



# Intérêt de l'utilisation de l'huile essentielle du *Thymus Capitatus* en élevage bovin laitier et impact sur la qualité du lait

Ralph Nehme

## ► To cite this version:

Ralph Nehme. Intérêt de l'utilisation de l'huile essentielle du *Thymus Capitatus* en élevage bovin laitier et impact sur la qualité du lait. Sciences agricoles. Agrocampus Ouest, 2023. Français. NNT : 2023NSARB372 . tel-04547362

**HAL Id: tel-04547362**

**<https://theses.hal.science/tel-04547362>**

Submitted on 15 Apr 2024

**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.

# THESE DE DOCTORAT DE

## L'INSTITUT AGRO RENNES ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 600

*Ecologie, Géosciences, Agronomie, Alimentation*

Spécialité : Sciences de l'aliment

Par

**Ralph NEHME**

## Intérêt de l'utilisation de l'huile essentielle de *Thymus capitatus* en élevage bovin laitier et impact sur la qualité du lait

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 15 novembre 2023

Unité de recherche : INRAE Institut Agro RA \_ UMR 1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf

Thèse N° : B-372 2023-20

### Rapporteurs avant soutenance :

**Khadija Ouguerram**

Professeure, UMR 1280 PHAN, INRAE – Université Nantes

**Pascal Degraeve**

Professeur, Département Génie Biologique, Université Claude Bernard Lyon 1

### Composition du Jury :

Président : **Thomas Croguennec**

Professeur, STLO, Institut Agro Rennes-Angers

Examineurs : **Yassine Mallem**

Professeur, Nutrition, Pathophysiologie et Pharmacologie, ONIRIS, Nantes

**Ksouri Riadh**

Professeur, Centre de Biotechnologie, Borj Cedria, Tunisie

Dir. de thèse : **Saïd Bouhallab**

Directeur de Recherche, STLO, INRAE, Rennes

Co-dir. de thèse : **Latifa Abdennebi-Najar**

Directrice scientifique, Institut de l'élevage, Paris

### Invité(s)

**Michèle Sabbah**

Directrice de Recherche, Centre de Recherches Saint-Antoine-CRSA, Inserm, Paris



## Remerciements

Ces trois années de thèse ont certes été exigeantes mais cette aventure ne fut pas solitaire. En effet, j'ai eu le privilège de rencontrer de nombreuses personnes enrichissantes tant sur le plan professionnel que personnel. Les nombreux moments partagés avec elles, ont joué un rôle important dans mon développement intellectuel, contribuant à l'évolution et l'amélioration de mes travaux. A travers ces remerciements, je souhaite exprimer ma gratitude envers toutes ces personnes qui ont participé à la réussite de ma thèse.

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de thèse, Said Bouhallab. Merci pour ta confiance, tes encouragements, ton écoute mais aussi la transmission de ton expérience scientifique, ta patience et ta gentillesse. J'ai pu compter sur toi tout au long de ces trois années.

J'adresse également mes remerciements et mon admiration à ma co-directrice de thèse, Latifa Najar. Je suis heureux d'avoir pu compter sur ta confiance, ta patience et ton énergie qui m'ont permis de tenir le cap pendant cette thèse et de gagner en assurance pour faire mes propres choix.

Je tiens également à remercier mes rapporteurs de thèse Khadija Ouguerram et Pascal Degraeve, ainsi que les examinateurs : Thomas Croguennec, Riadh Ksouri et Yassine Mallem. Vos retours très positifs sur mon travail m'ont touché et m'ont permis de prendre la mesure du travail accompli au cours de ces trois années.

J'aimerais également remercier les membres de mon comité de suivi : Riadh Ksouri, Nathalie Bareille, Michele Sabbah, Yassine Mallem, Sergine Even et Elise Vanbergue pour leur aide précieuse. Votre regard extérieur et vos remarques constructives ont permis de faire évoluer mon travail pour atteindre ce résultat final.

Je souhaite aussi remercier Marie-Pierre Jacqueroud, responsable de site à l'IDELE, Yves Le Loir, directeur du STLO, et Michèle Sabbah, directrice du centre de recherche scientifique Saint-Antoine, pour leur accueil toujours bienveillant dans leurs institutions respectives.

De même, je tiens à remercier l'ensemble des collègues de l'IDELE qui m'ont accompagné, notamment Elise Vanbergue, Cléa Michelet, Philippe Rousselle, Valérie Hardit, Faustine Noel, Catherine Malayrat, Anne Aupiais et Maxime Legris ; ainsi que l'ensemble des collègues du



STLO dont Lucie Rault, Pascaline Hamon, Florence Rousseau, Sergine Even, Nathalie Daniel, Marie-Noelle Madec, Marie-Hélène Famelart et Marie-Bernadette Maillard. Je vous remercie encore pour votre soutien et votre aide au quotidien qui m'ont permis de mener à bien mes nombreuses expérimentations.

Je n'oublie pas nos partenaires du projet MilkQua issus de différents pays et continents. Nos échanges ont été enrichi de cette interculturalité propre à un monde universitaire ouvert sur le monde. Je les remercie pour leurs conseils, leur écoute, leur convivialité et la bonne entente qui régnait sur ce projet collectif.

Je remercie l'ensemble des technicien-e-s de la ferme expérimentale de Mejusseaume au Rheu pour leur disponibilité, leur rigueur, leur engagement pour contribuer à la réussite de mes expérimentations.

Mes remerciements ne seraient pas complets sans remercier mes ami-e-s Rémy Sebastia et Joanna Nehme pour leur aide précieuse de relecture et de correction des articles et de ce manuscrit ainsi qu'un soutien régulier face aux découragements occasionnels.

Il est aussi important pour moi de remercier ma famille ; mes parents pour le soutien inconditionnel à la fois moral et financier à mon projet de vie qui m'a conduit en France ; ainsi qu'à mes sœurs, Reine et Reem, pour leurs encouragements et leur soutien.

Enfin, je ne peux conclure ces remerciements sans m'adresser à mes collègue du STLO. Merci pour l'ambiance exceptionnelle au bureau ainsi qu'en dehors (lors de nos soirées). Je pense notamment à Julia, Coralie, Rima, Lucas, Alizé, Charles, Margot, Talès, Yasmine, Ligia, Éric, etc.

Et bien évidemment, je remercie toutes les personnes que j'ai croisé sur ma route ces trois dernières années et qui ont apporté quelque chose à mon travail ou à mon développement.

## Table des matières

<b>Introduction générale .....</b>	<b>21</b>
<b>État de l'art.....</b>	<b>29</b>
1. Glande mammaire et production de lait.....	29
1.1. Physiologie de la glande mammaire bovine .....	29
1.2. Synthèse et composition du lait .....	30
1.2.1. Protéines.....	31
1.2.2. Matière grasse .....	32
1.2.3. Glucides .....	33
1.2.4. Vitamines et minéraux.....	33
2. Les mammites chez la vache laitière.....	34
2.1. Généralités.....	34
2.1.1. Les deux formes de mammites.....	34
2.1.2. Incidence des mammites en France et dans le monde .....	35
2.1.3. Impact économique.....	35
2.2. Pathogènes impliqués dans les cas de mammites.....	36
2.2.1. Bactéries environnementales.....	37
2.2.2. Bactéries contagieuses .....	38
2.3. Les mécanismes de défense de la glande mammaire .....	38
2.3.1. Réponse immunitaire de la glande mammaire .....	38
2.3.2. Cellules somatiques du lait .....	41
2.4. Microbiote de la mamelle .....	41
2.4.1. Microbiote sain du lait.....	42
2.4.2. Relation entre microbiote du lait et mammite .....	44
2.5. Traitements conventionnels des mammites en élevage .....	45
2.5.1. Mammites cliniques .....	45

2.5.2.	Mammites subcliniques.....	46
2.5.3.	Traitement au tarissement .....	47
3.	Approches alternatives aux antibiotiques .....	48
3.1.	Les huiles essentielles dans l'élevage : de la santé à la qualité alimentaire.....	49
3.2.	Huiles essentielles et mammites .....	87
3.2.1.	Études in vitro.....	87
3.2.2.	Études in vivo.....	89
3.3.	Que dit la réglementation française sur les usages des huiles essentielles en médecine vétérinaire ? .....	90
4.	Conservation des huiles essentielles par encapsulation.....	91
4.1.	Intérêts de l'encapsulation des huiles essentielles .....	91
4.2.	Nano-émulsion.....	92
4.2.1.	La sonication .....	92
4.2.2.	L'homogénéisation à haute pression .....	93
4.3.	Coacervation complexe.....	94
4.3.1.	La coacervation complexe hétéroprotéique .....	96
4.3.2.	Les deux protéines impliquées dans la coacervation complexe .....	96
4.3.2.1.	La lactoferrine (LF) .....	96
4.3.2.2.	La beta-Lactoglobuline (BLG).....	97
4.3.3.	Facteurs influençant la formation de la coacervation complexe .....	98
4.3.3.1.	pH.....	98
4.3.3.2.	Concentration des protéines et rapport de concentration .....	99
4.3.3.3.	La force ionique .....	99
4.4.	Exemples d'encapsulation des huiles essentielles.....	100
4.4.1.	Par nano-émulsion.....	100
4.4.2.	Par coacervation complexe .....	102

<b>Questions de recherche et stratégie générale.....</b>	<b>107</b>
<b>Chapitre 1 : Effets d'une application cutanée de l'HETC sur l'inflammation et la qualité du lait chez les vaches atteintes de mammites subcliniques .....</b>	<b>111</b>
1. Introduction.....	111
2. Les effets d'une application topique de HETC sur la qualité du lait : une approche de biologie systémique.....	111
3. Données complémentaires .....	149
3.1. Matériels et méthodes.....	149
3.1.1. Détection des mammites subcliniques et sélection et inclusion des 12 vaches laitières dans le protocole expérimentale .....	149
3.1.2. Sélection de l'huile essentielle de <i>Thymus capitatus</i> .....	149
3.1.3. Prise de sang jugulaire .....	150
3.1.4. Isolation des PBMC.....	150
3.1.5. RT-PCR.....	151
3.2. Résultats.....	151
3.2.1. Sélection de l'HETC .....	151
3.2.2. Expression des gènes inflammatoires .....	152
4. Discussion .....	154
5. Conclusion .....	156
<b>Chapitre 2 : Études <i>in vitro</i> des effets anti-inflammatoires et antibactériens des huiles essentielles.....</b>	<b>159</b>
1. Introduction.....	159
2. Effets anti-inflammatoires des HEs .....	160
2.1. Activité anti-inflammatoire de HETC et de son composé principal le carvacrol .	160
2.1.1. Matériels et méthodes .....	160
2.1.1.1. Culture et stimulation des PBMC.....	160
2.1.1.2. Évaluation de la toxicité des HETC et du carvacrol.....	161

2.1.1.3. Analyse RT-PCR .....	162
2.1.1.4. MILLIPLEX® bovine magnetic bead panel multiplex .....	162
2.1.2. Résultats .....	162
2.1.2.1. Cytotoxicité de l'HETC et du carvacrol.....	162
2.1.2.2. Expression des gènes .....	163
2.1.2.3. Dosage des cytokines par MILLIPLEX® .....	165
2.1.3. Discussion .....	166
2.2. Activité anti-inflammatoire des huiles essentielles méditerranéennes et de leurs principaux composés chez les macrophages THP-1 .....	167
3. Étude des effets antibactériens du carvacrol après encapsulation .....	169
3.1. Introduction .....	169
3.2. Propriétés antibactériennes du carvacrol libre, nano-émulsionné et complexé avec des protéines.....	170
4. Conclusion .....	195
4.1. Propriétés anti-inflammatoires des HEs .....	195
4.2. Encapsulation des HEs et activité antibactérienne.....	196
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>201</b>
<b>Valorisation de la thèse .....</b>	<b>207</b>
<b>Liste des annexes.....</b>	<b>211</b>
Annexe 1 : Tableau représentant les différents Work packages (WP) du projet MilkQua	211
Annexe 2 : Les objectives des deux Work Packages 4 et 6.....	212
Annexe 3 : Exemple de protocole de thérapie clinique des mammites basée sur la culture bactériologique.....	213
Annexe 4: Liste des huiles essentielles autorisées en médecine vétérinaire (extrait du tableau 1 du règlement LMR).....	214
Annexe 5 : <i>Thymus capitatus</i> .....	215

<b>Annexe 6 : Effets de l'exposition olfactive à 12 huiles essentielles sur le comportement et la santé des vaches laitières atteintes de mammites subcliniques .....</b>	<b>216</b>
1. Introduction.....	216
2. Matériels et méthodes .....	218
2.1. Choix des vaches laitières .....	218
2.2. Sélection des douze huiles essentielles .....	219
2.3. Détermination des sous-groupes et de la hiérarchie sociale .....	220
2.4. Protocole olfaction.....	220
2.4.1. Parcelle et HEs .....	220
2.4.2. Étape d'habituation .....	221
2.4.3. Première étape du protocole .....	222
2.4.4. Seconde étape du protocole .....	222
2.5. Prélèvement et mesures .....	223
3. Résultats préliminaires et discussions .....	224
3.1. Étude de comportements .....	224
3.1.1. Analyse comparative de l'intérêt des vaches envers les HEs .....	224
3.1.2. Étude de répétabilité .....	225
3.1.3. Les huiles essentielles et leurs familles chimiques.....	226
3.2. Étude physiologique.....	227
3.2.1. Évolution du cortisol sanguin .....	227
3.2.2. Évolution de CCS et de la bactériologie dans le lait .....	228
4. Conclusion .....	228
Annexe 7 : <i>Laurus nobilis</i> .....	229
Annexe 8 : <i>Cinnamosma fragrans</i> .....	230
Annexe 9 : <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	231
Annexe 10 : <i>Zingiber officinalis</i> .....	232

Annexe 11 : <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	233
Annexe 12 : <i>Pinus ponderosa</i> .....	234
Annexe 13 : <i>Eucalyptus citriodora</i> .....	235
Annexe 14 : <i>Lavandula angustifolia</i> .....	236
Annexe 15 : <i>Coriandrum sativum</i> .....	237
Annexe 16 : <i>Pelargonium graveolens</i> .....	238
Annexe 17 : <i>Artemisia herba alba</i> .....	239
Annexe 18 : L'analyse bactériologique du lait issue des quartiers atteintes de mammites subcliniques .....	240
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>245</b>

## Légende des figures<sup>1</sup>

Figure 1 : Evolution de la consommation totale d'antibiotiques chez les humains et les animaux d'élevages dans les 27 pays de l'Union européenne et de l'espace économique européenne.	23
Figure 2 : A : Anatomie de la glande mammaire de la vache laitière. B : Structure de l'alvéole mammaire	30
Figure 3 : Lumière alvéolaire et synthèse des différents constituants du lait	32
Figure 4 : Diverses sources des micro-organismes causant les mammites bovines.	37
Figure 5 : Accumulation des cellules immunitaires dans la glande mammaire saine et infectée.	39
Figure 6 : Le rôle des cytokines dans l'inflammation	40
Figure 7 : Répartition des vingt genres bactériens les plus prévalents trouvés dans 50 échantillons de lait de quartiers sains contenant moins de 20 000 cellules par millilitre.	43
Figure 8 : Les facteurs qui influencent l'homéostasie de la glande mammaire	44
Figure 9 : Evolution du nombre de traitement intra-mammaires par vaches laitières depuis 1991.	48
Figure 10 : Graphique de répartition du nombre d'articles contenant « Mastitis » et «essential oil» selon l'année de publication (2007-2023).	50
Figure 11 : Les 3 étapes de l'homogénéisation de haute pression : fragmentation (Droplet breakage), coalescence et adsorption.	94
Figure 12 : Schéma d'une coacervation complexe.	95
Figure 13 : Structure tertiaire de la lactoferrine liant à deux atomes de fer (sphères rouges).	97
Figure 14 : Caractéristiques de la structure native de BLG	98
Figure 15 : Graphique de répartition du nombre d'articles contenant « nanoemulsion essential oil» selon l'année de publication (2000-2023).	100
Figure 16 : Graphique de répartition du nombre d'articles contenant « complexe coacervation » et «essential oil» selon l'année de publication (2000-2023)	102
Figure 17 : Schéma récapitulatif de la stratégie générale	108

<sup>1</sup>Les figures de la revue bibliographique et des articles ne sont pas référencées



Figure 18 : Diamètre de la zone d'inhibition des 9 HEs tunisiennes et de 4 antibiotiques (Amoxicilline, Ampicilline, Colistine et Céphalexine) contre <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> . ....	152
Figure 19 : Expression normalisée de 6 gènes inflammatoires Cox-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ et IL-12 $\beta$ au jour 7 (le lendemain du dernier traitement) par rapport à T0 pour les 2 groupes (témoin et HE) .....	153
Figure 20 : Illustration des deux stratégies adoptées dans notre étude. ....	161
Figure 21 : Viabilité des PBMC traitées avec des concentrations croissantes d'huile essentielle de <i>Thymus capitatus</i> (HETC) et de carvacrol (C) évaluée par le test MTT. ....	163
Figure 22 : Effets préventifs de l'huile essentielle de <i>Thymus capitatus</i> et du carvacrol sur l'expression des ARNm de COX-2, IL-6 et TNF- $\alpha$ induite par LPS. ....	164
Figure 23 : Effets curatifs de l'huile essentielle de <i>Thymus capitatus</i> (HETC) et du carvacrol (C) sur l'expression des ARNm de COX-2, IL-8, IL-6 et TNF- $\alpha$ induite par LPS. ....	165
Figure 24 : Effets préventifs de l'huile essentielle de <i>Thymus capitatus</i> et du carvacrol sur la sécrétion des protéines IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ et IL-1 $\beta$ induites par le LPS. ....	166
Figure 25 : Pistes et perspectives envisageables basées sur les résultats du traitement des mammites subcliniques.....	204
Figure 26 : Graphique de répartition du nombre d'articles contenant « inhalation essential oils » selon l'année de publication (2007-2023).....	216
Figure 27 : Répartition spatiale des huiles essentielles (HEs) en zones en fonction de la famille chimique de leur principal composé. ....	221
Figure 28 : Schéma de la première étape du protocole.....	222
Figure 29 : Schéma de la seconde étape du protocole. ....	223
Figure 30 : Temps moyen consacré par chaque groupe de vaches à inhaler une ou plusieurs HEs. ....	225
Figure 31 : Répartition des familles chimiques d'huiles essentielles senties par les deux groupes de vaches.....	226
Figure 32 : Évolution du taux de cortisol sanguin moyen des 29 vaches laitières avant et après l'expérimentation.....	227
Figure 33 : Boxplot de l'évolution de nombre de cellules somatiques (CCS) dans le lait en fonction de la période de prélèvement chez les vaches atteintes de mammites subcliniques (VM) et les vaches saines (VS).....	228

## Légende des tableaux<sup>2</sup>

Tableau 1 : Composition du lait de vache .....	31
Tableau 2 : Les lipides dans le lait bovin .....	33
Tableau 3 : Liste de 5 publications récentes sur les effets antibactériens des HEs contre les pathogènes responsables des mammites bovines .....	88
Tableau 4 : Liste des 10 publications récentes sur la nano-émulsion des HEs et sur son effet sur l'amélioration de leurs propriétés biologiques .....	101
Tableau 5 : Liste des 10 publications récentes sur la coacervation complexe des huiles essentielles et son impact sur leurs propriétés .....	103
Tableau 6 : Les séquences des amorces sens et antisens. ....	151
Tableau 7 : Les séquences des amorces sens et antisens. ....	162
Tableau 8 : Liste de neuf publications sur l'impact de l'inhalation des HEs sur la santé.....	217
Tableau 9 : Les douze HEs sélectionnées pour l'expérimentation.....	219
Tableau 10 : Pourcentage de vaches ayant inhalé au moins une HE dans les deux groupes : vaches atteintes de mammites (VM) et vaches saines (VS).....	225

<sup>2</sup>Les tableaux de la revue bibliographique et des articles ne sont pas référencés

## Liste des abréviations

### B

BLG : Beta lactoglobuline

### C

C : Carvacrol

CCS : Comptage cellules somatiques

CMI : Concentration minimale inhibitrice

### D

Dex : Dexaméthasone

### E

*E. coli* : *Escherichia coli*

### F

FBS : Fetal Bovine Serum

### G

GC-MS : Gas Chromatography-Mass Spectrometry

### H

HE : Huile essentielle

HEs : Huiles essentielles

HETC : Huile essentielle de *Thymus capitatus*

HCC : Coacervation complexe hétéroprotéique

### L

LF : Lactoferrine

## M

MES : Acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

## N

NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor-kappa B

## P

PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique

PBS : Phosphate-Buffered Saline

## R

RAA : Résistance aux antibiotiques

RSM : Réponse de Surface Méthodologie

RT-PCR : Réaction en chaîne par polymérase avec transcription inverse

## S

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*

SCN : Staphylocoques à coagulase négative

## T

$\tau$  : Turbidité

## V

VM : Vaches atteintes de mammites

VS : Vaches saines

## W

WP : Work package



## Avant-propos

À la suite de mon diplôme d'ingénieur en agroalimentaire, j'ai entrepris une thèse de recherche pluridisciplinaire intitulée "Intérêt de l'utilisation de l'huile essentielle de *Thymus capitatus* en élevage bovin laitier et impact sur la qualité du lait". Cette thèse fait partie du projet européen Prima "MilkQua". En plus de mes structures d'accueil l'INRAe STLO et l'Institut de l'Élevage (IDELE), j'ai eu l'opportunité de collaborer avec différents partenaires, notamment l'Università degli Studi di Milano (UMIL) en Italie, l'University Porto - Faculty of Pharmacy (UPFF) au Portugal, la ferme de Mejusseaume de l'INRAe, ainsi que le centre de biotechnologie de Borj Cedria en Tunisie. Par ailleurs, j'ai passé trois mois au sein du Centre de Recherche Scientifique Saint-Antoine (CRSA) à Paris pour m'initier aux techniques de lecture cellulaires. Ma thèse pluridisciplinaire a englobé divers domaines de recherche, notamment la zootechnie, l'immunologie, la microbiologie, la biologie moléculaire et cellulaire, le génie des procédés, et, dans une moindre mesure, l'éthologie. Cette pluridisciplinarité est un avantage pour construire mon avenir professionnel.



# Introduction générale





## Introduction générale

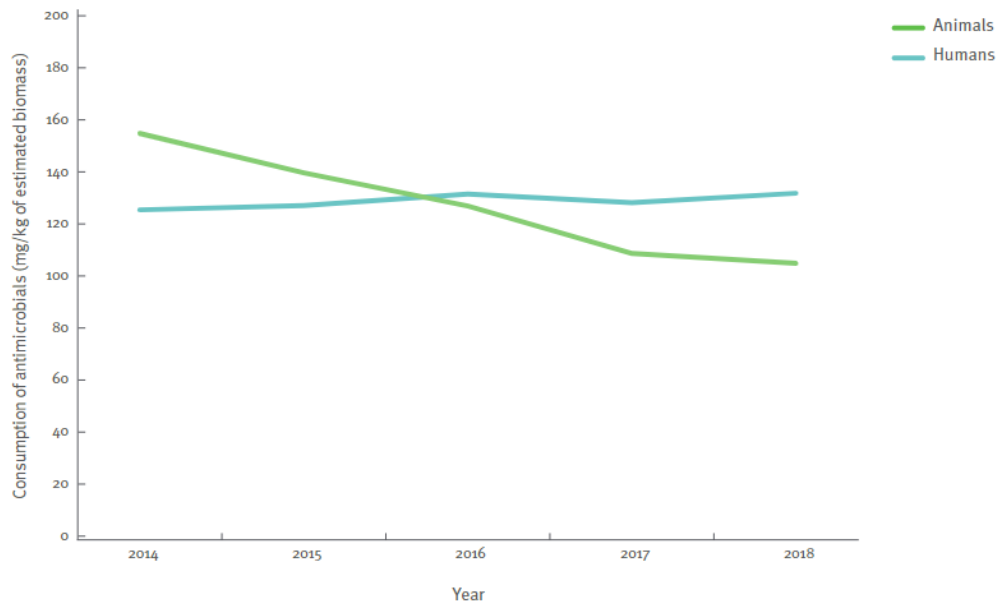
Les mammites bovines, inflammations des glandes mammaires chez les vaches, ont des conséquences importantes à l'échelle mondiale. Ces pathologies représentent un défi majeur pour l'industrie laitière en raison de leur impact économique considérable, avec un coût total mondial estimé entre 19,7 et 32 milliards de dollars américains par an (Cha et al., 2011; Huijps, Lam, & Hogeveen, 2008; Rollin, Dhuyvetter, & Overton, 2015). De plus, elles posent des enjeux scientifiques complexes liés à leur prévention et à leur traitement, ainsi que des répercussions sur la santé des animaux et des consommateurs (Cheng & Han, 2020). Les mammites bovines sont considérées comme l'une des principales maladies infectieuses touchant les vaches laitières. Elles entraînent une diminution significative de la production laitière, des coûts de traitements vétérinaires élevés et une augmentation des pertes économiques liées à l'abattage précoce des animaux atteints. Outre les conséquences directes sur les éleveurs et les exploitations, les mammites ont également un impact sur les marchés laitiers nationaux et internationaux (Halasa, Huijps, Østerås, & Hogeveen, 2007). Le traitement des mammites est également un défi car il nécessite une approche adaptée à chaque cas. Les antibiotiques sont souvent utilisés pour combattre l'infection (El-Sayed & Kamel, 2021). En ce qui concerne l'élevage laitier en France, les mammites sont la principale cause d'utilisation des antibiotiques, notamment d'antibiotiques d'importance critique comme les céphalosporines de troisième et de quatrième génération (Manriquez, Costa, Ferchiou, Raboisson, & Lhermie, 2022).

Depuis leur apparition dans les années 1930, les antibiotiques ont été massivement utilisés dans les fermes, les aquacultures ainsi que dans les usines agroalimentaires dans le but de traiter et prévenir les maladies et de conserver les produits alimentaires. Leur diffusion rapide dans tous les domaines de la production et de la transformation des aliments était alors considérée comme un progrès technique. Cependant, cette utilisation massive des antibiotiques a des impacts dramatiques sur la santé humaine, animale et environnementale. De nos jours, la production annuelle mondiale d'antibiotiques est estimée à 100 000 tonnes, avec plus d'un milliard de tonnes produites en cumulées depuis 1940. Environ 73 % de la

consommation totale d'antibiotiques dans le monde est consacrée à l'élevage (Tiseo, Huber, Gilbert, Robinson, & Van Boeckel, 2020).

L'utilisation d'antibiotiques dans le monde agricole pose des problèmes liés à leurs résidus et au développement de la résistance aux antibiotiques (RAA). Selon l'organisation mondiale de la santé, la RAA est considérée comme l'une des plus graves menaces pesant sur la santé publique ("Les 10 menaces pour la santé mondiale en 2019 selon l'OMS," 2019). D'ici 2050, la RAA pourrait tuer 10 millions de personnes chaque année. Cette menace est due à l'utilisation massive d'antibiotiques dans le domaine de la santé et de l'élevage, ainsi que par le transfert de bactéries et de leurs gènes résistants entre les humains et les animaux (les animaux étant traités avec des antibiotiques également utilisés en médecine humaine) (Kirchhelle, 2018).

Face à ce risque, plusieurs organisations internationales se sont mobilisées, c'est le cas de la Commission européenne qui s'est emparée de la problématique de la RAA en 2020. Avec sa stratégie *Farm to fork* (De la ferme à la fourchette), elle instaure de nouvelles actions pour renforcer la lutte contre la RAA, comme l'objectif de réduction de 50% d'ici 2030 des ventes globales d'antibiotiques destinés aux animaux d'élevage et à l'aquaculture dans l'Union Européenne. Selon le rapport de l'Autorité européenne de sécurité des aliments publié en 2021, la consommation totale d'antibiotiques pour les animaux d'élevage en Europe (quantité d'antibiotiques administrée par rapport à la taille de la population animale) a diminué de 32% entre 2014 et 2018 (Figure 1). Cependant, cette diminution n'est pas uniforme dans tous les pays européens. Certains pays, tels que la Finlande, les Pays-Bas et le Danemark, ont drastiquement réduit leur utilisation d'antibiotiques (European Centre for Disease, Control, European Food Safety, & European Medicines, 2021), tandis que d'autres pays européens, comme l'Espagne et la Pologne, ont fait usage davantage d'antibiotiques du fait de la prédominance des élevages intensifs sur leur territoire.



*Figure 1 : Evolution de la consommation totale d'antibiotiques chez les humains et les animaux d'élevages dans les 27 pays de l'Union européenne et de l'espace économique européenne.  
(European Centre for Disease et al., 2021)*

Afin de réduire davantage la consommation d'antibiotiques en préventif et en curatif dans les élevages, plusieurs molécules alternatives ont été étudiées, notamment les huiles essentielles (HEs) en raison de leurs propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires. L'utilisation des HEs semble une approche prometteuse pour aider à lutter contre les infections responsables des mammites (Caneschi, Bardhi, Barbarossa, & Zaghini, 2023; Nehme et al., 2021).

Dans les élevages français, l'utilisation de l'aromathérapie pour traiter les mammites bovines est de plus en plus fréquente. Selon plusieurs enquêtes (Colombo, 2022; Guénic & Coll, 2014), cette approche est principalement utilisée dans les élevages bovins biologiques, où 72% des éleveurs en font usage. En revanche, dans les élevages bovins laitiers conventionnels, environ 19% des éleveurs adoptent cette pratique. La majorité des éleveurs concernés semblent satisfaits des résultats obtenus par l'aromathérapie. Il n'en reste pas moins que les études portant spécifiquement sur l'effet des HEs sur les mammites bovines sont encore limitées, et leurs résultats souvent contradictoires. Certaines recherches suggèrent que les HEs pourraient offrir des perspectives prometteuses en réduisant l'inflammation, en combattant les agents pathogènes responsables des mammites et en améliorant les taux de guérison chez les vaches touchées (Abboud, El Rammouz, Jammal, & Sleiman, 2015; Cho et al., 2015). Cependant,

d'autres études n'ont pas fourni de résultats aussi concluants et ont soulevé des doutes quant à l'efficacité réelle de ces traitements (Lefevre et al., 2008; Nehme et al., 2021).

C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet européen MilkQua. Ce projet interdisciplinaire du programme PRIMA, financé par l'Union européenne, implique cinq partenaires européens issus de quatre pays (France, Italie, Espagne et Portugal), ainsi que cinq partenaires tunisiens, dont des fermes d'élevage, des institutions universitaires et de recherche et des entreprises laitières. Un des objectifs principaux du projet est de réduire l'utilisation des antibiotiques dans les élevages bovins, en explorant des approches innovantes à base d'HEs issues de plantes méditerranéennes. Les Work Packages (WP) de ce projet sont donnés dans l'Annexe 1.

Ma thèse s'inscrit dans les deux WP 4 et 6 du projet MilkQua (présentés dans l'Annexe 2). L'objectif général de ce travail a été d'explorer les effets de l'HE de *Thymus capitatus* (HETC) sur les mammites subcliniques et sur la qualité du lait, moyennant le développement d'approches d'encapsulation pour améliorer son efficacité.

Ce manuscrit de thèse est constitué en premier lieu d'un état de l'art comprenant quatre parties. La première partie donne un bref aperçu de la physiologie de la mamelle et du processus de synthèse des divers composants du lait. Dans la deuxième partie, sont décrits les principaux mécanismes de défense de la glande mammaire. De plus, les différents types de mammites bovines et de l'inflammation, les pathogènes responsables et les traitements conventionnels à base d'antibiotiques sont définissent.

Dans la troisième partie est incluse la revue de (Nehme et al., 2021) publiée dans le journal « Antioxydants » "Essential Oils in Livestock: From Health to Food Quality", qui mets en avant l'usage des HEs dans le domaine de l'élevage et de l'industrie agroalimentaire. Dans la dernière partie de l'état de l'art, deux méthodes d'encapsulation des HEs utilisées dans le but de protéger leurs composés actifs de la dégradation et de l'oxydation sont détaillées.

Dans la section des résultats, nous abordons, dans le premier chapitre, les effets d'une application cutanée de l'HETC sur l'inflammation de la glande mammaire et la bactériologie du lait des vaches laitières atteintes de mammites subcliniques. Cependant, en raison des résultats non concluants issus de la première étude, nous avons entrepris de vérifier les effets anti-inflammatoires de l'HETC et de son principal composé, le carvacrol, sur les cellules PBMC

isolées du sang des vaches laitières, qui constituent la première ligne de défense contre les mammites. De plus, une étude a été réalisée pour évaluer l'effet de l'encapsulation de l'HETC et du carvacrol sur leurs propriétés antibactériennes sur des souches bactériennes responsables de la mammite. Une troisième étude a été menée pour évaluer les effets anti-inflammatoires de 8 HEs méditerranéennes inscrites dans le projet MilkQua, dans le but d'identifier les HEs dotées d'une puissante activité anti-inflammatoire et qui pourraient potentiellement jouer un rôle dans le traitement des mammites. Ces trois études constituent le chapitre 2. Enfin, dans le troisième chapitre, nous explorons une autre voie d'administration des HEs, à savoir l'administration par voie olfactive chez les vaches laitières atteintes de mammites subcliniques. Cette étude a porté sur les effets d'un traitement à base d'HEs par voie olfactive sur l'inflammation de la glande mammaire et sur les comportements des vaches laitières. Il est à noter que cette section a été incluse en annexe en raison de la précocité des résultats, avec d'autres analyses en cours.



# État de l'art





## État de l'art

### 1. Glande mammaire et production de lait

La lactation est une fonction vitale, assurée par la glande mammaire. Ce processus complexe permet à la mère de produire et de fournir du lait à sa progéniture, garantissant ainsi sa croissance et son développement.

#### 1.1. Physiologie de la glande mammaire bovine

La glande mammaire est un organe complexe constituée de structures anatomiques interconnectées. Elle joue un rôle essentiel dans la production de lait. Chez la vache laitière, la glande mammaire est composée de deux rangées de deux demi-mamelles, chacune reliée à un trayon par lequel le lait est éjecté lors de la traite (Figure 2A).

Les quartiers, au nombre de quatre, sont les unités fonctionnelles de la glande mammaire. Chacun de ces quartiers fonctionne comme une glande distincte, possédant son propre tissu sécréteur de lait appelé parenchyme. Le parenchyme est composé d'alvéoles (ou acinus), de canaux et de tissu conjonctif qui soutient et protège les tissus glandulaires délicats. Les alvéoles, de minuscules structures en forme de globes d'un diamètre de 50 à 250  $\mu$ m en fonction du volume de lait accumulé, sont les unités productrices de lait. Elles sont tapissées par une seule couche de cellules épithéliales cuboïdes à cylindriques sur leurs bordures périphériques.

Les composants du lait sont libérés dans la lumière ou l'intérieur de l'alvéole pour être stockés entre les traites (Figure 2B). Lorsque le lait s'accumule dans la lumière alvéolaire entre les traites, la pression exercée sur la paroi épithéliale entraîne l'aplatissement des cellules sécrétoires. Cela signale aux cellules d'arrêter la synthèse du lait et de le libérer dans la lumière. Avant la traite, environ 60 % du lait synthétisé est retenu dans les alvéoles et les petits canaux et 40 % du lait est stocké dans les citernes et les grands canaux (Nickerson, 1995).

Des cellules myoépithéliales entourent les alvéoles ainsi que les petits canaux. Ces cellules jouent un rôle crucial dans l'éjection du lait en exerçant une force mécanique sur les canaux, facilitant ainsi le flux du lait vers les trayons lors de la traite (Nickerson & Akers, 2011).

