and T. V. Riley. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46: 1914–1920.

Carter, O. A., R. J. Peters, and R. Croteau. 2003. Monoterpene biosynthesis pathway construction in *Escherichia coli*. Phytochemistry 64: 425-433.

Castillejos, L., S. Calsamiglia, and A. Ferret. 2006. Effect of Essential Oil Active Compounds on Rumen Microbial Fermentation and Nutrient Flow in In Vitro Systems. Journal of Dairy Science 89: 2649-2658.

Castillejos, L., S. Calsamiglia, A. Ferret, and R. Losa. 2005. Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. Animal Feed Science and Technology 119: 29-41.

Cecava, M. J., and J. E. Parker. 1993. Intestinal supply of amino acids in steers fed ruminally degradable and undegradable crude protein sources alone or in combination. Journal of Animal Science 71: 1596-1605.

Chai, M., and J. Pawliszyn. 1995. Analysis of Environmental Air Samples by Solid Phase Microextraction and GC/Ion Trap Mass Spectrometry. Environmental Science and Technology 29: 693-701.

Chang, H. C., D. A. Gage, and P. J. Oriel. 1995. Cloning and expression of a limonene degradation pathway from *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli.* Journal of Food Science 60: 551-553.

Chang, H. C., and P. J. Oriel. 1994. Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolates of *Bacillus stearothermophilus*. Journal of Food Science 59: 660-662.

Chao, S. C., D. G. Young, and C. J. Oberg. 2000. Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. Journal of Essential Oil Research 12: 639-649.

Chararas, C., and A. Koutroumpas. 1977. Comparative study of the glycosidases of 2 Lepidoptera wood-eating Cossidae (*Cossus cossus L.),* CR Academic Science, Paris.

Chatterjee, T., and D. K. Bhattacharyya. 2001. Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. Applied Microbiology and Biotechnology 55: 541-546.

Cheeke, P., and L. R. Shull. 1985. Natural toxicants in feeds and poisonous plants. AVI Publishing Company, Westport CT, USA.

Cheeke, P. R. 1998. Natural toxicants in feeds, forages, and poisonous plants. Interstate Publishers Inc., Danville, USA.

Cheynier, V., M. Feinberg, C. Chararas, and C. Ducauze. 1983. Application of Response Surface Methodology to Evaluation of Bioconversion Experimental Conditions. Applied and Environmental Microbiology 45: 634–639

Chizzola, R., W. Hochsteiner, and S. Hajek. 2004. Gc analysis of essential oils in the rumen fluid after incubation of thuja orientalis twigs in the rusitec system. Research in Veterinary Science 76: 77-82.

Chvílíèková, I. 2004. Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME): a microscale sampling technique for determination of monoterpene hydrocarbons in coniferous needles by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Analytical and Bioanalytical Chemistry 378: 150-158.

Clark, H., T. H. Klusmeyer, and M. R. Cameron. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitro-gen fractions to the duodenum of dairy cows. Journal of Dairy Science 75: 2304-2323.

Cluff, L. K., B. L. Welch, J. C. Pederson, and J. D. Brotherson. 1982. Concentration of Monoterpenoids in Rumen Ingesta of Wild Mule Deer. Journal of Range Management 35: 192-194.

Coleman, W. M., and B. M. Lawrence. 2000. Examination of the enantiomeric distribution of certain monoterpene hydrocarbons in selected essential oils by automated solid-phase microextraction-chiral gas chromatography-mass selective detection. Journal of Chromatographic Science 38: 95-99.

Comfort, R.B. and H.S. Ragheb. 1968. Effect of Neomycin and Vancomycin on Growth of Some Rumen Bacteria. Applied Microbiology 16: 1255-1256.

Connolly, G. E., B. O. Ellison, J. W. Fleming, S. Geng, R. E. Kepner, W. M. Longhurst, J. H. Oh, and G. F. Russell. 1980. Deer browsing of Douglas-fir trees in relation to volatile terpene composition and in vitro fermentability. Forest Science 26: 179-193.

Cornu, A., A. Carnat , B. Martin, J. Coulon , J. Lamaison, and J. Berdagué 2001. Solid-phase microextraction of volatile components from natural grassland plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 203-209.

Cornu, A., B. Martin, I. Verdier-Metz, P. Pradel, J. B. Coulon, and J. L. Berdague. 2002. Use of terpene profiles in dairy produce to trace the diet of dairy cows. In: Multi-function grasslands: quality forages, animal products and landscapes. Proceedings of the 19th General Meeting of the European Grassland Federation., La Rochelle, France. p 550-551.

Cornu, A., N. Kondjoyan, B. Martin, I. Erdier-Metz, P. Pradel, J. L. Berdague, and J. B. Coulon. 2005. Terpene profiles in *Cantal* and *Saint-Nectaire*-type cheese made from raw or pasteurised milk. Journal of the Science of Food and Agriculture 85: 2040-2046.

Coulon, J. B., and A. Priolo. 2002. La qualité sensorielle des produits laitiers et de la viande dépend des fourrages consommés par les animaux. INRA Produit Animale 15: 333-342.

Coulon, J. B., A. Delacroix-Buchet, B. Martin, and A. Pirisi. 2005. Ruminant management and sensory characteristics of cheeses. Facteurs de production et qualité sensorielle des fromages Productions Animales. 18:49-62.

Cox, S. D., C. M. Mann, and J. L. Markham. 2001. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Journal of Applied Microbiology 91: 492-497.

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

Cremieux, A., H. Guirard-Dauriac, and G. Dumenil. 1981. Neutralisation des antiseptiques et désinfectants. Journal de Pharmacie de Belgique 36: 223-226.

Croteau, R., and F. Karp. 1977. Demonstration of a cyclic pyrophosphate intermediate in the enzymatic conversion of neryl pyrophosphate to borneol. Archives of Biochemistry and Biophysics 184: 77-86.

Crowell, P. L. 1999. Prevention and Therapy of Cancer by Dietary Monoterpenes. Journal of Nutrition 129: 775-778.

Davidson, P. M. 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: M. P. Doyle, L. R. Beuchat and T. J. Montville (eds.) Food Microbiology. p 520-556. ASM, Washington.

DeBruin, L. S., P. D. Josephy, and J. B. Pawliszyn. 1998. Solid-phase microextraction of monocyclic aromatic amines from biological fluids. Analytical Chemistry 70: 1986-1992.

de Carvalho, C. C. C. R., and M. M. R. da Fonseca. 2003. Towards the bio-production of trans-carveol and carvone from limonene: induction after cell growth on limonene and toluene. Tetrahedron: Asymmetry 14: 3925-3931.

de Carvalho, C. C. C. R., F. van Keulen, and M. M. R. da Fonseca. 2000. Biotransformation of limonene-1,2-epoxide to limonene-1,2-diol by *Rhodococcus erythropolis* cells An introductory approach to selective hydrolysis and product separation. Food Technology and Biotechnology 38: 181-185.

De Feo, V., E. Quaranta, V. Fedele, S. Claps, R. Rubino, and C. Pizza. 2006. Flavonoids and terpenoids in goat milk in relation to forage intake. Italian Journal of Food Science 18: 85-92.

Demeyer, D. I., and C. J. Van Nevel. 1975. Methanogenesis, an integrated part of carbohydrate fermentation and its control. In: I. W. McDonald and A. C. I. Warner (eds.) Digestion and metabolism in the ruminant. p 366-382. University of New England Publishing Unit, Armidale.

Demeyer, D. I. 1982. Influence of calcium peroxide on fermentation pattern and protozoa in the rumen. Archiv für Tierernährung 32: 579-593.

Demyttenaere, J. C. R., K. V. belleghem, and N. Kimpe. 2001. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)- Limonene by fungi and use of Solid Phase Microextraction for screening. Phytochemistry 57: 199-208.

Demyttenaere , J. C. R., M. d. C. Herrera, and N. D. Kimpe 2000. Biotransformation of geraniol, nerol and citral by sporulated surface cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium sp*. Phytochemistry 55: 363-373.

Derringer, G., and R. Suich. 1980. Simultaneous optimization of several response variables. Journal of Quality Technology 12: 214-219. (A2)

Dhavlikar, R., and P. Bhattacharyya. 1966. Microbiological transformations of terpenes. Part VIII. Fermentation of limonene in a soil pseudomonad. Indian Journal of Biochemistry 3: 144-157.

Didry, N., L. Dubreuil, and M. Pinkas. 1993. Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. Pharmazie 48: 301-304.

Dolfing, J., P. Zeyer, P. Binder-Eicher, and R. P. Schwarzenbach. 1990. Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. Archives of Microbiology 154: 336-341.

Dorman, H. J. D., and S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology 88: 308-316.