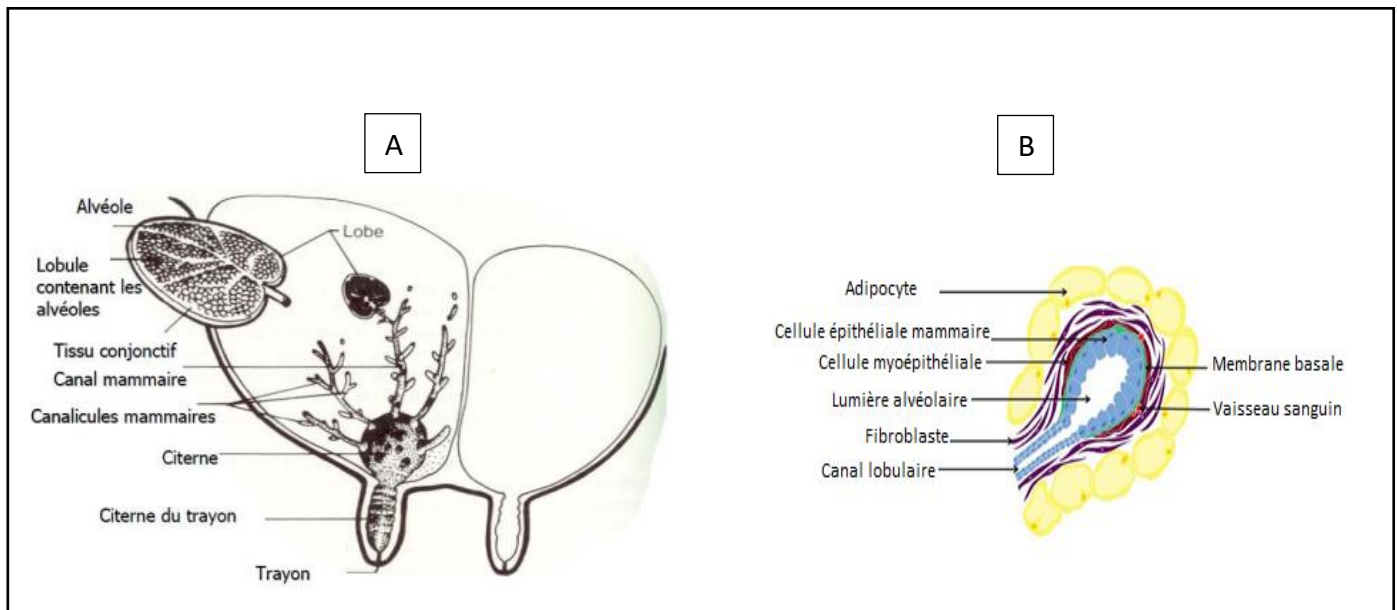


Figure 2 : A : Anatomie de la glande mammaire de la vache laitière.

B : Structure de l'alvéole mammaire

Source A : <https://shorturl.at/pvyAU>

Source B : (Charton, 2017)

## 1.2. Synthèse et composition du lait

Le lait de vache est une source importante de nombreux nutriments essentiels pour les veaux et les êtres humains. Il est composé principalement d'eau (autour de 87%) et contient des protéines, de la matière grasse, du lactose, des minéraux et des oligo-éléments (Tableau 1). La composition du lait peut varier en fonction de la race, de l'alimentation et de la période de lactation de la vache laitière (Garro-Aguilar et al., 2023).

Tableau 1 : Composition du lait de vache.  
Source : <https://urlz.fr/mEj7>

Composant du lait de vache	Intervalle (%)	Moyenne (%)
Eau	85.5 - 89.5	87
Matière sèche dont :	10.5 - 14.5	13
<i>Matière grasse</i>	2.5 - 6	4
<i>Protéines</i>	2.9 - 5	3.4
<i>Lactose</i>	3.6 - 5.5	4.8
<i>Minéraux</i>	0.6 - 0.9	0.8

### 1.2.1. Protéines

La synthèse de la majorité des protéines du lait se réalise dans les cellules épithéliales mammaires (Figure 3). Les caséines, représentant 80 à 90 % de la matière protéique totale du lait, sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique des cellules épithéliales. Elles subissent ensuite des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et la glycosylation dans l'appareil de Golgi. Les caséines s'agrègent ensuite pour former des micelles qui sont sécrétées dans la lumière alvéolaire par exocytose. Les protéines solubles du lait comprenant principalement la  $\beta$ -lactoglobuline et l' $\alpha$ -lactalbumine sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique des cellules épithéliales tandis que d'autres protéines solubles comme l'albumine et les immunoglobulines sont d'origine sanguine. Le lait contient également des hormones et des facteurs de croissance qui sont synthétisés par les cellules épithéliales ou proviennent de la circulation sanguine (McManaman & Neville, 2003).

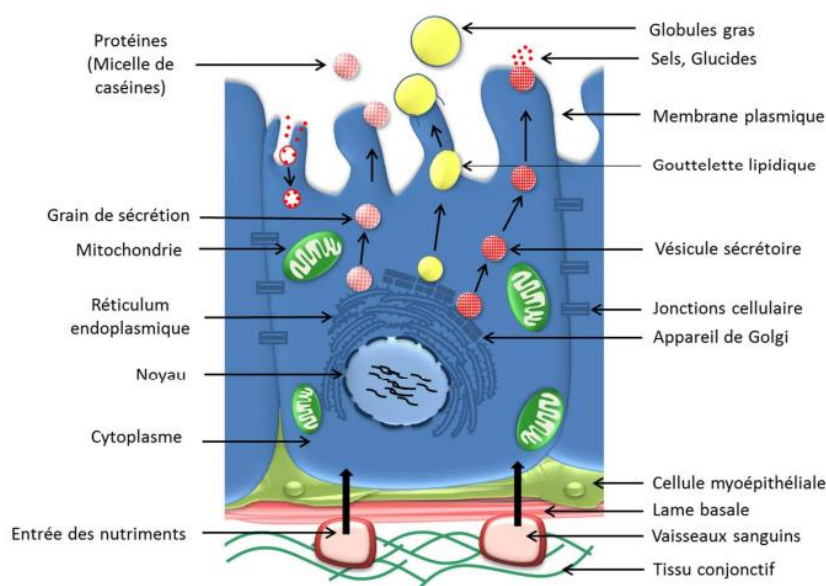


Figure 3 : Lumière alvéolaire et synthèse des différents constituants du lait  
Source : (Herve, 2017)

### 1.2.2. Matière grasse

La matière grasse est présente dans le lait sous forme d'une émulsion d'huile dans l'eau. La matière grasse du lait se compose principalement de triglycérides, et d'autres lipides comme le diacylglycérol, le cholestérol, les phospholipides et les acides gras libres (Tableau 2). La taille du globule gras du lait augmente avec l'augmentation de la teneur en matières grasses du lait suite à des fusions entre les globules gras (Månsson, 2008).

La biosynthèse des acides gras dans la glande mammaire de la vache produit des acides gras avec un nombre pair de carbones de 4 à 16 carbones de longueur et représente environ 60% et 45% des acides gras sur une base molaire. Ces gouttelettes de graisse sont formées par le réticulum endoplasmique des cellules épithéliales des alvéoles et recouvertes en surface par des protéines et des lipides polaires. Lorsqu'ils sont sécrétés, ils sont enveloppés par la membrane plasmique de la cellule. Les matériaux associés à la membrane peuvent représenter 2 à 6 % de la masse des globules (Herve, 2017). Les acides gras avec un nombre de carbones de 16 ou plus proviennent principalement de l'alimentation de la vache ainsi que de l'activité microbienne dans le rumen de la vache.

Tableau 2 : Les lipides dans le lait bovin.  
Source : (Bauman, McGuire, & Harvatine, 2011)

CLASSES DE LIPIDES	POURCENTAGES DE LIPIDES TOTAUX (G/100 G)
TRIGLYCERIDES	95.80%
1,2-DIACYLGLYCEROLS	2.25%
PHOSPHOLIPIDES	1.11%
CHOLESTEROL	0.46%
ACIDES GRAS LIBRES	0.28%
MONOACYLGLYCEROLS	0.08%

### 1.2.3. Glucides

Le lait de vache contient en moyenne 50 g de glucides par litre, principalement sous forme de lactose. Le lactose est un disaccharide spécifique du lait. Il est synthétisé uniquement par les cellules épithéliales mammaires (Figure 3). La synthèse du lactose commence dans le réticulum endoplasmique, où une molécule de glucose est transformée en UDP-galactose. Ensuite, dans l'appareil de Golgi, la dernière étape de la synthèse du lactose se produit. Elle implique l'association de l'UDP-galactose avec une molécule de glucose sous l'action de l'enzyme galactosyltransférase, en présence de l' $\alpha$ -lactalbumine, un cofacteur spécifique. Seules les cellules épithéliales mammaires sont capables de synthétiser du lactose, car elles sont les seules cellules de l'organisme à produire de l' $\alpha$ -lactalbumine.

Le lactose, en raison de son pouvoir osmotique, joue un rôle dans la régulation de l'entrée d'eau dans la lumière alvéolaire, ce qui influence grandement le volume de lait produit (Mardones & Villagrán, 2020).

### 1.2.4. Vitamines et minéraux

Le lait est une source de vitamines, notamment la vitamine A, la vitamine D et la vitamine E. Il contient également différents minéraux provenant de la circulation sanguine, tels que le potassium (K<sup>+</sup>), le sodium (Na<sup>+</sup>), le chlore (Cl<sup>-</sup>), le calcium (Ca<sup>2+</sup>), le phosphore (P<sup>+</sup>) et le magnésium (Mg<sup>2+</sup>). Les minéraux K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> se trouvent sous forme soluble dans le lait, tandis que Ca<sup>2+</sup>, P<sup>+</sup> et Mg<sup>2+</sup> sont partiellement associés aux micelles de caséines. Les cellules

épithéliales mammaires possèdent des pompes membranaires qui facilitent le passage du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{K}^+$  du cytoplasme vers le lait, ainsi que l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules épithéliales mammaires à partir du compartiment sanguin (Gaucheron, 2011).

## 2. Les mammites chez la vache laitière

### 2.1. Généralités

La mammite bovine est une réponse inflammatoire du tissu mammaire d'un ou de plusieurs quartiers, causée par des infections par des micro-organismes ou un traumatisme physique. Elle est considérée comme la maladie la plus courante chez les vaches laitières (Khan et al., 2023; Nehme et al., 2021).

Il existe deux formes d'infections mammaires : les mammites cliniques et les mammites subcliniques, une mammite subclinique pouvant évoluer vers une mammite clinique, et inversement.

#### *2.1.1. Les deux formes de mammites*

Les mammites cliniques se caractérisent par la présence de signes cliniques, indiquant une altération de la sécrétion de la glande mammaire.

La gravité d'une mammite clinique est généralement classée en trois groupes (Cheng & Han, 2020) :

- Légère : Apparition des changements visibles dans le lait (lait aqueux avec la présence de flocons et de caillots) ;
- Modérée : Apparition des signes inflammatoires du quartier infecté (quartier rouge et gonflé) ;
- Sévère : Apparition des signes de maladie systémique (fièvre, décubitus...).

Contrairement à la mammite clinique, la mammite subclinique n'est associée à aucun signe clinique visible. L'animal ne présente aucun signe d'inflammation local ou systémique, et le lait a un aspect normal. Elle se révèle par la détection de globules blancs dans le lait sous forme de cellules somatiques, indiquant une réponse immunitaire contre une infection bactérienne

subtile (Sumon, Parvin, Ehsan, & Islam, 2020). (Des informations complémentaires sur les cellules somatiques sont fournies dans le paragraphe 2.3.2)

### *2.1.2. Incidence des mammites en France et dans le monde*

La prévalence des mammites bovines varie en fonction des pays, des pratiques agricoles et des systèmes de gestion. Dans certaines zones, la prévalence peut être relativement faible grâce à des mesures de contrôle efficaces et à des pratiques d'hygiène strictes (Pitkälä, Haveri, Pyörälä, Myllys, & Honkanen-Buzalski, 2004), tandis que dans d'autres régions, elle est plus élevée en raison d'une hygiène insuffisante et d'une exposition à des agents pathogènes contagieux. (kerro Dego, 2020)

À l'échelle mondiale, les mammites demeurent l'une des maladies les plus courantes et économiquement impactantes affectant le bétail laitier. Les taux de prévalence peuvent varier de quelques pourcents à des chiffres plus importants dans certaines régions ou troupeaux. (Heringstad, Klemetsdal, & Ruane, 2000; kerro Dego, 2020)

Il est important de noter que les chiffres de prévalence peuvent évoluer au fil du temps en raison des améliorations des pratiques de gestion, des avancées en médecine vétérinaire et des changements dans les normes de l'industrie. Une surveillance régulière, des programmes de contrôle et le respect de bonnes pratiques de traite et d'hygiène sont essentiels pour gérer et réduire la prévalence des mammites bovines.

Les mammites subcliniques sont 15 à 40 fois plus fréquentes que les mammites cliniques (A. Singh et al., 2022). En France, 40 % des vaches en production sont touchées par des mammites (cliniques et subcliniques) ("Les mammites j'anticipe," 2023)

### *2.1.3. Impact économique*

Les mammites entraînent d'importantes pertes économiques, estimées à 35 milliards de dollars chaque année à l'échelle mondiale (Mubarack, Doss, Dhanabalan, & Venkataswamy, 2011). Ces pertes se divisent en plusieurs catégories. D'abord, il y a des pertes à court terme (environ 7 % des pertes) liées au lait non-commercialisé, aux frais vétérinaires et aux médicaments vétérinaires utilisés pour le traitement (antibiotiques, anti-inflammatoires...).



Ensuite, des pertes à moyen terme (environ 10 % des pertes) sont causées par la dépréciation commerciale due à une augmentation de la concentration cellulaire de tank ou à la présence accidentelle d'antibiotiques dans le lait. Ensuite, les pertes à plus long terme (environ 70 % des pertes) résultent de la chute qualitative et quantitative de la production laitière, des frais de remplacement des animaux réformés et de la perte du potentiel génétique. Enfin, il y a des coûts plus indirectes et difficiles à quantifier, telles que les prélèvements et le travail supplémentaire engendré (Garro-Aguilar et al., 2023; Romero, Benavides, & Meza, 2018; Wani et al., 2022).

La perte de production laitière d'une lactation varie entre 3 % et 6 %. Elle dépend de plusieurs facteurs, tels que le germe impliqué (les pathogènes majeurs entraînent davantage de conséquences que les pathogènes mineurs), le stade de lactation, le niveau de production laitière et le type de mammite (clinique ou subclinique) (Ameni et al., 2022; Cobirka, Tancin, & Slama, 2020). Selon Goulart & Mellata, un cas de mammite clinique dû à *L'Escherichia coli* entraîne une perte de 1170 litres de lait, soit 14 % du potentiel de production total (Goulart & Mellata, 2022). En France L'impact économique des mammites cliniques est estimé à 230€ par vache et par an ("Les mammites j'anticipe," 2023)

La perte économique causée par les mammites subcliniques est difficile à quantifier, mais les experts s'accordent à dire qu'elle est 3 à 5 fois supérieure que pour les cas cliniques (Jadhao & Bhardwaj, 2021; Paramasivam et al., 2023).

## 2.2. Pathogènes impliqués dans les cas de mammites

Plusieurs approches ont été utilisées pour catégoriser les agents pathogènes responsables des mammites. On peut les distinguer en fonction de leur impact sur la santé de la mamelle : les pathogènes majeurs et les pathogènes mineurs. Les pathogènes majeurs, tels que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. et *E. coli*, sont responsables de réactions inflammatoires sévères pouvant entraîner une augmentation significative du comptage de cellules somatiques (CCS) et une réduction substantielle de la production de lait, et dans les cas extrêmes, la mort de l'animal. En revanche, les pathogènes mineurs, tels que *Corynebacterium* spp., les *Streptococcus non agalactiae* et les Staphylocoques à coagulase

négative (SCN), provoquent une inflammation légère et une légère augmentation du CCS (Vanderhaeghen et al., 2014).

La transmission des agents pathogènes peut se faire à partir de différentes sources (Figure 4 A). *S. aureus* et *Streptococcus dysgalactiae* se transmettent des mamelles infectées aux mamelles saines lors de la traite, via les mains contaminées du trayeur, les manchons trayeurs ou les serviettes utilisées pour laver ou sécher les mamelles. En revanche, *Streptococcus uberis*, *Colibacillus* et les coliformes tels que *E. coli* et *Klebsiella spp.* proviennent généralement de l'environnement (Figure 4 B) (Paramasivam et al., 2023).

Une autre classification peut être réalisée selon la provenance des bactéries : les bactéries environnementales et les bactéries contagieuses.

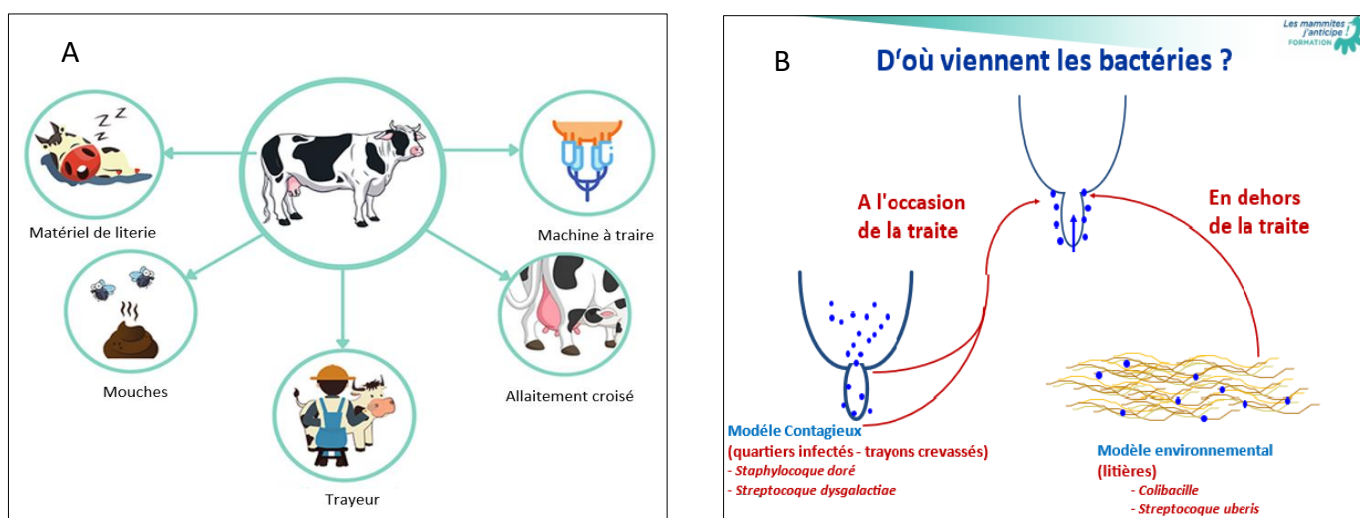


Figure 4 : Diverses sources des micro-organismes causant les mammites bovines

A : Source adaptée de : (Paramasivam et al., 2023)

B : Source de : ("Les mammites j'anticipe," 2023)

### 2.2.1. Bactéries environnementales

Les bactéries environnementales, telles que *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* et *Trueperella pyogenes*, se trouvent principalement dans l'environnement de la vache, comme le fumier, la litière, les aliments et l'eau. Elles sont responsables majoritairement de mammites cliniques. Les coliformes, notamment *E. coli* et *Klebsiella spp.*, représentent environ 40% des cas sévères de mammites cliniques dans certains pays comme le Canada (Schukken et al., 2012). *Streptococcus uberis* et *S. dysgalactiae* sont présentes dans l'environnement de la vache notamment dans les litières. *Trueperella pyogenes*, liée aux mouches, est connue pour

causer des cas sévères de mammites pendant l'été sur certaines zones particulières (montagnes, zones humides) avec des sécrétions épaisses et malodorantes (Goetz, 2018).

### 2.2.2. Bactéries contagieuses

Les bactéries contagieuses comprennent *S. aureus*, certains SCN, et *Mycobacterium bovis*. Le *M. bovis* se transmet facilement par le matériel de traite et nécessite des règles d'hygiène strictes. *S. aureus* est principalement isolé dans la glande mammaire, se transmettant d'une vache à l'autre par les mains du trayeur, la machine de traite ou les mouches. Les SCN sont aussi considérés comme des pathogènes contagieux. Leur détection est plus fréquente lors des mammites subcliniques (Goetz, 2018; Pang et al., 2017).

## 2.3. Les mécanismes de défense de la glande mammaire

Le système immunitaire de la glande mammaire, constitue un système complexe et coordonné pour garantir une réponse immunitaire efficace. Les barrières physiques, les trayons et le canal du trayon jouent un rôle crucial en empêchant la pénétration des agents pathogènes dans la glande mammaire. Les barrières chimiques sont représentées par les composants antimicrobiens naturels présents dans le lait de la vache, tels que les immunoglobulines, les lactoferrines, les lysozymes et les enzymes antimicrobiennes. Ces facteurs contribuent à neutraliser et à éliminer les agents pathogènes. La glande mammaire abrite également diverses cellules immunitaires, dont les cellules épithéliales, les macrophages, les lymphocytes et les polynucléaires neutrophiles, qui sont responsables de la détection et de l'élimination des agents pathogènes (Sordillo, 2018).

### 2.3.1. Réponse immunitaire de la glande mammaire

Lorsqu'une infection survient dans la glande mammaire, le système immunitaire de la mamelle réagit en déclenchant une réponse inflammatoire locale. Cette réponse inflammatoire est caractérisée par une série de mécanismes visant à éliminer l'agent pathogène et à rétablir la santé de la glande mammaire. Tout d'abord, l'augmentation du flux sanguin vers la région infectée, connue sous le nom d'hyperémie, permet d'amener des cellules immunitaires

supplémentaires, des nutriments et des facteurs de guérison pour combattre l'infection. Parallèlement, des cellules immunitaires telles que les macrophages et les cellules PBMC (lymphocytes) s'accumulent dans la région infectée. Les macrophages ingèrent et détruisent les agents pathogènes par phagocytose et initient la réponse immunitaire acquise. De leur côté, les neutrophiles migrent du flux sanguin vers le site infecté, où ils phagocytent les organismes intrus par explosion oxydative. Cette réaction libère une forte concentration de radicaux libres, qui aident à éliminer les bactéries, mais peuvent également entraîner des lésions tissulaires et la mort des cellules. Cette accumulation de cellules immunitaires contribue à la lutte contre l'infection et à l'augmentation du CCS dans le lait (Bruno, 2010). La Figure 5 ci-dessous compare l'accumulation des cellules immunitaires dans la glande mammaire saine et infectée.

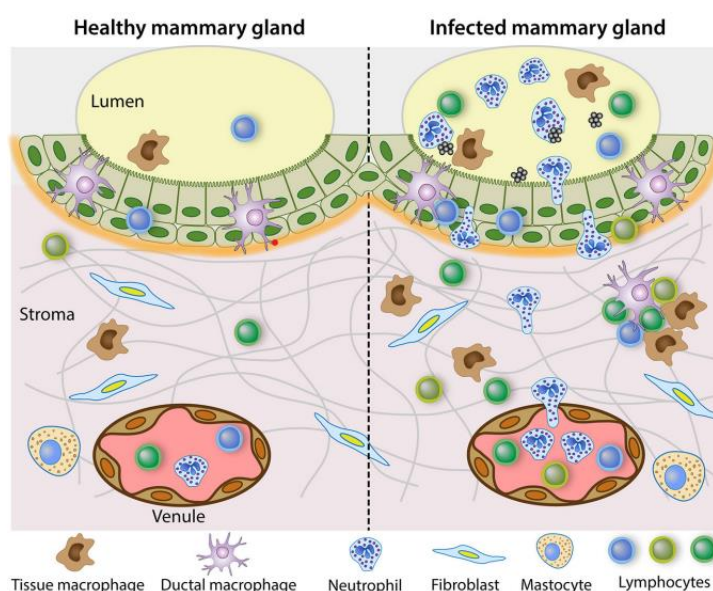


Figure 5 : Accumulation des cellules immunitaires dans la glande mammaire saine et infectée.  
Source : (Rainard et al., 2022)

La réponse inflammatoire entraîne une augmentation de la production de facteurs inflammatoires tels que les cytokines (voir Figure 6), qui jouent un rôle crucial dans la communication entre les cellules immunitaires et l'amplification de la réponse inflammatoire en activant la voie de signalisation du facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B). Les cytokines contribuent également au recrutement de cellules supplémentaires vers la région infectée. Enfin, le système immunitaire adaptatif de la mamelle, grâce aux lymphocytes B et T, permet une réponse spécifique à l'agent pathogène en produisant des anticorps spécifiques qui se

lient à l'agent pathogène, neutralisant ainsi son effet néfaste. Les mécanismes de la réponse inflammatoire et du système immunitaire adaptatif de la mamelle travaillent en synergie pour éliminer l'agent pathogène, réduire l'inflammation, réparer les tissus endommagés et rétablir la santé globale de la glande mammaire (Rainard, Gilbert, & Germon, 2022).

Bien que la mamelle des vaches laitières dispose d'une réponse immunitaire efficace, elle reste sujette à diverses infections bactériennes, virales et fongiques.

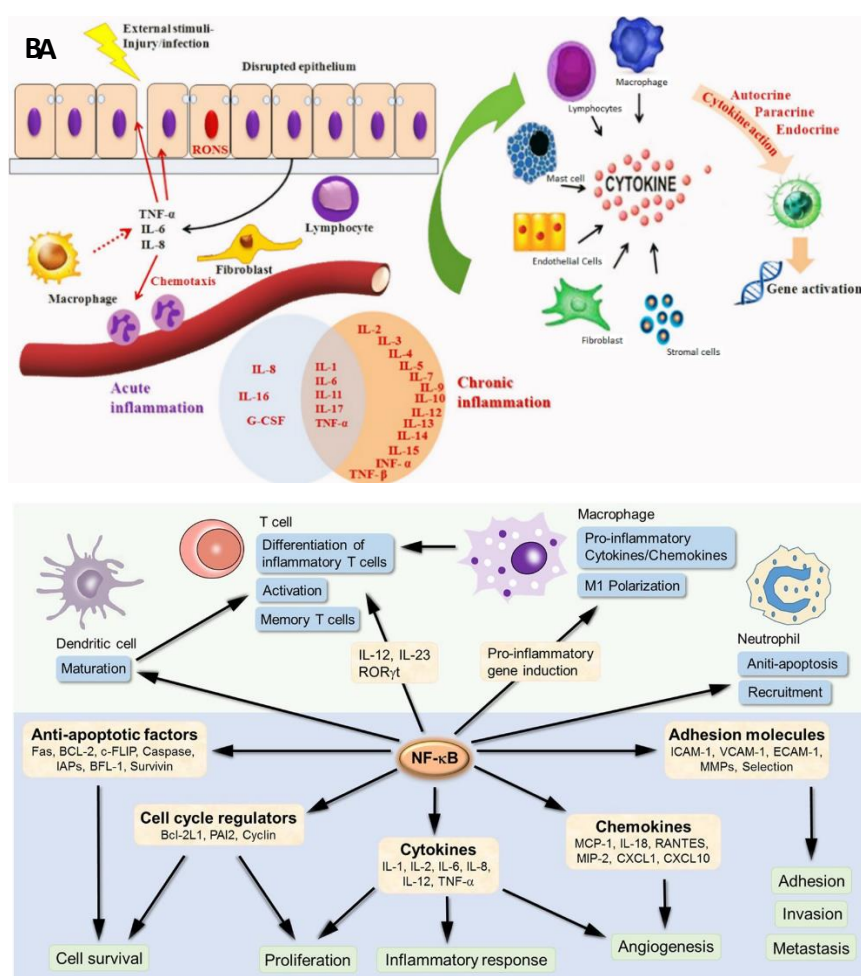


Figure 6 : Le rôle des cytokines dans l'inflammation

A : Les cytokines jouent un rôle central dans la communication entre les cellules, l'initiation de la réponse inflammatoire, son amplification et leur régulation.

Source : (Megha, Joseph, Akhil, & Mohanan, 2021)

B : Les gènes cibles de NF-κB impliqués dans le développement et la progression de l'inflammation. Après son activation, il peut activer la transcription de divers gènes et ainsi réguler l'inflammation. NF-κB cible l'inflammation non seulement directement en augmentant la production de cytokines inflammatoires, de chimiokines et de molécules d'adhésion, mais régule également la prolifération cellulaire, l'apoptose, la morphogenèse et la différenciation cellulaire.

Source : (T. Liu, Zhang, Joo, & Sun, 2017)

### 2.3.2. Cellules somatiques du lait

Les cellules somatiques du lait sont principalement composées de leucocytes (macrophages, neutrophiles et lymphocytes) et d'une petite fraction (< 7 %) de cellules épithéliales mammaires éliminées de la muqueuse de la glande mammaire (Williamson, Callaway, Rollin, & Ryman, 2022). Une glande mammaire saine maintient un niveau bas de CCS, inférieur à 100 000 cellules/ml. Lorsque la glande mammaire est confrontée à une infection intra-mammaire, le CCS dépasse le seuil de 100 000 cellules/ml (Sumon et al., 2020; Zhang et al., 2022). C'est en raison de cela que le CCS est utilisé comme indicateur pour le suivi des mammites dans les exploitations d'élevage.

### 2.4. Microbiote de la mamelle

La présence et le rôle du microbiote dans la glande mammaire sont des sujets qui suscitent des débats et des controverses. La glande mammaire saine est considérée comme un organe stérile selon certaines études (Hillerton, 2020; Rainard, 2017). En revanche, d'autres études montrent que la glande mammaire contient un microbiote (Addis et al., 2016; Hooman Derakhshani et al., 2018; Oikonomou et al., 2020). Ces divergences peuvent être attribuées aux différentes méthodologies de recherche utilisées (métagénomique vs culture bactérienne) et des interprétations des différentes équipes de recherche.

Les scientifiques qui décrivent l'existence d'un microbiote de la glande mammaire ont révélé (grâce à l'utilisation des méthodes moléculaires tels que les 16S métagénomiques) la présence de communautés microbiennes commensales dans la glande mammaire saine. Selon eux, La composition spécifique du microbiote mammaire peut varier en fonction de facteurs tels que l'âge de la vache, la génétique, l'alimentation, la gestion de la traite et l'environnement. La diversité du microbiote laitier s'exprime à travers la diversité alpha, qui évalue la richesse et la répartition des espèces au sein d'un échantillon de lait, ainsi que la diversité bêta, qui compare la composition microbienne entre échantillons, et mesure leur degré de différence ou de similitude (Addis et al., 2016; Hooman Derakhshani et al., 2018; Oikonomou et al., 2020).

Dans cette partie nous définissons la communauté bactérienne commensale détectée dans le lait de la glande mammaire saine ainsi que la relation entre les mammites et l'équilibre du microbiote du lait.

#### 2.4.1. Microbiote sain du lait

Les scientifiques qui décrivent l'existence d'un microbiote de la glande mammaire, montrent que le microbiote du lait bovin est extrêmement diversifié et comprend généralement des *Fecalibacterium*, *Lachnospiraceae*, *Propionibacterium* et *Aeribacillus* qui font partie d'un microbiote de base sain du lait. D'autres genres prévalents peuvent aussi exister dans la plupart des échantillons de lait avec un faible nombre de cellules somatiques comme les *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Anaerococcus*, *Lactobacillus*, *Porphyromonas*, *Comamonas*, *Fusobacterium* et *Enterococcus* comme le montre la Figure 7. Certains genres bactériens comme la *Lactobacillus* et la *Paenibacillus* sont associés à des quartiers mammaires plus sains (Addis et al., 2016).

Le microbiote sain joue un rôle important dans la défense de la glande mammaire contre les infections causées par des pathogènes. L'épuisement des bactéries commensales peut avoir des effets néfastes sur l'homéostasie de la mamelle et son système immunitaire. Les commensaux peuvent résister à la colonisation par des agents pathogènes exogènes et inhiber la prolifération des opportunistes par plusieurs mécanismes, notamment la compétition métabolique pour les ressources nutritives limitées, la production de peptides inhibiteurs (par exemple, des bactériocines) qui modifient les conditions de l'écosystème pour défavoriser la croissance des agents pathogènes (par exemple, abaissement du pH), la compétition pour les sites de fixation sur la surface des cellules épithéliales, et la régulation des réponses pro et anti-inflammatoires de l'hôte (Hooman Derakhshani et al., 2018; Winther et al., 2022).



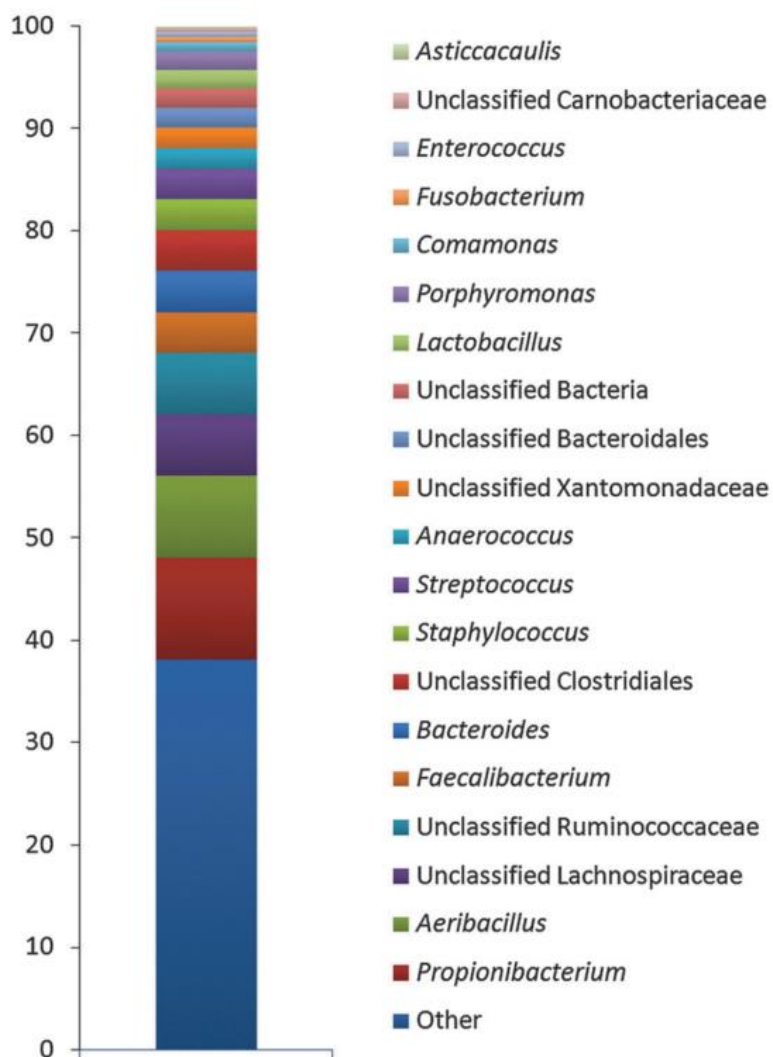


Figure 7 : Répartition des vingt genres bactériens les plus prévalents trouvés dans 50 échantillons de lait de quartiers sains contenant moins de 20 000 cellules par millilitre.

Source : (Addis et al., 2016)

Plusieurs facteurs liés à la vache, à son environnement et aux pratiques agricoles peuvent influencer la composition du microbiote de la glande mammaire (cf. Figure 8). Pour plus de détails, veuillez consulter la revue de (H. Derakhshani et al., 2018).



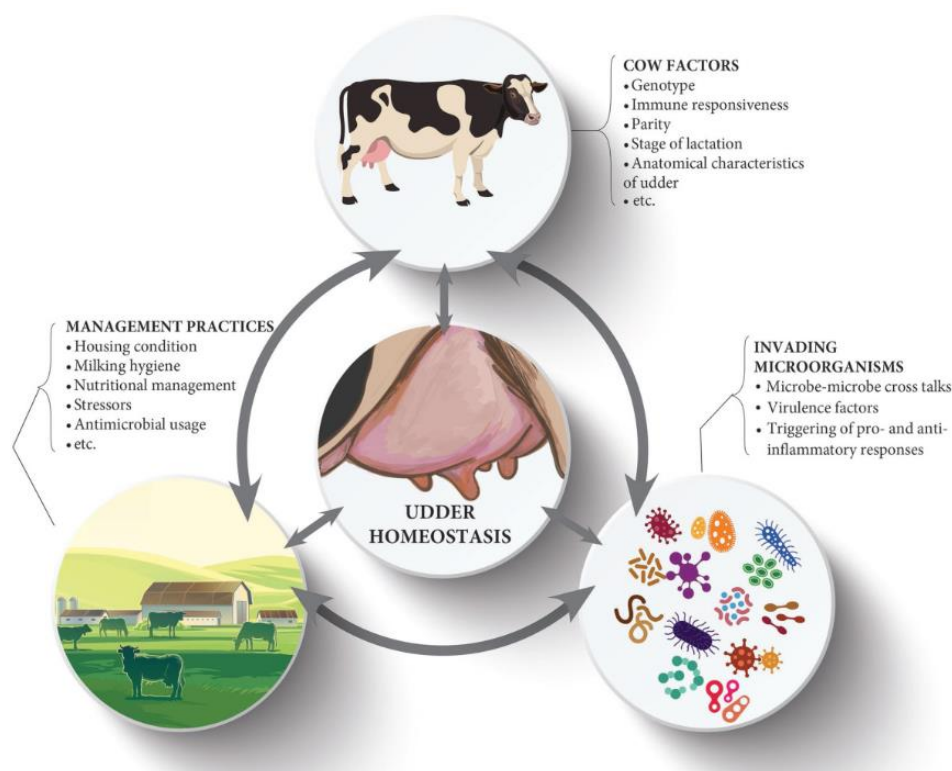


Figure 8 : Les facteurs qui influencent l'homéostasie de la glande mammaire.  
Source (H. Derakhshani et al., 2018)

#### 2.4.2. Relation entre microbiote du lait et mammite

Les recherches qui décrivent l'existence d'un microbiote de la glande mammaire montrent que les mammites sont associées à une diminution de la diversité et à l'altération de l'équilibre du microbiote intra-mammaire (la dysbiose). Le lien entre les mammites et la dysbiose du microbiote reste un sujet de débat, quant à son rôle comme cause ou conséquence des mammites (H. Derakhshani et al., 2018).

Les agents pathogènes responsables des mammites peuvent rapidement proliférer dans l'écosystème de la mamelle et dominer le microbiote commensal résident. Cette prolifération peut réduire la richesse du microbiote (alpha-diversité) et modifier la composition (beta-diversité). Cependant, la dominance des pathogènes dans un écosystème mammaire ne persiste généralement pas et est résolue soit spontanément, grâce à l'activité des cellules immunitaires et à l'élimination par la traite régulière, soit à l'aide d'une intervention thérapeutique (H. Derakhshani et al., 2018).

## 2.5. Traitements conventionnels des mammites en élevage

L'efficacité du traitement des mammites demeure un enjeu crucial dans la filière laitière, visant à préserver la santé des vaches laitières, la qualité et la quantité du lait produit. Un traitement adéquat représente un outil essentiel pour combattre les infections bactériennes à l'origine d'une mammite. Le traitement des mammites chez les vaches laitières a généralement lieu à deux moments particuliers : en lactation et au tarissement.

### 2.5.1. Mammites cliniques

L'utilisation d'antibiotiques associés ou non à des anti-inflammatoires représente la pierre angulaire du traitement des mammites chez les vaches laitières. En tant que principaux agents antimicrobiens, les antibiotiques jouent un rôle essentiel dans l'élimination des infections bactériennes responsables des mammites.

L'antibiotique est à la base de la majorité des traitements des mammites cliniques (Annexe 3).

Il existe deux types d'administration des antibiotiques :

- Administration intra-mammaire des antibiotiques (traitement local) . C'est l'administration dans la cavité de la glande mammaire d'onguents antibiotiques. Il est considéré comme un traitement de première ligne pour les vaches présentant des mammites légères, non compliquée, dans un seul quartier.
- Administration par voie intramusculaire. Elle est généralement préconisée pour traiter les cas graves de mammites, caractérisés par plusieurs quartiers inflammés, des altérations significatives au niveau des mamelles et la détresse de la vache. Cette approche est privilégiée lorsque la mammite a atteint un stade avancé et nécessite une intervention immédiate pour soulager la douleur, réduire l'infection et améliorer le bien-être de l'animal.

À noter qu'une thérapie combinée, avec des antibiotiques systémiques et intra-mammaires, peut être utilisée même si les effets bénéfiques de cette approche sont sujets à controverse. De plus, l'utilisation des anti-inflammatoires non stéroïdiens (en parallèle des antibiotiques) réduisent l'inflammation et la douleur associées à la mammite. Le taux de guérison des vaches traitées par des antibiotiques et des anti-inflammatoires est plus élevé que celui des vaches

traitées uniquement avec des antibiotiques (El-Sayed & Kamel, 2021; Klostermann et al., 2008).

Selon l'ANSES, les familles des antibiotiques les plus fréquemment utilisés en France dans le traitement des mammites en 2020 sont les Aminoglycosides, Polypeptides et Tétracyclines en période de lactation, les Céphalosporines de 1ère et 2e générations et les Pénicillines. Les familles les plus utilisées au tarissement sont les Aminoglycosides, Céphalosporines de 1ère et 2e générations et Pénicillines (Anses, 2021).

### *2.5.2. Mammites subcliniques*

Les mammites subcliniques sont généralement traitées lors du tarissement des vaches, avec la possibilité d'opter pour la réforme. Les vaches laitières touchées par des mammites subcliniques abritent une infection latente de la mamelle, pouvant entraîner de nouvelles infections pendant la traite (Rattez, 2017).

Un traitement peut être administré pendant la lactation en fonction de la concentration cellulaire et du seuil de pénalité, selon les recommandations du vétérinaire. Des études ont montré que, dans un contexte des grands troupeaux Holstein en France, le traitement en lactation peut être recommandé, pour les vaches jeunes en cas d'infection récente et en début de lactation, dans le cas d'une prévalence d'infections subcliniques élevée. Cependant, il est impératif que ce traitement soit toujours accompagné d'un renforcement des mesures de prévention visant à réduire l'incidence de nouvelles infections. (Seegers, Billon, Fourichon, & Hortet, 2002; Serieys, 2006)

L'efficacité du traitement des mammites subclinique par des antibiotiques repose sur une multitude de facteurs, exigeant ainsi une sélection minutieuse des vaches à traiter, en prenant en compte des aspects tels que le nombre de quartiers touchés, l'âge et la récence de la mammite. (Petit, 2013; Rattez, 2017). Dans certains cas (infection ancienne, enkystement des bactéries, etc), les vaches sont incurables, il est alors préférable de les réformer pour une meilleure gestion de l'utilisation des antibiotiques. (Petit, 2013; Rattez, 2017; Remy, 2010).

### 2.5.3. *Traitement au tarissement*

Pendant la période de tarissement, qui s'étend généralement sur une durée moyenne de 63 jours chez les vaches laitières, l'arrêt de la sécrétion lactée offre une opportunité cruciale pour le renouvellement cellulaire et la restructuration du tissu mammaire (Roussel, N Ballot, P. Gautier, R. Bore, & Jurquet, 2020). Le tarissement se révèle être une période idéale pour traiter les cas de mammites subcliniques. L'absence de production laitière dans les mamelles facilite la pénétration de l'antibiotique dans les tissus mammaires. Les taux de guérison varient, avec des pourcentages avoisinant les 90 % pour les vaches infectées par un streptocoque, tandis qu'ils sont inférieurs à 70 % pour celles infectées par un staphylocoque doré, en raison de sa profonde internalisation dans les tissus mammaires, rendant l'accès à l'antibiotique plus difficile. Si une mammite subclinique n'est pas guérie à la fin du tarissement, la vache est considérée comme incurable et devra être réformée (détaillés dans la thèse de (Rattez, 2017)).

La mise en place d'un traitement antibiotique local le jour du tarissement, environ 2 mois avant le prochain vêlage, a montré des progrès significatifs dans la réduction des mammites et a permis à de nombreuses exploitations laitières de réduire la prolifération des pathogènes responsable des mammites. Cependant, cette application pourrait contribuer à l'émergence de bactéries résistantes à l'antibiotiques (Krömker & Leimbach, 2017; Oliver & Murinda, 2012). Selon la société allemande de recherche sur les consommateurs « Gesellschaft für Konsumforschung » (GfK, 2016), en 2015, seuls 27 % de tous les antibiotiques intra-mammaires appliqués ont été utilisés pour le traitement des mammites contre 73 % en prévention (le jour du tarissement)(Krömker & Leimbach, 2017). Concernant la France, le traitement au tarissement a gagné de la place à partir de 2016 en dépassant le traitement pendant la lactation. Nous constatons aussi une baisse de 12,6% en 10 ans pour le traitement au tarissement et de 49,5 % pour les traitements pendant la lactation (Figure 9)

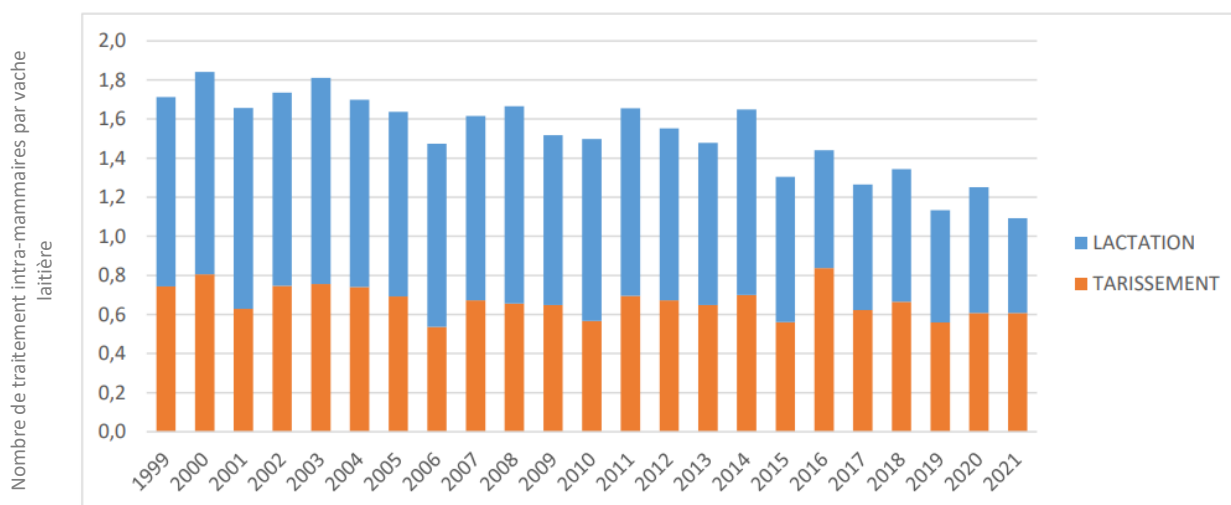


Figure 9 : Evolution du nombre de traitement intra-mammaires par vaches laitières depuis 1991.

Source : (Anses, 2021)

### 3. Approches alternatives aux antibiotiques

L'utilisation des antibiotiques présente plusieurs risques, dont la résistance aux antibiotiques qui est un enjeu majeur de santé publique à l'échelle mondiale. L'émergence de l'antibiorésistance a des effets considérables sur la santé humaine, l'environnement et l'économie. Cette résistance rend les antibiotiques inefficaces contre les pathogènes ce qui entraînera des séjours hospitaliers plus longs avec des risques accrus de complications et une mortalité accrue (Karuniawati, Hassali, Ismail, Taufik, & Suryawati, 2021).

La résistance aux antibiotiques des bactéries d'origine alimentaire et animale a presque triplé depuis l'année 2000. Certaines bactéries d'origine alimentaire sont devenues résistantes notamment certaines souches appartenant aux familles des entérocoques, *Campylobacter*, *Salmonella* et *E. coli*. Elles peuvent transférer des gènes résistants aux humains par le biais des chaînes alimentaires ou par contact direct (Roess et al., 2015).

Pour répondre à ces défis liés à l'utilisation d'antibiotiques, des nombreuses stratégies sont explorées par les chercheurs comme les vaccins, les phages, les nanoparticules et les probiotiques (détaillés dans la revue de (D. Tomanić, Samardžija, & Kovačević, 2023)). En France, l'aromathérapie à base d'HEs connaît un grand essor, principalement dans les élevages

bovins biologiques, où 72% des éleveurs en font usage. La majorité des éleveurs concernés semblent satisfaits des résultats obtenus grâce à cette technique (Hellec, Manoli, & Joybert, 2021). L'aromathérapie sera développée en détail dans la suite de ce rapport.

### 3.1. Les huiles essentielles dans l'élevage : de la santé à la qualité alimentaire

Les HEs se définissent comme des mélanges de substances aromatiques, liquides et volatiles, obtenues à partir d'un matériel végétal et nommées d'après la plante dont elles sont issues. Elles sont principalement composées de métabolites végétaux secondaires. Elles sont largement utilisées dans les industries cosmétiques et dans la fabrication des parfums. En raison de leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes, les HEs sont également utilisées dans des applications médicales (15% de la production d'HEs) et agro-alimentaires (29% de la production d'HEs) (Ríos, 2016).

Les traitements à base de plantes ont joué un rôle important dans les anciennes cultures et surtout en Asie (Parham et al., 2020). Les HEs sont utilisées par l'humain depuis des millénaires. Les composés issues des HEs ont été identifiés au 19<sup>ème</sup> siècle, ce qui a contribué au développement de l'industrie pharmaceutique. Cependant, les recherches scientifiques sur leurs propriétés médicinales ont été interrompues après la découverte des traitements antibiotiques au 20<sup>ème</sup> siècle qui se sont avérés plus efficaces contre les infections bactériennes. Au cours des dernières années, l'intérêt pour les HEs est réapparu suite à l'augmentation massive de l'usage des antibiotiques et des problèmes d'antibiorésistance décrits précédemment (Mucha & Witkowska, 2021).

Actuellement, des HEs sont utilisées dans les élevages de volailles, de porcs et de bovins. Les éleveurs de ces secteurs utilisent les HEs dans leurs pratiques de gestion de la santé animale. Dans les élevages de volailles biologiques, les HEs sont souvent utilisées pour prévenir les infections et les maladies, stimuler l'immunité, favoriser la digestion et améliorer le bien-être général des oiseaux (Puvača, Tufarelli, & Giannenas, 2022). Dans les élevages de porcs, les HEs peuvent être utilisées pour soulager le stress, améliorer la santé respiratoire et favoriser la digestion (Pejsak, Kaźmierczak, Butkiewicz, Wojciechowski, & Woźniakowski, 2023). Quant aux élevages bovins, les HEs peuvent être utilisées pour réduire le stress, améliorer la

digestion, réduire l'émission de méthane et prévenir les mammites (Becker, Spengler, Reinicke, & Heider-van Diepen, 2023).

Notre revue de synthèse intitulé : « Essential Oils in Livestock: From Health to Food Quality » publié dans le journal « Antioxidants » en 2021 (Nehme et al., 2021) résume l'état des connaissances sur l'usage des HEs en élevage et son impact sur la santé de l'animal et la qualité des produits (porc et volaille compris). Notons que le nombre d'articles traitant de l'usage des HEs pour soigner les mammites reste faible. Toutefois, depuis 2020, on observe une augmentation significative d'études dans ce domaine (voir Figure 10). Signalons aussi que cette revue a enregistré 40 citations et a été consultée environ 5 000 fois en deux ans (900 lectures sur ReserchGate à ce jour) ce qui atteste de l'intérêt porté à ce domaine par la communauté scientifique.

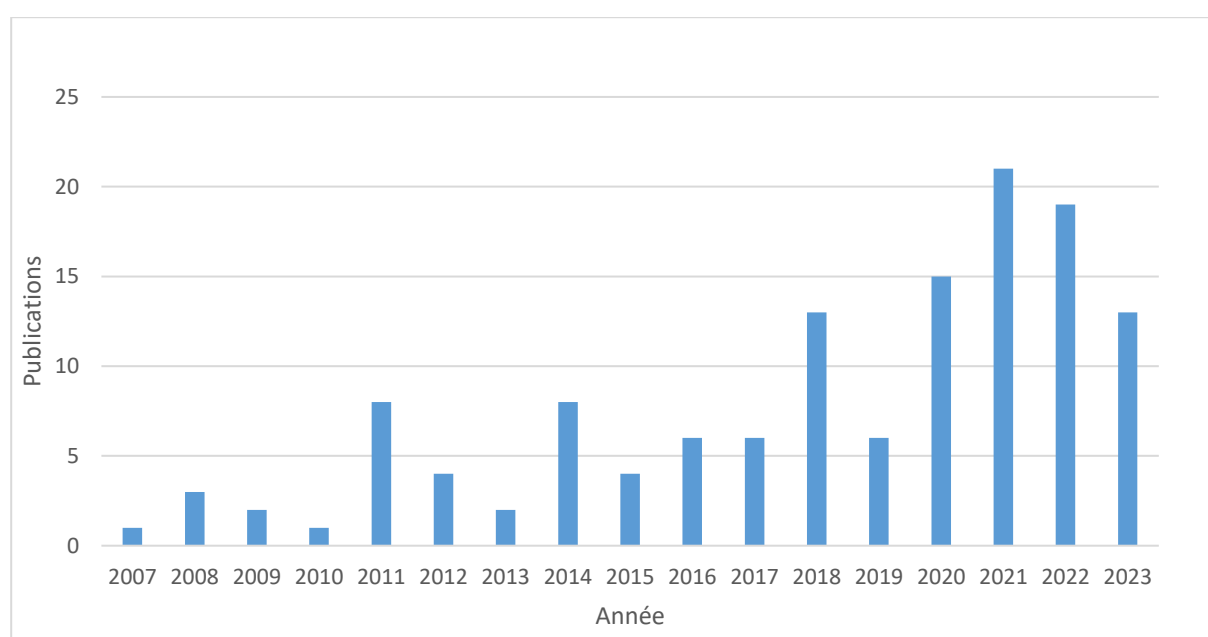


Figure 10 : Graphique de répartition du nombre d'articles contenant « Mastitis » et «essential oil» selon l'année de publication (2007-2023).

Source : Webofscience.com



## Review

# Essential Oils in Livestock: From Health to Food Quality

Ralph Nehme <sup>1,2</sup>, Sonia Andrés <sup>3</sup>, Renato B. Pereira <sup>4</sup> , Meriem Ben Jemaa <sup>5</sup>, Said Bouhallab <sup>2</sup> , Fabrizio Ceciliani <sup>6</sup> , Secundino López <sup>3,7</sup> , Fatma Zohra Rahali <sup>5</sup>, Riadh Ksouri <sup>5</sup>, David M. Pereira <sup>4</sup> and Latifa Abdennebi-Najar <sup>1,8,\*</sup>

- <sup>1</sup> Quality and Health Department, IDELE Institute, 149 rue de Bercy, 75595 Paris CEDEX 12, France; ralph.nehme@idele.fr
- <sup>2</sup> INRAE, Institut Agro, STLO, F-35042 Rennes, France; said.bouhallab@inrae.fr
- <sup>3</sup> Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León, Finca Marzanas s/n, 24346 Grulleros, Spain; sonia.andres@eae.csic.es (S.A.); s.lopez@unileon.es (S.L.)
- <sup>4</sup> REQUIMTE/LAQV Laboratory of Pharmacognosy, Department of Chemistry Faculty of Pharmacy, University of Porto R Jorge Viterbo Ferreir 228, 4050-313 Porto, Portugal; rjpereira@ff.up.pt (R.B.P.); dpereira@ff.up.pt (D.M.P.)
- <sup>5</sup> Laboratory of Aromatic and Medicinal Plants, Biotechnology Center of Borj-Cédria, Hammam-Lif BP 901 2050, Tunisia; mariembenjemaa@yahoo.fr (M.B.J.); fatma1707@gmail.com (F.Z.R.); ksouriradh@gmail.com (R.K.)
- <sup>6</sup> Department of Veterinary Medicine Università degli Studi di Milano, 20122 Milano, Italy; Fabrizio.ceciliani@unimi.it
- <sup>7</sup> Departamento de Producción Animal, Universidad de León, 24007 León, Spain
- <sup>8</sup> Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Sorbonne University, INSERM UMR\_S\_938, 75020 Paris, France
- \* Correspondence: Latifa.najar@idele.fr; Tel.: +33-(0)1-40-04-51-64; Fax: +33-(0)-1-40-04-49-60



**Citation:** Nehme, R.; Andrés, S.; Pereira, R.B.; Ben Jemaa, M.; Bouhallab, S.; Ceciliani, F.; López, S.; Rahali, F.Z.; Ksouri, R.; Pereira, D.M.; et al. Essential Oils in Livestock: From Health to Food Quality. *Antioxidants* **2021**, *10*, 330. <https://doi.org/10.3390/antiox10020330>

Academic Editor: Ana I. Rey

Received: 31 January 2021

Accepted: 20 February 2021

Published: 23 February 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Using plant essential oils (EOs) contributes to the growing number of natural plants' applications in livestock. Scientific data supporting the efficacy of EOs as anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant molecules accumulates over time; however, the cumulative evidence is not always sufficient. EOs antioxidant properties have been investigated mainly from human perspectives. Still, so far, our review is the first to combine the beneficial supporting properties of EOs in a One Health approach and as an animal product quality enhancer, opening new possibilities for their utilization in the livestock and nutrition sectors. We aim to compile the currently available data on the main anti-inflammatory effects of EOs, whether encapsulated or not, with a focus on mammary gland inflammation. We will also review the EOs' antioxidant activities when given in the diet or as a food preservative to counteract oxidative stress. We emphasize EOs' in vitro and in vivo ruminal microbiota and mechanisms of action to promote animal health and performance. Given the concept of DOHaD (Developmental Origin of Health and Diseases), supplementing animals with EOs in early life opens new perspectives in the nutrition sector. However, effective evaluation of the significant safety components is required before extending their use to livestock and veterinary medicine.

**Keywords:** essential oils; antioxidant; antimicrobial; livestock; encapsulation; inflammation; mastitis; immunity; fermentation; nutrition

## 1. Introduction

The intensification of animal husbandry and the globalization of trade have contributed to the extensive and improper use of antibiotics to combat infectious diseases. Since the end of the 1990s, awareness of this risk increased, prompting a gradual mobilization of the international community [1]. It has become an important issue as it has been recognized as a selective pressure, driving the accelerated emergence of bacterial resistance worldwide [2,3]. Prudent use of antibiotics in the future is urgently needed. It should be addressed in a One Health perspective, given that antibiotic resistance in humans, food, environment, and animals are connected, and exchange may continuously occur [4,5].



In 2006, the European Union banned all antibiotics as animal growth promoters and proposed alternatives [6]. Natural products, such as medicinal plants, essential oils (EOs), and herbal extracts, are regarded as promising alternative agents [7]. EOs are among the most economically relevant plant-derived products, being frequently responsible for several species' health-promoting properties. These compounds are extracted from several plants generally localized in temperate to warm countries, like the Mediterranean and tropical countries, representing an important part of the traditional pharmacopoeia. EOs are a mixture of low-molecular-weight molecules that include terpenes (monoterpenes and sesquiterpenes), alcohols, aldehydes, and ketones which, in addition to their bioactive molecules, are also responsible for the aromatic fragrance that these materials frequently exhibit [8]. Presently, over 3000 EOs are known, 10% of which are commercially and economically relevant. These products are potential reservoirs of many bioactive compounds with several beneficial properties, and are aligned with current consumer preference for natural products [9]. They also offer the advantage of being better tolerated in the human body with fewer side effects [10].

EOs were also exploited for their flavoring properties [11,12] and for their potential to be used as food preservatives as they extend the length of the shelf life of products [13] or reduce the concentration of *Clostridium* numbers [14]. However, the main obstacle to using them as food preservatives is that they are often not potent enough and cause organoleptic alteration when added in sufficient quantities to induce the antimicrobial effect. However, this approach requires more insights into the interaction between molecules to determine the most synergetic effects, which remain elusive.

The popularity of EOs in the animal field and health has increased rapidly during the last decade. Nevertheless, their antioxidant and beneficial immunomodulatory effects in the ruminant sector remain poorly explored [15,16]. Mostly in poultry and pig sectors, studies have highlighted the capacity of some EOs to increase animal performances and efficiency by enhancing digestive secretions [17], increasing the number of probiotic bacteria such as *Lactobacillus* spp. [18,19], stimulating the immune function and the gastrointestinal microbiota [20,21], and decreasing oxidative stress [20]. However, some inconsistencies regarding the efficacy of EOs still exist, mainly linked to the nature of the compounds and some intrinsic and extrinsic factors, such as infection, nutritional status, environment, and particularly, diet composition [22].

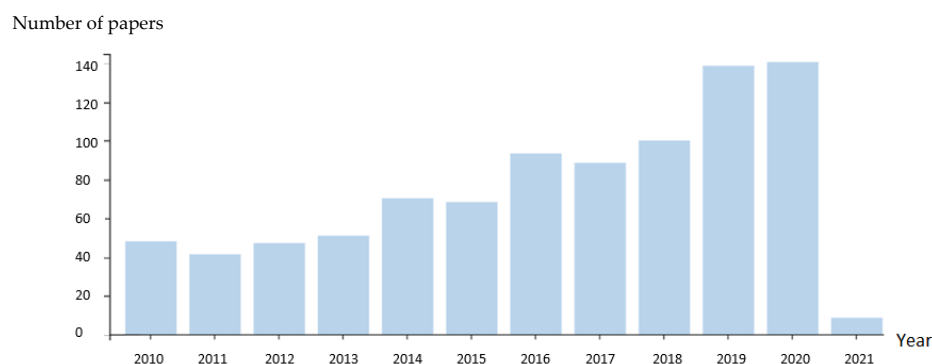
The potential use of EOs as new nutraceutical additives during early growth (pregnancy and/or lactation) has not been explored yet and might be a very promising way to limit the use of antimicrobials in livestock, according to the DOHaD (Developmental Origin of Health and Diseases) concept. This concept was initially developed in humans by Barker [23,24] and was extended more recently to animal science [25,26]. This plan may raise early animals in an antibiotic-free production environment and drive heard performances and efficiency at later life, contributing to reduce antimicrobial resistance.

To our knowledge, little is known about the potential use of EOs in livestock. The literature's significant findings are related to medicinal plant species' effects among livestock disease without distinguishing the effects of their isolated bioactive compounds. Data on EOs in ruminant and particularly the dairy sector are also limited. Our review is the first to overview the current knowledge about the antioxidant and antimicrobial properties of EOs in both monogastric and ruminant husbandry, to treat mastitis, and use as feed additives, modulation of rumen metabolism, and in animal product-derived foods. Its finality is to drive the nutritional and pharmaceutical industries to the potential use of EOs to improve animal health and explore encapsulated EOs as enhancers of milk and meat quality products that can facilitate their implementation as natural preservatives in foods.

## 2. Methods

To cover a maximum range of publications from Scopus, Web of Science (WOS), and Google scholar, we screened for the different database terms "essential oils", "antibacterial", "anti-inflammatory", "immunity", "additive", "diet", "animal products", "livestock",

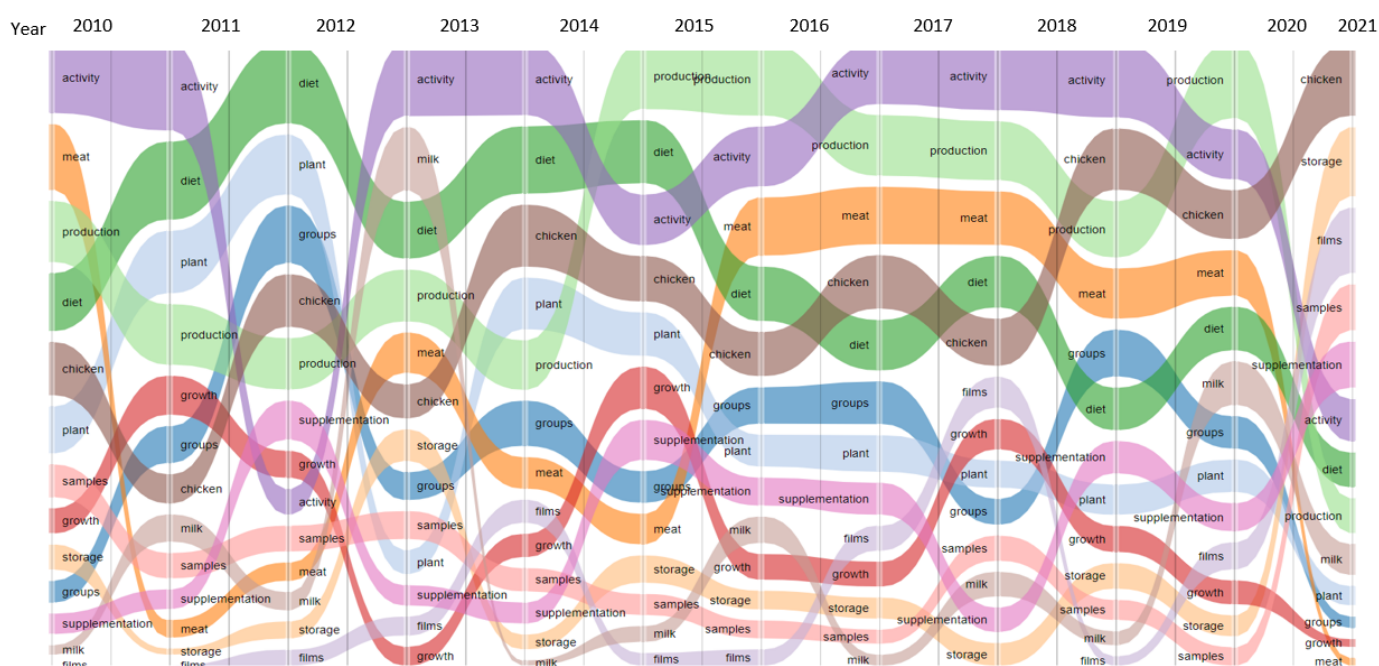
“encapsulation”, and in some cases, combining the primary taxonomic designation and botanical synonym names of plants with the listed key terms. Then, we performed an additional literature search from WOS on EOs in livestock. The total number of articles treating the use of EOs linked with animal production and livestock and their abstract between 2010 and 2021 was 919. The distribution of the number of papers according to the year of publication (2010–2021) is represented in Figure 1.



**Figure 1.** Distribution graph of the number of the articles containing essential oils (EOs) and a livestock animal or an animal food product according to the year of publication (2010–2021).

Among these articles, 138 records were obtained related to the characteristics of EOs as an anti-inflammatory, antibacterial, and immunoregulator, and 28 papers linking the use of EOs to treat mastitis, which is a new field of research.

Figure 2 shows an “Epic epoch” graph allowing to visualize the first 5 most used keywords in each article for each year and their evolutions. The map presents the different fields where EOs were used. We notice the growing evolution of the terms “chicken” and “storage” and the decreasing evolution of the word “diet”.



**Figure 2.** “Epic epoch” graph allowing to visualize the first 5 most used keywords in each article for each year, from 2010 to 2021.

Additional literature screening was performed to compare the number of articles with EOs in both monogastric and ruminants. When utilizing the keyword “EO” AND (“milk OR cow OR dairy OR cattle OR ruminant OR rumen OR sheep OR goat”), we obtained 478 articles between 2010 to 2021, with 15 reports in 2010, reaching a maximum of 80 papers in 2020. In non-ruminants, when screening with “EOs” AND (“pork OR pig OR swine OR chicken OR poultry OR monogastric”), we obtained 666 results with 40 articles in 2010 versus 110 in 2020. Note that the number of articles related to “EO” AND “in vitro” studies in livestock animal was 118, while only 15 papers were related to in vivo studies.

### 3. Importance of EOs

EOs are known for their natural protecting role for the host plants and the fact that these oils contain properties many times more powerful than those found in dried herbs. Among these properties are the antibacterial, antimicrobial, antiviral, and antifungal activities, together with some particular medicinal effects that make EOs of very considerable interest [27,28].

#### 3.1. Definition of EOs

EOs, also called volatile or ethereal oils [29], are aromatic lipophilic liquids obtained from plant material (flowers, buds, seeds, leaves, twigs, bark, herbs, wood, fruits, and roots). They can be obtained by expression, fermentation, enfleurage, or extraction, but steam distillation is most commonly used for commercial production of EOs [30]. The term ‘essential oil’ is thought to derive from the name coined in the 16th century by the Swiss reformer of medicine, Paracelsus von Hohenheim, who named the effective component of a drug *Quinta essential* [29]. As mentioned above, an estimated 3000 EOs are known, of which about 300 are commercially important destined chiefly for the flavors and fragrances market [30]. It has long been recognized that some EOs have antimicrobial properties [29], and these have been reviewed in the past [31,32], like antimicrobial properties of spices [31]. Still, the relatively recent enhancement of interest in ‘green’ consumerism has renewed scientific interest in these compounds [32,33]. Besides antibacterial properties [32,34,35], EOs or their components have been shown to exhibit antiviral, antimycotic [34], anti-toxicogenic [35,36], antiparasitic [37,38], and insecticidal properties [39,40]. These characteristics are possibly related to these compounds’ function in plants [29,41].

#### 3.2. Historical Use of EOs

Although spices were used for their perfume, flavor, and food preservatives since antiquity [42], only turpentine oil was mentioned in Greek and Roman history [29].

Concerning EO extraction, distillation was the first used method in the East (Egypt, India, and Persia) [29] more than 2000 years ago, and was improved in the 9th century by the Arabs [42].

The Catalan physician Villanova (ca. 1235–1311) wrote the first authentic EO distillation account [29]. It was only by the 13th century that pharmacies made EOs and pharmacopoeias described their pharmacological effects [42]. Still, EO’s utilization was not widespread in Europe before the 16th century via their trade in London City [43]. In that century, Brunschwig and Reiff, Strassburg physicians, mentioned, in each of their publications on EO distillation and use, only a few oils: anise, cinnamon, clove, juniper wood, mace, nutmeg, rosemary, spike, and turpentine [29]. The tea tree oil used for medical purposes has been recorded since Australia’s colonization at the end of the 18th century [44]. The first experimental measurement of EO antimicrobial efficiencies was performed in 1881 by De la Croix [24].

#### 3.3. Current Use of EOs

Presently, EOs are used in various fields. The pharmaceutical, cosmetic, and food industries are increasingly interested in EOs due to their biological activities, notably antibacterial, antifungal, and antioxidant ones. For example, in the European Union (EU),

EOs are the most used in food as flavoring agents, in cosmetics such as aftershaves and perfumes, and in pharmaceuticals for their attractive functional efficiencies [45]. Moreover, the pure molecules of EOs have been used as food flavorings [46], as dental care products [47], as antiseptics [48,49], and as feed supplements for livestock [50,51].

Natural preservatives based on EOs have become commercially available, such as 'DMC Base Natural'. This food preservative (produced by DOMCA S.A., Alhendín, Granada, Spain) is composed of 50% EO mixture (rosemary, sage, and citrus) and 50% glycerol [52]. Another example of commercialized EOs is 'Protecta I' and 'Protecta II', consisting of blended herb extracts proposed by Bavaria Corp. Apopka, FL, USA. The contained EOs are dispersed in sodium citrate and sodium chloride solutions [53].

#### 4. Extraction Methods for EOs

Extraction is the main factor that ensures the quality of EOs, and inappropriate extraction methods can cause losses in volatile compounds and decrease the quality of obtained extracts. There are two main categories of EOs' extraction procedures: conventional and unconventional or innovative methods.

##### 4.1. Conventional Extraction Methods

In this category of extraction techniques, the heating process' water distillation is classically used to obtain EOs from aromatic plants by two methods: hydro distillation and steam distillation. As for the first method, plant material is immersed into boiled water inside the alembic and vapors are condensed onto liquid in a decanter separating the EO from water. In contrast, in the steam distillation, plant material is heated by water steam. Another method used to recover EO compounds is solvent extraction by using acetone, petroleum ether, hexane, methanol, or ethanol, but the inconvenience of this method is that it allows extracting other non-volatile compounds at the same time which makes the second step of EO purification essential [54].

##### 4.2. Innovative Extraction Methods

New EO extraction techniques have emerged with many advantages in recent years, such as reducing extraction time, energy consumption, and solvents used and carbon dioxide emission [55]. Among these innovative techniques is solvent-free microwave extraction (SFME), a combination of heating plant samples using microwave energy followed by dry distillation at atmospheric pressure in the absence of any solvent. This method's advantages are to obtain EOs with high yield and selectivity, shorter extraction time, and a green and safe process [56]. Another emerging method is supercritical fluid extraction using fluids at critical temperature ( $T_c$ ) and pressure ( $P_c$ ), having remarkable properties such as low viscosity, high diffusivity, and density closer to liquids [55]. Generally, for extracting EO compounds, carbon dioxide fluid is used, and the obtained extract is not pure and further purification stages are needed. Also, water use at subcritical state is a powerful method for extracting EOs [57]. The subcritical water stage is reached when water pressure becomes higher than the critical pressure and temperature lower than the critical temperature, or vice-versa. This extraction method is considered the best alternative EO recovery technique since it enables a fast isolation process at a low working temperature [58].

#### 5. Chemical Composition of EOs

The composition of EOs from a particular species of plant can differ depending on harvesting seasons, genetics, agricultural practices, and geographical sources [59–61]. Such variation led to the formation of chemically different molecules, but with similarities. For example, in Greek oregano plants, the sum of cymene,  $\gamma$ -terpinene, carvacrol, and thymol is similar in EO derived from different geographic origins [62]. Also, it remains stable whatever the season of plant harvesting [63,64]. This indicates that the four listed compounds are biologically and functionally associated.

Adding fertilizers containing potassium nitrogen and phosphorous could increase the amount of EOs and change its composition. Fertilizers could increase the concentration of some enzymes responsible for the biosynthesis of terpenoids [61]. Sarmoun et al. showed that irrigation could affect the quality of EOs produced by *Rosmarinus officinalis* L.: the non-irrigated plant has a higher yield of EOs than the irrigated plant. However, the EOs, made from the irrigated *Rosmarinus officinalis*, show more variability in their compounds than the non-irrigated plant, such as trans-verbanol and linalyl-isobutyrate [65].

Generally, EOs produced from herbs harvested during or immediately after flowering possess the most potent antimicrobial activity [66]. Enantiomers of EO components have been shown to exhibit antimicrobial activity to different extents [67]. Table 1 shows the significant components of selected EOs that exhibit antibacterial properties.