Dudareva, N., F. Negre, D. A. Nagegowda, and I. Orlova. 2006. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. Critical Reviews in Plant Sciences 25: 417-440.

Duetz, W., A. H. M. Fjallman, S. Ren, C. Jourdat, and B. Witholt. 2001. Biotransformation of D-Limonene to (1) trans-Carveol by Toluene-Grown *Rhodococcus Opacus PWD4* Cells. Applied and Environmental Microbiology 67: 2829-2832.

Dumont, J. P., J. Adda, and P. Rousseaux. 1981. Exemple de variation de l'arôme à l'intérieur d'un même type de fromage. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie. 14: 198-202.

Durand, M., and R. Kawashima. 1980. Influence of minerals in rumen microbial digestion. In: Y. Ruckebusch and P. Thivend (eds.) Digestive physiology and metabolism in ruminants. p 375-408. MTP Press Limited, Lancaster.

Dziba, L. E., J. O. Hall, and F. D. Provenza. 2006. Feeding behavior of lambs in relation to kinetics of 1,8-cineole dosed intravenously or into the rumen. Journal of Chemical Ecology 32: 391-408.

Dziba, L. E., and F. D. Provenza. 2008. Dietary monoterpene concentrations influence feeding patterns of lambs. Applied Animal Behaviour Science 109: 49-57.

Eadie, J. M., J. Hyldgaard-Jensen, S. O. Mann, R. S. Reid, and F. G. Whitelaw. 1970. Observations on the microbiology and biochemistry of the rumen in cattle given different quantities of a pelleted barley ration. Br J Nutr 24: 157-177.

Eadie, J. M., and A. E. Oxford. 1957. A simple and safe procedure for the removal of holotrich ciliates from the rumen of an adult fistulated sheep. Nature 179: 485.

Eadie, J. M., and W. J. Shand. 1981. The effect of synperonic np9 upon ciliate-free and faunated sheep. Proceedings of the Nutrition Society 40: 113A.

Estell, R. E., E. L. Fredrickson, D. M. Anderson, K. M. Havstad, and M. D. Remmenga. 1996. Tarbush leaf surface terpene profile in relation to mammalian herbivory. General Technical Report - Intermountain Research Station, USDA Forest Service.

Estell, R. E., E. L. Fredrickson, D. M. Anderson, K. M. Havstad, and M. D. Remmenga. 1998. Relationship of tarbush leaf surface terpene profile with livestock herbivory. Journal of Chemical Ecology 24: 1-12.

Estell, R. E., E. L. Fredrickson, D. M. Anderson, K. M. Havstad, and M. D. Remmenga. 2000. Effect of individual terpenes on consumption of alfalfa pellets by sheep. Journal of Animal Science 78: 1636-1640.

Estell, R. E., E. L. Fredrickson, D. M. Anderson, K. M. Havstad, and M. D. Remmenga. 2002. Effects of four mono- and sesquiterpenes on the consumption of alfalfa pellets by sheep. Journal of Animal Science 80: 3301-3306.

Estell, R. E., E. L. Fredrickson, D. M. Anderson, and M. D. Remmenga. 2005. Effects of gamma-terpinene, terpinolene, alpha-copaene, and alpha -terpinene on consumption of alfalfa pellets by sheep. Journal of Animal Science 83: 1967-1971.

Evans, D. J., and S. A. Martin. 2000. Effects of Thymol on Ruminal Microorganisms. Current Microbiology 41: 336-340.

Fedele, V., S. Claps, R. Rubino, L. Sepe, and G. F. Cifuni. 2004. Variation in terpene content and profile in milk in relation to the dominant plants in the diet of grazing goats. South African Journal of Animal Science 34: 145-147.

Fedele, V., S. Claps, R. Rubino, L. Sepe, and G. F. Cifuni. 2005a. Volatile compounds in herbage intake by goats in two different grazing seasons. In: E. Molina Alcaide, H. Ben Salem, K. Biala and P. Morand-Fehr (eds.) Options Mediterranéennes. Serie A, Seminaires Mediterraneens No.67. p 261-267. CIHEAM-IAMZ, Zaragoza.

Fedele, V., R. Rubino, S. Claps, L. Sepe, and G. Morone. 2005b. Seasonal evolution of volatile compounds content and aromatic profile in milk and cheese from grazing goat. Small Ruminant Research 59: 273-279.

Fernandez, C., C. Astier, E. Rock, J. B. Coulon, and J. L. Berdague. 2003. Characterization of milk by analysis of its terpene fractions. International Journal of Food Science and Technology 38: 445-451.

Foley, W. J. 1992. Nitrogen and energy retention and acid-base status in the common ringtail possum (*Pseudocheirus peregrinus*): evidence of the effects of absorbed allelochemicals. Physiological Zoology 65: 403-421.

Foss, S., and J. Harder. 1997. Microbial transformation of a tertiary allylalcohol: Regioselective isomerisation of linalool to geraniol without nerol formation. FEMS Microbiology Letters 149: 71-75.

Foss, S., U. Heyen , and J. Harder. 1998. Alcaligenes defragrans sp. nov., description of four strains isolated on alkenoic monoterpenes ((+)-menthene, alpha-pinene, 2-carene, and alpha-phellandrene) and nitrate. Systematic and Applied Microbiology 21: 237-244.

Freeland, W. J., P. H. Calcott, and L. R. Anderson. 1985. Tannin and saponin: interaction in herbivore diets. Biochemical Systematics and Ecology 13: 189-193.

Gaines, R. B., E. B. Ledford, and J. D. Stuart. 1998. Analysis of water samples for trace levels of oxygenate and aromatic compounds using headspace solid-phase microextraction and comprehensive two-dimensional gas chromatography. Journal of Microcolumn Separations 10: 597-604.

Gallois , A., and D. Langlois 1990. New results in the volatile odorous compounds of French cheese. Lait 70: 89-106.

Girdler, C. P., P. C. Thomas, and D. G. Cahmberlain. 1988. Effects of intraabomasal infusions of amino acids or of a mixed animal protein source on milk production in dairy cow. Proceedings of Nutrition Society 47: 82A. (Abstract).

Giuffrida, A., R., M. T. Clasadonte, and A. Zerbo. 1999. Determination of benzene and toluene in vegetable oils by SPME/HPLC. Journal of Commodity Science 38: 3-14.

Glasser, F., P. Schmidely, D. Sauvant, and M. Doreau. 2008. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors. 2. C18 fatty acids. Animal 2: 691-704.

Gohlke, R. S., and F. W. McLafferty. 1993. Early gas chromatography/mass spectrometry. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 4: 367-371.

Górecki, T., X. Yu, and P. Pawliszyn. 1999. Theory of analyte extraction by selected porous polymer spme fibres†. Analyst 124: 643–649.

Griffin, S. G., D. N. Leach, J. Markham, and R. Johnstone. 1998. Antimicrobial activity of essential oils from Zieria. Journal of Essential Oil Research 10: 165-174.

Griffin, S. G., S. G. Wyllie, J. L. Markham, and D. N. Leach. 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. Flavour and Fragrance Journal 14: 322-332.

Guan, F. Y., K. Watanabe, A. Ishii, H. Seno, T. Kumazawa, H. Hattori, and O. Suzuki. 1998. Headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic determination of dinitroaniline herbicides in human blood, urine and environmental water. Journal of Chromatography B 714: 205-213.

Guenther, E. 1948. The Essential Oils. Van Nostrand, New York.

Guichard, E. 2002. Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. Food Reviews International 18: 49-70.

Guinamant, J. L. 1992. Extraction des composés volatils et/ou semi-volatils. Analusis 20: M43-45.

Hageman, K., L. Mazeas, C. Grabanski, D. Miller, and S. Hawthorne. 1996. Coupled Subcritical Water Extraction with SPME for Determining Semivolatile Organics in Environmental Solids. Analytical Chemistry 68: 3892-3898.

Hahn, J. G., W. Q. Meeker, and P. I. Feder. 1976. Evaluation and comparison of experimental designs for fitting regression relationship. Journal of Quality Technology 8: 140-157.

Hammer, K. A., C. F. Carson , and T. V. Riley. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology 86: 985-990.

Hammond, J. A., D. Fielding, and S. C. Bishop. 1997. Prospects for Plant Anthelmintics in Tropical Veterinary Medicine. Veterinary Research Communications 21: 213-228.

Harder, J., and C. Probian. 1995. Microbial degradation of monoterpenes in the absence of molecular oxygen. Applied and Environmental Microbiology 61: 3804-3808.

Harfoot, C. G., and G. P. Hazlewood. 1997. The rumen Microbial Ecosystem. . Blackie Academic and Professional (Reino Unido).

Harms, G., R. Rabus, and F. Widdel. 1999. Anaerobic oxidation of the aromatic plant hydrocarbon p-cymene by newly isolated denitrifying bacteria. Archives of Microbiology 172: 303-312.

Hartley, H. O. 1959. Smallest composite designs for quadratic response surfaces. Biometrics 15: 611-624.

Havenga, W., and E. Rohwer. 1999. Chemical characterization and screening of hydrocarbon pollution in industrial soils by headspace SPME. Journal of Chromatography A 848: 279-295.

Hayes, A. J., D. N. Leach, J. L. Markham, and B. J. Markovic. 1997. In vitro cytotoxicity of Australian tea tree oil using human cell lines. Essential Oil Researches 9: 575-582.

Heyen, U., and J. Harder. 2000. Geranic acid formation, an initial reaction of anaerobic monoterpene metabolism in denitrifying Alcaligenes defragrans. Applied and Environmental Microbiology 66: 3004-3009.

Hespell, R. B., and M. P. Bryant. 1979. Efficiency of Rumen Microbial Growth: Influence of some Theoretical and Experimental Factors on ATP. Journal of Animal Science 49: 1640-1659.

Heywood, V. H. 1995. The Mediterranean flora in the context of world biodiversity. Ecologia Mediterranea 21: 11-18.

Hinou, J. B., C. E. Harvala, and E. B. Hinou. 1989. Antimicrobial activity screening of 32 common constituents of essential oils. Pharmazie 44: 302-303.

Hjältén, J., and P. W. Price. 1997. Can plants gain protection from herbivory by association with unpalatable neighbors?: a field experiment in a willow-sawfly system. Oikos 78: 317-322.

Hobson, P. N. 1988. The rumen Microbial Ecosystem. Elsevier Applied Science, London and New York.

Hoke, A. T. 1974. Economical second-order designs based on irregular fractions of 3^n factorial. Technometrics 16: 375-423.

Huie, C. W. 2002. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. Analytical and Bioanalytical Chemistry 373.

Hungate, R. E. 1966. The Rumen and its Microbes. Academic Press, New York.

Harder, J., and C. Probian. 1995. Microbial degradation of monoterpenes in the absence of molecular oxygen. Applied and Environmental Microbiology 61: 3804-3808.

Ikwuegbu, O. A., and J. D. Sutton. 1982. The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. British Journal of Nutrition 48: 365-375.

Imhof, R., and J. O. Bosset. 1994. Quantitative GC-MS analysis of volatile flavour compounds in pasteurized milk and fermented milk products applying a standard addition method. Food Science and Technology 27: 265-269.

Jouany, J. P., D. I. Demeyer, and J. Grain. 1988. Effect of defaunating the rumen. Animal Feed Science and Technology 21: 229-265.

Jouany, J. P., and J. Senaud. 1979. Defaunation of the sheep rumen. Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique 19.

Jaouen, J. P. l. 1990. Milk production and the market for goat milk products in the mediterranean basin. Options Mediterraneennes. Serie A, Seminaires Mediterraneens.

Justicia, J., J. E. Oltra, A. F. Barrero, A. Guadano, A. Gonzalez-Coloma, and J. M. Cuerva. 2005. Total synthesis of 3-hydroxydrimanes mediated by titanocene (III) - evaluation of their antifeedant activity. European Journal of Organic Chemistry 4: 712-718.

Juven, B. J., J. Kanner, F. Schved, and H. Weisslowicz. 1994. Factors That Interact with the Antibacterial Action of Thyme Essential Oil and Its Active Constituents. Journal of Applied Bacteriology 76: 626-631.

Kalemba, D., and A. Kunicka. 2003. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. Current Medicinal Chemistry 10: 813-829.

Kalodera, Z., S. Pepeljnak, N. Blazevic, and T. Petrak. 1997. Chemical composition and antimicrobial activity of *Tanacetum parthenium* essential oil. Pharmazie 52: 885-886.

Karp, F., C. A. Mihaliak, J. L. Harris, and R. Croteau. 1990. Monoterpene biosynthesis: Specificity of the hydroxylations of (-)-limonene by enzyme preparations from peppermint (Mentha piperita), spearmint (Mentha spicata), and perilla (Perilla frutescens) leaves. Archives of Biochemistry and Biophysics 276: 219-226.

Kataoka , H., H. L. Lord , and J. Pawliszyn 2000. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. Journal of Chromatography A 880: 35-62.

Kieslich, K., W. R. Abraham, B. Stumpf, B. Thede, and P. Washausen. 1986. Progress in essential oil research. Walter de Gruyter Company, Berlin, Germany.

Kim, N. S., and D. S. Lee. 2004. Headspace solid-phase microextraction for characterization of fragrances of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Separation Science 27: 96-100.

Kim , S. C., A. T. Adesogan , J. H. Kim, and Y. D. Ko 2006. Influence of replacing rice straw with wormwood (*Artemisia montana*) silage on feed intake, digestibility and ruminal fermentation characteristics of sheep. Animal Feed Science and Technology 128: 1-13.

Kimball, B. A., L. E. Dziba, J. J. Johnston, and F. D. Provenza. 2004. Chromatographic analysis of sagebrush monoterpenes in blood plasma. Journal of Chromatographic Science 42: 245-249.

Kingsbury, J. M. 1983. The evolutionary and ecological significance of plant toxins. In: R. F. Keeler and A. T. Tu (eds.) Handbook of Natural Toxins. Marcel Dekker, New York.

Knobloch, K., A. Pauli, B. Iberl, H. Weigand, and N. Weis. 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. Journal of Essential Oil Research 1: 119-.

Knudsen, J. T., R. Eriksson, J. Gershenzon, and B. Stahl. 2006. Diversity and distribution of floral scent (Appendix I: Distribution of Floral Scent Compounds at the Level of Plant Family). The Botanical Review 72: 1-120.

Koch, J., W. Eisenreich, A. Bacher, and G. Fuchs. 1993. Products of enzymatic reduction of benzoyl-CoA, a key reaction in anaerobic aromatic metabolism. European Journal of Biochemistry 211: 649-661.

Kristensen, N. B. 2000. Quantification of whole blood short-chain fatty acids by gas chromatographic determination of plasma 2-chloroethyl derivatives and correction for dilution space in erythrocytes. Acta Agriculturae Scandinavica Section A Animal Science 50: 231-236. (A4, A5)

Kronberg, S. L., W. C. Lynch, C. D. Cheney, and J. W. Walker. 1995. Potential aversive compounds in leafy spurge for ruminants and rats. Journal of Chemical Ecology 21: 1387-1399.

Langenfeld, J. J., S. B. Hawthorne, and D. J. Miller. 1996a. Optimizing split/splitless injection port parameters for solid-phase microextraction. Journal of Chromatography A 740: 139-145.

Langenfeld, J. J., S. B. Hawthorne, and D. J. Miller. 1996b. Quantitative analysis of fuel-related hydrocarbons in surface water and wastewater samples by solid-phase microextraction. Analytical Chemistry 68: 144-155.

Langenheim, J. H. 1994. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. Journal of Chemical Ecology 20: 1223-1280.

Lassalas, B., J. P. Jouany, and L. Broudiscou. 1993. High-performance liquid-chromatographic determination of purine and pyrimidine-bases. Annales De Zootechnie 42: 170-171.

Li, J., E. M. Perdue, S. G. Pavlostathis, and R. Araujo. 1998. Physicochemical properties of selected monoterpenes. Environment International 24: 353-358.

Lis-Balchin, M., S. G. Deans, and H. S. 1996. Bioactivity of geranium oils from different commercial sources. Journal of Essential Oil Research 8: 281-290.

Loomis, D., and R. Croteau. 1980. Biochemistry of Terpenoids: A Comprehensive Treatise. In: P. K. Stumpf and E. E. Conn (eds.) The Biochemistry of Plants. Lipids: Structure and Function No. 4. p 364-410. Academic Press, San Francisco.

Lord, H., and J. Pawliszyn. 2000. Evolution of solid-phase microextraction technology. Journal of Chromatography A 885: 153-193.

Lorimer, S. D., N. B. Perry, L. M. Foster, and E. J. Burgess. 1996. A nematode larval motility inhibition assay for screening plant extracts and natural products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44: 2842-2845.

Losa, R. 2001. The use of essential oils in animal nutrition. Cahiers Options Mediterraneennes 54.

Lovley, D. R., and D. J. Lonergan. 1990. Anaerobic oxidation of toluene, phenol and p-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism GS-15. Applied and Environmental Microbiology 56: 1858-1864.

Lucas, J. M. 1974. Optimum composite designs. Technometrics 16: 561-567. (A2)

Lunde, C. S., and I. Kubo. 2000. Effect of polygodial on the mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 44: 1943-1953.