**Table 1.** Major components of selected essential oils (EOs) that exhibit antibacterial properties.




Latin Name of Plant Source	Major Components	Approximate % Composition	References
 <i>Salvia officinalis</i> L. Credit: Dusan Baksa	Camphor $\alpha$ -Pinene $\beta$ -Pinene 1,8-Cineole $\alpha$ -Thujone	6–15% 4–5% 2–10% 6–14% 20–42%	[68]
 <i>Laurus nobilis</i> Credit: Stefano	1,8-Cineol Borneol	51.63–63.19% 5.8–12.80%	[69]
 <i>Coriandrum sativum</i> Credit: Forest & Kim Starr	Linalool	40–70%	[70,71]



Table 1. Cont.








Latin Name of Plant Source	Major Components	Approximate % Composition	References
 <p><i>Rosmarinus officinalis</i> Credit: Peter Stenzel</p>	$\alpha$ -Pinene Bornyl acetate Camphor 1,8-Cineole	2–25% 0–17% 2–14% 3–89%	[72–74]
 <p><i>Thymus vulgaris</i> Credit: Ralf Wimmer</p>	Thymol Carvacrol $\delta$ -Terpinene <i>p</i> -Cymene	10–64% 76.1% 2–31% 10–56%	[59,63,66,72,75]
 <p><i>Nigella sativa</i> Credit: Eran Finkle</p>	Thymoquinone Carvacrol <i>p</i> -Cymene	27–45% 7–11.6% 7–15%	[76]
 <p><i>Juniperus officinalis</i> Credit: Zoran Radosavljevic</p>	B-Phellandrene $\alpha$ -Terpinyl acetate $\alpha$ -Pinene $\alpha$ -Phellandreneinene Manonyl oxide	4.9–23.8% 4.6–15.5% 28–60% 0.8–17.7% 0.4–14.4%	[77]

Table 1. Cont.

Latin Name of Plant Source	Major Components	Approximate % Composition	References
 <i>Pelargonium graveolens</i> Credit: Forest & Kim Starr	Citronellol Geraniol Linalool Citronellyl formate <i>p</i> -Menthone	33.6% 26.8% 10.5% 9.7% 6%	[78]
 <i>Origanum vulgare</i> Credit: Koromelana.yandex.ru	Carvacrol Thymol $\gamma$ -Terpinene	Trace–80% Trace–64% 2–52%	[40,68,72,79–83]
 <i>Artemisia herba alba</i> Credit: Pegnum	Limonene Fenchol $\alpha$ -Thujone Camphor Nordavanone	4–9% 7–14% 11–14% Trace–30% 1–9%	[84]

## 6. Stability and Encapsulation of EOs

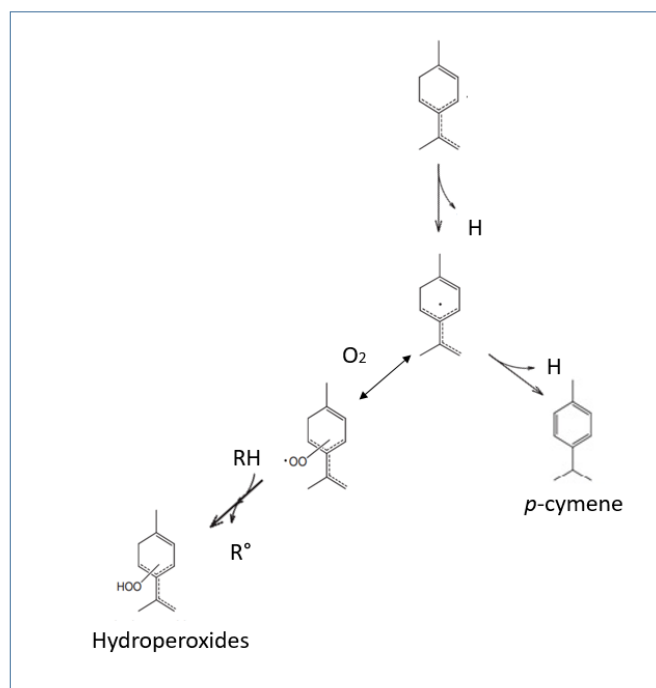
Although EOs are considered secondary and non-essential plant metabolites, they have gained interest around the world due to their specific biological functions [61], many of which lend themselves to commercial exploitation. EOs production on a larger scale was started in the USA in the earlier 19th century [85]. Indeed, combining their established historical use as medicines to their range of biological activities aroused a great interest in their use as medicinal products [63]. Besides, attractive EOs, which leave a pleasant memory association, are used as marketing devices to sell cosmetic products, including detergents, scent perfumes, lotions, soaps, and household cleaners [86]. For instance, lavender EO and d-limonene from the citrus peel are potent solvents, and they are used in a wide variety of cleaning and cosmetic products [85]. For food industries, EOs are more and more considered to act as natural additives as antioxidant/antimicrobial agents [87]. The remarkable efficiency of most EOs against a wide range of pathogenic microorganisms, responsible for food spoilage and generally involved in food poisoning, was repeatedly reported [86–88].

However, it has been repeatedly discussed that EOs' valorization in innovative industries is not economically and practically ideal [89,90]. One of the crucial issues with using EOs as green and efficient bioactive molecules is their impact on the final product's sensory

properties. The EO required to inhibit microbial growth may compromise organoleptic properties (aroma and taste) and produce an undesirable effect [91]. Alternatively, the use of lower concentrations of EOs may be possible if multiple preservation strategies that result in additive or synergistic effects on antimicrobial activity are involved [90,92].

Besides, it was confirmed that the incorporation of EOs in foods can be prejudice given their hydrophobicity and volatility [89]. Thus, EOs lose small quantities of volatile compounds when stored at high temperatures. Some components are highly unstable at pH variations, like citral, easily decomposed in an acidic environment [93]. Moreover, the hydrophobicity of EOs leads to their heterogeneous distribution in an aqueous medium. Such characteristics would lead to decreased EOs efficiencies as antimicrobial and antioxidant agents and limit their use as green and natural preservatives.

Another valorization-limiting characteristic is EOs' easy oxidation. Once deprived of the protective compartment in the plant matrix, EOs' constituents are easily prone to different chemical transformations. Indeed, as EOs are both thermo-sensitive and volatile, they are easily alterable [94]. Several factors could be responsible for the degradation of the chemical constituent of EOs. First, the plant's growth stage and the vegetable material's post-harvest storage conditions profoundly influence an EO's alteration. Besides, other factors related to handling or storing the oil itself will also lead to the acceleration of EOs' oxidation, such as temperature, light, and atmospheric oxygen availability. Indeed, the ultraviolet light and visible light are considered accelerators of the self-oxidation process by taking out hydrogen, leading to alkyl radicals' formation. The oxidation of terpenoids, for example, produces the *p*-Cymene (Figure 3). They also give rise to a range of stable oxidized products such as alcohols, ketones, and aldehydes [95].



**Figure 3.** Oxidation of terpenoids adapted from Reference [95].

The encapsulation of EOs seems to be an attractive new approach to overcome all previously listed impediments [90]. Encapsulation consists of coating sensitive materials (solid, liquid, or gas) known as core material, with a protective layer called wall material [96]. EO encapsulation is a complex process with interrelated steps [97]. In this context, several research groups focused on EO encapsulation, and different techniques were proposed [98]. Accordingly, choosing the encapsulation method and the encapsulating material depend on specific parameters: targeted mean particle size, the physicochemical characteristics



of wall and core ingredients, the intended applications of the encapsulated material, the release system of capsule content, production capacity, and cost [96,99].

Concretely, the EO encapsulation approach has succeeded to convince the research society of its efficacy. Firstly, the oxidation phenomenon has been avoided /retarded after EOs' encapsulation. Bakry et al. highlighted that basil EO's microencapsulation protected it against oxidation under accelerated storage conditions for 49 days [100]. In addition, EO encapsulation allows the preservation of their biological efficiencies during their storage, transport, and processing. The encapsulation of oregano EO into microspheres of native sorghum and rice starch significantly prolonged its antioxidant activity during storage [101].

Moreover, using encapsulation as a technological alternative to conceal EOs' highly undesirable taste has been repeatedly justified. Ghalem and Zouaoui suggested that adding *Lavandula* and *Chamaemelum* spp. EOs to yoghurt decreased its acceptability by panelists [102]. In addition, EO encapsulation represents an efficient approach to increase their bioactivity and bioavailability by ensuring their even distribution in the medium [103]. To overcome EO hydrophobic limitation, the outer protective layer, used in the encapsulation, acts as a hydrophilic barrier to EOs. In this context, Ben Jemaa et al. have pointed out that bulk thyme EO, with low water solubility, was roughly distributed in the medium and its action extent was therefore limited. On the contrary, when encapsulated in the nanoemulsion-based delivery system, its diffusion was homogeneously leading to more efficient antimicrobial activity [104].

In this context, multiple methods were developed for EOs' encapsulation, as follows.

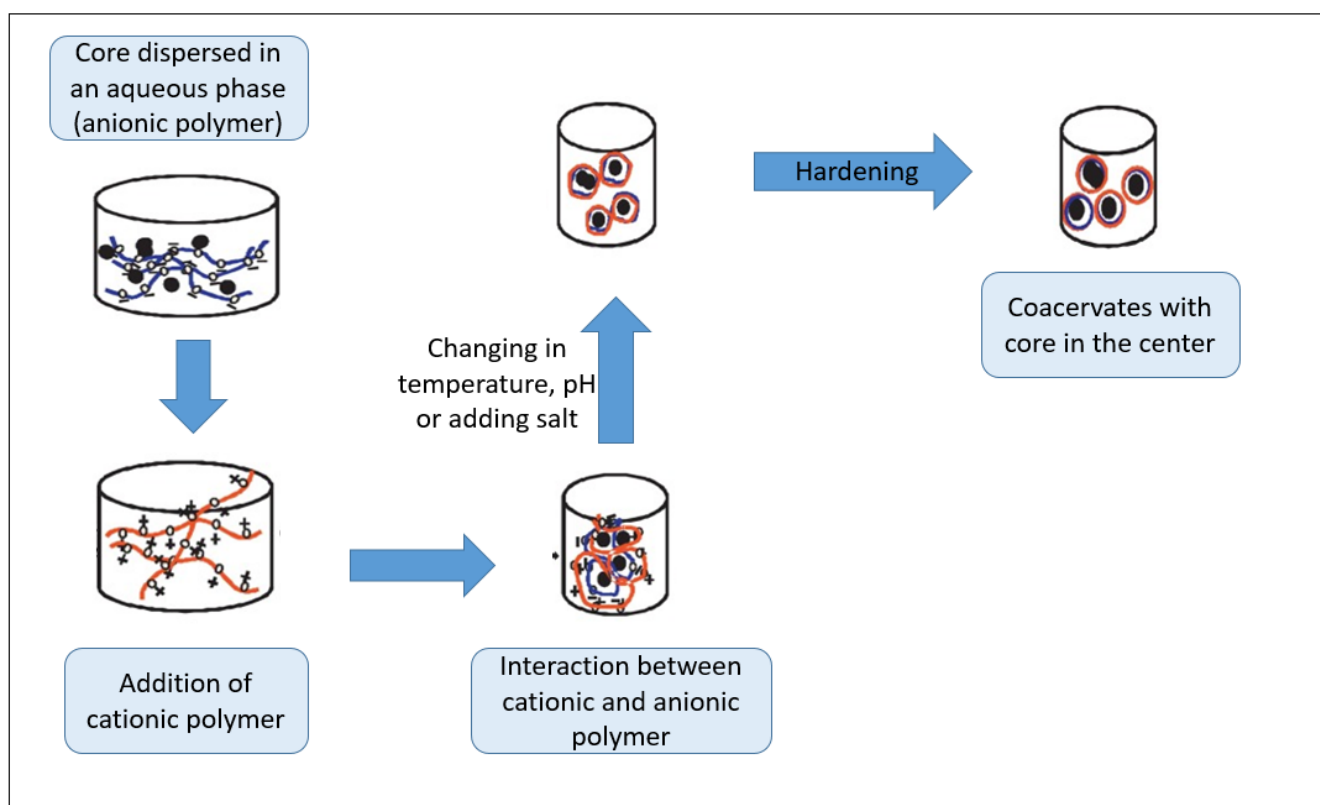
**The complex coacervation process:** This process involves a liquid–liquid phase separation formed between two or more oppositely charged biopolymers from the initial solution, leading to coacervate formation around the active ingredient [100]. Mixtures between proteins and polysaccharides are generally used to prepare complex coacervates for encapsulation purposes. Encapsulation by complex coacervation can involve various steps for the formation of microcapsules: (i) an aqueous solution is prepared to contain two or more anionic and cationic polymers, (ii) the aqueous phase is mixed with a hydrophobic solution to produce a stable emulsion, (iii) a sudden change in pH and temperature induces the coacervation and the phase separation, and (iv) the polymer matrices harden by using a desolvating agent, high temperature, or a crosslinking agent (Figure 4) [105].

Recent studies showed that complex coacervation could be used by mixing two oppositely charged proteins with an affinity for an encapsulated bioactive component [106]. Efficient encapsulation yield with a protective effect was reported for vitamin B9 encapsulated in milk-derived protein coacervates. Complex coacervation is a mix of food proteins that constitutes a new, biosourced, and economically viable method suitable for entrapment and encapsulation of hydrophobic molecules such as EOs [106].

**Liposomes:** Liposomes are made with many phospholipids bilayers vesicles enclosing an internal aqueous volume [107]. The growing interest in liposomes can be attributed mainly to their property of mimicking biological cells. Accordingly, liposomes are highly biocompatible, making them an ideal candidate for a drug delivery system, with applications ranging from delivering enzymes, antibacterial drugs, fungicides, and adjuvants for vaccines [108]. The membrane structure can vary significantly, making it possible to create different liposomes with diverse characteristics and applications [109].

**Nanoemulsion:** In nanoemulsion, tiny EO droplets are confined to a cavity surrounded by a unique polymer membrane [110]. The EO dispersion in water is obtained through the chemical action of surfactants. It is highly recommended to encapsulate EO into nanoemulsion-based delivery systems for different reasons: non-toxic and non-irritant, high kinetic stability, capacity to solubilize hydrophobic bioactive molecules and to enhance their bioavailability, and suitability for human and veterinary uses [111]. The nanoencapsulation of EOs can be performed using multiple techniques, such as high-pressure homogenization [104], micro-fluidization [112], and sonication [113].

**Solid lipid nanoparticles (SLN):** These particles are made up of lipids (triacylglycerols or waxes), solid at room temperature, biodegradable, and non-toxic, stabilized by adding suitable surfactants [97]. Solid lipids instead of oils allow improving the control in releasing the active molecules due to its reduced mobility in a solid phase compared to the oily liquid phase [107]. They are generally obtained by preparing an oil in water emulsion at a temperature exceeding the lipid phase melting point, and then the cooling of produced emulsion, leading to crystallization of the lipid and the trap of the target molecules either in the core or on the wall of the obtained particles [97]. This technique is highly recommended in carrying lipophilic active components since it offers adequate protection, less leakage, and sustained release of EOs [114].



**Figure 4.** Coacervation process adapted from Reference [105]. The bioactive molecule to be encapsulated (core) is first mixed with one polymer before adding the oppositely charged polymer. The complex coacervation process is generally spontaneous or induced by altering the physicochemical parameters (pH, temperature, ionic strength, etc.). This process leads to the formation of micrometric droplets (5–10  $\mu\text{m}$ ) with entrapped bioactive molecules. At the end, stabilization can be performed using chemical or physical treatments.

## 7. Main Properties of EOs

The therapeutic properties of EOs are directly linked to the molecules that compose them. They present antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory properties.

### 7.1. Antimicrobial Activity

Several studies tried to explain the mechanism of action of an EO towards bacteria. This mechanism's complexity is related to the chemical composition of EOs, which presents a high diversity of molecules (each molecule acts on a specific target). EOs can target the cell membrane, disrupting the cell energy status (the process of energy transduction coupled with the membrane and the solute transport) and the metabolic regulation. Sometimes, it modifies the expression of operons by inhibiting self-inducing mediators [115].

Many mechanisms of action are attributed to the interaction of EOs with the components of the cell membrane. The lipophilic character of molecules in EOs make them

capable of penetrating the phospholipid double layer of the cell membrane, leading to a lack of regulation of the cell membrane, thereby disrupting the transportation of nutrients. Membrane transport can also dysregulate via disturbance of the ionic gradient on the cytoplasmic membrane's two sides. However, some bacteria strains have been able to develop mechanisms allowing it to counteract this effect through ion pump use [115].

EOs could affect the biosynthesis of lipids, including unsaturated fatty acids, thus modifying the cell membrane structure due to the hydrophobic characteristic. EOs in the bacterial cell, even in a concentration below the minimum inhibitory concentration (MIC), decrease the level of unsaturated fatty acids that are generally responsible for the membrane fluidity. For example, thymol, carvacrol, and eugenol can increase saturated fatty acids and decrease C18 unsaturated fatty acids. The action of EOs can also affect the enzymes responsible for the latter's biosynthesis [115].

Hundreds of in vitro studies were carried out to evaluate the effects of EOs on some pathogens, such as Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, Gram-negative bacteria: *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, yeasts: *Candida albicans*, and molds: *Aspergillus niger*. These six species are the most abundant infectious microorganisms, mainly because they are the most frequently tested [86]. Table 2 shows the minimum inhibitory concentration (MIC) (the lowest concentration of a chemical preventing a bacteria's visible growth) of EOs against some pathogens [27].

**Table 2.** List of recent studies that tested the antibacterial properties of some EOs against pathogens by identifying the minimum inhibitory concentration (MIC) of EOs.

EOs	Bacteria	MIC	References
<i>Cymbopogon</i> spp. and <i>Cinnamomum verum</i>	<i>Escherichia coli</i>	0.075% to 0.3% (v/v) and 0.0075% (v/v), respectively	[116]
<i>A. sativum</i> , <i>C. verum</i> , <i>O. basilicum</i> , <i>S. aromaticum</i> and <i>T. vulgaris</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>A. jandaei</i> and <i>Citrobacter freundii</i> isolated from diseased freshwater fish	MIC $\leq$ 500 $\mu$ g/mL	[117]
<i>Lavandula x intermedia</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> and <i>Candida albicans</i>	MIC 9–18 $\mu$ g/mL for <i>Streptococcus</i> MIC 9–18 $\mu$ g/mL for <i>Candida</i>	[118]
<i>Mentha arvensis</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> and <i>Candida albicans</i>	MIC 18–36 $\mu$ g/mL for <i>Streptococcus</i> MIC 18–144 $\mu$ g/mL for <i>Candida</i>	[118]
<i>P. armeniaca</i>	<i>M. luteus</i> , <i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i>	MIC 23.4 $\mu$ g/mL for <i>M. luteus</i> MIC 23.4 $\mu$ g/mL for <i>S. aureus</i> MIC 11.7 $\mu$ g/mL for <i>E. coli</i>	[119]
<i>L. nobilis</i>	<i>M. luteus</i> , <i>S. aureus</i> and <i>B. subtilis</i>	MIC 22.2 $\mu$ g/mL for <i>M. luteus</i> MIC 5.55 $\mu$ g/mL for <i>S. aureus</i> MIC 1.39 $\mu$ g/mL for <i>B. subtilis</i>	[119]
<i>M. alternifolia</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and <i>E. coli</i>	MIC 0.5 and 4 $\mu$ g/mL	[120]
<i>T. vulgaris</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and <i>E. coli</i>	MIC 1 to 16 $\mu$ g/mL	[120]
Garlic, cinnamon, and onion	<i>L. monocytogenes</i>	MIC respectively 100, 100, and 25 $\mu$ g/mL	[121]

## 7.2. AntiInflammatory Properties

Inflammation is a physiological response caused by an infected or injured tissue in the body. Inflammatory processes can: (i) increase the permeability of mucosal endothelial cells and the interstitium's influx of blood leukocytes, (ii) cause the expression of cell adhesion molecules, such as vascular cell adhesion molecules (VCAM) and intercellular adhesion molecules (ICAM), (iii) upregulate the activity of several enzymes (oxygenase, peroxidase, and nitric oxide synthase) and the metabolism of arachidonic acid, and (iv) cause the release of pro-inflammatory cytokines [122–125].

EOs can interact with the signaling cytokines, the regulatory transcription factors, and the expression of pro-inflammatory genes in addition to their antioxidant activities. The mechanism of action may be indirect in an immunostimulatory reaction or direct via several mechanisms such as:

- Hyperemia, which accelerates the recruitment of leukocytes, promoting the anti-inflammatory reactions (citral, citronellal, and cuminal in external use),
- Blockage of the synthesis and secretion of mediators of inflammation (histamine, pro-inflammatory cytokines, prostaglandins, leukotrienes, nitric oxide, free radicals), thus acting at different levels of anti-inflammatory activity [126,127].

## 8. EO and Inflammation: The Bovine Mastitis as a Paradigm Case

The immunomodulatory activity of EOs in human medicine has been reported for a long time, presenting the much more complicated evidence than previously believed, and not only limited to antioxidant activity. The EO obtained from *Lavandula angustifolia* showed the capacity to increase phagocytosis and decrease pro-inflammatory cytokine production, counter-balancing the inflammatory signaling induced by experimental infection with *S. aureus* [128].

In both ruminants and monogastrics, identifying immunomodulatory molecules for bovine mastitis, or calf, pig, and chicken intestinal diseases, is a promising alternative strategy to using antibiotics that may result in resistance development in humans and animals. Although there is a growing interest in the use of EOs, few data are available on the degradation rate of EOs and their compounds in the gastrointestinal tract and the way they are prepared and fed to animals, e.g., whether they are micro-encapsulated or not [129].

In monogastric species like pigs, the integration of diet with EO can change the distribution of lymphocytes in the gut. It is unknown whether this effect is direct, e.g., related to EOs' interaction with the intestinal immune system, or indirect, via EOs' interaction with the resident microbiome, which changes its relationship with the resident immune system. By integrating diets with a mixture of carvacrol, cinnamaldehyde, and capsicum oleoresin, it was possible to decrease intraepithelial lymphocyte (IEL) population jejunum and ileum and increase lymphocyte in the lamina propria of early-weaned pigs [130]. Indeed, this information does not allow to understand the consequence of this immunomodulatory activity for the overall animal health. On one side, a decrease of the immune activation may protect the animal from the unwanted excess of immune stimulation, and prevent collateral damages related to inflammation. On the other hand, decreasing immune activity might also pave the way for a breakthrough of pathogens.

On the contrary, other EOs' activities are related to potentiating immune responses, such as improving serum lymphocyte proliferation rate, phagocytosis rate, immunoglobulin (Ig) G, IgA, IgM, C3, and C4 levels in piglets [131]. These results were recently confirmed by similar studies, demonstrating an increase of IgG and IgM after plant EO supplementation [132].

A recent study also reported the anti-inflammatory activity of encapsulated EO [133], demonstrated by a decrease of the major pro-inflammatory cytokines (Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin 6 (IL-6)). However, even anti-inflammatory cytokines, like IL-10, are decreased, confirming that EO activities are more complex, and not one-sided.

The molecular basis of the immunomodulatory activity of EOs has not been investigated in-depth and may indeed change, depending on the specific EO used. Regarding oregano-derived EO, the immunomodulatory activity is related to downregulation of pro-inflammatory pathways, including the mitogen-activated protein kinase (MAPK), protein kinase B (Akt), and nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathways, which reflects on the decreased expression of inflammatory cytokines in the jejunum of pigs models [134].

The effects of dietary EO have been studied in the other primary livestock monogastric species, the chicken, albeit less intensively. The EOs have an evident immunomodulatory activity on mRNA expression in intestinal cells on IL-17A, Interferon (INF)  $\alpha$ , INF- $\gamma$ , Transforming growth factor (TGF)  $\beta$ , and IL-10 [135]. Carvacrol can decrease the inflammatory activity induced by lipopolysaccharides (LPS) treatment by downregulating the mRNA expression of some pro-inflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and of pathogen-associated molecular pattern membrane receptors, such as TLR2 and 4, and the

downstream pathways related to them, such as NF- $\kappa$ B [136], after LPS challenge, demonstrating the potential anti-inflammatory activities of this EO against intestinal infection. A study on *Minthostachys verticillata* EO with immunomodulatory activity on human T cells and anti-inflammatory activities showed its capability to increase macrophage phagocytosis and oxidative burst in a Balb/c mice model. Moreover, this EO can decrease neutrophil chemotaxis to the mammary gland, and downregulate pro-inflammatory cytokines', such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , mRNA expression. Consistently, the anti-inflammatory cytokine IL-10 is also upregulated. Given that *M. verticillata* EO was also shown to induce a decrease of the bacterial count in the glands of mice experimentally infected with *E. faecium*, this model demonstrated that this EO could boost the innate immunity to help to resolve inflammation [137].

In ruminants, the anti-inflammatory activity of EO was also reported in a model of Sub-Acute Ruminant Acidosis: introducing a mixture of EO and polyphenols in the diet could reduce the number of circulating neutrophils and of the acute phase proteins Serum Amyloid A, Haptoglobin, and Lipopolysaccharide Binding proteins, that are regarded as markers of inflammation in cows [138,139].

The mammary gland's inflammation, also called mastitis, is one of the most frequent and costly dairy cows' diseases, mostly caused by intramammary infection due to bacteria and other microorganisms [140]. Bovine mastitis is an inflammation of the udder. It is the result of an infection of the udder by bacteria, yeasts, or viruses. Mastitis or inflammation of the mammary gland develops when a pathogen crosses the teat canal barriers and multiplies in the milk. When the immune defense mechanisms fight this infection quickly and effectively, mastitis will be mild and transient. On the other hand, when the defense mechanisms are compromised, during parturition, or when the pathogen has evasion mechanisms against the immune system, mastitis will be more severe or become chronic [141].

The intensity of the inflammatory response will determine the type of mastitis: subclinical or clinical. Major pathogens related to mastitis include *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, and *Streptococcus agalactiae*, and other bacteria, such as *Arcanobacterium pyogenes*, *Staphylococcus non-aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia asteroides*, *Clostridium perfringens*, *Mycobacterium* spp., *Listeria monocytogenes*, and many others can be found as associated with mastitis. Following clinical signs, bacterial infiltration reaction in dairy cows develops following two different clinical events: clinical mastitis and subclinical mastitis [142]. The clinical mastitis usually recapitulates acute inflammation's significant features: the infected udder becomes swollen, red, hot, and sometimes painful to be touched. Clinical mastitis significantly affects milk quality and quantity.

The resulting milk looks like an inflammatory exudate, hemorrhagic or sometimes purulent, exhibits the formation of flakes and clots, decreased protein, fat, and lactose contents. The exudate is infiltrated by cells migrated from the blood via diapedesis, mostly neutrophil granulocytes, and are defined as somatic cells (SC) [141]. Subclinical mastitis is more challenging to detect. In most of the cases, the only sign is the increase of SC. Bovine mastitis causes a drop in milk production in the affected quarters. This decrease is most marked in the event of clinical mastitis. Subclinical inflammations can also reduce milk productivity by up to 40%. As a result, veterinary costs, pharmacological treatment, and milk wastage due to treatments impact the farm's profitability [143]. Beside the decrease in milk production in animals with mastitis, the milk containing somatic cells is removed from the dairy chain, increasing the economic burden [144].

The conventional therapy against mastitis still includes aggressive treatment with antibiotics which, although necessary, is not fully efficient, and presents several drawbacks. Extending over the critical use of antibiotics is at the background of the development of antimicrobial resistance that can persist in the bacterial community [145], as shown for *Streptococcus agalactiae* and *S. aureus* [146], causing antibiotic resistance in humans as well [142]. Alternative and complementary approaches are therefore investigated, such as using EOs.



In vitro studies have demonstrated the antibacterial activity of EOs against several pathogens that can cause mastitis, such as, among the others, *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *E.coli*, and *S. aureus* [147]. The EOs' chemical constituents promote bacterial cell wall and membrane damages, such as cell wall degradation, protein denaturation, and destabilization of proton motive force. Given their lipophilic nature, EOs can penetrate the lipid bi-layer of the bacterial cell membrane, causing loss of integrity and structural organization [148]. In general, Gram-positive bacteria are more sensitive than Gram-negative to disruptive activity, probably due to the lipopolysaccharides at the outside of the cell wall [149].

Their natural origin, coupled with lower side effects and the limited development of resistance after prolonged use, have identified EOs as promising therapeutics agents against mastitis, both in vitro and in vivo [150].

In vitro studies have been carried out to test the effects of selected EOs on the cells present in the mammary glands, such as epithelial mammary gland cells, or against bacteria involved in mastitis development. The activity of EOs against Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) may be related to the disruption of biofilms in a syntrophic consortium within a self-produced matrix of extracellular polymeric substances (EPS). Biofilm production is a strictly coordinated process by which planktonic bacteria switch from free-floating forms to sessile anchored cells embedded in self-produced EPS [151].

Remarkably, several studies demonstrated that the major components of EOs, when isolated, appear to be less active against bovine pathogens than does the full-fledged EO, suggesting the hypothesis that, along with the individual antibacterial activity of each component, the various molecules present in the EO act synergistically to fulfil an antibacterial activity [148].

As expected, there are very limited and less conclusive in vivo studies. Moreover, in many cases, the molecules used for in vivo studies were not tested for the presence of lipopolysaccharides or other pro-inflammatory molecules, which may bias the experimental design, particularly when directly infused in the mammary gland. Most in vivo studies, including the treatment with external application, do not provide enough scientific evidence to support the use of the EO directly in the mammary gland.

On the other hand, as mentioned previously, bibliographic research highlights a low number of in vivo experiments made on the use of EOs in treating mastitis: Abboud et al. studied the effect of 10% of a mixture of *Thymus vulgaris* and *Lavandula angustifolia*, by intramammary infusion and external application on the quarter. After four days of treatment, they discovered a substantial decrease in the bacterial colony count. The most potent antibacterial activity was achieved by massaging the udder with the mixture of EOs [152].

Another study was conducted to evaluate the effect of *Origanum vulgare* by intramammary infusion: 0.9 mL of EO was given twice a day for three days. *S. aureus* and *E. coli* were not detected in milk after the treatment [153]. The intramammary infusion of sage EO to ewes affected with subclinical mastitis resulted in a significant decrease in somatic cell count 24 and 48 h post-treatment. On the other hand, Lefevre et al. treated 55 cases of mastitis with a mixture of EOs containing *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus verbenone*, and *Laurus nobilis* (1.5% each in 10 mL of sunflower oil), and 45 mastitis with a combination of *Thymus vulgaris* and *Rosmarinus verbenone* (6% of each in sunflower oil or water). The results were unsatisfactory: The recovery rate was only 40% [154].

Several hypotheses were advanced trying to explain these contradictory observations: (i) milk can interact with the EO, resulting in an alteration of their antibacterial properties, (ii) the concentration of the EO used in the in vivo treatment is not enough, and (iii) the excipient could modify the physicochemical characteristics of EOs [155].

#### *Antioxidant Activity and Mechanisms of Action*

EOs obtained from different plants are a source of natural antioxidants [156]. Most EOs have the virtue of being non-toxic—the literature has demonstrated that, compared

to inorganic supplements, plant-derived products such as EOs are less toxic, residue-free, and thought to be ideal growth promoters for both milk and beef production and quality [156,157]. In addition, transition metals such as Fe and Cu, often given as mineral supplementation, favor the formation of highly reactive free radicals in meat, accelerating its oxidation [158,159]. However, in high concentrations, they can exert toxicity, such as necrosis. Hence, it is a common practice in the study of EOs, although not entirely correct, to identify natural antioxidants as “molecules able to react with radicals” or molecules that present the reducing power to counteract the oxidative stress caused by radicals [156,160]. Accordingly, there are several methods used to examine the antioxidant properties of EOs. The most common tests used to screen the antioxidant activity of EOs are based on the *in vitro* reaction of the phytochemicals with some colored persistent radicals (e.g., 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) or 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ABTS<sup>•+</sup> assay) (antiradical) or with some oxidizing nonradical species such as Fe<sup>3+</sup> ions (e.g., ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay) [161]. From a mechanistic point of view, these methods are classified as electron transfer (ET)-based assays, contrary to hydrogen atom transfer (HAT)-based assays, also widely used, which include oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay, radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) assay, crocin bleaching assay using 2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide dihydrochloride (AAPH) as a radical generator, and  $\beta$ -carotene bleaching (BCB) assay [162,163]. In Table 3, we summarized some studies on the *in vitro* antioxidant activity of the selected EOs.

Many studies exploring the bioactivity of EOs have mainly attributed their antioxidant capacity to terpenoids with phenolic groups such as carvacrol, methyl chavicol, thymol, and eugenol, as they can donate hydrogen atoms to free radicals and transform them into more stable products [162,164]. For example, about 80% of oregano EOs are constituted by carvacrol and thymol, mainly responsible for its antioxidant activity [165,166]. Similarly, EOs from other aromatic plant species, like lemon balm, basil, thyme, and sage, have also been established as rich sources of antioxidants [162]. The study conducted by Viuda-Martos and co-workers demonstrated the ability EOs from oregano (*Origanum vulgare*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*), and sage (*Salvia officinalis*) to chelate Fe<sup>2+</sup>, with rosemary EO displaying the highest effect (76.06%). Moreover, oregano EO showed the most increased antioxidant activity in the Rancimat test [167]. Tunisian *Thymus capitatus* EO's antioxidant activity, mainly composed of carvacrol, *p*-cymene, and  $\gamma$ -terpinene, was compared with butylated hydroxyanisole (BHA) and Butylated hydroxytoluene (BHT) by DPPH and thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) methods, evidencing better antioxidant properties [168]. On the other hand, Kulisic et al. revealed that the antioxidant activity of *O. vulgare* EO was less effective than ascorbic acid (AA), but comparable with the  $\alpha$ -tocopherol and BHT, based on the BCB test, DPPH radical scavenging method, and thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) assay [169]. Furthermore, *in vivo* experiments carried out in pigs fed with diets containing *O. vulgare* crude herbal drug promoted significantly improved stability and lower cholesterol oxide content in raw belly bacon than controls after 34 weeks of storage [170]. In line with these findings, Botsoglou et al. demonstrated that laying hens fed with a *Thymus vulgaris*-enriched diet (3% ground herb) led to an increased storage time (over 60 days) in the refrigerator, mostly due to reduced oxidation of liquid yolk [171]. Additionally, higher enzyme levels of the antioxidative enzymes, namely superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx), were found in ageing rats dietary supplemented with thyme oil or thymol [172]. Studies conducted in White pigs demonstrated that rosemary EO (150 mg/kg) significantly reduced the generation of TBARS and hexanal, and carbonyls, indicators of lipid and protein oxidation, respectively [165,173]. A study developed by Takayama et al. showed that pre-treatment of rats with *R. officinalis* EO (50 mg/kg) protected against the gastric injury induced by ethanol, probably by modulating the activities of SOD and GPx, and increasing or maintaining the levels of glutathione (GSH) [174]. *In vitro* experiments dealing with the DPPH scavenging activity of *Nigella sativa* EO revealed that its potent antioxidant activity (The half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) = 19  $\mu$ g/mL) could be attributed to the presence of oxy-

genated monoterpenes such as thymol and thymoquinone [175]. Furthermore, *N. sativa* EO strongly inhibited tert-Butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH) induced 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH) oxidation with an IC<sub>50</sub> of 1.0 µg/mL in WS-1 cells, indicating its ability to inhibit reactive oxygen species (ROS) production [176]. In vivo assays demonstrated that *N. sativa* EO holds the potential to significantly improve the oxidant status of normal rats by enhancing the activity of several antioxidant enzymes, namely glutathione reductase and glutathione transferase [177]. Singh et al. also showed the strong antioxidant effect of *N. sativa* EO in the rapeseed oil system, evidencing comparable results to BHA and BHT effects at the 6 mg levels [158].