Malecky, M., V. Fedele, and L.P. Broudiscou. 2006. Rumen degradability of terpenes present in the spring diet of lactating goats from Basilicata (Italy). Rencontres Recherches Ruminants, Paris; Institut de l'Elevage - INRA; Vol. 13, pp. 134.

Mariaca, R. G., T. H. F. Berger, R. Gauch, M. I. Imhof, B. Jeangros, and J. O. Bosset. 1997. Occurrence of volatile mono- and sesquiterpenoids in highland and lowland plant species as possible precursors for flavour compounds in milk and dairy products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 4423-4434.

Martin, B., S. Buchin, and A. Hauwuy. 2005a. Influence of the botanical composition of the highland pastures on the sensory characteristics of the Beaufort cheeses. Sciences des Aliments 25: 67-75.

Martin, B., A. Priolo, M. A. Valvo, D. Micol, and J. B. Coulon. 2005b. Effects of grass feeding on milk, cheese and meat sensory properties. Options Mediterraneennes. Serie A, Seminaires Mediterraneens.

Mathieu, D., J. Nony, and R. Phan-Tan-Luu. 2000. Nemrodw. LPRAI, Marseille.

McCaskill, D., and R. Croteau. 1997. Prospects for the bioengineering of isoprenoid biosynthesis. In: R. G. Berger (ed.) Biotechnology of Aroma Compounds. p 107-146. Springer, Berlin.

McCorkindale, N. J. 1976. the filamentous Fong. Weily, New York.

McIntosh, F. M., P. Williams, R. Losa, R. J. Wallace, D. A. Beever, and C. J. Newbold. 2003. Effects of Essential Oils on Ruminal Micro-organisms and Their Protein Metabolism. Applied and Environmental Microbiology 69: 5011-5014.

McNaughton, S. J. 1983. Compensatory growth as a response to herbivory. Oikos 40: 329-336.

Mejlholm, O., and P. Dalgaard. 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. Letters in Applied Microbiology 34: 27-31.

Messchendorp, L., G. J. Z. Gols, and J. J. A. van Loon. 2000. Behavioural observations of *Pieris brassicae* larvae indicate multiple mechanisms of action of analogous drimane antifeedants. Entomology Experimental Applied 95: 217-227.

Minitab. 1998. User's guide 2: Data analysis and quality tools. Minitab Inc., State College.

Misra, G., S. G. Pavlostathis, E. M. Perdue, and R. Araujo. 1996. Aerobic biodegradation of selected monoterpenes. Applied Microbiology and Biotechnology 45: 831-838.

Mitchell, T. J., and C. K. Bayne. 1978. D-optimal fractions of three-level factorial designs. Technometrics 20: 369-383.

Miyazawa, M., and T. Murata. 2000. Biotransformation of β-Myrcene by the Larvae of Common Cutworm *(Spodoptera litura)*. The Journal of Agriculture and Food Chemistry 48: 123-125.

Miyazawa, M., T. Wada, and H. Kameoka. 1996. Biotransformation of α-terpinene in common cutworm larvae (*Spodoptera litura Fabricius*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 44: 2889- 2893.

Miyazawa, M., T. Wada, and H. Kameoka. 1998. Biotransformation of (+)- and (-)-Limonene by the Larvae of Common Cutworm (*Spodoptera litura*). Journal of Agriculture and Food Chemistry 46: 300-303.

Molero, R., A. Ibars, S. Calsamiglia, A. Ferret, and R. Losa. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. Animal Feed Science and Technology 114: 91-104.

Moore, R. E. 1977. Volatile Compounds from Marine Algae. Accounts of Chemical Research 10: 40-47.

Morand-Fehr, P., V. Fedele, M. Decandia, and Y. l. Frileux. 2007. Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. Small Ruminant Research 68.

Mote, T. E., J. J. Villalba, and F. D. Provenza. 2007. Relative availability of tannin- and terpene-containing foods affects food intake and preference by lambs. Journal of Chemical Ecology 33: 1197-1206.

Nagajara, T. G., C. J. Newbold, C. N. Van Nevel, and D. I. Demeyer. 1997. Manipulation of rumen fermentation. In: P. N. Hobson and C. S. Stewart (eds.) The rumen microbial ecosystem. p 523-632. Chapman et Hall, London.

Nagy, J. G., H. W. Steinhoff, and G. M. Ward 1964. Effects of Essential Oils of Sagebrush on Deer Rumen Microbial Function. Journal of Wildlife Management 28: 785-790.

Naigre, R., P. Kalck, C. Roques, I. Roux, and G. Michel. 1996. Comparison of antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products. Planta Medica 62: 275-277.

Namera, A., T. Watanabe, M. Yahiki, Y. Iwasaki, and T. Kojima. 1998. Simple Analysis of Tetracyclic Antidepressants in Blood Using Headspace SPME and GC-MS. Journal of Analytical Toxicology 22: 396-400.

Namera, A., M. Yahiki, K. M.Liu, K. Okajima, T. Hara, and T. Imamura. 2000. Simple and simultaneous analysis of fenfluramine, amphetamine, amphetamine, and methamphetamine in whole blood by GC-MS after headspace SPME and derivatization in blood. Forensic Science International 109: 215-223.

Narjisse, H. 1982. Acceptability of big sagebrush to sheep and goats: Role of monoterpenes. Dissertation Abstracts International, B 42.

Nes, W. R., and M. L. McKean. 1977. Biochemistry of steroids and other isoprenoids. Univ.Park Press, Baltimore , Maryland.

Newbold, C. J., F. M. McIntosh, P. Williams, R. Losa, and R. J. Wallace. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. Animal Feed Science and Technology 114: 105-112.

Noirot, V., R. Moncoulon, D. Saucant, and C. Bayourthe. 2007. Effet d'une supplémentation en huiles essentielles et composés d'huiles essentielles chez le ruminant : analyse statist. Revue de Medecine Veterinaire 158: 589-597.

Noma, Y., S. Ymasaki , and Y. Asakawa 1992. Biotransformation of limonene and related compounds by *Aspergillus Cellulosae*. Phytochemistry 31: 2725-2727.

Noni, I. D. and G. Battelli. 2008. Terpenes and fatty acid profiles of milk fat and "Bitto" cheese as affected by transhumance of cows on different mountain pastures. Food Chemistry. 109:299-309.

Ogimoto, K., and S. Imai. 1981. Atlas of Rumen Microbiology. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.

Oh, H. K., T. Sakai, M. B. Jones, and W. M. Longhurst 1967. Effects of various essential oils isolated from Douglas fir needles upon sheep and deer rumen microbial activity. Applied Microbiology 15: 777-784.

Olson, P. E., and J. E. Bidlack. 1997. Yield and enzymatic activity of sweet basil (ocimum basilicum) subjected to alternative pest control. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants 4.

Onken, J., and R. G. Berger. 1999. Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. Journal of Biotechnology 69: 163-168.

Orpin, C. G. 1977. Studies on the defaunation of the ovine rumen using dioctyl sodium sulphosuccinate. Journal of Applied Bacteriology 43: 309-318.

Pass, G. J., S. McLean, I. Stupans, and N. Davies. 2001. Microsomal metabolism of the terpene 1,8-cineole in the common brushtail possum (*Trichosurus Vulpecula*), koala (*Phascolarctos Cinereus*), rat and human. Xenobiotica 31: 205-221.

Pavlostathis, S. G., and G. Misra. 1999. Biotransformation of selected monoterpenes under nitrate-reducing conditions. Applied Microbiology and Biotechnology 53: 63-68.

Pena, R. M., G. Barciela, C. Herrero, and S. Garcia-Martin. 2005. Optimization of Solid-Phase Microextraction methods for GC-MS determination of terpenes in wine. Journal of the Science of Food and Agriculture 85: 1227-1234.

Pessoa , L. M., S. M. Morais, C. M. L. Bevilaqua, and J. H. S. Luciano. 2002. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum Linn.* and eugenol against *Haemonchus contortus*. Veterinary Parasitology 109: 59-63.

Pfister, J., D. Adams, R. Wiedmeier, and R. Cates. 1992. Adverse effects of pine needles on aspects of digestive performance in cattle. Journal of Range Management 45: 528-533.

Pfister, J. A., F. D. Provenza, G. D. Manners, D. R. Gardner, and M. H. Ralphs. 1997. Tall larkspur ingestion: can cattle regulate intake below toxic levels? Journal of Chemical Ecology 23: 759-777.

Pol, I. E., H. C. Mastwijk, R. A. Slump, M. E. Popa, and E. J. Smid. 2001. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. Journal of Food Protection 64: 1012– 1018.

Potter, D. W., and J. Pawliszyn. 1994. Rapid-determination of polyaromatic hydrocarbons and polychlorinated-biphenyls in water using solid-phase microextraction and gcms. Environmental Science & Technology 28: 298-305.

Poulose, A. J., and R. Croteau. 1987. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of gamma-terpinene to p-cymene and thymol in Thymus vulgaris. Archives of Biochemistry and Biophysics 187: 307-314.

Povolo, M., G. Contarini, M. Mele, and P. Secchiari. 2007. Study on the influence of pasture on volatile fraction of Ewes' Dairy products by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Journal of Dairy Science 90: 556-569.

Priolo, A., A. Cornu, S. Prache, M. Krogmann, N. Kondjoyan, D. Micol, and J. L. Berdague. 2004. Fat volatiles tracers of grass feeding in sheep. Meat Science 66: 475-481.

Pritz , R. K., K. L. Launchbaugh, and C. A. Taylor. 1997. Effects of breed and dietary experience on juniper consumption by goats. Journal of Range Management 50: 600-606.

Provenza , F. D. 1996. Acquired Aversions as the Basis for Varied Diets of Ruminants Foraging on Rangelands. Journal of Animal Science 74: 2010-2020.

Provenza, F. D., J. Villalba , C. D. Cheney, and S. J. Werner. 1998. Selforganization of foraging behaviour: from simplicity to complexity without goals. Nutrition Research Reviews 11: 199-222.

Provenza, F. D., J. J. Villalba, and J. P. Bryant. 2002. Foraging by herbivores: linking the biochemical diversity of plants with herbivore culture and landscape. In: J. A. Bissonette and I. Storch (eds.) Landscape ecology and resource management: linking theory with practice. Island Press, New York.

Rastogi, N., K. S. Abaul, A. Goh, and E. Devallois. 1998. Antimycobacterial activity of chemically defined natural substances from the *Caribbean flora* in Guadeloupe. FEMS Immunology and Medical Microbiology 20: 267-273.

Richter, G. 1993. Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne. (A3, A4)

Risenhoover, K. L., L. A. L. Renecker, and E. Morgantini 1985. Effects of secondary metabolites from balsam poplar and paper birch on cellulose digestion. Journal of Range Management 38: 370-372.

Robbins, C. T., T. A. Hanley, A. E. Hagerman, O. Hjeljord, D. L. Baker, C. C. Schwartz, and W. W. Mautz. 1987. Role of tannins in defending plants against ruminants: reduction in protein availability. Ecology 68: 98-107.

Rohloff, J. 2004. Essential oil drugs - terpene composition of aromatic herbs Production practices and quality assessment of food crops, vol 3. Production practices and quality assessment of food crops No. 3. p 73-128.

Röhring, L., and H. U. Meisch. 2000. Application of solid phase micro extraction for the rapid analysis of chlorinated organics in breast milk. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 366: 106-111.

Rueter, P., R. Rabus, H. Wilkes, F. Aeckersberg, F. A. Rainey, H. W. Jannasch, and F. Widdel. 1994. Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulfate-reducing bacteria. Nature 372: 455-458.

Rulquin, H., R. Verite, and J. Guinard-Flament. 2001. Acides aminés digestibles dans l'intestin. Le système AADI et les recommandations d'apport pour la vache laitière. Productions Animales, INRA 14: 3-13.

Russell, J. B., and D. B. Wilson. 1999. Why Are Ruminal Cellulolytic Bacteria Unable to Digest Cellulose at Low pH? Journal of Dairy Science 79: 1503-1509.

Rutledge, D. 1981. Bioconversion de molécules terpénoïdiques par des bactéries du tube digestif d'insectes xylophages. PhD, Université Pierre et Marie Curie, Paris.

Ruzicka, L., A. Eschenmoser, and H. Heusser. 1953. The isoprene rule and the biogenesis of isoprenoid compounds. Experientia 9: 357-367.

SAS/STAT®. 1990. User's guide. Release 6.04. SAS Institute, Inc., Cary.

Sangwan, N. S., A. H. A. Farooqi, F. Shabih, and R. S. Sangwan. 2001. Regulation of essential oil production in plants. Plant growth regulation 34: 3-21.

Sansford, C. E. 1998. Karnal bunt (*Tilletia indica*): An assessment of the significance of the initial detection of *Tilletia indica* Mitra in the USA in early 1996 and the potential risk to the United Kingdom (and the European Union). at Bunts and Smuts of Wheat: An International Symposium, at North Carolina, USA.

Schafer, B., P. Hennig, and W. Engewald. 1995. Analysis of monoterpenes from conifer needles using solid-phase microextraction. Hrc-Journal of High Resolution Chromatography 18: 587-592.

Schantz, V. M., and B. S. Ek. 1971. Ueber die Bildung von ätherischem Oel in Kümmel, Carum carvi L (About the formation of essential oil in caraway, Carum carvi L). Scientific Pharmaceuticals Inc. 39: 82-101.

Schlichtherle-Cerny, H., M. Imhof, E. Fernandez Garcia, and J. O. Bosset. 2004. Changes in terpene composition from pasture to cheese. Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene 95: 681-688.

Schlichtherle-Cerny, H., M.I. Imhof, E.F. Garcia and J.O. Bosset. 2007. From pasture to cheese: Changes in terpene composition. ACS Symposium Series: 123-133.

Schmidely, P., F. Glasser, D. Doreau, and D. Sauvant. 2008. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors. 1. Total fatty acid. Animal 2: 667-690.

Schwartz, C. C., W. L. Regelin, and J. G. Nagy. 1980. Deer preference for juniper forage and volatile oil treated foods. Journal of Wildlife Management 44: 114-120.(B, A5)

Sclafani, A. 1991. The hedonics of sugar and starch. In: R. C. Bolles (ed.) The Hedonics of Taste. p 59-87. Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale.

Seubert, W., and E. Fass. 1964. Untersuchungen uëber den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden. IV. Reinigung und Eigenschaften der L-Isohexenylglutaconyl-CoA-hydratase und L-Hydroxy-L-isohexenylglutaryl-CoA-lyase. Z.341, Biochem.

Seubert, W., E. Fass, and U. Remberger. 1963. Untersuchungen uëber den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden. III. Reinigung und Eigenschaften der Geranylcarboxylase. Z.338, Biochem.

Shaw, R. A., J. J. Villalba, and F. D. Provenza. 2006. Influence of stock density and rate and temporal patterns of forage allocation on the diet mixing behavior of sheep grazing sagebrush steppe. Applied Animal Behaviour Science 100: 207-218.

Shelef, L. A. 1983. Antimicrobial effects of spices. Journal of Food Safety 6: 29-44.(B, A5)

Sikkema, J., J. A. M. De Bont, and B. Poolman. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiological Reviews 59: 201-222.

Silverstein, R. M., and J. O. Rodin. 1966. Identification of two new terpene alcohols from frass produced by Ips confusus in ponderosa pine. Tetrahedron 22: 1929-1936.

Skandamis, P. N., and G.-J. E. Nychas. 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. Journal of Applied Microbiology 91: 1011-1022.

Sorensen, J. S., C. A. Turnbull, and M. D. Dearing. 2004. A specialist herbivore (Neotoma stephensi) absorbs fewer plant toxins than does a generalist (Neotoma albigula). Physiological and Biochemical Zoology 77: 139-148.

Smith, G. S. 1992. Toxification and detoxification of plant compounds by ruminants: an overview. Journal of Range Management 45: 25-30.

Snee, R. D. 1973. Some aspects of non-orthogonal data analysis. Part i: Developing prediction equations. Journal of Quality Technology 5: 67-79.

Snow, N. H. 2000. Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. Journal of Chromatography A 885: 445-455.

Suckling, C. J. 1988. The Cyclopropyl Group in Studies of Enzyme Mechanism and Inhibition. Angewandte Chemie International Edition in English 27: 537 - 552.

Supelco. 1998. Solid-phase microextraction: Theory and optimisation of conditions. Supelco Bulletin 923.

Supelco. 2001. A Practical guide to quantitation with Solid Pahse Microextraction. Supelco Bulletin 929.

Speelmans, G., A. Bijlsma, and G. Eggink. 1998. Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product, perillic acid, by a solvent-resistant Pseudomonas putida strain. Applied Microbiology and Biotechnology 50: 538-544.

Suzuki, O., H. Seno, and A. Ishii. 1996. Analysis of Drugs and Poisons in Legal Medicine. Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan 44: 321-333.

Tassou, C., E. H. Drosinos, and G.-J. E. Nychas. 1995. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 jC and 10 jC. Journal of Applied Bacteriology 78: 593– 600.

Thomas , P. C. 1984. Feeding and milk protein production. In: R. G. Gunn (ed.) Milk Comositional quality and its importance in future markets. British Society of Animal Production, Edinburgh.