**Table 3.** Antioxidant activity of selected EOs.

Essential Oil (Plant Species)	Location (Plant Part)	Main Components	In Vitro Assay, Bioactivity	References
<b>Sage (<i>Salvia officinalis</i> L.)</b>	Saudi Arabia (leaves)	Camphor (20.3%), 1,8-cineole (15.0%), $\alpha$ -thujone (14.9%), viridiflorol (9.9%), carvone (6.2%), $\beta$ -thujone (5.7%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 970 µg/mL	[178]
	Morocco (leaves)	Camphor (24.1%), $\alpha$ -thujone (21.4%), 1,8-Cineole (16.5%), $\alpha$ -pinene (11.2%), camphene (6.9%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 2.12 mg/mL (> Q and AA); BCB, RC <sub>50</sub> = 3.78 mg/mL (> Q and BHT); FRAP, EC <sub>50</sub> = 2.98 mg/mL (> Q and AA)	[179]
	Spain (leaves and flowers)	Camphor (25.0%), 1,8-cineole (24.7%), camphene (7.6%), $\alpha$ -pinene (6.8 %), $\alpha$ -terpinyl acetate (6.0%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 4.20 mg/mL (> AA and BHT); TBARS, EC <sub>50</sub> = 35.56 mg/mL (> AA and BHT); FIC, EC <sub>50</sub> = 7.16 mg/mL (< AA and BHT); Rancimat, AAI = 1.07 (< AA and BHT)	[167,180]
	Tunisia (leaves)	Camphor (25.1%), $\alpha$ -thujone (18.8%), 1,8-cineole (14.1%), viridiflorol (8.0%), $\beta$ -thujone (4.5%), and $\beta$ -caryophyllene (3.3%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 6.7 mg/mL (> BHT); FRAP, IC <sub>50</sub> = 28.4 mg/mL (> BHT); LAP inhibition, IC <sub>50</sub> = 9.6 mg/mL (> $\alpha$ -tocopherol)	[181]
<b>Laurel (<i>Laurus nobilis</i> L.)</b>	Morocco; (Flowers)	1,8-Cineole (45.0%), $\alpha$ -caryophyllene (7.5%), germacradienol (6.1%), limonene (4.7%), $\alpha$ -pinene (3.0%), germacrene D (3.1%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 82.01 µg/mL (> BHT and AA)	[182]
	Turkey (leaves)	1,8-Cineole (51.8%), $\alpha$ -terpinyl acetate (11.2%), sabinene (10.1%), $\alpha$ -terpineol (5.2%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 59.2 µg/mL (> BHT and AA); BCB, RAA = 76.8 % (< BHT and AA)	[183]
	Lebanon (leaves)	1,8-Cineole (35.2%), 1- <i>p</i> -menthen-8-ethyl acetate (13.5%), linalool (7.1%), sabinene (6.2%), $\alpha$ -pinene (5.7%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 53.5 µg/mL (> AA); BCB, IC <sub>50</sub> = 35.6–38.9 µg/mL (> PG)	[184]
	Lebanon (seeds)	$\beta$ -Ocimene (21.8%), 1,8-cineole (9.4%), $\alpha$ -pinene (3.7%), $\beta$ -pinene (2.1%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 66.1 µg/mL (> AA); BCB, IC <sub>50</sub> = 41.1–45.9 µg/mL (> PG)	[184]
<b>Coriander (<i>Coriandrum sativum</i> L.)</b>	Slovakia (fruit)	$\beta$ -Linalool (66.1%), camphor (8.3%), geranyl acetate (6.9%), cymene (6.4%)	DPPH, IC <sub>50</sub> ~ 39.38 mg TEAC/L	[185]
<b>Rosemary (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)</b>	Morocco (leaves)	1,8-Cineole (42.3%), camphor (14.8%), $\alpha$ -pinene (8.9%), $\beta$ -pinene (6.3%), $\alpha$ -terpineol (5.6%), borneol (4.9%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 4.82 mg/mL (> Q and AA); BCB, RC <sub>50</sub> = 5.79 mg/mL (> Q and BHT); FRAP, EC <sub>50</sub> = 5.62 mg/mL (> Q and AA)	[179]
	Serbia (leaves)	Limonene (21.7%), camphor (21.6%), $\alpha$ -pinene (13.5%), Z-linalool oxide (10.8%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 3.82 µL/mL (< BHT)	[186]
	Serbia (aerial parts)	1,8-Cineole (43.8%), camphor (12.5%), $\alpha$ -pinene (11.5%), $\beta$ -pinene (8.2%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 77.6 µL/mL (= $\alpha$ -tocopherol)	[187]
<b>Conehead thyme (<i>Thymus capitatus</i>)</b>	Morocco (aerial parts)	<i>p</i> -Cymene (18.9%), carvacrol (13.4%), geranyl acetate (12.2%), borneol (10.2%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 103 µg/mL (> AA)	[188]
	Tunisia (aerial parts)	Carvacrol (65.6–80.7%), <i>p</i> -cymene (4.8–8.9%), $\gamma$ -terpinene (5.3–13.7%), $\beta$ -caryophyllene (1.8–3.2%)	DPPH, IC <sub>50</sub> ~ 250 µg/mL (< BHT); TBARS, IC <sub>50</sub> < 100 µg/mL	[168]
	Algeria (leaves)	Thymol (51.2%), carvacrol (12.6%), $\gamma$ -terpinene (10.3%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 0.62 µg/mL (< BHA, AA, and thymol); FRAP, EC <sub>50</sub> = 2.13 µg/mL (< BHA, AA, and thymol); TAC, EC <sub>50</sub> = 0.78 µg/mL (< BHA, AA, and thymol)	[189]



Table 3. Cont.

Essential Oil (Plant Species)	Location (Plant Part)	Main Components	In Vitro Assay, Bioactivity	References
<b>Black cumin</b> ( <i>Nigella sativa</i> )	Austria (seeds)	Thymoquinone (30–48%), <i>p</i> -cymene (7–15%), carvacrol (6–12%), 4-terpineol (2–7%), longifolene (1–8%), <i>t</i> -anethole (1–4%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 460 µg/mL (> BHT, AA, Q, carvacrol, and thymoquinone); •OH, IC <sub>50</sub> = 0.011 µg/mL (< carvacrol and thymoquinone)	[76]
	Iran (seeds)	Thymoquinone (20.3 %), camphene (11.0 %), thymol (10.1 %), β-pinene (7.0 %), α-thujene (6.0%), γ-terpinene (5.1 %)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 19 µg/mL (> BHA, AA, and thymoquinone, but < α-thujene, β-pinene, <i>p</i> -cymene, and γ-terpinene)	[175]
	Tunisia (seeds)	<i>p</i> -Cymene (60.5%), α-thujene (6.9%), γ-terpinene (3.5%), thymoquinone (3.0%), β-pinene (2.4%), carvacrol (2.4%), terpinen-4-ol (2.1%)	DCFH (ROS production), IC <sub>50</sub> = 1 µg/mL (< Q)	[176]
<b>Cade</b> ( <i>Juniperus oxycedrus</i> )	Tunisia (leaves)	β-Phellandrene (36.8%), α-terpinolene (13.2%), β-myrcene (9.1%), α-campholenal (9.0%), and <i>p</i> -cymene (6.0%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 20.1 µg/mL (< BHT); FRAP, 15.9 µmol Fe <sup>2+</sup> /g	[190]
	Turkey (needles)	Caryophyllene oxide (31.6%), α-pinene (24.3%), caryophyllene (10.0%)	DPPH, IC <sub>50</sub> < 40 µg/mL (< BHA and BHT); FRAP, 179.6 µmol TX/g (< BHA and BHT)	[191]
	Turkey (cones)	β-Pinene (29.9%), α-pinene (26.6%), limonene (9.7%)	DPPH, IC <sub>50</sub> < 40 µg/mL (< BHA and BHT); FRAP, 415.38 µmol TX/g (< BHA and BHT)	[191]
	Algeria (aerial parts)	α-Pinene (37.8%), abietadiene (8.3%), bulnesol (7.2%), manoyl oxide (5.0%), germacrene D (4.8%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 91.25 mg/mL (> AA); FRAP, 0.97 µmol TX/g (< AA); ABTS, 5.82 µmol TX/g (< AA)	[192]
<b>Geranium</b> ( <i>Pelargonium graveolens</i> )	India (leaves)	Citronellol (37.0%), geraniol (18.0%), citronellyl formate (5.5%), linalool (4.1%), rose oxide (2.4%), geranyl formate (2.2%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 18.02 µg/mL (> AA); NO, IC <sub>50</sub> = 19.98 µg/mL (> AA)	[193]
	Egypt (leaves)	β-Citronellol (35.9%), geraniol (11.7%), citronellyl formate (11.4%), linalool (9.6%), (+)-isomenthone (6.4%), σ-selinene (5.5%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 6.2 µg/mL (> BHT); BCLA, IC <sub>50</sub> = 4.1 µg/mL (> BHT)	[194]
<b>Oregano</b> ( <i>Origanum vulgare</i> )	Croatia (flowered tops and stalks)	Thymol (35.0%), carvacrol (32.0%), γ-terpinene (10.5%), <i>p</i> -cymene (9.1%), α-terpinene (3.6%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 0.5 mg/mL (> BHT, AA, and α-tocopherol, but = thymol); TBARS, AAI = 29.9% (< BHT, α-tocopherol, but = thymol and carvacrol)	[169]
	Chile (aerial parts)	Thymol (15.9%), Z-sabinene hydrate (13.4%), γ-terpinene (10.6%), <i>p</i> -cymene (8.6%), linalyl acetate (7.2%), sabinene (6.5%), carvacrol methyl ether (5.6%), carvacrol (3.1%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 4.75 mg/mL (> Q and TX); ABTS, 1252.7 µmol TX/g; FRAP, 270.5 µmol TX/g	[195]
	Algeria (aerial parts)	<i>p</i> -Cymene (25.6%), thymol (23.1%), carvacrol (20.3%), γ-terpinene (16.6%), α-terpinene (1.8%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 0.461 mg/mL (> AA)	[166]
<b>White wormwood</b> ( <i>Artemisia herba-alba</i> )	Algeria (aerial parts)	Davanone D (49.5%), camphor (10%), <i>trans</i> -γ-cadinene (3.9%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 2.61 mg/mL (> than AA); FRAP, 8.17 µmol TX/g (< AA); ABTS, 6.74 µmol TX/g (< AA)	[192]
	Morocco (aerial parts)	β-Thujone (42.9%), chrysanthenone, α-terpineol (9.7%), α-thujone (5.4%), α-pinene (4.6%), bornyl acetate (2.4%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 2.9 µg/mL (> BHT)	[196]
	Tunisia (aerial parts)	α-Thujone (17.6%), <i>trans</i> -sabinyl acetate (17.2%), chrysanthenone (8.3%), β-thujone (7.6%), germacrene D (7.0%)	DPPH, IC <sub>50</sub> = 1.17 mg/mL (> TX); FRAP, 161.6 µmol Fe <sup>2+</sup> /g; BCB, 0.6 mg/mL (> BHT)	[197]

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); BCB: β-carotene bleaching; FRAP: ferric reducing antioxidant power; TBARS: thiobarbituric acid-reactive species; FIC: ferrous ion-chelating; BCLA: β-carotene-linoleic acid assay; AAI: antioxidant activity index; TAC: total antioxidant capacity; RAA: relative antioxidant activity; TEAC: trolox equivalent antioxidant capacity; LAP: linoleic acid peroxidation; ROS: reactive oxygen species; DCFH: 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; BHA: butylated hydroxyanisole; BHT: butylated hydroxytoluene; AA: ascorbic acid; Q: quercetin; PG: propyl gallate.

Care should be taken before assuming that the antioxidant property of EOs is simply that of one characteristic component. Identifying a leading antioxidant compound and the elucidation of the exact mechanism of action is a herculean task due to the presence of a plethora of compounds with different molecular structures of antioxidant powers. However, EOs' chemical composition can allow to roughly predict its antioxidant potential, since it is expected that EOs containing higher amounts in phenolics and modest content in unsaturated terpenes display more robust antioxidant properties. One additional point

should be considered concerning the antioxidant activity of EOs, and that is the enormous variability in chemical composition, even in EOs obtained from the same plant species, which hampers a direct comparison of published data. Such diversity is strictly connected to multiple factors, including geographic location, parts of the plant used, harvest time, environmental and agronomic conditions, phenological stage, and extraction methods [198].

Furthermore, synergistic or antagonistic effects could occur among the components, and such interactions may positively or negatively affect the ultimate antioxidant properties of EOs. For the aforementioned reasons, more in-depth knowledge of the mechanism of action and effects of individual compounds would allow the formulation of mixtures of compounds with optimized efficacy. Moreover, the vast amount of information being generated by in vitro assays requires further validation through systematic animal studies and clinical investigation.

## 9. EOs and Rumen Fermentation

EOs have been proposed for use in ruminant feed targeting different nutritional purposes and modulating the rumen's anaerobic fermentation processes. Microbial digestion in the rumen can be improved by using feed additives. Some additives could drive the fermentation reactions towards the formation of more efficient products by acting on the balance of the microbial population. Antibiotics have been widely used in the past as microbiota regulators. However, their use as feed additives has been banned in the EU since 2006. In this context, EOs could offer some new opportunities to replace antibiotics [199].

Some of the effects of EO can be indirectly related to EO activity on gut microbiota. Most of the studies have reported EO's effects on gut microbiota in pigs and poultry, whereas research on EOs' impact on ruminant microbiota is somehow lagging. Feeding pigs with a blend of oregano and cinnamon oil increased *Lactobacillaceae* and *Ruminococcaceae* and decreased *Clostridiaceae* in the intestine [200]. *Firmicutes* and *Bacteroidetes* were the two most dominant phyla in a study involving a mixture of EOs and organic acids in weaned piglets, which also induced an increase in performance [201]. Dietary supplementation with EO was associated with increased Lactobacilli and decreased coliforms in vivo [202]. Feeding thymol- and cinnamaldehyde-supplemented diets induced a decrease in *E. coli* carriage in piglets at a similar level to that obtained with in-feed antibiotics [203]. These results are mostly consistent using, in most cases, culture-related techniques. Introducing next-generation sequencing approaches to study EOs' impact on microbiota would probably provide more insights into the relationship between EO and the microbial community in the intestine and, in turn, how this relationship may shape the immune system. In poultry, treatment with EO has a synergistic effect with antibacterial peptides to reduce pathogenic intestinal microbiota's negative impact. Indeed, cecal microbiota composition can be substantially changed with either cinnamaldehyde alone or in combination with citral in the feed [204]. It is commonly found that EO may exhibit a potential antimicrobial activity against bacteria, archaea, protozoa, or fungi in the rumen [205]. Patra described EOs' potential to inhibit hyper-ammonia production bacteria, selective inhibition of *Selenomonas ruminantium* by thymol, and no substantial EO effects on ruminal ciliate protozoa. At high doses, EO can be highly inhibitory for most ruminal microorganisms [206].

However, other observations have shown that some compounds may not be inhibitory depending on the EO and the dose used. Using microarray analysis, Patra and Yu observed that some Firmicutes (especially *Clostridia*) and *Butyrivibrio* were decreased by EOs, whereas *Bacteroidetes* (*Prevotella*) were increased. However, the effects were highly dependent on the type of EO supplemented [207]. Oh and Hristov showed that dietary supplementation with oregano leaves in dairy cows decreased *Ruminococcus flavefaciens*, an important rumen fibrolytic bacteria [208]. However, Kim et al. observed an increase in several bacterial species (*Selenomonas ruminantium*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, and *Ruminococcus flavefaciens*) and in fungi in response to an EO mixture [209]. Alagawany et al. reviewed the reported observations on effects of oregano and its main compounds (carvacrol, thymol) and found somewhat controversial effects.

In most cases, a depressing impact on methanogen and fungal counts was reported [210]. Ruminal protozoa can also be reduced in response to EO activity [211,212]. Metagenomic analyses on the ruminal fluid from goats receiving EO-supplemented diets demonstrated ruminal microbiota changes in a dose-dependent way [213].

Considering the multiple effects of EO on rumen microbiota, it has been proposed that EOs could improve the feed efficiency and nutrient utilization in ruminants. EO can also decrease protein degradation in the rumen, whereas controversial effects on fiber degradation have been reported. In some cases, fiber degradation seems to be enhanced [212], whereas other studies have shown a decrease in the digestion of cell wall carbohydrates in the rumen. As a result, EO effects on the extent of degradation of feed in the rumen may be highly variable, depending on the source and type of EO, dose used, and methodology used in each study. Several studies have evaluated the effects of EO on ruminal fermentation in vitro. An increase in the culture medium's pH has been observed, although the difference observed depends on the EO added, the dose applied, and the buffer used in the medium. In general, pH is increased to a greater extent, with higher concentrations of phenols or cinnamaldehyde in the medium. This effect can be associated with the decrease in volatile fatty acid concentration in the medium, regardless of the EO tested. Although in some in vitro studies, a slight reduction in VFA production was observed when EO was added to the medium, other reports show little or no EO effect on VFA production or concentration. The VFA profile (molar proportion of each VFA) is a suitable indicator of any shift in the rumen fermentation pattern occurring in response to EO. Again, the literature results are highly diverging, although most commonly, effects showing a decrease in acetate and a trend to increase propionate and butyrate [212,214] have been reported. As a result, it is commonly observed that EO supplementation is related to a decrease in the acetate to propionate ratio in the rumen digesta [214,215]. Figure 5 summarizes the main effects of EOs in ruminal fermentation.

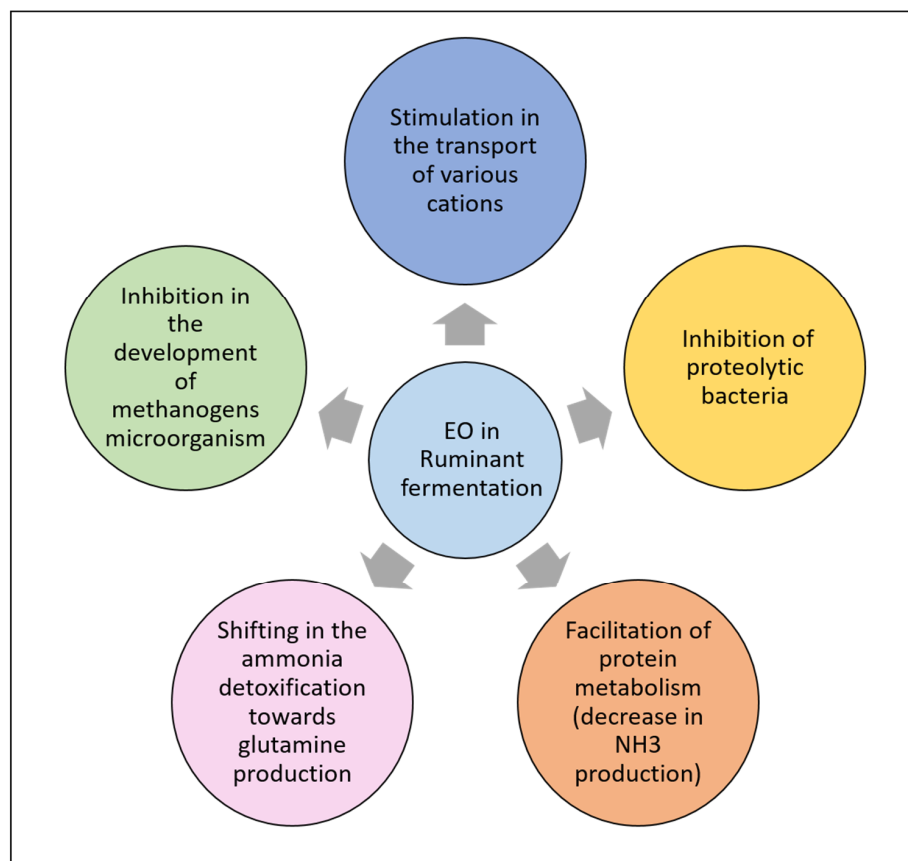


Figure 5. Essential oils in ruminant fermentation [216].

EOs may also affect the degradation and metabolism of feed proteins in the rumen by reducing the reactions of deamination of amino acids, thus decreasing ammonia production. In this sense, EOs could selectively prevent the proliferation of hyper-ammonia-producing bacteria, responsible for these reactions [217]. Only phenols and cinnamaldehyde decrease the concentration of ammonia-nitrogen ( $\text{N-NH}_3$ ) [218].

Due to its antimicrobial activity, a commonly recognized potential activity of EOs is the inhibiting effect on methanogenic archaea responsible for methane production. This is one of EOs' most widely recognized effects on ruminal fermentation and has been extensively explored (mainly in vitro) to reduce methane emissions from ruminants. Methane represents a loss of gross energy from feed and is considered a greenhouse gas. Thus, any reduction in methane derived from ruminal fermentation may enhance feed efficiency and reduce ruminant farming's environmental impact. Nevertheless, although the reducing effects on ruminal methanogenesis have been shown by several studies testing a diversity of EO [216,219,220], some results are also questionable, as Jafari showed in his review on the effects of oregano, carvacrol, and thymol on ruminal methanogenesis [211].

Furthermore, EO can also affect some ruminal microorganisms involved in the biohydrogenation pathways, thus causing a modification of fatty acid profile/Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in ruminal digesta when EOs are fed to ruminants. Rosemary and thyme by-products seem to have a potential to increase the unsaturated FA content (particularly n-3 FA) in animal products due to their content in polyphenol compounds, which may inhibit targeted ruminal bacteria involved in biohydrogenation [221]. It must be considered, however, that different compounds and proportions are found in other EOs, blends, so to better describe the effects caused by these products at a ruminal level, it is desirable to carry out studies with pure compounds (e.g., carvacrol, thymol, eugenol) added at different levels, to better understand the modifications produced on ruminal microbiota and bio-hydrogenation pathways.

Summing up, the antimicrobial activity of some of the compounds contained in EO may affect the rumen microbiota. This may cause a shift in the ruminal fermentation pattern. Thus, in the derived digestion end-products that are either absorbed and used by the animal or disposed of as waste metabolites (methane or urea from ammonia), any effects of EO (at a given dose) must be the most selective as possible. Any broad and non-specific activity will cause a general inhibition of ruminal fermentation with no beneficial impacts on the ruminant. Any success on any of the targeted activities may significantly impact animal metabolism, feed efficiency, product quality, and environmental impact. However, the literature results show that these effects are highly dependent on EO type, source, applied dose, and the mixture of EOs. Effects can also be transient due to an adaptation of the microbiota to survive EOs' antimicrobial effects. Thus, although results may suggest some tendencies, not entirely conclusive outcomes can be drawn from the available information. As an example, although effects from both carvacrol and thymol have been demonstrated in vitro, recently, the authors of Reference [222] have reported that no such effects on ruminal fermentation, animal productivity, and feed efficiency were observed in dairy cows in vivo.

## 10. EOs in Animal Nutrition

The effects of EOs, when supplied in the feed on the meat and milk quality of the animal, are contradictory, probably due to the different compositions of the EOs administered in each study. However, there is a consensus that low doses of EOs when feeding between 1.33 and 4 g/animal/day, may improve, in some cases, meat quality and shelf life (lessened color degradation, increased antioxidant activity, and decreased lipid oxidation in the meat). A dose of 3.5 g/animal/day could be recommended in feedlot animals [223,224]. These low doses have shown some antioxidant activity, which may reduce the lipid peroxidation of meat (and improve color) and the oxidation proteases such as calpain, thus enhancing the tenderness of meat [225].

An extensive review describing the mechanisms of actions of EOs to improve meat quality of lambs has been recently published by Garcia-Galicia et al. [226].

However, greater doses could have a pro-oxidant effect on the animal, with detrimental consequences on health status and product quality. This is because high doses of EO can permeabilize the mitochondria, thus changing electrons' flow and producing more free radicals, such as reactive oxygen species (ROS) that oxidize lipids and proteins. Some metabolites might be accumulated at the meat level, since supplementing lambs with rosemary EOs improved the sensory properties of lamb's meat (e.g., flavor and overall acceptability were increased) [221]. However, it is interesting to note that most of the studies published describing the effects of EOs on meat quality when being fed to animals do not evaluate the transmission of metabolites/compounds to the product, which can be different according to the absorption distribution metabolism and excretion (ADME) of the various components included in the composition of the EO administered. Therefore, many of these studies cannot attribute the effects observed in meat quality to direct or indirect effects caused by the different compounds of EOs at the meat level. This approach should be addressed in the future for a better comprehension of the mechanisms of action unchained by EOs at the meat level.

Similar doses of EOs have been suggested when feeding dairy ruminants to improve feed efficiency and milk quality. For example, Al-Suwaiegh et al. have recently described improvements in milk yield, milk total bacterial count, milk somatic cell count, and feed efficiency when feeding the lowest dose (2.5 g/head/day vs 5 g/head/day) of an EOs blend of clove, oregano, and juniper in equal proportions to early lactating Holstein dairy cows. They attributed these effects, at least partially, to lack of inhibition of the rumen microbial populations by the lowest EO dose [227].

A recent study done by El-Essawy et al. evaluated the effect of a mixture of EOs (anise, clove, and thyme) on eight lactating shawi goats. Supplementation of these EOs improved digestibility with no effect on intake and milk yield. They found that EOs' supplementation improved the fermentation (digestibility of organic matter, ether extract, and acid detergent fiber was higher). Adding the EO increased milk fat yield, fat content, and the concentrations of unsaturated and monounsaturated fatty acids (FA) compared with the control diet [228]. Benchaar found that dairy cows' feed added with *Thymus* EO failed to improve the fermentation [222]. Soltan et al. studied the effect of a microencapsulated mixture of EOs containing cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol, and capsicum oleoresin on Santa Inês sheep. They found that the feed implementation of this mixture decreases methane production [229].

Adding EOs to animal feed could affect the quality of fat in milk and meat, by inhibiting bacteria responsible for the bio-hydrogenation of unsaturated fat. It was also proven that supplementation in anise, nails clove, and juniper EOs improves the concentration of Conjugated Linoleic Acids and omega 3 in dairy goats [230]. Kholif et al. demonstrated that adding *Capsicum* and *Thymus* EO with fibrolytic enzyme (obtained from *Aspergillus niger*) to Farafra ewes' feeding increased the milk production, the feed efficiency, and the fat content in the milk. This mixture enhances the fiber digestibility by increasing the number of cellulolytic bacteria, causing an increase in the fat quantity. It also minimizes the energy and protein losses, causing an increase in milk production [231].

## 11. EOs in Food Products

To enhance the shelf life of food products and conserve their sensory characteristics, EOs could be added directly to food or in active food packaging. Researchers have been studying this phenomenon for years, and they have proven its effectiveness in vegetables, fish, dairy products, poultry, and beef packages. The EO is incorporated into a polymer matrix which is used to pack food. The migration of EO into food was studied to ensure the sensory stability of the food product. Table 4 lists five recent studies where the EOs were used in the food packaging.



**Table 4.** Five selected bibliographical studies showing the beneficial use of EOs in different food packaging.

EO	Polymer	Food	Results	Reference
<i>Laurus nobilis</i> and <i>Rosmarinus officinalis</i>	Polyvinyl alcohol	Chicken breast fillets	Inhibition of the lipid oxidation up to 68%. Beneficial effect on both the pH and color parameters of the fillets during storage.	[232]
Rosemary and cinnamon EO	Polyethylene films	Pacific white shrimp	Prolonged and retained shrimp freshness and shelf life	[233]
Carvacrol, oregano, and cinnamon	Cardboard tray	Cherry tomato	Tomato color and firmness were highly maintained during storage. The shelf life was extended up to 4 days	[234]
Cumin EO	Shahri Balangu seed mucilage	Beef	Expand the shelf life of the beef	[235]
Oregano	Edible coating: mandarin fiber and sodium alginate	Low-fat cheese	Decontamination of external pathogens such as <i>Staphylococcus aureus</i>	[236]

Several papers have demonstrated the inhibitory effect of EOs to extend the shelf life of beef burgers by controlling the proliferation of pathogenic bacteria through antimicrobial activity. This is due to hydroxyl groups' presence in phenolic compounds (e.g., thymol, eugenol, carvacrol) which can degrade the bacterial cell wall, disturbing the phospholipid bilayer of the cytoplasmic membrane, causing leakage and cell death. They can further disrupt the proton motive force, electron flow, and active transport, coagulate the cell contents, impair enzymes involved in the energy regulation and synthesis of structural components [147], or inactivate or destroy genetic material, increasing the EOs' antimicrobial activities.

Meat and poultry products are also sensitive to oxidation. This process leads to the deterioration of odor, color, and flavors in these products [237]. Adding EOs to the meat products enhances their shelf life by inhibiting their oxidation: Adding rosemary EO on frankfurters significantly decreases the number of carbonyls originated from protein. It also reduces the color change, hardness, chewiness, and frankfurters' adhesiveness during storage in a fridge [238]. Another study shows that *Thymbra spicata* EO was more effective than synthetic antioxidants on Turkish dry-fermented sausage [239]. Adding oregano EO in salchichon (fermented dry Spanish sausages) led to an increase in the quantity of unsaturated fatty acids without affecting the lipolysis process or the final product's sensory attributes [240].

However, this beneficial activity of EOs when added to meat can be reduced when there is a high content of fat, for example [241]. An extensive review of the antimicrobial effects of EOs when added to meat was published by Pateiro et al. [242], compiling the different extraction protocols for EOs.

EOs could be added to edible oils and fat to block unsaturated oils' oxidative reaction, causing unpleasant taste and flavor production. The oxidation of fat could also produce some toxic compounds, such as aliphatic and aromatic ketones, carboxylic acids, aldehydes, esters, sulfoxides, phenols, anhydrides, quinones, and aliphatic and aromatic alcohols [243]. Adding oregano EO in a combination of saturated and unsaturated fatty acids inhibited the oxidation process in the presence of light for one year [244]. The same results were observed when blackseed EO (*Nigella sativa* L.) was added to sunflower oil [203], clove and thyme EOs to cottonseed oil [245], and zenyan EO to mayonnaise [246].

EOs could also be added in dairy products: (i) Adding *Thymus capitatus* EO to raw milk could improve its pasteurization and improve its conservation by delaying its spoilage [247]. (ii) The incorporation of 250 µL/kg of EO such as cinnamon, clove, and rosemary in concentrated yoghurt could also increase the product's shelf life [248]. (iii) EOs could also be added to ice cream: Adding lemon peel and lavender EOs inhibits the development of

*Salmonella*, *E. coli*, *Listeria*, and *S. Aureus* [249]. (iv) *Thymus* and cumin EOs could be added to butter to prevent its deterioration during room-temperature storage [250].

## 12. Conclusions

The health status of animals and the quality of the final products are heavily affected by the adverse effects caused by the oxidative stress [16,251,252]. EOs isolated from plants display biological properties with antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial activities [115,156], leading to environmentally friendly technologies and limiting antimicrobial resistance. Their robust antioxidant properties can be attributed, at least in part, to their richness in terms of phenolic derivatives acting by preventing lipid peroxidation, scavenging free radicals, or, and in very few cases, chelating metal ions [156,157].

Due to the rising concerns on the safety of their long-term consumption, EOs as food additives protecting against foodborne pathogens have come to the forefront of this field of research. Moreover, chemical preservatives cannot eliminate several pathogenic bacteria on food products, such as *Listeria monocytogenes*, or delay the growth of spoilage microorganisms. EOs may play that role. They are also environmentally friendly and have the advantage of being better tolerated in the human body, usually with fewer side effects [10].

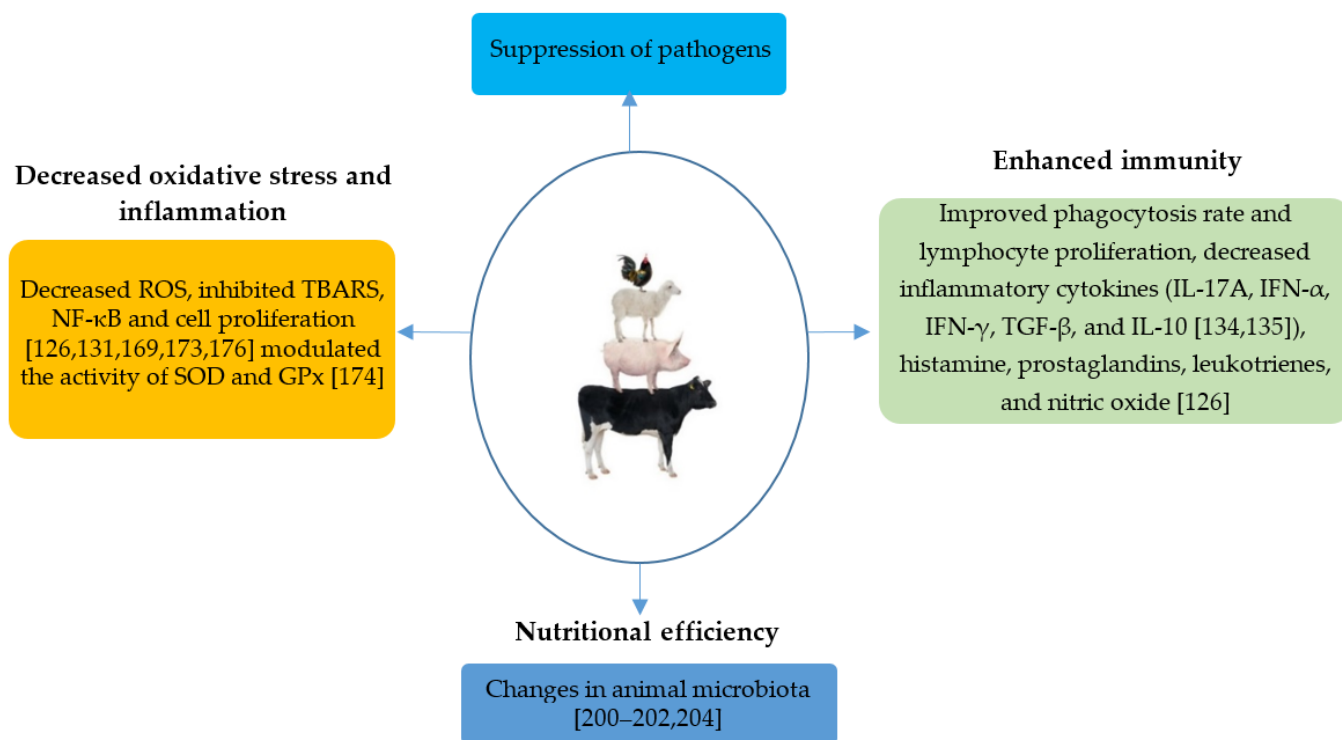
Effectiveness of EOs in extending the shelf life and oxidative stability of dairy and meat products was proven [147]. However, some issues are raised. EOs can negatively alter the product's organoleptic properties due to their intense aroma, which may affect the consumer acceptability [253]. Moreover, the possible interaction between EOs' components and constituents, such as fats, carbohydrates, protein, and salts, should be considered. These reactions may reduce the antioxidant activity of these natural products [147]. The synergistic effect of the combination of different EOs could address this issue since it allows lower concentrations of EOs combined with other compounds, thus enhancing their antioxidant effect.

Using EOs to promote animal health and welfare from a One Health perspective is very important (Figure 6). Studies in controlled conditions mostly agree that EOs affect the immune system by activating the arachidonic metabolism or cytokine production and/or the modulation of pro-inflammatory gene expression by regulating the NF- $\kappa$ B inflammatory pathway and MAPK signaling pathway [136]. Macrophage phagocytosis and oxidative burst have also been considered as additional potential mechanisms modulated by the action of EOs [137]. Nevertheless, the effects were mostly demonstrated under in vitro conditions. More well-designed in vitro and in vivo studies, involving a normalization of dose, taking into account environmental factors such as the type of the diet, breed, and age, will allow a better understanding of EOs' biological activities under several environmental conditions. In addition, the activities' molecular bases have not been primarily investigated in depth in this field and may change depending on the specific EO used and the type and severity of the disease. Thus, considering the multitude of components of EOs and the spectrum of possible activities, there is still a vast amount unknown about their actual effects on animal health and particularly in ruminants.

Emerging studies in cattle indicate an improvement in ruminant performance and feed efficiency when EOs are given in the diet [228,230,231], which may add perspective in using EOs in animal nutrition. These positive effects might be partially due to the modulation exerted on the ruminal microbiota, increasing the fiber's digestibility to produce volatile fatty acids and synthesize microbial protein as an energy and protein supply ruminant, respectively [254,255]. Recent studies with thymol supplementation contrasted with the claimed in vitro antimicrobial activity of EOs: no positive effects on rumen metabolism (i.e., N and VFA) nor beneficial effects on rumen fermentation, nutrient utilization, and milk performance in dairy cows were observed, indicating the complexity of each EO effect per se. Care should be taken before assuming that the property of EOs is simply that of one characteristic component. Identifying a leading beneficial compound and the elucidation of the exact mechanism of action is complicated due to a plethora of compounds with different molecular structures, and antioxidant and antimicrobial activities. More in-depth

knowledge of the mechanism of action and effects of individual compounds would allow the formulation of compounds with optimized efficacy and EOs' inclusion in the diet.

### Reduced antimicrobial and antimicrobial resistance



**Figure 6.** EOs in livestock from a One Health perspective. IL: Interleukin; NF-κB: Nuclear Factor Kappa B; TGF-β: Transforming growth factor-beta; IFN: Interferon; GPx: Glutathione peroxidase; SOD: superoxide dismutase; ROS: Reactive oxygen species, TBARS: Thiobarbituric acid-reactive species.

Given the plasticity of the gut and the DOHaD concept's microbiome, the potential use of EOs in early nutrition programs (gestation and lactation) would be worthwhile. Early EO supplementation may improve the immunity responses with beneficial effects in feed efficiency and later-life performance [256–258]. This strategy might be considerably relevant. It can reduce both the administration time (limited only to the first two months of life instead of during the lactation) and the dose needed to positively affect calves at adult age. A reduction in the total cost of the treatment might be expected. However, attention should be paid regarding the doses given to the fetus and newborn due to the unknown potential toxicity effects of EOs when given during early life.