Tornambé, G., A. Cornu, P. Pradel, N. Kondjoyan, A. P. Carnat, M. Petit, and B. Martin. 2006. Changes in terpene content in milk from pasture-fed cows. Journal of Dairy Science 89: 2309-2319.

Trudgill, P. W. 1990. Microbial metabolism of monoterpenes-recent developments. Biodegradation 1: 93-105.

Trudgill, P. W. 1994. Microbial metabolism and transformation of selected monoterpenes. In: C. Ratledge (ed.) Biochemistry of Microbial Degradation. p 33-61. Kluwer, Dordrecht ,The Netherlands.

Trytek, M., and J. Fiedurek. 2002. Biotransformation of d-limonene to carvone by means of glucose oxidase and peroxidase. Acta Microbiologica Polonica 51: 57-62.

Ulrich, S. J. 2000. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. Journal of Chromatography A 902: 167-194.

Ultee, A., M. H. J. Bennik, and R. Moezelaar. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology 68: 1561-1568.

Van de Braak, S. A. A. J., and G. C. J. J. Leijten. 1999. Essential Oils and Oleoresins, CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam.

Van den Dool, H., and Kratz, P. 1963. A generalisation of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. Journal of Chromatography 11: 463-471.

Van der Werf , M. J., and A. M. Boot 2000. Metabolism of carveol and dihydrocarveol in *Rhodococcus erythropolis* DCL14. Microbiology 146: 1129-1141.

Van der Werf, M. J., J. A. M. de Bont, and D. J. Leak. 1997. Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes. In: S. B. Heidelberg (ed.) Biotechnology of Aroma Compounds No. 55. p 147-177, Berlin.

Van Dyk, M. S., E. Van Rensburg, and N. Moleki. 1998. Hydroxylation of (+) limonene, (-) alpha-pinene and (-) beta-pinene by a *Hormonema sp.* Biotechnology Letters 20: 431-436.

Van Nevel, C. J., and D. I. Demeyer. 1981. Effect of methane inhibitors on the metabolism of rumen microbes in vitro. Archiv Für Tierernحhrung 31: 141-151.

Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science 74: 3583-3597.

Vanek, T., I. Valterova, R. Vankova, and T. B. L. Vaisar. 1999. Biotransformation of (-)-limonene using *Solanum aviculare* and *Dioscorea deltoidea* immobilized plant cells. Biotechnology Letters 21: 625-628.

Varel, V. H. 2001. Plant-Derived Oils Reduce Pathogens and Gaseous Emissions from Stored Cattle Waste. Applied and Environmental Microbiology 67: 1366-1370.

Vas, G., and K. Vékey. 2004. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. Journal of Mass Spectrometry 39: 233-254.

Vernat , G., and J. L. Berdagué 1995. Dynamic headspace-mass spectrometry (DHS-MS): a new approach to real-time characterization of food products. In: Bioflavours, Dijon (France). p 59-62.

Viallon, C., B. Martin, I. Verdier-Metz, P. Pradel, J. P. Garel, J. B. Coulon, and J. L. Berdague. 2000. Transfer of monoterpenes and sesquiterpenes from forages into milk fat. Lait 80: 635-641.

Viallon, C., I. Verdier-Metz, C. Denoyer, P. Pradel, J. B. Coulon, and J. L. Berdague. 1999. Desorbed terpenes and sesquiterpenes from forages and cheeses. Journal of Dairy Research 66: 319-326.

Villalba, J. J., F. D. Provenza, and J.P. Bryant. 2002. Consequences of the interaction between nutrients and plant secondary metabolites on herbivore selectivity: benefits or detriments for plants? *Oikos* 97: 282-292.

Villalba, J. J., F. D. Provenza, and K. C. Olson. 2006. Terpenes and carbohydrate source influence rumen fermentation, digestibility, intake and preference in sheep. Journal of Animal Science 84: 2463-2473.

Wallace, R. J., N. R. McEwan, F. M. McIntosh, B. Teferedegne, and C. J. Newbold. 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. Asian-Australian Journal of Animal Science 10: 1458-1468.

Welch, B. 1981. In Vitro Digestibility among Accessions of Big Sagebrush by Wild Mule Deer and Its Relationship to Monoterpenoid Content. Journal of Range Management 34: 497-500.

Welch, B., E. D. Mcartur, and J. N. Davis 1983. Mule Deer Preference and Monoterpenoids (Essential Oils). Journal of Range Management 36: 485-487.

Weidenhamer, J. D., F. A. Macias, N. H. Fischer, and G. B. Williamson. 1993. Just how soluble are monoterpenes? Journal of Chemical Ecology 19: 1799-1807. (A3, A4)

Wendakoon, C. N., and M. Sakaguchi. 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. Journal of Food Protection 58: 280– 283.

Wheatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Analitycal chemistry. Analitycal Chemistry 38: 971-977.

Wilson, D., and B. Hrutfiord. 1975. The fate of turpentine in aerated lagoons. Pulp Paper Can 76: 91-93.

Wilson, J. R. 1981. Environmental and nutritional factors affecting herbage quality. In: J. B. Hacker (ed.) Nutritional limits to animal production from pastures. p 111-129.

Zani, F., G. Massimo, S. Benvenuti, A. Bianchi, A. Albasini, M. Melegari, G. Vampa, A. Bellotti, and P. Mazza. 1991. Studies on the Genotoxic Properties of Essential Oils with *Bacillus subtilis* rec-Assay and *Salmonella*/Microsome Reversion Assay. Planta Medica 57: 237-241.

Zeppa, G., M. Giordano, M. Bertolino, and V. Gerbi. 2004. Use of monoterpenes and sesquiterpenes for the characterization of mountain cheeses. Acta Agriculturae Slovenica 84.

Zhang, Z. Y., and J. Pawliszyn. 1993. Headspace solid-phase microextraction. Analytical Chemistry 65: 1843-1852.

Ziino, M., C. Condurso, V. Romeo, D. Giuffrida, and A. Verzera. 2005. Characterization of "Provola dei Nebrodi", a typical Sicilian cheese, by volatiles analysis using SPME-GC/MS. International Dairy Journal 15: 585-593.

Zygmunt, B., and J. Namiesnik. 2001. Solid-phase microextraction-gas chromatographic determination of volatile monoaromatic hydrocarbons in soil. Fresenius Journal of Analytical Chemistry 370: 1096-1099.

Annexes

Dégradabilité ruminale de monoterpènes présents dans le régime de printemps de la chèvre laitière dans le Basilicate (Italie)

Rumen degradability of terpenes present in the spring diet of lactating goats from Basilicate (Italy)

M. MALECKY (1), V. FEDELE (2), L. BROUDISCOU (1)
(1) UMR Physiologie de la Nutrition et Alimentation, INAPG - INRA, 16 rue Claude Bernard - 75231 Paris Cedex 05 (France)
(2) Istituto sperimentale per la Zootecnia , Via Appia, Bella Scalo - 85054 Muro Lucano (Italie)

INTRODUCTION

Les terpènes végétaux consommés par les ruminants suscitent l'intérêt parce que ces métabolites secondaires sont identifiés dans les produits laitiers et peuvent servir de marqueurs de l'origine botanique de la ration. Malgré la relation entre le profil terpénique de la ration et celui des produits animaux, l'impact des microorganismes du rumen, premier compartiment traversé lors du transfert de ces composés vers le lait, sur ce profil est mal connu. L'objectif de notre essai a été d'estimer *in vitro* la dégradabilité ruminale de 9 monoterpènes présents dans les régimes de printemps de l'élevage caprin du Basilicate, terroir du sud de l'Italie.

1. MATERIEL ET METHODES

Les terpènes testés, de qualité chromatographique, ont été le limonène, le linalool, l'α-phellandrène, le ß-ocimène (E) et (Z), l'α-terpinène et le 4-terpinénol. Nous avons mesuré leur taux de disparition après incubation de 24 heures en présence de bactéries mixtes du rumen. Les terpènes ont été groupés en deux mélanges sur la base de leurs indices de Kovats pour réduire le nombre d'incubations en gardant une bonne résolution des séparations par CPG.

Quatre fermenteurs à effluent double (Broudiscou *et al.*, 1997) ont fourni les *inoculums* nécessaires aux incubations en tube de culture. Les fermenteurs continus ont été ensemencés par du contenu de rumen caprin et maintenus durant 10 jours sur une ration [foin de dactyle / maıs grain / tourteau de soja 48 + complément minéral : 65 /20 /15 en % MF] à raison de 15 g MF toutes les 12 heures.

Les terpènes ont été mis à incuber en anaérobiose dans des tubes de culture de 72 ml. La croissance microbienne a été supportée par l'apport de cellobiose (0,50 mmole /tube), maltose (0,50 mmole /tube), tryptone, sulfate et di hydrogéno-phosphate d'ammonium sous forme de solution tampon et nutritive (STN). Pour chaque mélange de terpène, 6 répétitions ont été faites à raison de 2 tubes/ jour en trois jours consécutifs :

a/ 2 ml de STN + 8 ml d'*inoculum* (tube témoin).

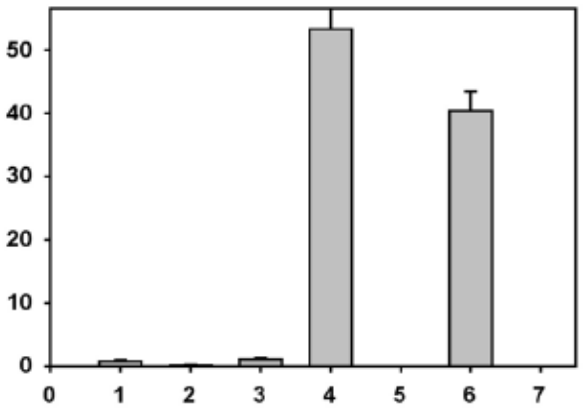
b/ 2 ml de STN + 8 ml d'*inoculum* + 5 µl d'un mélange de terpènes donnant une concentration finale de 3,33 ppm par terpène.

Les tubes ont été conservés à –30°C jusqu'à extraction par SPME (solide phase micro extraction). Les conditions opératoires de la SPME (mélange de 0,5 ml d'échantillon et 5,5 ml de tampon phosphate 0,3M pH 6,75, extraction à 45°C en 18'40'') ont été optimisées par la méthode des surfaces de réponse et la linéarité de la méthode a été vérifiée. Les terpènes extraits ont été analysés par CPG-FID (CP-Sil 5 CB 25m ID 0,25mm). Les valeurs de référence pour calculer les taux de disparition ont été obtenues en utilisant les milieux fermentaires des tubes témoins comme matrices lors de la SPME.

2. RESULTATS

Les différences entre jours d'incubation ou entre répétitions au sein du même jour ont été non significatives. Il a été clairement établi que l'α-terpinène, les deux formes de ß-ocimène, l'α-phellandrène et le linalool ont été dégradés en quasi-totalité tandis que le limonène et le 4-terpinénol n'ont été que partiellement dégradés, 59,6 % et 46,7 % des quantités initiales respectivement, soit une vitesse de dégradation de 1,98 ppm /j pour le limonène et 1,55 ppm /j pour le 4-terpinénol. La disparition des terpènes a été accompagnée de l'apparition de pics inconnus sur les chromatogrammes qui seront dans un premier temps identifiés par leur indice de Kovats et constituent d'éventuels produits de la transformation des terpènes testés.

Figure 1 : pourcentages d'α-terpinène (1), ß-ocimène-Z (2), ß-ocimène-E (3), 4-terpinénol (4), α-phellandrène (5), limonène (6) et linalool (7) restant après 24 h d'incubation (+ SEM)



CONCLUSION

Conformément aux résultats de Broudiscou *et al.* (2003) pour le ß-ocimène et le limonène et à ceux de Heyen et Harder (1998) sur la bioconversion de l'α-phellandrène par les bactéries méthanogènes, nous avons noté d'importantes différences de dégradabilité ruminale *in vitro* entre terpènes, de 100 % - pour l'α-phellandrène et le linalool - à 60 % pour le 4-terpinénol. Il faudra confirmer l'action des microbes du rumen sur des mélanges de terpènes, en solution éthanolique à différentes concentrations ou dans les tissus végétaux d'origine.

Broudiscou L.P., Papon Y., Fabre M., Broudiscou A.F. 1997. *J. Sci. Food. Agric.* 75, 273-280

Broudiscou L., Rouzeau A., Cornu A. 2003. Actes du 5ème colloque international sur les fromages d'alpage, 11-12, Beaufort, France

Heyen U., Harder J. 1998. *Fems. Microbiol. Lett.*, 169,67-71

Flux duodénaux de terpènes chez des chèvres laitières ingérant un mélange de linalool, p-cymène, α- et ß-pinène

Duodenal flows of terpenes in dairy goats ingesting a mixture of linalool, p-cymene, α- and ß-pinene

MALECKY M., SCHMIDELY P., BROUDISCOU L.

UMR Physiologie de la nutrition et alimentation, INAPG - INRA, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05 (France)

INTRODUCTION

En zone méditerranéenne, les terpènes contenus dans les plantes consommées par les ruminants laitiers sont susceptibles d'agir sur la qualité de la production fromagère. Par ailleurs, leur identification dans les produits laitiers pourrait aider à certifier le régime alimentaire utilisé dans les élevages à des fins de traçabilité. Dans le but d'étudier leur métabolisme chez le ruminant, les flux duodénaux de quatre monoterpènes caractéristiques du régime de printemps de l'élevage caprin du Basilicate (Italie du sud) ont été quantifiés chez des chèvres de races Alpine et Saanen en lactation.

1. MATERIEL ET METHODES

Durant six semaines, douze chèvres en lactation fistulées au rumen et au duodénum ont reçu, *ad libitum* en deux repas égaux, une ration complète comprenant 50 % de foin de graminées, 25 % de pulpes de betteraves, 20 % de concentré standard (blé, maïs, tourteau de soja) , de la mélasse et du bicarbonate. Les animaux ont été logés en case individuelle puis en cages de digestibilité dès l'adaptation à l'apport d'oxyde de chrome utilisé comme marqueur du flux duodénal.

Les chèvres ont été réparties en trois lots expérimentaux. Deux lots de cinq chèvres ont reçu le mélange de terpènes à raison de 0,05 ml (lot B) et 0,5 ml (lot H) par kg de matière sèche ingérée (MSI). Deux chèvres témoins n'ont reçu aucun terpène. Les terpènes testés ont été mélangés dans les proportions molaires suivantes : linalool 45,1 %, p-cymène 36,7 %, α-pinène 16,0 %, ß-pinène 2,2 %, conformément aux données de Fedele *et al.* (2005). Le mélange de terpènes a été introduit par la canule du rumen à chaque repas.

La mesure des flux duodénaux a été faite par introduction de chrome (1,2 g de Cr_2O_3 par repas) dans le rumen pendant trois semaines : une semaine d'adaptation au chrome, une semaine de récolte fécale et trois jours consécutifs de collecte de digesta duodénaux, à raison de douze prélèvements individuels couvrant le nycthémère avec un pas de temps de 2 h. Chaque prélèvement, d'environ 60 ml, a été aliquoté et congelé immédiatement.

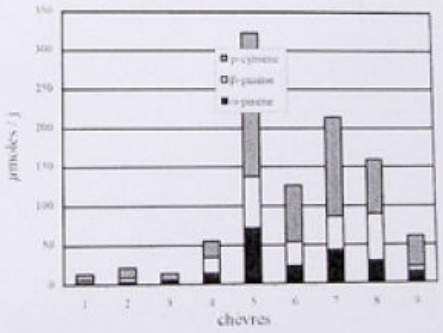
Les échantillons de contenu duodénaux ont été conservés à –30°C jusqu'à extraction par SPME (*solide phase micro extraction*). Les conditions opératoires de la SPME (mélange de 0,5 ml d'échantillon et 5,5 ml de tampon phosphate 0,3M pH 6,75, extraction à 45°C en 18'40'') ont été optimisées par la méthode des surfaces de réponse. La linéarité de la méthode a été vérifiée. Les terpènes extraits ont été analysés par CPG-FID (CP-Sil 5 CB 25m ID 0,25mm). Les étalonnages ont été faits en utilisant les contenus duodénaux des animaux témoins comme matrices lors de la SPME. Les flux de terpènes chez les lots B et H ont été calculés après soustraction des concentrations mesurées chez les animaux témoins.

2. RESULTATS

Une chèvre du lot B a été éliminée suite à un incident sanitaire. Les animaux du lot B ont reçu de 344 à 413 µmoles / j de linalool, de 279 à 335 µmoles / j de p-cymène, de 122 à 146 µmoles / j d'α-pinène et de 17 à 20 µmoles / j de ß-pinène, en relation avec des niveaux d'ingestion variant de 2,55 à 3,05 kg MSI / j. De même, le lot H a reçu de 2,63 à 3,87 mmoles / j de linalool, de 2,14 à 3,14 mmoles / j de p-cymène, de 0,93 à 1,37 mmoles / j d'α-pinène et de 128 à 188 µmoles / j de ß-pinène, pour des ingestions variant de 1,94 à 2,87 kg MSI / j.