In summary, our review identified EOs as a potential future therapeutic option in both ruminant and monogastric husbandries. EOs are unlikely to replace antimicrobials, but they can at least be used as a complementary treatment. The results of this review provide support for a need for additional *in vitro* and *in vivo* research focused on EOs as antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial agents for recently emerging and challenging diseases in livestock and to improve animal-derived products. While many peer-reviewed studies about EOs were performed in humans and experimental models, more research is needed to evaluate the potential of EOs for the treatment of farm animals.

Regarding feeding, hygiene, and conservation, EOs are part of a sustainable, natural option for improving animal health and animal product-derived food, reducing the use of antimicrobials in livestock farming.

We hope that the present review will stimulate further *in vitro* and *in vivo* research focused on EOs' effects among livestock management practice and diseases prevention, opening new avenues in this field and providing guidance on EOs as new challenging molecules in livestock.



**Author Contributions:** Conceptualization, L.A.-N.; writing—original draft preparation, R.N. and L.A.-N.; writing—review and editing: R.N., S.A., M.B.J., R.B.P., S.B., F.C., S.L., F.Z.R., R.K., D.M.P., and L.A.-N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded under H2020-PRIMA 2018—Section 2.

**Acknowledgments:** The authors gratefully acknowledge Florence Macherez for her assistance during the conception of the work and Eva Drouin for bibliometrics.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

EOs	Essential oils
EO	Essential oil
LPS	Lipopolysaccharides
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
BCB	$\beta$ -carotene bleaching
FRAP	Ferric-reducing antioxidant power
TBARS	Thiobarbituric acid-reactive species
FIC	Ferrous ion-chelating
BCLA	$\beta$ -carotene-linoleic acid assay
AAI	Antioxidant activity index
TAC	Total antioxidant capacity
RAA	Relative antioxidant activity
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
LAP	Linoleic acid peroxidation
DCFH	2',7'-dichloro-fluorescein-diacetate
BHA	Butylated hydroxyanisole
BHT	Butylated hydroxytoluene
AA	Ascorbic acid
Q	Quercetin
PG	propyl gallate
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$
IL	Interleukin
DAO	Diamine oxidase
Ig	Immunoglobulin
ZO-1	Zonula occludens-1
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor Kappa B
BAX	Bcl-2 Associate X protein
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
IFN	Interferon
GPx	Glutathione peroxidase
SOD	superoxide dismutase
ROS	Reactive oxygen species
FA	fatty acids
ADME	absorption distribution metabolism and excretion
IC <sub>50</sub>	The half maximal inhibitory concentration

## References

1. Lesage, M. Les Antibiorésistances en Élevage: Vers des Solutions Intégrées. MONTREUIL SOUS BOIS. Available online: [https://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/cep\\_analyse82\\_antibioresistances\\_en\\_elevage.pdf](https://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/cep_analyse82_antibioresistances_en_elevage.pdf) (accessed on 13 January 2021).
2. Wall, B.A.; Mateus, A.L.P.; Marshall, L.; Pfeiffer, D.U.; Lubroth, J.; Ormel, H.J.; Otto, P.; Patriarchi, A. *Drivers, Dynamics and Epidemiology of Antimicrobial Resistance in Animal Production*; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2016; Available online: <http://www.fao.org/publications/card/fr/c/d5f6d40d-ef08-4fcc-866b-5e5a92a12dbf/> (accessed on 14 February 2021).
3. Goossens, H.; Ferech, M.; Vander Stichele, R.; Elseviers, M. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: A cross-national database study. *Lancet* **2005**, *365*, 579–587. [CrossRef]
4. Hu, Y.; Gao, G.F.; Zhu, B. The antibiotic resistome: Gene flow in environments, animals and human beings. *Front. Med.* **2017**, *11*, 161–168. [CrossRef]

5. Forsberg, K.J.; Reyes, A.; Wang, B.; Selleck, E.M.; Sommer, M.O.; Dantas, G. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* **2012**, *337*, 1107–1111. [CrossRef]
6. Simitzis, P.E. Enrichment of Animal Diets with Essential Oils—A Great Perspective on Improving Animal Performance and Quality Characteristics of the Derived Products. *Medicines* **2017**, *4*, 35. [CrossRef] [PubMed]
7. Mushtaq, S.; Shah, A.M.; Shah, A.; Lone, S.A.; Hussain, A.; Hassan, Q.P.; Ali, M.N. Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. *Microb. Pathog.* **2018**, *114*, 357–361. [CrossRef]
8. Jean, B. *Pharmacognosy Phytochemistry, Medicinal Plants, 2nd ed*; Lavoisier: Paris, France, 2008; Volume 934.
9. Brenes, A.; Roura, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2010**, *158*, 1–14. [CrossRef]
10. Liu, Q.; Meng, X.; Li, Y.; Zhao, C.-N.; Tang, G.-Y.; Li, H.-B. Antibacterial and Antifungal Activities of Spices. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1283. [CrossRef]
11. Gutierrez, J.; Barry-Ryan, C.; Bourke, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiol.* **2009**, *26*, 142–150. [CrossRef]
12. Shi, C.; Zhang, X.; Zhao, X.; Meng, R.; Liu, Z.; Chen, X.; Guo, N. Synergistic interactions of nisin in combination with cinnamaldehyde against *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *Food Control* **2017**, *71*, 10–16. [CrossRef]
13. Fernandes RV de, B.; Guimarães, I.C.; Ferreira, C.L.R.; Botrel, D.A.; Borges, S.V.; de Souza, A.U. Microencapsulated Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Essential Oil as a Biopreservative in Minas Frescal Cheese. *J. Food Process. Preserv.* **2017**, *41*, e12759. [CrossRef]
14. Moro, A.; Librán, C.M.; Berruga, M.I.; Carmona, M.; Zalacain, A. Dairy matrix effect on the transference of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil compounds during cheese making. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 1507–1513. [CrossRef] [PubMed]
15. Lykkesfeldt, J.; Svendsen, O. (2007, May). Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *Vet. J.* **2007**, *173*, 502–511. [CrossRef]
16. Castillo, C.; Hernandez, J.; Bravo, A.; Lopez-Alonso, M.; Pereira, V.; Benedito, J.L. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Vet. J.* **2005**, *169*, 286–292. [CrossRef]
17. Jang, I.S.; Ko, Y.H.; Kang, S.Y.; Lee, C.Y. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2007**, *134*, 304–315. [CrossRef]
18. Cetin, E.; Yibar, A.; Yesilbag, D.; Cetin, I.; Cengiz, S.S. The effect of volatile oil mixtures on the performance and ileo-caecal microflora of broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* **2016**, *57*, 780–787. [CrossRef]
19. Adaszynska-Skwirzynska, M.; Szczerbinska, D. The effect of lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil as a drinking water supplement on the production performance, blood biochemical parameters, and ileal microflora in broiler chickens. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 358–365. [CrossRef]
20. Zeng, Z.; Xu, X.; Zhang, Q.; Li, P.; Zhao, P.; Li, Q.; Liu, J.; Piao, X. Effects of essential oil supplementation of a low-energy diet on performance, intestinal morphology and microflora, immune properties and antioxidant activities in weaned pigs. *Anim. Sci. J.* **2015**, *86*, 279–285. [CrossRef] [PubMed]
21. Li, S.Y.; Ru, Y.J.; Liu, M.; Xu, B.; Péron, A.; Shi, X.G. The effect of essential oils on performance, immunity and gut microbial population in weaner pigs. *Livest. Sci.* **2012**, *145*, 119–123. [CrossRef]
22. Omonijo, F.A.; Ni, L.; Gong, J.; Wang, Q.; Lahaye, L.; Yang, C. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Anim. Nutr.* **2018**, *4*, 126–136. [CrossRef]
23. Barker, D.J.P.; Osmond, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* **1986**, *327*, 1077–1081. [CrossRef]
24. Boyle, W. Spices and Essential Oils as Preservatives. In *The American Perfumer and Essential Oil Review* 66; 1955; pp. 25–28. Available online: [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnjsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=902045](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnjsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=902045) (accessed on 30 January 2021).
25. Luebbe, K.M.; Stalker, L.A.; Klopfenstein, T.J.; Funston, R.N. Influence of weaning date and late gestation supplementation on beef system productivity I: Animal performance. *Transl. Anim. Sci.* **2019**, *3*, 1492–1501. [CrossRef]
26. Funston, R.N.; Summers, A.F. Effect of prenatal programming on heifer development. *Vet. Clin. Food Anim. Pract.* **2013**, *29*, 517–536. [CrossRef] [PubMed]
27. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446–475. [CrossRef]
28. Kasaian, J.; Asili, J.; Iranshahi, M. Sulphur-containing compounds in the essential oil of *Ferula alliacea* roots and their mass spectral fragmentation patterns. *Pharm. Biol.* **2016**, *54*, 2264–2268. [CrossRef]
29. Guenther, E. *The Essential Oils*; D. Van Nostrand: New York, NY, USA, 1948.
30. Van de Braak, S.A.A.J.; Leijten, G.C.J.J. *Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union*; CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries: Rotterdam, The Netherlands, 1999; p. 116.
31. Shelef, L.A.; Jyothi, E.K.; Bulgarellii, M.A. Growth of Enteropathogenic and Spoilage Bacteria in Sage-Containing Broth and Foods. *J. Food Sci.* **1984**, *49*, 737–740. [CrossRef]
32. Nychas, G.J.E. Natural antimicrobials from plants. In *New Methods of Food Preservation*; Gould, G.W., Ed.; Blackie Academic and Professional: London, UK, 1995; pp. 58–89. [CrossRef]

33. Tuley de Silva, K. A Manual on the Essential Oil Industry; United Nations Industrial Development Organization, Vienna, Austria, 1996.
34. Mari, M.; Bertolini, P.; Pratella, G.C. Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *94*, 761–766. [\[CrossRef\]](#)
35. Ultee, A.; Smid, E.J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *64*, 373–378. [\[CrossRef\]](#)
36. Juglal, S.; Govinden, R.; Odhav, B. Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. *J. Food Prot.* **2002**, *65*, 683–687. [\[CrossRef\]](#)
37. Pandey, R.; Kalra, A.; Tandon, S.; Mehrotra, N.; Singh, H.N.; Kumar, S. Essential Oils as Potent Source of Nematicidal Compounds. *J. Phytopathol.* **2000**, *148*, 501–502. [\[CrossRef\]](#)
38. Pessoa, L.M.; Morais, S.M.; Bevilacqua, C.M.L.; Luciano, J.H.S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* **2002**, *109*, 59–63. [\[CrossRef\]](#)
39. Konstantopoulou, I.; Vassilopoulou, L.; Mavragani-Tsipidou, P.; Scouras, Z.G. Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven Greek aromatic plants on *Drosophila auraria*. *Experientia* **1992**, *48*, 616–619. [\[CrossRef\]](#)
40. Karpouhtsis, I.; Pardali, E.; Feggou, E.; Kokkini, S.; Scouras, Z.G.; Mavragani-Tsipidou, P. Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1111–1115. [\[CrossRef\]](#)
41. Mahmoud, S.S.; Croteau, R.B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* **2002**, *7*, 366–373. [\[CrossRef\]](#)
42. Bauer, K.; Garbe, D.; Surburg, H. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2001; p. 293.
43. Crosthwaite, D. UK trade within the flavour and fragrance industry. In *Proceedings of the International Federation of Essential Oils and Aroma Trades—21st International Conference on Essential Oils and Aroma's 1998*; IFEAT: London, UK, 1998; pp. 6–12.
44. Carson, C.F.; Riley, T.V. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Lett. Appl. Microbiol.* **1993**, *16*, 49–55. [\[CrossRef\]](#)
45. KBauer und, D. *Garbe: Common Fragrance and Flavour Materials: Preparation, Properties and Uses*; John Wiley & Sons: Weinheim, Germany, 2008. [\[CrossRef\]](#)
46. Oosterhaven, K.; Poolman, B.; Smid, E.J. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Ind. Crop. Prod.* **1995**, *4*, 23–31. [\[CrossRef\]](#)
47. Manabe, A.; Nakayama, S.; Sakamoto, K. Effects of Essential Oils on Erythrocytes and Hepatocytes from Rats and Dipalmitoyl Phosphatidylcholine-Liposomes. *Jpn. J. Pharmacol.* **1987**, *44*, 77–84. [\[CrossRef\]](#)
48. Bauer, K.; Garbe, D.; Surburg, H. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*, 3rd ed.; John Wiley & Sons: Weinheim, Germany, 2008; Available online: <https://www.wiley.com/en-us/Common+Fragrance+and+Flavor+Materials%3A+Preparation%2C+Properties+and+Uses%2C+3rd+Edition-p-9783527612376> (accessed on 1 February 2021).
49. Cox, S.D.; Mann, C.M.; Markham, J.L.; Bell, H.C.; Gustafson, J.E.; Warmington, J.R.; Wyllie, S.G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *88*, 170–175. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Van Krimpen, M.M.; Binnendijk, G. RopadiarR as alter252 S. Burt. *International Journal of Food Microbiology* **94**, 223–253. Retrieved from native for antimicrobial growth promoter in diets of weanling pigs. Lelystad, Praktijkonderzoek Veehouderij, May 2001; ISSN 0169-3689. p. 14.
51. Ilsley, S.; Miller, H.; Greadhead, H.; Kamel, C. Herbal sow diets boost pre-weaning growth. *Pig Progress* **2002**, *18*, 8–10.
52. Mendoza-Yepes, M.J.; Sanchez-Hidalgo, L.E.; Maertens, G.; Marin-Iniesta, F. Inhibition Of *Listeria Monocytogenes* And Other Bacteria By A Plant Essential Oil (Dmc) In Spanish Soft Cheese. *J. Food Saf.* **1997**, *17*, 47–55. [\[CrossRef\]](#)
53. Cutter, C.N. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella Typhimurium* associated with beef. *J. Food Prot.* **2000**, *63*, 601–607. [\[CrossRef\]](#)
54. Řebíčková, K.; Bajer, T.; Šilha, D.; Ventura, K.; Bajerová, P. Comparison of Chemical Composition and Biological Properties of Essential Oils Obtained by Hydrodistillation and Steam Distillation of *Laurus nobilis* L. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2020**, *75*, 495–504. [\[CrossRef\]](#)
55. El Asbahani, A.; Miladi, K.; Badri, W.; Sala, M.; Addi, E.H.A.; Casabianca, H.; El Mousadik, A.; Hartmann, D.; Jilale, A.; Renaud, F.N.R.; et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int. J. Pharm.* **2009**, *483*, 220–243. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Bousbia, N.; Abert Vian, M.; Ferhat, M.A.; Petitcolas, E.; Meklati, B.Y.; Chemat, F. Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chem.* **2009**, *114*, 355–362. [\[CrossRef\]](#)
57. Özel, M.Z.; Göğüş, F.; Lewis, A.C. Comparison of direct thermal desorption with water distillation and superheated water extraction for the analysis of volatile components of *Rosa damascena* Mill. using GCxGC-TOF/MS. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *566*, 172–177. [\[CrossRef\]](#)
58. Aziz, Z.A.; Ahmad, A.; Setapar, S.H.M.; Karakucuk, A.; Azim, M.M.; Lokhat, D.; Rafatullah, M.; Ganash, M.; Kamal, M.A.; Ashraf, G.M. Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential—A Review. *Curr. Drug Metab.* **2018**, *19*, 1100–1110. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

59. Juliano, C.; Mattana, A.; Usai, M. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of thymus herba-barona loisel growing wild in sardinia. *J. Essent. Oil Res.* **2000**, *12*, 516–522. [\[CrossRef\]](#)
60. Faleiro, M.L.; Miguel, M.G.; Ladeiro, F.; Venancio, F.; Tavares, R.; Brito, J.C.; Figueiredo, A.C.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of Thymus. *Lett. Appl. Microbiol.* **2003**, *36*, 35–40. [\[CrossRef\]](#)
61. Moghaddam, M.; Mehdizadeh, L. Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. In *Soft Chemistry and Food Fermentation*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2017; pp. 379–419. [\[CrossRef\]](#)
62. Kokkini, S.; Karousou, R.; Dardioti, A.; Krigas, N.; Lanaras, T. Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 883–886. [\[CrossRef\]](#)
63. Cosentino, S.; Tuberoso, C.I.G.; Pisano, B.; Satta, M.; Mascia, V.; Arzedi, E.; Palmas, F. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Lett. Appl. Microbiol.* **1999**, *29*, 130–135. [\[CrossRef\]](#)
64. Jerkovic, I.; Mastelic, J.; Milos, M. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of Origanum vulgare L. ssp. hirtum grown wild in Croatia. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2001**, *36*, 649–654. [\[CrossRef\]](#)
65. Sarmoum, R.; Haid, S.; Biche, M.; Djazouli, Z.; Zebib, B.; Merah, O. Effect of Salinity and Water Stress on the Essential Oil Components of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agronomy* **2019**, *9*, 214. [\[CrossRef\]](#)
66. Marino, M.; Bersani, C.; Comi, G. Antimicrobial activity of the essential oils of Thymus vulgaris L. measured using a bioimpedometric method. *J. Food Prot.* **1999**, *62*, 1017–1023. [\[CrossRef\]](#)
67. Lis-Balchin, M.; Deans, S.G.; Eaglesham, E. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour Fragr. J.* **1998**, *13*, 98–104. [\[CrossRef\]](#)
68. Marino, M.; Bersani, C.; Comi, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *67*, 187–195. [\[CrossRef\]](#)
69. Sellami, I.H.; Wannes, W.A.; Bettaieb, I.; Berrima, S.; Chahed, T.; Marzouk, B.; Limam, F. Qualitative and quantitative changes in the essential oil of Laurus nobilis L. leaves as affected by different drying methods. *Food Chem.* **2011**, *126*, 691–697. [\[CrossRef\]](#)
70. Nejad Ebrahimi, S.; Hadian, J.; Ranjbar, H. Essential oil compositions of different accessions of Coriandrum sativum L. from Iran. *Nat. Prod. Res.* **2010**, *24*, 1287–1294. [\[CrossRef\]](#)
71. Msaada, K.; Hosni, K.; Taarit, M.B.; Hammami, M.; Marzouk, B. Effects of growing region and maturity stages on oil yield and fatty acid composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit. *Sci. Hortic.* **2009**, *120*, 525–531. [\[CrossRef\]](#)
72. Daferera, D.J.; Ziogas, B.N.; Polissiou, M.G. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on Penicillium digitatum. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2576–2581. [\[CrossRef\]](#)
73. Daferera, D.J.; Ziogas, B.; Polissiou, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of Botrytis cinerea, Fusarium sp. and Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis. *Crop Prot.* **2003**, *39*–44. [\[CrossRef\]](#)
74. Pintore, G.; Usai, M.; Bradesi, P.; Juliano, C.; Boatto, G.; Tomi, F.; Chessa, M.; Cerri, R.; Casanova, J. Chemical composition and antimicrobial activity of Rosmarinus officinalis L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour Fragr. J.* **2002**, *17*, 15–19. [\[CrossRef\]](#)
75. Lens-Lisbonne, C.; Cremieux, A.; Maillard, C.; Balansard, G. Methodes d'évaluation de l'activité antibacterienne des huiles essentielles: Application aux essences de thym et de cannelle. *J. De Pharm. De Belg.* **1987**, *42*, 297–302.
76. Burits, M.; Bucar, F. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. *Phytother. Res.* **2000**, *14*, 323–328. [\[CrossRef\]](#)
77. Dob, T.; Dahmane, D.; Chelghoum, C. Essential oil composition of Juniperus oxycedrus growing in Algeria. *Pharm. Biol.* **2006**, *44*, 1–6. [\[CrossRef\]](#)
78. Rana, V.S.; Juyal, J.P.; Blazquez, M.A. Chemical constituents of essential oil of Pelargonium graveolens leaves. *Int. J. Aromather.* **2002**, *12*, 216–218. [\[CrossRef\]](#)
79. Lawrence, B.M. The botanical and chemical aspects of oregano. *Perfum. Flavorist* **1984**, *9*, 41–51.
80. Prudent, D.; Perineau, F.; Bessiere, J.M.; Michel, G.M.; Baccou, J.C. Analysis of the essential oil of wild oregano from martinique (Coleus aromaticus Benth.)—Evaluation of its bacteriostatic and fungistatic properties. *J. Essent. Oil Res.* **1995**, *7*, 165–173. [\[CrossRef\]](#)
81. Charai, M.; Mosaddak, M.; Faïd, M. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Two Aromatic Plants: Origanum majorana L. and O. compactum Benth. *J. Essent. Oil Res.* **1996**, *8*, 657–664. [\[CrossRef\]](#)
82. Sivropoulou, A.; Papanikolaou, E.; Nikolaou, C.; Kokkini, S.; Lanaras, T.; Arsenakis, M. Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1202–1205. [\[CrossRef\]](#)
83. Demetzos, C.; Perdetzoglou, D.K.; Tan, K. Composition and antimicrobial studies of the oils of Origanum calcaratum juss. and O. scabrum boiss. et Heldr. from Greece. *J. Essent. Oil Res.* **2001**, *13*, 460–462. [\[CrossRef\]](#)
84. Bourgou, S.; Tammar, S.; Salem, N.; Mkadimi, K.; Msaada, K. Phenolic Composition, Essential Oil, and Antioxidant Activity in the Aerial Part of Artemisia Herba-Alba from Several Provenances: A Comparative Study. *Int. J. Food Prop.* **2016**, *19*, 549–563. [\[CrossRef\]](#)
85. Hernandez, E. Essential Oils | Distillation. In *Encyclopedia of Separation Science*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2000; pp. 2739–2744. [\[CrossRef\]](#)
86. Kalemba, D.A.A.K.; Kunicka, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *10*, 813–829. [\[CrossRef\]](#)
87. Tongnuanchan, P.; Benjakul, S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *J. Food Sci.* **2014**, *79*, R1231–R1249. [\[CrossRef\]](#)



88. Rojas-Graü, M.A.; Raybaudi-Massilia, R.M.; Soliva-Fortuny, R.C.; Avena-Bustillos, R.J.; McHugh, T.H.; Martín-Belloso, O. Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. *Postharvest Biol. Technol.* **2007**, *45*, 254–264. [\[CrossRef\]](#)
89. Salvia-Trujillo, L.; Rojas-Graü, M.A.; Soliva-Fortuny, R.; Martín-Belloso, O. Use of antimicrobial nanoemulsions as edible coatings: Impact on safety and quality attributes of fresh-cut fuji apples. *Postharvest Biol. Technol.* **2015**, *105*, 8–16. [\[CrossRef\]](#)
90. Donsì, F.; Annunziata, M.; Sessa, M.; Ferrari, G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *Lwt Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 1908–1914. [\[CrossRef\]](#)
91. Taylor, L. *The Healing Power of Rainforest Herbs: A Guide to Understanding and Using Herbal Medicinals*; Square One Publishers: New York, NY, USA, 2005.
92. Selim, S. Antimicrobial activity of essential oils against vancomycin-resistant enterococci (vre) and *Escherichia coli* o157:h7 in feta soft cheese and minced beef meat. *Braz. J. Microbiol.* **2011**, *42*, 187–196. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
93. Dima, C.; Dima, S. Essential oils in foods: Extraction, stabilization, and toxicity. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, *5*, 29–35. [\[CrossRef\]](#)
94. Worsfold, P.; Townshend, A.; Poole, C.F.; Miró, M. (Eds.) *Encyclopedia of Analytical Science*, 2nd ed.; Elsevier Inc: Amsterdam, The Netherlands; London, UK; New York, NY, USA, 2019; pp. 554–561. [\[CrossRef\]](#)
95. Turek, C.; Stintzing, F.C. Stability of essential oils: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2013**, *12*, 40–53. [\[CrossRef\]](#)
96. Özbek, Z.A.; Ergönül, P.G. A Review on Encapsulation of Oils. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* **2017**, *13*, 293–309. [\[CrossRef\]](#)
97. Sagiri, S.S.; Anis, A.; Pal, K. Review on Encapsulation of Vegetable Oils: Strategies, Preparation Methods, and Applications. *Polym. Plast. Technol. Eng.* **2016**, *55*, 291–311. [\[CrossRef\]](#)
98. Maes, C.; Bouquillon, S.; Fauconnier, M.L. Encapsulation of Essential Oils for the Development of Biosourced Pesticides with Controlled Release: A Review. *Molecules* **2019**, *24*, 2539. [\[CrossRef\]](#)
99. Nehme, R.; Blel, W.; Montillet, A.; Bellettre, J.; Marchal, L. Production of oil in water emulsions in microchannels at high throughput: Evaluation of emulsions in view of cosmetic, nutraceutical or pharmaceutical applications. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **2021**, *161*, 108301. [\[CrossRef\]](#)
100. Bakry, A.M.; Abbas, S.; Ali, B.; Majeed, H.; Abouelwafa, M.Y.; Mousa, A.; Liang, L. Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15*, 143–182. [\[CrossRef\]](#)
101. Almeida, F.N.; Htoo, J.K.; Thomson, J.; Stein, H.H. Amino acid digestibility in camelina products fed to growing pigs. *Can. J. Anim. Sci.* **2013**, *93*, 335–343. [\[CrossRef\]](#)
102. Ghalem, B.R.; Zouaoui, B. Microbiological, physico-chemical and sensory quality aspects of yoghurt enriched with *Rosmarinus officinalis* oil. *Afr. J. Biotechnol.* **2013**, *12*, 192–198. [\[CrossRef\]](#)
103. Shah, B.; Davidson, P.M.; Zhong, Q. Encapsulation of eugenol using Maillard-type conjugates to form transparent and heat stable nanoscale dispersions. *Lwt Food Sci. Technol.* **2012**, *49*, 139–148. [\[CrossRef\]](#)
104. Benjemaa, M.; Neves, M.A.; Falleh, H.; Isoda, H.; Ksouri, R.; Nakajima, M. Nanoencapsulation of *Thymus capitatus* essential oil: Formulation process, physical stability characterization and antibacterial efficiency monitoring. *Ind. Crop. Prod.* **2018**, *113*, 414–421. [\[CrossRef\]](#)
105. Timilsena, Y.P.; Akanbi, T.O.; Khalid, N.; Adhikari, B.; Barrow, C.J. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *121*, 1276–1286. [\[CrossRef\]](#)
106. Chapeau, A.L.; Bertrand, N.; Briard-Bion, V.; Hamon, P.; Poncelet, D.; Bouhallab, S. Coacervates of whey proteins to protect and improve the oral delivery of a bioactive molecule. *J. Funct. Foods* **2017**, *38*, 197–204. [\[CrossRef\]](#)
107. Hajjali, H. Assemblage Nanoparticules Lipidiques Solides-Polysaccharide: Étude des Propriétés Physico-Chimiques Pour la Vectorisation d'un Polyphénol. Université de Lorraine, France 2015. Available online: <http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm> (accessed on 4 January 2021).
108. Torchilin, V.P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *AAPS J.* **2007**, *9*, E128–E147. [\[CrossRef\]](#)
109. Kulkarni, M.; Greiser, U.; O'Brien, T.; Pandit, A. Liposomal gene delivery mediated by tissue-engineered scaffolds. *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 28–36. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
110. Setya, S.; Talegaonkar, S. Nanoemulsions: formulation methods and stability aspects. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **2014**, *3*, 2214–2228.
111. Liu, C.H.; Yu, S.Y. Cationic nanoemulsions as non-viral vectors for plasmid DNA delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, *79*, 509–515. [\[CrossRef\]](#)
112. Qian, C.; McClements, D.J. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. *Food Hydrocoll.* **2011**, *25*, 1000–1008. [\[CrossRef\]](#)
113. Delmas, T.; Piraux, H.; Couffin, A.C.; Texier, I.; Vinet, F.; Poulin, P.; Cates, M.E.; Bibette, J. How to prepare and stabilize very small nanoemulsions. *Langmuir* **2011**, *27*, 1683–1692. [\[CrossRef\]](#)
114. Alhaj, N.A.; Shamsudin, M.N.; Alipiah, N.M.; Zamri, H.F.; Bustamam, A.; Ibrahim, S.; Abdullah, R. Characterization of *Nigella sativa* L. essential oil-loaded solid lipid nanoparticles. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, *5*, 52–57. [\[CrossRef\]](#)
115. Bouyahya, A.; Bakri, Y.; Et-Touys, A.; Talbaoui, A.; Khouchlaa, A.; Charfi, S.; Abrini, J.; Dakka, N. Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries Resistance to antibiotics and mechanisms of action of essential oils against bacteria. *Phytothérapie* **2017**. [\[CrossRef\]](#)

116. Scotti, R.; Stringaro, A.; Nicolini, L.; Zanellato, M.; Boccia, P.; Maggi, F.; Gabbianelli, R. Effects of Essential Oils from *Cymbopogon* spp. and *Cinnamomum verum* on Biofilm and Virulence Properties of *Escherichia coli* O157:H7. *Antibiotics* **2021**, *10*, 113. [\[CrossRef\]](#)
117. Assane, I.M.; Valladão, G.M.R.; Pilarski, F. Chemical composition, cytotoxicity and antimicrobial activity of selected plant-derived essential oils against fish pathogens. *Aquac. Res.* **2021**, *52*, 793–809. [\[CrossRef\]](#)
118. Iseppi, R.; Tardugno, R.; Brighenti, V.; Benvenuti, S.; Sabia, C.; Pellati, F.; Messi, P. Phytochemical Composition and In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oils from the Lamiaceae Family against *Streptococcus agalactiae* and *Candida albicans* Biofilms. *Antibiotics* **2020**, *9*, 592. [\[CrossRef\]](#)
119. Nafis, A.; Kasrati, A.; Jamali, C.A.; Custódio, L.; Vitalini, S.; Iriti, M.; Hassani, L. A Comparative Study of the in Vitro Antimicrobial and Synergistic Effect of Essential Oils from *Laurus nobilis* L. and *Prunus armeniaca* L. from Morocco with Antimicrobial Drugs: New Approach for Health Promoting Products. *Antibiotics* **2020**, *9*, 140. [\[CrossRef\]](#)
120. Iseppi, R.; Di Cerbo, A.; Aloisi, P.; Manelli, M.; Pellesi, V.; Provenzano, C.; Camellini, S.; Messi, P.; Sabia, C. In Vitro Activity of Essential Oils Against Planktonic and Biofilm Cells of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)/Carbapenamase-Producing Gram-Negative Bacteria Involved in Human Nosocomial Infections. *Antibiotics* **2020**, *2020*, 272. [\[CrossRef\]](#)
121. Somrani, M.; Inglés, M.C.; Debbabi, H.; Abidi, F.; Palop, A. Garlic, onion, and cinnamon essential oil anti-biofilms' effect against *listeria monocytogenes*. *Foods* **2020**, *9*, 567. [\[CrossRef\]](#)
122. Miguel, M.G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules* **2010**, *15*, 9252–9287. [\[CrossRef\]](#)
123. Sandner, G.; Heckmann, M.; Weghuber, J. Immunomodulatory activities of selected essential oils. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1139. [\[CrossRef\]](#)
124. Chandrakanthan, M.; Handunnetti, S.M.; Sirimal, G.; Premakumara, A.; Kathirgamanathar, S. Topical Anti-Inflammatory Activity of Essential Oils of *Alpinia calcarata* Rosc., Its Main Constituents, and Possible Mechanism of Action. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* **2020**, *2020*. [\[CrossRef\]](#)
125. Kim, T.; Song, B.; Sang Cho, K.; Lee, I.-S. Therapeutic Potential of Volatile Terpenes and Terpenoids from Forests for Inflammatory Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2187. [\[CrossRef\]](#)
126. Inouye, S.; Abe, S. Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytotherapie* **2007**, *5*, 2–4. [\[CrossRef\]](#)
127. Chouhan, S.; Guleria, S. Anti-inflammatory Activity of Medicinal Plants: Present Status and Future Perspectives. In *Botanical Leads for Drug Discovery*; Springer: Singapore, 2020; pp. 67–92. [\[CrossRef\]](#)
128. Giovannini, D.; Gismondi, A.; Basso, A.; Canuti, L.; Braglia, R.; Canini, A.; Mariani, F.; Cappelli, G. *Lavandula angustifolia* mill. Essential oil exerts antibacterial and anti-inflammatory effect in macrophage mediated immune response to *staphylococcus aureus*. *Immunol. Investig.* **2016**, *45*, 11–28. [\[CrossRef\]](#)
129. Benchaar, C.; Greathead, H. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2011**, *166–167*, 338–355. [\[CrossRef\]](#)
130. Manzanilla, E.G.; Nofrarias, M.; Anguita, M.; Castillo, M.; Perez, J.F.; Martin-Orue, S.M.; Kamel, C.; Gasa, J. Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* **2006**, *84*, 2743–2751. [\[CrossRef\]](#)
131. Li, P.; Piao, X.; Ru, Y.; Han, X.; Xue, L.; Zhang, H. Effects of adding essential oil to the diet of weaned pigs on performance, nutrient utilization, immune response and intestinal health. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **2012**, *25*, 1617–1626. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
132. Su, G.; Zhou, X.; Wang, Y.; Chen, D.; Chen, G.; Li, Y.; He, J. Effects of plant essential oil supplementation on growth performance, immune function and antioxidant activities in weaned pigs. *Lipids Health Dis.* **2018**, *17*, 139. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
133. Xu, Y.; Lahaye, L.; He, Z.; Zhang, J.; Yang, C.; Piao, X. Micro-encapsulated essential oils and organic acids combination improves intestinal barrier function, inflammatory responses and microbiota of weaned piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* F4 (K88+). *Anim. Nutr.* **2020**, *6*, 269–277. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
134. Zou, Y.; Xiang, Q.; Wang, J.; Peng, J.; Wei, H. Oregano Essential Oil Improves Intestinal Morphology and Expression of Tight Junction Proteins Associated with Modulation of Selected Intestinal Bacteria and Immune Status in a Pig Model. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
135. Xie, Z.; Zhao, Q.; Wang, H.; Wen, L.; Li, W.; Zhang, X.; Lin, W.; Li, H.; Xie, Q.; Wang, Y. Effects of antibacterial peptide combinations on growth performance, intestinal health, and immune function of broiler chickens. *Poult. Sci.* **2020**, *99*, 6481–6492. [\[CrossRef\]](#)
136. Liu, S.D.; Song, M.H.; Yun, W.; Lee, J.H.; Kim, H.B.; Cho, J.H. Effect of carvacrol essential oils on immune response and inflammation-related genes expression in broilers challenged by lipopolysaccharide. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 2026–2033. [\[CrossRef\]](#)
137. Montironi, I.D.; Reinoso, E.B.; Paullier, V.C.; Siri, M.I.; Pianzola, M.J.; Moliva, M.; Campra, N.; Bagnis, G.; LaRocque-de-Freitas, I.F.; Decote-Ricardo, D.; et al. *Minthostachys verticillata* essential oil activates macrophage phagocytosis and modulates the innate immune response in a murine model of *Enterococcus faecium* mastitis. *Res. Vet. Sci.* **2019**, *125*, 333–344. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
138. De Nardi, R.; Marchesini, G.; Plaizier, J.C.; Li, S.; Khafipour, E.; Ricci, R.; Andrighetto, I.; Segato, S. Use of dicarboxylic acids and polyphenols to attenuate reticular pH drop and acute phase response in dairy heifers fed a high grain diet. *BMC Vet. Res.* **2014**, *10*. [\[CrossRef\]](#)
139. Cecilian, F.; Ceron, J.J.; Eckersall, P.D.; Sauerwein, H. Acute phase proteins in ruminants. *J. Proteom.* **2012**, *75*, 4207–4231. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

140. Keane, O.M. Symposium review: Intramammary infections—Major pathogens and strain-associated complexity. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 4713–4726. [\[CrossRef\]](#)
141. Halasa, T.; Huijps, K.; Østerås, O.; Hogeveen, H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Vet. Q.* **2007**, *29*, 18–31. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
142. Lopes, T.S.; Fontoura, P.S.; Oliveira, A.; Rizzo, F.A.; Silveira, S.; Streck, A.F. Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
143. Hogeveen, H.; Van Der Voort, M. Assessing the economic impact of an endemic disease: The case of mastitis. *Oie Rev. Sci. Tech.* **2017**, *36*, 217–226. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
144. Halasa, T.; Nielsen, M.; De Roos, A.P.W.; Van Hoorne, R.; de Jong, G.; Lam, T.J.G.M.; Van Werven, T.; Hogeveen, H. Production loss due to new subclinical mastitis in Dutch dairy cows estimated with a test-day model. *J. Dairy Sci.* **2009**, *92*, 599–606. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
145. Andersson, D.I.; Hughes, D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, *35*, 901–911. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
146. Sharma, C.; Rokana, N.; Chandra, M.; Singh, B.P.; Gulhane, R.D.; Gill, J.P.S.; Ray, P.; Puniya, A.K.; Panwar, H. Antimicrobial resistance: Its surveillance, impact, and alternative management strategies in dairy animals. *Front. Vet. Sci.* **2018**, *4*, 237. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
147. Burt, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *94*, 223–253. [\[CrossRef\]](#)
148. Aiemsard, J.; Aiumlamai, S.; Aromdee, C.; Taweekaisupapong, S.; Khunkitti, W. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. *Res. Vet. Sci.* **2011**, *91*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
149. Tavares, T.D.; Antunes, J.C.; Padrao, J.; Ribeiro, A.I.; Zille, A.; Amorim, M.T.P.; Felgueiras, H.P. Activity of Specialized Biomolecules against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics* **2020**, *9*, 314. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
150. Kher, M.N.; Sheth, N.R.; Bhatt, V.D. In Vitro Antibacterial Evaluation of Terminalia chebula as an Alternative of Antibiotics against Bovine Subclinical Mastitis. *Anim. Biotechnol.* **2019**, *30*, 151–158. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
151. Fox, L.K.; Zadoks, R.N.; Gaskins, C.T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet. Microbiol.* **2005**, *107*, 295–299. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
152. Abboud, M.; El Rammouz, R.; Jammal, B.; Sleiman, M. In vitro and in vivo antimicrobial activity of two essential oils Thymus vulgaris and Lavandula angustifolia against bovine *Staphylococcus* and *Streptococcus* mastitis pathogen. *Middle East J. Agric. Res.* **2015**, *4*, 975–983.
153. Cho, B.W.; Cha, C.N.; Lee, S.M.; Kim, M.J.; Park, J.Y.; Yoo, C.Y.; Son, S.E.; Kim, S.; Lee, H.J. Therapeutic effect of oregano essential oil on subclinical bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean J. Vet. Res.* **2015**, *55*, 253–257. [\[CrossRef\]](#)
154. Kammerer, M.; Le Guenic, M.; Roussel, P.; Linclau, O.; Cartaud, G.; Tainturier, D.; Larrat, M.; Bareille, N. Le traitement des mammites cliniques de la vache laitière par des huiles essentielles. *Innov. Agron.* **2009**, *4*, 79–83.
155. Corre, C. L'utilisation de L'aromathérapie Dans les Élevages Français: État des Lieux, Efficacité et Limites. Available online: <https://hal.inrae.fr/hal-02788515/document> (accessed on 1 February 2021).
156. Amorati, R.; Foti, M.C.; Valgimigli, L. Antioxidant Activity of Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *61*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
157. Castillo, C.; Hernandez, J.; Pereira, V.; Benedito, J.L. Update about Nutritional Strategies in Feedlot for Preventing Ruminant Acidosis. *Adv. Zool. Res.* **2012**, *4*, 1–84.
158. Younsi, F.; Mehdi, S.; Aissi, O.; Rahali, N.; Jaouadi, R.; Boussaid, M.; Roura, E. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Flavour Fragr. J.* **2020**, *25*, 282. [\[CrossRef\]](#)
159. Amaral, A.B.; SILVA, M.V.D.; LANNES, S.C.D.S. Lipid oxidation in meat: Mechanisms and protective factors a review. *Food Sci. Technol.* **2018**, *38*, 1–15. [\[CrossRef\]](#)
160. Elshafie, H.S.; Camele, I. An Overview of the Biological Effects of Some Mediterranean Essential Oils on Human Health. *BioMed Res. Int.* **2017**, *2017*, 9268468. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
161. Sharma, S.; Barkauskaite, S.; Jaiswal, A.K.; Jaiswal, S. Essential oils as additives in active food packaging. *Food Chem.* **2021**, *343*, 128403. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
162. Mimica-Dukić, N.; Orčić, D.; Lesjak, M.; Šibul, F. Essential oils as powerful antioxidants: Misconception or scientific fact. In *ACS Symposium Series*; American Chemical Society: Washington, DC, USA, 2016; Volume 1218, pp. 187–208. [\[CrossRef\]](#)
163. Alam, M.N.; Bristi, N.J.; Rafiquzzaman, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm. J.* **2013**, *21*, 143–152. [\[CrossRef\]](#)
164. Jugreet, B.S.; Suroowan, S.; Rengasamy, R.R.K.; Mahomoodally, M.F. Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *101*, 89–105. [\[CrossRef\]](#)
165. Zhai, H.; Liu, H.; Wang, S.; Wu, J.; Klünter, A.M. Potential of essential oils for poultry and pigs. *Anim. Nutr.* **2018**, *4*, 179–186. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
166. Bouhaddouda, N.; Aouadi, S.; Labiod, R. Evaluation of chemical composition and biological activities of essential oil and methanolic extract of *Origanum vulgare* L. ssp. *glandulosum* (DESF.) Ietswaart from Algeria. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* **2016**, *8*, 104–112.



167. Viuda-Martos, M.; Ruiz Navajas, Y.; Sánchez Zapata, E.; Fernández-López, J.; Pérez-Álvarez, J.A. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour Fragr. J.* **2010**, *25*, 13–19. [\[CrossRef\]](#)
168. Bounatirou, S.; Smiti, S.; Miguel, M.G.; Faleiro, L.; Rejeb, M.N.; Neffati, M.; Costa, M.M.; Figueiredo, A.C.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chem.* **2007**, *105*, 146–155. [\[CrossRef\]](#)
169. Kulisic, T.; Radonic, A.; Katalinic, V.; Milos, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.* **2004**, *85*, 633–640. [\[CrossRef\]](#)
170. Franz, C.; Baser, K.; Windisch, W. Essential oils and aromatic plants in animal feeding a European perspective. A review. *Flavour Fragr. J.* **2010**, *25*, 327–340. [\[CrossRef\]](#)
171. Botsoglou, N.A.; Yannakopoulos, A.L.; Fletouris, D.J.; Tserveni-Goussi, A.S.; Fortomaris, P.D. Effect of Dietary Thyme on the Oxidative Stability of Egg Yolk. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3711–3716. [\[CrossRef\]](#)
172. Youdim, K.A.; Deans, S.G. Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the ageing rat brain. *Br. J. Nutr.* **2000**, *83*, 87–93. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
173. Estévez, M.; Cava, R. Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: Contradictory effects in different types of frankfurters. *Meat Sci.* **2006**, *72*, 348–355. [\[CrossRef\]](#)
174. Takayama, C.; de-Faria, F.M.; de Almeida, A.C.A.; Dunder, R.J.; Manzo, L.P.; Socca, E.A.R.; Luiz-Ferreira, A. Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2016**, *6*, 677–681. [\[CrossRef\]](#)
175. Kazemi, M. Phytochemical Composition, Antioxidant, Anti-inflammatory and Antimicrobial Activity of *Nigella sativa* L. Essential Oil. *J. Essent. Oil Bear. Plants* **2014**, *17*, 1002–1011. [\[CrossRef\]](#)
176. Bourgou, S.; Pichette, A.; Marzouk, B.; Legault, J. Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia. *S. Afr. J. Bot.* **2010**, *76*, 210–216. [\[CrossRef\]](#)
177. Sultan, M.T.; Butt, M.S.; Karim, R.; Ahmad, N.; Ahmad, R.S.; Ahmad, W. *Nigella sativa* fixed and essential oil improves antioxidant status through modulation of antioxidant enzymes and immunity. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2015**, *28*, 589–595. [\[PubMed\]](#)
178. El Jerry, A.; Hasan, M.; Rashid, M.M.; Al Mesfer, M.K.; Danish, M.; Ben Rebah, F. Phytochemical characterization, and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from leaves of the common sage *Salvia officinalis* L. from Abha, Saudi Arabia. *Asian Biomed.* **2020**, *14*, 261–270. [\[CrossRef\]](#)
179. Ed-Dra, A.; Filali, F.R.; Presti, V.L.; Zekkori, B.; Nalbone, L.; Bouymajane, A.; Trabelsi, N.; Lamberta, F.; Bentayeb, A.; Giuffrida, A.; et al. Chemical composition, antioxidant capacity and antibacterial action of five Moroccan essential oils against *Listeria monocytogenes* and different serotypes of *Salmonella enterica*. *Microb. Pathog.* **2020**, *149*, 104510. [\[CrossRef\]](#)
180. Viuda-Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; Fernández-López, J.; Pérez-Álvarez, J.A. Chemical Composition of the Essential Oils Obtained From Some Spices Widely Used in Mediterranean Region. *Acta Chim. Slov.* **2007**, *54*, 921–926.
181. Ben Khedher, M.R.; Ben Khedher, S.; Chaieb, I.; Tounsi, S.; Hammami, M. Chemical composition and biological activities of *Salvia officinalis* essential oil from Tunisia. *Excli J.* **2017**, *16*, 160–173. [\[CrossRef\]](#)
182. Mssillou, I.; Agour, A.; El Ghouizi, A.; Hamamouch, N.; Lyoussi, B.; Derwich, E. Chemical Composition, Antioxidant Activity, and Antifungal Effects of Essential Oil from *Laurus nobilis* L. Flowers Growing in Morocco. *J. Food Qual.* **2020**, *2020*, 8819311. [\[CrossRef\]](#)
183. Yilmaz, E.S.; Timur, M.; Aslim, B. Antimicrobial, Antioxidant Activity of the Essential Oil of Bay Laurel from Hatay, Turkey. *J. Essent. Oil Bear. Plants* **2013**, *16*, 108–116. [\[CrossRef\]](#)
184. Saab, A.M.; Tundis, R.; Loizzo, M.R.; Lampronti, I.; Borgatti, M.; Gambari, R.; Menichini, F.; Esseyli, F.; Menichini, F. Antioxidant and antiproliferative activity of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) leaves and seeds essential oils against K562 human chronic myelogenous leukaemia cells. *Nat. Prod. Res.* **2012**, *26*, 1741–1745. [\[CrossRef\]](#)
185. Kačániová, M.; Galovičová, L.; Ivanišová, E.; Vukovic, N.L.; Štefániková, J.; Valková, V.; Borotová, P.; Žiarovská, J.; Terentjeva, M.; Felšöciiová, S.; et al. Antioxidant, Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) Essential Oil for Its Application in Foods. *Foods* **2020**, *9*, 282. [\[CrossRef\]](#)
186. Bozin, B.; Mimica-Dukic, N.; Samojlik, I.; Jovin, E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7879–7885. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
187. Rašković, A.; Milanović, I.; Pavlović, N.; Čebović, T.; Vukmirović, S.; Mikov, M. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complement. Altern. Med.* **2014**, *14*, 225. [\[CrossRef\]](#)
188. Ouariachi, E.; Paolini, J.; Bouyanzer, A.; Tomi, P.; Hammouti, B.; Salghi, R.; Costa, J. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns and link from Morocco. *J. Med. Plant Res.* **2011**, *5*, 5773–5778.
189. Goudjil, M.B.; Zighmi, S.; Hamada, D.; Mahcene, Z.; Bencheikh, S.E.; Ladjel, S. Biological activities of essential oils extracted from *Thymus capitatus* (Lamiaceae). *S. Afr. J. Bot.* **2020**, *128*, 274–282. [\[CrossRef\]](#)
190. Riahi, L.; Chograni, H.; Ziadi, S.; Zaouali, Y.; Zoghalmi, N.; Mliki, A. Chemical profiles and antioxidant activities of the essential oils of two medicinal plant species grown in Tunisia. *J. Essent. Oil Res.* **2013**, *25*, 324–329. [\[CrossRef\]](#)
191. Sahin Yaglioglu, A.; Eser, F.; Yaglioglu, M.S.; Demirtas, I. The antiproliferative and antioxidant activities of the essential oils of *Juniperus* species from Turkey. *Flavour Fragr. J.* **2020**, *35*, 511–523. [\[CrossRef\]](#)



192. Cheraif, K.; Bakchiche, B.; Gherib, A.; Bardaweel, S.K.; Çol Ayvaz, M.; Flamini, G.; Ascrizzi, R.; Ghareeb, M.A. Chemical Composition, Antioxidant, Anti-Tyrosinase, Anti-Cholinesterase and Cytotoxic Activities of Essential Oils of Six Algerian Plants. *Molecules* **2020**, *25*, 1710. [CrossRef]
193. Lohani, A.; Mishra, A.K.; Verma, A. Cosmeceutical potential of geranium and calendula essential oil: Determination of antioxidant activity and in vitro sun protection factor. *J. Cosmet. Dermatol.* **2019**, *18*, 550–557. [CrossRef] [PubMed]
194. Elansary, H.O.; Abdelgaleil, S.A.M.; Mahmoud, E.A.; Yessoufou, K.; Elhindi, K.; El-Hendawy, S. Effective antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of essential oils of horticultural aromatic crops in northern Egypt. *BMC Complement. Altern. Med.* **2018**, *18*, 214. [CrossRef] [PubMed]
195. Simirgiotis, M.J.; Burton, D.; Parra, F.; López, J.; Muñoz, P.; Escobar, H.; Parra, C. Antioxidant and Antibacterial Capacities of *Origanum vulgare* L. Essential Oil from the Arid Andean Region of Chile and its Chemical Characterization by GC-MS. *Metabolites* **2020**, *10*, 414. [CrossRef]
196. Lairini, S.; Farah, A.; Taghzouti, K.; Lalami, A.E.O. Antioxidant and Antibacterial Activities of *Artemisia herba-alba* Asso Essential Oil from Middle Atlas, Morocco. *Phytotherapie* **2018**, *16*, S48–S54. [CrossRef]
197. Younsi, F.; Mehdi, S.; Aissi, O.; Rahali, N.; Jaouadi, R.; Boussaid, M.; Messaoud, C. Essential Oil Variability in Natural Populations of *Artemisia campestris* (L.) and *Artemisia herba-alba* (Asso) and Incidence on Acetylcholinesterase and Antioxidant Activities. *Chem. Biodivers.* **2017**, *14*, e1700017. [CrossRef]
198. Miguel, G.; Cruz, C.; Faleiro, M.L.; Simões, M.T.F.; Figueiredo, A.C.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G. *Salvia officinalis* L. essential oils: Effect of hydrodistillation time on the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Nat. Prod. Res.* **2011**, *25*, 526–541. [CrossRef]
199. Noirot, V.; Moncoulodon, R.; Sauvante, D.; Bayourthe, C. Effet d'une Supplémentation en Huiles Essentielles et Composés D'huiles Essentielles Chez le Ruminant: Analyse Statistique. *Rev. Med. Vet.* **2007**, *158*, 587–597. Available online: [https://www.researchgate.net/publication/281798515\\_Effet\\_d\\_T1\textquoterightune\\_supplémentation\\_en\\_huiles\\_essentielles\\_et\\_composés\\_d\\_T1\textquoterightghthuiles\\_essentielles\\_chez\\_le\\_ruminant\\_analyse\\_statistique](https://www.researchgate.net/publication/281798515_Effet_d_T1\textquoterightune_supplémentation_en_huiles_essentielles_et_composés_d_T1\textquoterightghthuiles_essentielles_chez_le_ruminant_analyse_statistique) (accessed on 1 February 2021).
200. Arzola-Alvarez, C.; Hume, M.E.; Anderson, R.C.; Latham, E.A.; Ruiz-Barrera, O.; Castillo-Castillo, Y.; Olivas-Palacios, A.L.; Felix-Portillo, M.; Armendariz-Rivas, R.L.; Arzola-Rubio, A.; et al. Influence of sodium chlorate, ferulic acid, and essential oils on *Escherichia coli* and porcine fecal microbiota. *J. Anim. Sci.* **2020**, *98*, 1–9. [CrossRef]
201. Yang, C.; Zhang, L.; Cao, G.; Feng, J.; Yue, M.; Xu, Y.; Dai, B.; Han, Q.; Guo, X. Effects of dietary supplementation with essential oils and organic acids on the growth performance, immune system, fecal volatile fatty acids, and microflora community in weaned piglets. *J. Anim. Sci.* **2019**, *97*, 133–143. [CrossRef] [PubMed]
202. Wei, H.K.; Xue, H.X.; Zhou, Z.X.; Peng, J. A carvacrol-thymol blend decreased intestinal oxidative stress and influenced selected microbes without changing the messenger RNA levels of tight junction proteins in jejunal mucosa of weaning piglets. *Animal* **2017**, *11*, 193–201. [CrossRef]
203. Singh, G.; Marimuthu, P.; de Heluani, C.S.; Catalan, C. Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Nigella sativa* seeds. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 2297–2306. [CrossRef]
204. Yang, C.; Kennes, Y.M.; Lepp, D.; Yin, X.; Wang, Q.; Yu, H.; Yang, C.; Gong, J.; Diarra, M.S. Effects of encapsulated cinnamaldehyde and citral on the performance and cecal microbiota of broilers vaccinated or not vaccinated against coccidiosis. *Poult. Sci.* **2020**, *99*, 936–948. [CrossRef] [PubMed]
205. Oh, S.Y.; Yun, W.; Lee, J.H.; Lee, C.H.; Kwak, W.K.; Cho, J.H. Effects of essential oil (blended and single essential oils) on anti-biofilm formation of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *J. Anim. Sci. Technol.* **2017**, *59*. [CrossRef] [PubMed]
206. Patra, A.K. Effects of Essential Oils on Rumen Fermentation, Microbial Ecology and Ruminant Production. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* **2011**, *6*, 416–428. [CrossRef]
207. Patra, A.K.; Yu, Z. Essential oils affect populations of some rumen bacteria in vitro as revealed by microarray (RumenBactArray) analysis. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*. [CrossRef]
208. Oh, J.; Hristov, A.N. Effects of plant-derived bio-active compounds on rumen fermentation, nutrient utilization, immune response, and productivity of ruminant animals. In *ACS Symposium Series*; American Chemical Society: Washington, DC, USA, 2016; Volume 1218, pp. 167–186. [CrossRef]
209. Kim, H.; Jung, E.; Lee, H.G.; Kim, B.; Cho, S.; Lee, S.; Kwon, I.; Seo, J. Essential oil mixture on rumen fermentation and microbial community—An in vitro study. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **2019**, *32*, 808–814. [CrossRef]
210. Alagawany, M.; Farag, M.R.; Abdelnour, S.A.; Elnesr, S.S. A review on the beneficial effect of thymol on health and production of fish. *Rev. Aquac.* **2021**, *13*, 632–641. [CrossRef]
211. Jafari, S.; Ebrahimi, M.; Goh, Y.M.; Rajion, M.A.; Jahromi, M.F.; Al-Jumaili, W.S. Manipulation of rumen fermentation and methane gas production by plant secondary metabolites (saponin, tannin and essential oil)—A review of ten-year studies. *Ann. Anim. Sci.* **2019**, *19*, 3–29. [CrossRef]
212. Torres, R.N.S.; Moura, D.C.; Ghedini, C.P.; Ezequiel, J.M.B.; Almeida, M.T.C. Meta-analysis of the effects of essential oils on ruminal fermentation and performance of sheep. *Small Rumin. Res.* **2020**, *189*. [CrossRef]
213. Lei, Z.; Zhang, K.; Li, C.; Jiao, T.; Wu, J.; Wei, Y.; Tian, K.; Li, C.; Tang, D.; Davis, D.I.; et al. Ruminal metagenomic analyses of goat data reveals potential functional microbiota by supplementation with essential oil-cobalt complexes. *BMC Microbiol.* **2019**, *19*, 30. [CrossRef]

214. Benchaar, C.; Petit, H.V.; Berthiaume, R.; Ouellet, D.R.; Chiquette, J.; Chouinard, P.Y. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 886–897. [\[CrossRef\]](#)
215. Khiaosa-ard, R.; Zebeli, Q. Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants. *J. Anim. Sci.* **2013**, *91*, 1819–1830. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
216. Calsamiglia, S.; Busquet, M.; Cardozo, P.W.; Castillejos, L.; Ferret, A. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 2580–2595. [\[CrossRef\]](#)
217. Ratika, K.; James Singh, R.K. Plant Derived Essential Oil in Ruminant Nutrition—A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2018**, *7*, 1747–1753. [\[CrossRef\]](#)
218. Noirot, V.; Moncoulon, R.; Sauvant, D.; Bayourthe, C. Effet d’une supplémentation en huiles essentielles et composés d’huiles essentielles chez le ruminant: Analyse statistique. *Rev. De Médecine Vétérinaire* **2007**, *158*, 589–597.
219. Vargas, J.E.; Andrés, S.; López-Ferreras, L.; Snelling, T.J.; Yáñez-Ruiz, D.R.; García-Estrada, C.; López, S. Dietary supplemental plant oils reduce methanogenesis from anaerobic microbial fermentation in the rumen. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–9. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
220. Günal, M.; Pinski, B.; AbuGhazaleh, A.A. Evaluating the effects of essential oils on methane production and fermentation under in vitro conditions. *Ital. J. Anim. Sci.* **2017**, *16*, 500–506. [\[CrossRef\]](#)
221. Smeti, S.; Hajji, H.; Mekki, I.; Mahouachi, M.; Atti, N. Effects of dose and administration form of rosemary essential oils on meat quality and fatty acid profile of lamb. *Small Rumin. Res.* **2018**, *158*, 62–68. [\[CrossRef\]](#)
222. Benchaar, C. Diet supplementation with thyme oil and its main component thymol failed to favorably alter rumen fermentation, improve nutrient utilization, or enhance milk production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 324–336. [\[CrossRef\]](#)
223. Rivaroli, D.C.; Guerrero, A.; Valero, M.V.; Zawadzki, F.; Eiras, C.E.; del Mar Campo, M.; Sañudo, C.; Jorge, A.M.; do Prado, I.N. Effect of essential oils on meat and fat qualities of crossbred young bulls finished in feedlots. *Meat Sci.* **2016**, *121*, 278–284. [\[CrossRef\]](#)
224. De Oliveira Monteschio, J.; de Souza, K.A.; Vital, A.C.P.; Guerrero, A.; Valero, M.V.; Kempinski, E.M.B.C.; Barcelos, V.C.; Nascimento, K.F.; do Prado, I.N. Clove and rosemary essential oils and encapsulated active principles (eugenol, thymol and vanillin blend) on meat quality of feedlot-finished heifers. *Meat Sci.* **2017**, *130*, 50–57. [\[CrossRef\]](#)
225. Harris, S.E.; Huff-Lonergan, E.; Lonergan, S.M.; Jones, W.R.; Rankins, D. Antioxidant status affects color stability and tenderness of calcium chloride-injected beef. *J. Anim. Sci.* **2001**, *79*, 666–677. [\[CrossRef\]](#)
226. Garcia, L.G.S.; da Rocha, M.G.; Lima, L.R.; Cunha, A.P.; de Oliveira, J.S.; de Andrade, A.R.C.; Ricardo, N.M.P.S.; Pereira-Neto, W.A.; Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F.G.; et al. Essential oils encapsulated in chitosan microparticles against *Candida albicans* biofilms. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *166*, 621–632. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
227. Al-Suwaiegh, S.B.; Morshedy, S.A.; Mansour, A.T.; Ahmed, M.H.; Zahran, S.M.; Alnemr, T.M.; Sallam, S.M.A. Effect of an Essential Oil Blend on Dairy Cow Performance during Treatment and Post-Treatment Periods. *Sustainability* **2020**, *12*, 9123. [\[CrossRef\]](#)
228. El-Essawy, A.M.; Anele, U.Y.; Abdel-Wahed, A.M.; Abdou, A.R.; Khattab, I.M. Effects of anise, clove and thyme essential oils supplementation on rumen fermentation, blood metabolites, milk yield and milk composition in lactating goats. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2021**, *271*, 114760. [\[CrossRef\]](#)
229. Soltan, Y.A.; Natel, A.S.; Araujo, R.C.; Morsy, A.S.; Abdalla, A.L. Progressive adaptation of sheep to a microencapsulated blend of essential oils: Ruminal fermentation, methane emission, nutrient digestibility, and microbial protein synthesis. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2018**, *237*, 8–18. [\[CrossRef\]](#)
230. Morsy, T.A.; Kholif, S.M.; Matloup, O.H.; Abdo, M.M.; El-Shafie, M.H. Impact of Anise, Clove and Juniper Oils as Feed additives on the productive performance of lactating goats. *Int. J. Dairy Sci.* **2012**, *7*, 20–28. [\[CrossRef\]](#)
231. Kholif, A.E.; Kassab, A.Y.; Azzaz, H.H.; Matloup, O.H.; Hamdon, H.A.; Olafadehan, O.A.; Morsy, T.A. Essential oils blend with a newly developed enzyme cocktail works synergistically to enhance feed utilization and milk production of Farafra ewes in the subtropics. *Small Rumin. Res.* **2018**, *161*, 43–50. [\[CrossRef\]](#)
232. Göksen, G.; Fabra, M.J.; Pérez-Cataluña, A.; Ekiz, H.I.; Sanchez, G.; López-Rubio, A. Biodegradable active food packaging structures based on hybrid cross-linked electrospun polyvinyl alcohol fibers containing essential oils and their application in the preservation of chicken breast fillets. *Food Packag. Shelf Life* **2021**, *27*, 100613. [\[CrossRef\]](#)
233. Dong, Z.; Xu, F.; Ahmed, I.; Li, Z.; Lin, H. Characterization and preservation performance of active polyethylene films containing rosemary and cinnamon essential oils for Pacific white shrimp packaging. *Food Control* **2018**, *92*, 37–46. [\[CrossRef\]](#)
234. Buendía, L.; Soto, S.; Ros, M.; Antolinos, V.; Navarro, L.; Sánchez, M.J.; Martínez, G.B.; López, A. Innovative cardboard active packaging with a coating including encapsulated essential oils to extend cherry tomato shelf life. *LWT* **2019**, *116*, 108584. [\[CrossRef\]](#)
235. Alizadeh Behbahani, B.; Noshad, M.; Jooyandeh, H. Improving oxidative and microbial stability of beef using Shahri Balangu seed mucilage loaded with Cumin essential oil as a bioactive edible coating. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2020**, *24*, 101563. [\[CrossRef\]](#)
236. Artiga-Artigas, M.; Acevedo-Fani, A.; Martín-Belloso, O. Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. *Food Control* **2017**, *76*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
237. Hashemi, S.M.B.; Khorram, S.B.; Sohrabi, M. Antioxidant Activity of Essential Oils in Foods. In *Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2017; pp. 247–265. [\[CrossRef\]](#)

238. Estévez, M.; Ventanas, S.; Cava, R. Protein oxidation in frankfurters with increasing levels of added rosemary essential oil: Effect on color and texture deterioration. *J. Food Sci.* **2005**, *70*, c427–c432. [\[CrossRef\]](#)
239. Bozkurt, H. Comparison of the effects of sesame and *Thymbra spicata* oil during the manufacturing of Turkish dry-fermented sausage. *Food Control* **2007**, *18*, 149–156. [\[CrossRef\]](#)
240. Martín-Sánchez, A.M.; Chaves-López, C.; Sendra, E.; Sayas, E.; Fenández-López, J.; Pérez-Álvarez, J.Á. Lipolysis, proteolysis and sensory characteristics of a Spanish fermented dry-cured meat product (salchichón) with oregano essential oil used as surface mold inhibitor. *Meat Sci.* **2011**, *89*, 35–44. [\[CrossRef\]](#)
241. Alsaiqali, M.; El-Shibiny, A.; El-Shibiny, A.; Adel, M.; Abdel-Samie, M.; Ghoneim, S. Use of Some Essential Oils as Antimicrobial Agents to Control Pathogenic Bacteria in Beef Burger. *World J. Dairy Food Sci.* **2016**, *11*, 109–120. [\[CrossRef\]](#)
242. Pateiro, M.; Barba, F.J.; Domínguez, R.; Sant'Ana, A.S.; Khaneghah, A.M.; Gavahian, M.; Gómez, B.; Lorenzo, J.M. Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review. *Food Res. Int.* **2018**, *113*, 156–166. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
243. Lee, R.F. Photo-oxidation and Photo-toxicity of Crude and Refined Oils. *Spill Sci. Technol. Bull.* **2003**, *8*, 157–162. [\[CrossRef\]](#)
244. Terenina, M.B.; Misharina, T.A.; Krikunova, N.I.; Alinkina, E.S.; Fatkulina, L.D.; Vorob'eva, A.K. Oregano essential oil as an inhibitor of higher fatty acid oxidation. *Prikl. Biokhimiia I Mikrobiol.* **2011**, *47*, 490–494. [\[CrossRef\]](#)
245. Özcan, M.M.; Arslan, D. Antioxidant effect of essential oils of rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils. *Food Chem.* **2011**, *129*, 171–174. [\[CrossRef\]](#)
246. Gavahian, M.; Hashemi, S.M.; Khaneghah, A.M.; Tehrani, M.A. Ohmically extracted Zenyan essential oils as natural antioxidant in mayonnaise. *Int. Food Res. J.* **2013**, *20*, 3189–3195.
247. Ben Jemaa, M.; Falleh, H.; Saada, M.; Oueslati, M.; Snoussi, M.; Ksouri, R. *Thymus capitatus* essential oil ameliorates pasteurization efficiency. *J. Food Sci. Technol.* **2018**, *55*, 3446–3452. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
248. Elama, C.; Alayoubi, M.; Jazsar, M. FA-R Effect of Different Essential Oils on the Shelf Life of Concentrated Yogurt. *Annu. Res. Rev. Biol.* **2019**, *30*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
249. Mishra, A.P.; Devkota, H.P.; Nigam, M.; Adetunji, C.O.; Srivastava, N.; Saklani, S.; Shukla, I.; Azmi, L.; Shariati, M.A.; Coutinho, H.D.M.; et al. Combination of essential oils in dairy products: A review of their functions and potential benefits. *LWT* **2020**, *133*, 110116. [\[CrossRef\]](#)
250. Ozkan, G.; Simsek, B.; Kuleasan, H. Antioxidant activities of Satureja cilicica essential oil in butter and in vitro. *J. Food Eng.* **2007**, *79*, 1391–1396. [\[CrossRef\]](#)
251. Castillo, C.; Pereira, V.; Abuelo, Á.; Hernández, J. Effect of Supplementation with Antioxidants on the Quality of Bovine Milk and Meat Production. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 616098. [\[CrossRef\]](#)
252. Castillo, C.; Hernández, J.; Valverde, I.; Pereira, V.; Sotillo, J.; Alonso, M.L.; Benedito, J.L. Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. *Res. Vet. Sci.* **2006**, *80*, 133–139. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
253. Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Meyer, R.L. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
254. Castro-Montoya, J.; Peiren, N.; Cone, J.W.; Zweifel, B.; Fievez, V.; De Campeneere, S. In vivo and in vitro effects of a blend of essential oils on rumen methane mitigation. *Livest. Sci.* **2015**, *180*, 134–142. [\[CrossRef\]](#)
255. Tóth, T.; Körmöndi, M.; Tkóvács, A.; Csavajda, É.; Trombitás, M.; Tóthi, R. Effect of essential oil supplement on milk yield and composition of lactating dairy cows. *Krmiva* **2017**, *59*, 15–19. [\[CrossRef\]](#)
256. Katsoulos, P.D.; Karatzia, M.A.; Dovas, C.I.; Filioussis, G.; Papadopoulos, E.; Kioussis, E.; Arsenopoulos, K.; Papadopoulos, T.; Boscós, C.; Karatzias, H. Evaluation of the in-field efficacy of oregano essential oil administration on the control of neonatal diarrhea syndrome in calves. *Res. Vet. Sci.* **2017**, *115*, 478–483. [\[CrossRef\]](#)
257. Froehlich, K.A.; Abdelsalam, K.W.; Chase, C.; Koppien-Fox, J.; Casper, D.P. Evaluation of essential oils and prebiotics for newborn dairy calves1. *J. Anim. Sci.* **2017**, *95*, 3772–3782. [\[CrossRef\]](#)
258. Akbarian-Tefaghi, M.; Ghasemi, E.; Khorvash, M. Performance, rumen fermentation and blood metabolites of dairy calves fed starter mixtures supplemented with herbal plants, essential oils or monensin. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2018**, *102*, 630–638. [\[CrossRef\]](#)

### 3.2. Huiles essentielles et mammites

Dans cette partie, subdivisée en 2 sous sections (études des effets *in vitro* et *in vivo* des HEs), sont présentés les résultats d'études qui ont porté sur l'usage des HEs dans le traitement des mammites.

#### 3.2.1. Études *in vitro*

Plusieurs études *in vitro* ont démontré l'activité antibactérienne des HEs contre plusieurs agents pathogènes responsables des mammites, tels que les *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* et *S. aureus* (Caneschi et al., 2023). Le Tableau 3 présente 5 études récentes qui démontre l'efficacité des HEs et de leurs principaux composés contre les bactéries responsables des mammites. L'activité antibactérienne des HEs découle de leur capacité à endommager les parois cellulaires et les membranes bactériennes, engendrant la dégradation des parois cellulaires, la dénaturation des protéines et la perturbation de la force motrice des protons. Leur nature lipophile leur permet de pénétrer la bicouche lipidique de la membrane cellulaire bactérienne, entraînant ainsi une altération de l'intégrité et de l'organisation structurelle (Aiemsaard, Aiumlamai, Aromdee, Taweechaisupapong, & Khunkitti, 2011). En général, les bactéries à Gram-positives sont plus sensibles que les bactéries à Gram-négatives à l'activité disruptive, probablement en raison des lipopolysaccharides à l'extérieur de la paroi cellulaire des Gram-négatives, agissant comme une barrière supplémentaire contre les HEs (T. D. Tavares et al., 2020). Plusieurs études ont montré que lorsque les principaux composés des HEs sont utilisés seuls, ils présentent une activité antibactérienne moins marquée contre les agents pathogènes bovins que lorsqu'ils sont testés en combinaison avec d'autres composés. Ceci suggère que les différentes molécules présentes dans les HEs, agissent d'une manière synergique pour assurer une activité antibactérienne efficace (Aiemsaard et al., 2011).

Tableau 3 : Liste de 5 publications récentes sur les effets antibactériens des HEs contre les pathogènes responsables des mammites bovines.

HEs/ composé principal	Bactéries	Résultats	Références
<b>Carvacrol, <i>trans</i>-cinnamaldehyde, et thymol</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 700698 et <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Forte activité antibactérienne de ces 3 molécules	(Rani, Singh, & Ram, 2022)
<b>HE <i>Melaleuca alternifolia</i> thymol et carvacrol</b>	<i>Staphylococcus</i> spp, <i>Streptococcus</i> spp, <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> et <i>Candida albicans</i>	Le thymol seul et la combinaison thymol carvacrol ont montré une forte activité antibactérienne	(Corona-Gómez et al., 2022)
<b>HEs de citronnelle, d'eucalyptus, de lavande, de menthe poivrée et de thym</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Staphylococcus chromogenes</i>	Les HEs de citronnelle et de thym ont montré une activité antibactérienne forte et supérieure à celle des 2 autres HEs	(Lopes et al., 2023)
<b>HEs de <i>Mentha × piperita</i> et de <i>Mentha pulegium</i>.</b>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Streptococcus agalactiae</i>	Les 2 HEs présentent une forte activité antibactérienne avec une activité supérieure pour la menthe poivrée	(Rahchamani, Noori, & Bayat kouhsar, 2023)
<b>HEs de <i>Mentha × piperita</i> et de la <i>Melissa officinalis</i></b>	<i>Staphylococcus</i> spp, <i>Streptococcus</i> spp, <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp ...	Les 2 HEs présentent une forte activité antibactérienne	(Dragana Tomanić et al., 2022)



### 3.2.2. Études *in vivo*

Il existe très peu d'études *in vivo* caractérisant les effets des HEs contre les mammites bovines. La plupart de ces études ne fournissent pas suffisamment de preuves scientifiques pour soutenir l'utilisation directe des HEs pour soigner ou prévenir les mammites. Parmi ces études, certaines ont mis en évidence des effets positifs des HEs, tandis que d'autres n'ont observé aucun effet antibactérien et anti-inflammatoire efficace.

Abboud et al. ont étudié l'effet de 10 % d'un mélange de *Thymus vulgaris* et *Lavandula angustifolia*, par perfusion intra-mammaire et par application externe sur les quartiers atteints de vaches laitières souffrant de mammite clinique. Après quatre jours de traitement, ils ont constaté une diminution substantielle du nombre de colonies bactériennes. L'activité antibactérienne la plus puissante a été obtenue en massant la mamelle avec le mélange d'HEs (Abboud et al., 2015).