Tous les digesta duodénaux étaient dépourvus de linalool (figure 1). Dans le lot B, 4,0 % du p-cymène, 4,2 % de l'α-pinène et 39,8 % du ß-pinène ingérés ont été retrouvés en moyenne au niveau duodénal. Dans le lot H, ces ratios entre flux terpéniques alimentaires et duodénaux ont été respectivement de 3,6 %, 3,0 % et 25,2 %. Au sein de chaque lot, nous avons observé des différences importantes entre chèvres dans les flux duodénaux de terpènes (figure 1), dans des rapports de 3,8 et de 5,3 respectivement pour les lots B et H.

Figure 1 : Flux duodénaux cumulés de p-cymène, α- et ß-pinène chez les chèvres du lot B (1 à 4) et du lot H (5 à 9).



CONCLUSION

Les quatre terpènes alimentaires ont été soumis à un transit duodénal différentiel, marqué par une disparition du linalool et un enrichissement relatif en ß-pinène, quel que soit le lot considéré. Les différences dans les flux duodénaux de terpènes entre chèvres ne peuvent être expliquées par les différences d'apport liées au niveau d'ingestion. D'éventuelles relations entre ces variations individuelles et des grandeurs descriptives du métabolisme ruminal seront recherchées dans la suite de cette étude.

Fedele V., Claps S., Rubino R., Sepe L., Cifuni G.F. 2005. Options méditerranéennes, Série A, Séminaires Méditerranéens, 67, 261-267

Résumé

L'objectif principal de cette thèse est d'étudier *in vitro* et *in vivo*, le métabolisme de certains terpènes caractéristiques de régimes d'hiver-printemps ingérés par les chèvres laitières dans la région du Basilicate (Italie). Nous avons cherché à quantifier dans une première étape le métabolisme des terpènes en milieu fermentaire *in vitro*, et de caractériser les facteurs majeurs de variation de leur métabolisme. Nous avons également effectué un essai *in vivo* sur 4 terpènes particuliers (α-pinène, β-pinène, p-cymène, et linalool, les terpènes principaux ingérés par les chèvres en Basilicate) dans le but de valider les résultats obtenus *in vitro*, de caractériser leur devenir dans le rumen, et leur flux au niveau duodénal et sanguin. En parallèle nous avons étudié l'impact de ces terpènes sur le métabolisme ruminal des parois et des protéines, ainsi que leurs effets sur les performances des chèvres laitières.

La partie expérimentale est composée de trois séries d'études. Les études méthodologiques, les études de métabolisme des terpènes *in vitro* et celles *in vivo*. Les études méthodologiques de mise au point d'une méthode d'extraction et d'analyse (SPME «Solid Phase Microextraction») ont été réalisées afin d'obtenir les conditions optimales pour l'extraction des terpènes en milieu fermentaire et dans la matrice sanguine.

Le premier essai *in vitro* a conduit à une discrimination des terpènes testés en termes de leur disparition dans le jus de rumen, qui a été associée au type chimique du terpène considéré. Les terpènes hydrocarbones ont montré en effet une disparition beaucoup plus marquée par rapport aux terpènes oxygénés. Cette différence tient principalement à leurs différences de propriétés physico-chimiques, qui sépare en partie leur voie métabolique. La disparition de terpènes semble avoir deux causes principales, une intervention biologique d'origine microbienne et une interaction avec la matrice. Une propriété moins toxique et plus hydrophobe semble renforcer le métabolisme (dégradation) microbien et l'intervention de la matrice sur les terpènes hydrate de carbones par rapport à ceux oxygénés.

Dans le deuxième essai *in vitro*, l'effet de trois facteurs de variation, le type d'inoculum (riche en fibre vs. riche en amidon), le type des bactéries (Gram + vs Gram -, sélectionnées par l'apport d'antibiotique) et le potentiel redox ont été étudiés sur le métabolisme des terpènes en milieu fermentaire. Les résultats obtenus ont montré que l'inoculum riche en fibre, théoriquement favorisant les bactéries cellulolytiques accroît la dégradation apparente de terpènes. L'absence d'un effet de l'ajout de l'antibiotique éliminant des bactéries Gram + a montré que ce sont les bactéries Gram - qui contribuent au métabolisme des terpènes. Enfin, l'augmentation du potentiel redox a augmenté la disparition de certains des terpènes testés, notamment dans l'inoculum riche en amidon.

Les résultats obtenus dans les études *in vitro* concernant le métabolisme des terpènes, ont été confirmé par ceux observés *in vivo*. Toutefois une disparition supérieure observée *in vivo* a suggéré l'intervention d'autres facteurs de variation qui peuvent être attribué à l'absorption dans le rumen et une perte causée par rumination et éructation. L'impact de terpènes sur le métabolisme du rumen et la performance des chèvres laitières a été étudié par l'incorporation d'un mélange de quatre terpènes (mentionnées ci-dessus) à deux doses (0.05 et 0.5 ml/kg MSI). L'ingestion de terpènes n'a provoqué aucun effet sur le métabolisme ruminal des fibres, et des protéines. Les performances de production des chèvres n'ont pas été affectées par les terpènes; cependant une modification du taux protéique (chute du Taux protéique à dose faible) observée, peut être considérée comme un effet secondaire (effet de dilution) lié à une augmentation numérique de la production du lait à cette dose

Mots-clés: Terpénoïdes, milieu fermentaire, Optimisation, Solid Phase Microextraction (SPME),dégradation, in vitro, in vivo, métabolisme, rumen, chèvres laitières

The metabolism of terprenoides in caprins

Abstract

The main objective of this thesis is to study *in vitro* and *in vivo* the metabolism of some terpenes characteristic of winter-spring ration ingested by dairy goats in the region of Basilicata (Italy). We sought to quantify as the first step, the metabolism of terpenes in the fermentation broth *in vitro* and to characterize the major variation factors of their metabolism. We also conducted a test *in vivo* on 4 individual terpenes (α-pinene, β-pinene, p-cymène and linalool, the main terpenes ingested by goats in Basilicata), in order to validate the results obtained *in vitro*, to characterize their changes in the rumen, and their duodenal and blood flow level. In parallel we have studied the impact of these terpenes on ruminal metabolism of cell walls and protein, as well as their effects on the performance of dairy goats.

The experimental part is composed of three sets of studies. The methodological studies, *in vitro* and *in vivo* studies of metabolism of terpenes. The methodological optimization studies of an extraction and analysis method (SPME "Solid Phase Microextraction") have been conducted in order to obtain the optimum conditions for the extraction of terpenes in the fermentation broth and blood matrix.

The first *in vitro* essay led to a discrimination of tested terpene in terms of their disappearance in the rumen juice, which has been associated to chemical type of considered terpene. The hydrocarbons terpenes showed indeed a much greater disappearance compared to oxygenated ones. This difference is mainly due to differences in their physico-chemical properties, which separates in part their metabolic pathway. The disappearance of terpenes appears to have two main causes, biological intervention of microbial origin and interaction with the matrix. A lower toxic and higher hydrophobic property seems to reinforce the microbial metabolism and the intervention of the matrix on hydrocarbon terpenes compared to those oxygenated ones.

In the second test *in vitro*, the effect of three variables, the type of inoculum (rich in cell walls vs. rich in starch), the type of bacteria (gramme positive vs gramme negative- selected by the contribution of antibiotic) and the redox potential were studied on the metabolism of terpenes in the fermentation broth. The results showed that the inoculum high in cell walls, theoretically supporting cellulolytic bacteria increases the apparent degradation of terpenes. The absence of an effect from the addition of the antibiotic eliminating gramme positive bacteria showed that the gramme negative bacteria are principal responsible, which contribute to the metabolism of terpenes. Finally, the increase in the redox potential increased the disappearance of some of tested terpenes, especially in the inoculum rich in starch.

The results from *in vitro* studies on the metabolism of terpenes, were confirmed by those observed *in vivo*. However a higher disappearance observed *in vivo* suggested the involvement of other varying factors that can be attributed to the absorption in the rumen and a loss from rumination and belching. The impact of terpenes on rumen metabolism and performance of dairy goats was studied by incorporating a mixture of four terpenes (mentioned above) at two doses (0.05 and 0.5 ml / kg DMI). Ingestion of terpenes did not produce any effect on the ruminal metabolism of cell walls, and protein. The productivity performance goats were not affected by terpenes, but a change in the milk protein content (a drop in protein content at low dose) observed, can be considered as a secondary effect (effect of dilution) linked to a numerically increase in the milk production at this dose level.

Keyword: Terpenoïdes, fermentation broth, Optimization, Solid Phase Microextraction (SPME), degradation, in vitro, in vivo, metabolism, rumen, dairy goats