Une autre étude a été réalisée pour évaluer l'effet de l'*Origanum vulgare* par perfusion intra-mammaire sur des mammites subcliniques : 0,9 ml d'HE ont été administrés deux fois par jour pendant trois jours. *S. aureus* et *E. coli* n'ont pas été détectés dans le lait après ce traitement (Cho et al., 2015). Guiadeur et al. ont comparé un mélange de 4 HEs (7 % de *Leptospermum scoparium*, 7 % de *Cymbopogon martinii*, 7 % de *Litsea citrata* et 3 % de *Corydothymus capitatus*) en dilution dans de l'huile de pépin de raisin (application par massage, 2 fois par jour pendant une semaine) avec un traitement à base d'antibiotiques (sans précision sur les antibiotiques utilisés, ni la durée du traitement). Les résultats des deux traitements étaient relativement similaires (Guiadeur et al., 2020). Rasool et al. ont étudié l'efficacité thérapeutique d'une application topique des HEs d'*Eucalyptus globulus* et de *Lavandula hybrida* sur 24 vaches atteintes de mammite subclinique, appliquées deux fois par jour pendant 28 jours. Après le traitement, le nombre de cellules somatiques (CCS) a été significativement réduits ( $p < 0,05$ ) et est revenu à la normale au vingt-huitième jour après l'application. (Rasool et al., 2021).

En revanche, Lefevre et al. ont traité 55 cas de mammites cliniques avec un mélange d'HE contenant *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus verbenone* et *Laurus nobilis* (1,5 % chacun dans 10 ml d'huile de tournesol), et 45 cas de mammite avec une combinaison de *T. vulgaris* et de *Rosmarinus verbenone* (6 % de chaque dans de l'huile de tournesol ou de l'eau). Les résultats étaient insatisfaisants : le taux de récupération n'était que de 40 % (Lefevre et al., 2008).

Mohamed Walid et al. ont testé une application topique contenant 5% d'HE d'*Origanum vulgare* pendant 3 jours sur des vaches ayant des mammites subcliniques. Aucune modification significative n'a été détectée quant à la présence de *Staphylococcus coagulase* positif dans le lait des vaches (Mohamed Walid et al., 2021).

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer ces observations contradictoires : (i) le lait peut interagir avec les HE, entraînant une altération de leurs propriétés antibactériennes, (ii) la concentration de l'HE utilisée dans le traitement in vivo n'est pas suffisante, et (iii) l'excipient pourrait modifier les caractéristiques physicochimiques des HE (Corre, 2018).

### 3.3. Que dit la réglementation française sur les usages des huiles essentielles en médecine vétérinaire ?

L'utilisation de l'aromathérapie dans les élevages français est soumise à un cadre réglementaire strict issu de la réglementation européenne. Afin de pouvoir utiliser une préparation à base d'HE pour prévenir ou guérir la maladie d'un animal de rente, celle-ci doit faire l'objet d'une prescription vétérinaire. Le vétérinaire peut prescrire deux types de spécialités :

- Des médicaments à base d'HE, qui possèdent une autorisation de mise sur le marché ;
- Des mélanges d'HE autorisés par la réglementation dans le cadre d'une « préparation extemporanée ».

Dans les deux conditions, toutes les substances utilisées doivent figurer sur une liste spécifique du règlement 2377/90 basée sur le statut LMR (Limite maximale de résidus). Le vétérinaire n'est pas autorisé légalement à prescrire des substances qui ne sont pas présentes dans cette liste. Aujourd'hui, et sur une centaine d'espèces de plantes utilisées par nos éleveurs, seules 21 plantes aromatiques (Annexe 4) sont autorisées en médecine vétérinaire (extrait du règlement LMR), avec des délais d'attente de 7 jours pour l'utilisation du lait conventionnel (14 jours pour le lait issu de l'élevage bio) et de 28 jours pour la viande.

L'absence d'évaluation de LMR pour un grand nombre d'espèces de plantes constitue un cadre réglementaire inadéquat, limitant l'utilisation de ces substances par un grand nombre d'éleveurs français (Corre, 2018).

#### 4. Conservation des huiles essentielles par encapsulation

En raison de leur sensibilité à la chaleur, à la lumière et à l'oxygène, les HEs risquent de perdre leurs propriétés thérapeutiques (voir revue partie 3.1 de l'état de l'art). Plusieurs techniques ont été développées pour préserver leur efficacité et leur durée de vie, parmi lesquelles la technique d'encapsulation qui est largement adoptée aujourd'hui. Cette approche implique d'enfermer les HEs au sein de microcapsules protectrices, généralement composées de matériaux tels que des polymères, qui agissent comme une barrière contre les facteurs de dégradation. L'encapsulation améliore la préservation des HEs, réduit leur volatilité et permet une régulation de leur libération. Cette section du manuscrit présente les avantages de l'encapsulation des HEs en détaillant deux méthodes spécifiques ayant été employées dans le cadre des travaux de ma thèse : la nano-émulsion et la coacervation complexe hétéroprotéique. À la fin de cette partie, plusieurs exemples tirés de recherches bibliographiques qui illustrent les effets de l'encapsulation sur les propriétés des HEs sont décrits.

##### 4.1. Intérêts de l'encapsulation des huiles essentielles

L'encapsulation des HEs présente de nombreux avantages tels que la protection des composés volatils contre l'oxydation, l'augmentation de la solubilité des HEs dans la phase aqueuse, la libération contrôlée de composés bioactifs et la bioactivité accrue en raison de l'augmentation de la surface de l'émulsion.

La réduction de la taille des gouttelettes dans l'émulsion améliore l'action antimicrobienne des HEs en raison de :

- La facilitation du transport des constituants bioactifs des HEs à travers les membranes cellulaires des micro-organismes ;



- L'augmentation de la surface de contact (suite à l'augmentation du nombre de gouttelettes dans une nano-émulsion) avec les cibles spécifiques dans la cellule, ce qui renforce le mécanisme d'interaction avec la membrane cellulaire et augmente la perméabilité des HEs (Maurya et al., 2021).

La section suivante aborde la nano-émulsion ainsi que la coacervation complexe hétéroprotéique, deux techniques utilisées dans les travaux de ma thèse.

## 4.2. Nano-émulsion

La nano-émulsion est une dispersion cinétiquement stable de deux phases non miscibles : la phase huileuse et la phase aqueuse, avec un diamètre de gouttelette de la phase dispersée de moins de 300nm. Elle est similaire à une émulsion conventionnelle, sauf que les diamètres des gouttelettes dispersées d'une nano-émulsion sont plus petits que dans une émulsion conventionnelle (Wang et al., 2023).

On peut distinguer 3 types de nano-émulsion en fonction de la disposition des gouttelettes (Y. Singh et al., 2017). Dans le cas de la nano-émulsion eau-dans-huile (E/H), les gouttelettes d'eau sont dispersées dans la phase huileuse. À l'inverse, dans la nano-émulsion huile-dans-eau (H/E), ce sont les gouttelettes d'huile qui sont dispersées dans la phase aqueuse. Enfin, la nano-émulsion bicontinue est un système où de petites gouttelettes d'huile et d'eau sont interdispersées de manière homogène, formant une structure dans laquelle les deux phases sont continuellement présentes.

Différentes techniques sont couramment utilisées pour la formation de nano-émulsion (voir les 2 revues (Gurpret & Singh, 2018; Kumar, Bishnoi, Shukla, & Jain, 2019). Dans cette partie, sont décrites les deux techniques de sonication et d'homogénéisation à haute pression que nous avons utilisé dans nos recherches.

### 4.2.1. La sonication

Cette méthode couramment utilisée implique l'utilisation d'ultrasons de haute amplitude. Dans cette technique, un homogénéisateur à ultrasons est utilisé pour générer des forces

perturbatrices intenses, qui brisent la phase dispersée en de très petites gouttelettes. Plusieurs facteurs peuvent influencer l'efficacité de l'homogénéisation par sonication.

Tout d'abord, l'intensité des ondes ultrasonores est un paramètre clé. Une intensité suffisamment élevée est nécessaire pour induire la fragmentation des gouttelettes d'huile et favoriser leur dispersion uniforme dans la phase aqueuse. Le temps de sonication est également un facteur important. Une durée de sonication adéquate est requise pour permettre une homogénéisation complète, en garantissant que les gouttelettes d'huile soient suffisamment réduites en taille (K & Kumar, 2022).

Le type et la quantité de l'émulsifiant présent jouent également un rôle crucial dans le processus de sonication. Les émulsifiants facilitent la formation et la stabilisation des émulsions en réduisant la tension interfaciale entre les phases huileuse et aqueuse. Le choix approprié de l'émulsifiant et sa concentration optimale peuvent améliorer l'efficacité de l'homogénéisation et la stabilité de l'émulsion résultante (Soares et al., 2019).

Enfin, la viscosité de la phase huileuse et aqueuse peut influencer l'homogénéisation par sonication. Des viscosités élevées peuvent rendre plus difficile la réduction des gouttelettes d'huile, nécessitant ainsi des conditions de sonication adaptées pour obtenir une dispersion homogène (Soares et al., 2019).

#### *4.2.2. L'homogénéisation à haute pression*

Dans cette méthode, un homogénéisateur produit une pression élevée sur un mélange d'eau, d'huile et d'émulsifiant afin de réduire la taille des gouttelettes et favoriser la formation de nano-émulsions. L'homogénéisation se déroule en trois étapes distinctes : la fragmentation, la coalescence et l'adsorption présentées dans la Figure 11.

La première étape, la fragmentation se produit lorsque la pression élevée générée par l'homogénéisateur brise les grosses gouttelettes d'huile en gouttelettes plus petites. Cette fragmentation est essentielle pour obtenir des gouttelettes de taille nanométrique.

Ensuite, la coalescence se produit lorsque les gouttelettes nouvellement formées ont tendance à se fusionner les unes avec les autres. Cependant, grâce à l'action de

l'homogénéisateur, la coalescence est minimisée, permettant ainsi la préservation de la taille réduite des gouttelettes et maintenant la stabilité de la nano-émulsion.

Enfin, lors de l'étape d'adsorption, les molécules d'émulsifiant présentes dans le mélange s'adsorbent à la surface des gouttelettes d'huile, formant ainsi une couche protectrice autour d'elles. Cette couche d'émulsifiant aide à stabiliser les gouttelettes et à prévenir leur coalescence ultérieure.

Cependant, bien que l'homogénéisation de haute pression soit une méthode efficace pour la formation de nano-émulsion, elle présente également certaines limites. Tout d'abord, la faible productivité est un inconvénient, car cette méthode est généralement adaptée aux petites échelles de production. De plus, la génération de chaleur pendant le processus d'homogénéisation peut entraîner la dégradation de certains composés sensibles à la chaleur, ce qui nécessite une gestion appropriée de la température lors de l'homogénéisation (Håkansson, Trägårdh, & Bergenståhl, 2009; P. Siva & Ho, 2022; Yong, Song, & Choo, 2021).

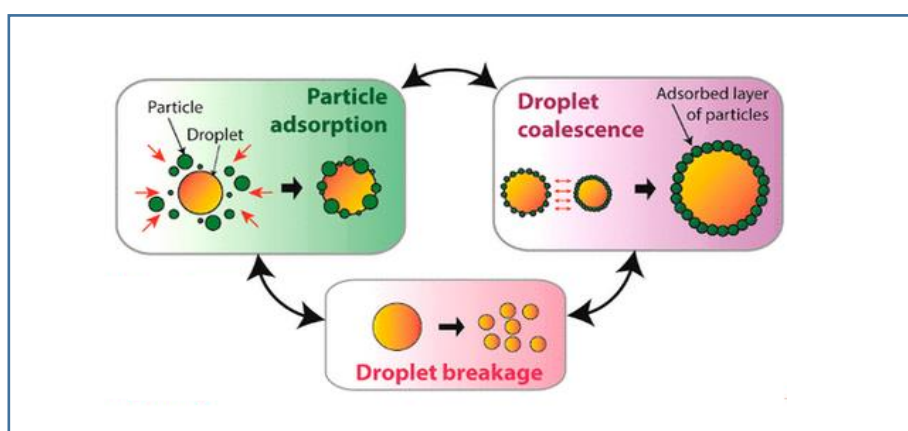


Figure 11 : Les 3 étapes de l'homogénéisation de haute pression : fragmentation (Droplet breakage), coalescence et adsorption.

Source : (P. Siva & Ho, 2022)

#### 4.3. Coacervation complexe

La coacervation complexe a été observée pour la première fois il y a près d'un siècle. Elle a suscité un grand intérêt en raison de sa capacité à former des structures complexes et à encapsuler des substances actives. Elle se définit comme une séparation de phase liquide-liquide et se produit dans des solutions contenant des macromolécules telles que des

protéines, des polysaccharides, des polymères et des colloïdes de charges opposées. Ces macromolécules peuvent s'associer suite à des interactions électrostatiques entre leurs charges opposées, conduisant à la formation de deux phases : le coacervat et le surnageant. Le coacervat est constitué d'une phase liquide concentrée en macromolécules, tandis que le surnageant est moins concentré (Figure 12). Les macromolécules peuvent également interagir par des forces hydrophobes ou des liaisons hydrogène qui facilitent davantage la coacervation complexe.

Les propriétés des coacervats dépendent à la fois des composés macromoléculaires, ainsi que des conditions environnementales telles que le pH et la force ionique de la solution.

La coacervation complexe impliquant des polyélectrolytes ou des combinaisons protéine-polysaccharide est largement présente dans la littérature (Devi, Sarmah, Khatun, & Maji, 2017; Schmitt & Turgeon, 2011). Dans ce rapport, nous nous concentrons sur la coacervation du complexe hétéroprotéique (HCC) impliquant la combinaison de deux protéines.

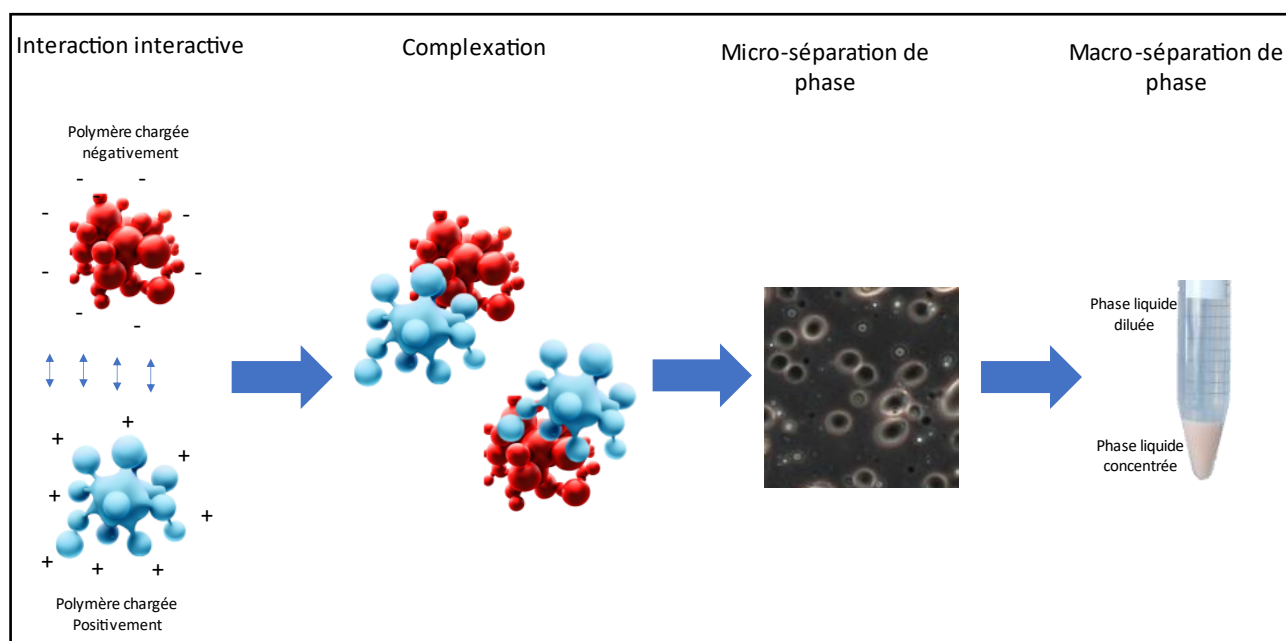


Figure 12 : Schéma d'une coacervation complexe

#### *4.3.1. La coacervation complexe hétéroprotéique*

La HCC est un phénomène spécifique de la coacervation complexe où les coacervats sont formés par l'association de deux protéines ayant des charges électriques opposées. Les protéines partagent des caractéristiques similaires aux molécules amphiphiles en raison des propriétés chimiques de leurs chaînes d'acides aminés. Cela entraîne une distribution hétérogène de charges électriques à la surface des protéines, créant une anisotropie de surface spécifique au niveau moléculaire, leur permettant d'interagir avec des molécules de natures différentes, qu'elles soient hydrophobes, hydrophiles ou chargées (Bouhallab & Croguennec, 2014).

La HCC résulte principalement des interactions électrostatiques entre les charges opposées des protéines, et la formation des coacervats dépend de l'équilibre spécifique entre les interactions coulombiennes (électrostatiques). En l'absence de cet équilibre, les protéines peuvent former soit un précipité amorphe et des agrégats, soit rester en solution (Bouhallab & Croguennec, 2014). La HCC est strictement conditionnée par un pH étroit, généralement situé entre les points isoélectriques des deux protéines, et elle est fortement influencée par la force ionique, la concentration et la stœchiométrie protéique (voir la revue (Croguennec, Tavares, & Bouhallab, 2017)).

Au fil du temps, divers systèmes de protéines alimentaires de sources animales telles que les protéines du lait (caséines, protéines de lactosérum) ou les protéines d'œuf (lysozyme ou ovalbumine), ou de sources végétales telles que les protéines de soja ou de pois ont été étudiés pour la HCC. En revanche, les conditions expérimentales de la HCC peuvent varier en fonction des protéines utilisées, ce qui représente un défi dans l'utilisation des protéines dans les technologies d'encapsulation (Matalanis, Jones, & McClements, 2011).

Dans ce document de thèse, nous allons nous intéresser uniquement à la HCC impliquant deux protéines : la lactoferrine (LF) et la beta lactoglobuline (BLG).

#### *4.3.2. Les deux protéines impliquées dans la coacervation complexe*

##### *4.3.2.1. La lactoferrine (LF)*

La LF est une glycoprotéine de la famille des transferrines avec une propriété spécifique de fixation du fer. La LF possède un point isoélectrique de 8,6-8,9 et porte une charge nette

positive à pH neutre. La LF est composée de 689 AA, organisés en deux lobes homologues (C et N lobes), pour un poids moléculaire total de 83 kDa. Ses charges électriques sont inégalement réparties sur sa surface : de grandes charges positives sont situées sur le lobe N et dans la région inter-lobe (Figure 13). Selon le niveau de saturation en fer, trois formes différentes de la LF existent : la forme apo (saturation en fer < 5%), la forme holo (entièrement saturée) et la forme native (15-20% de saturation en fer) (Bokkhim, Bansal, Grøndahl, & Bhandari, 2013). À pH neutre et à faible force ionique, la LF, principalement monomère, est chargé positivement. La LF interagit fortement avec différentes protéines acides dans certaines conditions physiologiques (Croguennec et al., 2017).

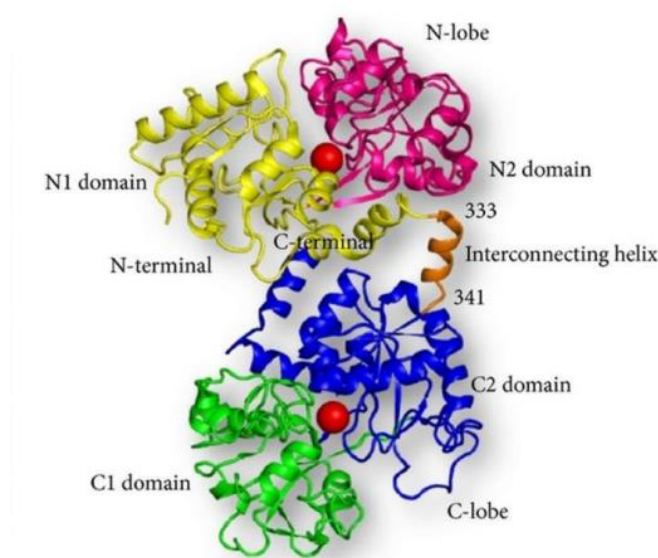


Figure 13 : Structure tertiaire de la lactoferrine liant à deux atomes de fer (sphères rouges).  
Image issue de (Sharma, Sinha, Kaushik, Kaur, & Singh, 2013)

#### 4.3.2.2. La beta-Lactoglobuline (BLG)

La BLG est la principale protéine composant le lactosérum du lait de vache, atteignant environ 50% de sa masse totale. Elle est composée de 162 acides aminés, pour un poids moléculaire total de 18,3 kDa. La BLG est une protéine acide avec un point isoélectrique de 5,1-5,2 (Farrell et al., 2004). La température de dénaturation de cette protéine est d'environ 75°C et la cystéine libre présente dans la structure joue un rôle crucial dans la thermostabilité, la dénaturation et l'autoagrégation de la protéine.

La BLG appartient à la famille des lipocalines en raison de sa capacité à lier une variété de petits ligands hydrophobes. En ajustant l'état d'association de la BLG, différentes fonctionnalités peuvent être obtenues avec cette protéine de lactosérum polyvalente, en

particulier en ce qui concerne les propriétés de gélification et de liaison. En solution aqueuse, les feuillets  $\beta$  (Figure 14) forment un calice bien défini, qui constitue un site de liaison idéal pour les ligands hydrophobes (Croguennec et al., 2017) .

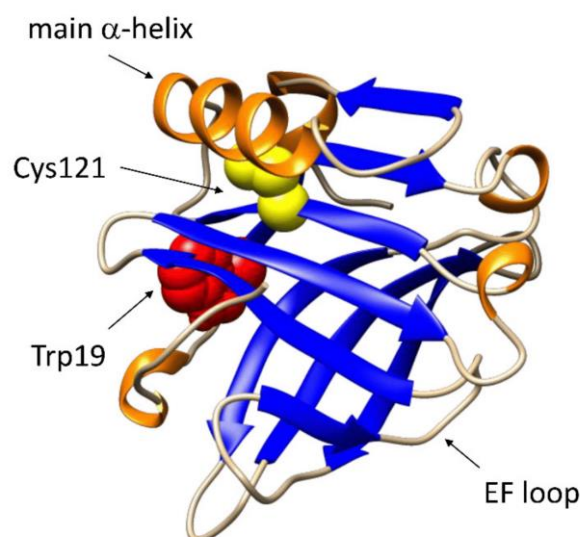


Figure 14 : Caractéristiques de la structure native de BLG.  
 Cys121 (en jaune) est caché sous l'hélice alpha principale (en orange) ; Trp19 (en rouge) est situé au fond du calice en forme de barillet (en bleu).  
 Source : (Barbiroli, Iametti, & Bonomi, 2022)

#### 4.3.3. Facteurs influençant la formation de la coacervation complexe

Les HCC, constitués de protéines globulaires de charge opposée, correspondent à un équilibre spécifique d'interactions électrostatiques. Les coacervats sont observés dans des plages très étroites de pH, de concentration des protéines, de force ionique et de stœchiométrie des protéines qui seront détaillées ci-dessous

##### 4.3.3.1. pH

La coacervation complexe se forme généralement dans une plage de pH intermédiaire situé entre les deux points isoélectriques (PI) des deux protéines, même si, en raison de l'anisotropie de charge des protéines, une complexation pourrait théoriquement se former lorsque les protéines portent la même charge nette. La charge de la surface d'une protéine dépend principalement de son PI et du pH du solvant, qui contrôle la protonation et la déprotonation des groupes amino et carboxyle de la chaîne latérale. Par conséquent, l'ajustement du pH peut

contrôler efficacement l'interaction électrostatique entre les deux protéines en présence (Croguennec et al., 2017; Zheng, Tang, & Sun, 2020).

Concernant les deux protéines BLG et LF, plusieurs études ont évalué l'effet du pH sur la formation de coacervats (Anema & de Kruif, 2014; Lund & Jönsson, 2005; G. M. Tavares, Croguennec, Hamon, Carvalho, & Bouhallab, 2015; Yan et al., 2013). Des coacervats LF/BLG se sont formés dans une plage de pH comprise entre 5 et 6,5.

#### *4.3.3.2. Concentration des protéines et rapport de concentration*

Si l'ajustement du pH contrôle la protonation et la déprotonation des groupes amino et carboxyle des chaînes latérales des protéines, le rapport de protéines agit sur la proportion de ces groupes. Par conséquent, le rapport de mélange des hétéroprotéines joue un rôle important dans le contrôle de l'équilibre de charge entre les protéines. La coacervation complexe se produit généralement dans une plage de composition étroite centrée sur la neutralité stœchiométrique (G. M. Tavares et al., 2015).

La concentration totale en protéines affecte de manière significative la distance intermoléculaire, modifiant ainsi l'énergie potentielle d'interaction et la cinétique d'assemblage entre les protéines. À des faibles concentrations de protéines, la turbidité augmente lentement et des précipités complexes se produisent. À des concentrations moyennes de protéines, la turbidité augmente instantanément pour atteindre une valeur maximale, puis elle diminue lentement, point auquel des coacervats seront observés (Croguennec et al., 2017).

Concernant les deux protéines LF et BLG, des coacervats ont été observés à de faibles concentrations protéiques. La disparition des coacervats à haute concentration protéique est liée à l'auto-agrégation des BLG conduisant à une déplétion progressive des BLG libres (Chapeau et al., 2015).

#### *4.3.3.3. La force ionique*

La coacervation complexe entre la LF et la BLG s'avère très sensible à la force ionique et se produit pour des valeurs faibles car la diminution de la force ionique augmente la force de l'interaction entre LF et BLG. Les sels affaiblissent donc les interactions électrostatiques. Le processus de coacervation complexe dépend donc de la force ionique et diminue progressivement en augmentant la force ionique jusqu'à disparition totale au-delà de 100mM



de NaCl. Une fois les coacervats formés, les protéines impliquent des interactions autres que les liaisons électrostatiques. Les liaisons d'hydrogènes et les interactions hydrophobes expliquent la forte quantité de sel nécessaire pour dissocier les coacervats, supérieure à la quantité de sel qui empêche leur association (Croguennec et al., 2017).

#### 4.4. Exemples d'encapsulation des huiles essentielles

Dans la section suivante, nous présentons une compilation de publications récentes sur l'encapsulation des HEs par les deux méthodes d'encapsulation la nano-émulsion et la coacervation complexe, tout en explorant l'effet de cette encapsulation sur leurs propriétés.

##### 4.4.1. Par nano-émulsion

Plusieurs publications ont étudié l'encapsulation des HEs par nano-émulsion (cf Figure 15). Le Tableau 4 ci-dessous récapitule dix études portant sur la nano-émulsion des HEs et son impact sur leurs propriétés antibactériennes et antioxydantes. La nano-émulsion a amélioré les activités antibactérienne et antioxydante des HEs indépendamment de leur nature, des émulsifiants utilisés et des techniques de nano-émulsion employées.

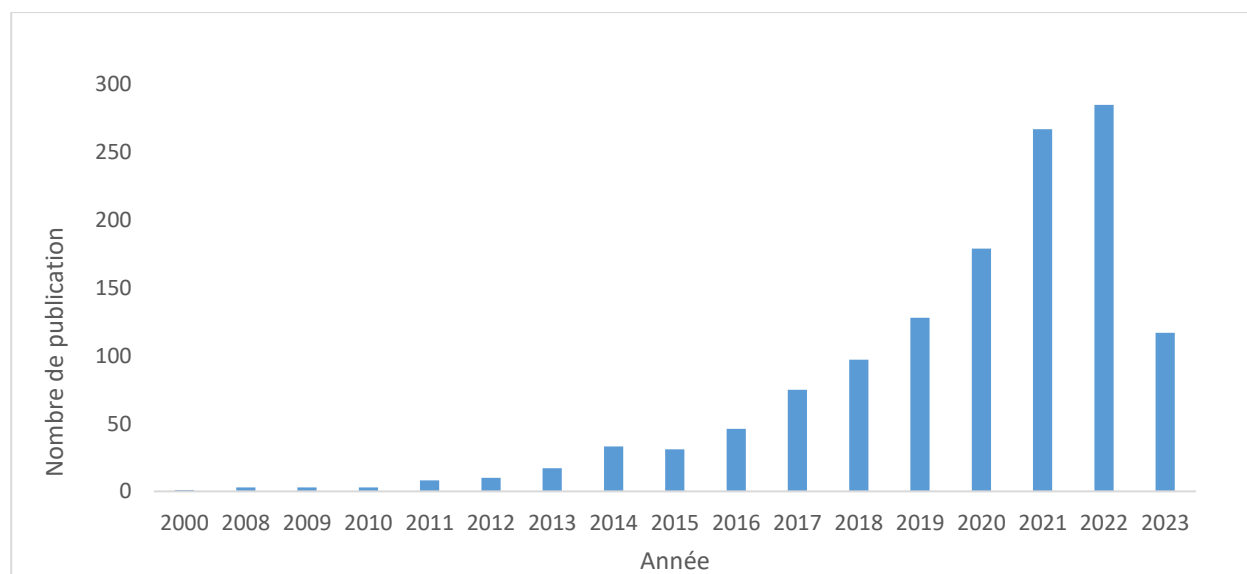


Figure 15 : Graphique de répartition du nombre d'articles contenant « nanoemulsion essential oil» selon l'année de publication (2000-2023).  
Source : Webofscience.com

Tableau 4 : Liste des 10 publications récentes sur la nano-émulsion des HEs et sur son effet sur l'amélioration de leurs propriétés biologiques.

HEs encapsulées	Méthodes d'encapsulation	Résultats	Source
<i>Citrus reticulata</i>	Solution d'alginate de sodium + Tween 80 + eau + HE (0.5%) + CaCl <sub>2</sub> + agitation	Amélioration des activités antibactériennes Cytotoxicité plus faible Effets antibiofilm plus élevés	(Torshabi, MoadabShoar, & Negahban, 2023)
<i>Satureja sahendica</i> Bornm	Eau + HE + Tween 80 (rapport massique 510:89:1) + homogénéisateur à ultrasons	Amélioration des activités antibactériennes et antioxydantes	(Gholamhosseinpour, Hashemi, & Jafarpour, 2023)
<i>Humulus lupulus</i>	HE + 0.5% Tween 80 + tampon de phosphate + Homogénéisation à haute pression	Amélioration des activités antifongique « <i>Fusarium graminearum</i> »	(Jiang, Zhong, Schwarz, Chen, & Rao, 2023)
<i>Ocotea indecora</i>	Eau 96% + 2% d'HE + 2 % des tensioactifs polysorbate 20 et monooléate de sorbitan. Agitation continue.	Diminution de plus de dix fois de la concentration fongistatique de l'HE	(Pinto et al., 2023)
<i>Carlina acaulis</i>	6% HE +2% oléate d'éthyle + 3 % de polysorbate 80. Homogénéisation à haute pression	Augmentation de l'efficacité pour contrôler les nématodes dans les racines infestées de tomates.	(Ntalli et al., 2023)
<i>Artemisia dracunculus</i>	2% HE + 6% de tween 20 + eau 5000 µL) + agitation	Amélioration des activités antibactériennes	(Osanloo et al., 2022)
<i>Piper nigrum</i>	10 % d'HE + 20% de Tween 80 Processus d'inversion de phase	Amélioration des activités antibactériennes <i>in vitro</i> et dans la viande	(Hien & Dao, 2021)
<i>Caryophyllus aromaticus</i>	1% HE et 3% de Tween 80 Méthode de la microfluidisation	Amélioration des activités antibactériennes	(Pilong, Chuesiang, Mishra, & Siripatrawan, 2022)
<i>Zanthoxylum piperitum</i>	Homogénéisation à haute pression	Amélioration des activités antibactériennes Aucune modification sur l'activité antioxydante	(Shi, Zhang, Chen, & Wang, 2022)
<i>Citrus spp</i>	Homogénéisation à haute pression	Amélioration des activités antibactériennes	(Kang, Chen, Zhou, Ullah, & Liang, 2022)

#### 4.4.2. Par coacervation complexe

Plusieurs publications se sont intéressées à l'encapsulation des HEs par coacervation complexe (Figure 16). Il convient de souligner qu'aucune étude sur l'encapsulation des HEs par HCC n'a été répertoriée dans la littérature scientifique. Toutes les études d'encapsulation des HEs utilisent généralement un polysaccharide associé à une protéine. Parmi les polysaccharides étudiés pour leur capacité à encapsuler efficacement les HEs, on retrouve notamment l'alginate de sodium, les fibres alimentaires et la gomme arabique souvent combinés à des isolats de protéines alimentaires ou de la gélatine. Le Tableau 5 ci-dessous résume dix études sur la coacervation complexe des HEs

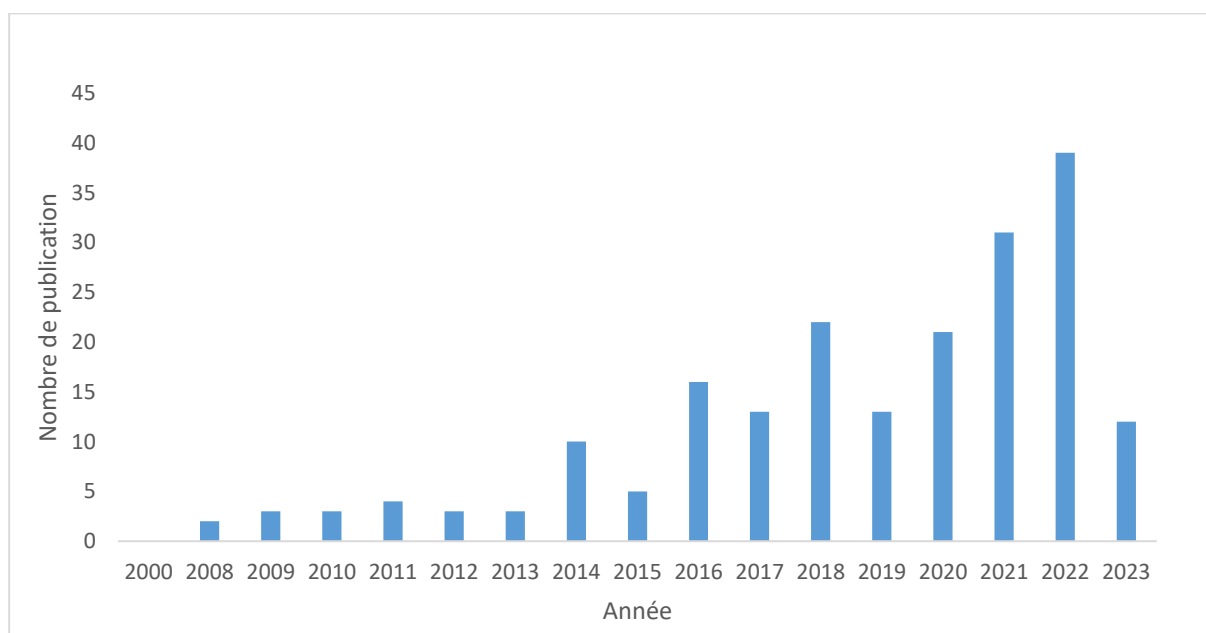


Figure 16 : Graphique de répartition du nombre d'articles contenant « complexe coacervation » et « essential oil » selon l'année de publication (2000-2023).

Source : Webofscience.com

Tableau 5 : Liste des 10 publications récentes sur la coacervation complexe des huiles essentielles et son impact sur leurs propriétés.

HES encapsulées	Macromolécules + Rendement d'encapsulation	Effet de l'encapsulation	Source
<i>Rosa spp.</i>	Isolat de protéines de périlla + alginate de sodium. Rendement = 88.26%	Meilleure stabilité thermique Amélioration de la capacité antibactérienne. Amélioration des effets conservateurs sur la viande.	(Qiu, Zhang, Adhikari, & Chang, 2023)
<i>Origanum vulgare</i> L. subsp. <i>hirtum</i>	Isolat de protéines de chanvre-gomme arabique Rendement = 90%	Préservation de l'activité antioxydante et antibactérienne	(Plati & Paraskevopoulou, 2023)
<i>Origanum spp.</i> , <i>Sinapis spp.</i> , <i>Citrus paradisi</i> et <i>Citrus limon</i> ,	Isolat de protéines de chanvre-gomme arabique Rendement entre 35% et 50%	Meilleure activité antibactérienne (exception pour l'origan)	(X. Liu, Xue, & Adhikari, 2023)
<i>Origanum vulgare</i>	Gélatine + mucilage de chia + séchage par atomisation Rendement > 80 %.	Application comme vecteur d'administration des ingrédients actifs	(Hernández-Nava, López-Malo, Palou, Ramírez-Corona, & Jiménez-Munguía, 2020)
<i>Rosa spp.</i>	Isolat de protéine de haricot + mungo-pectine d'écorce d'abricot Rendement > 87 %.	Amélioration de la capacité antioxydante	(Qiu, Zhang, Adhikari, & Chang, 2022)
<i>Piper Sichuanense</i>	Isolat de protéines de soja + fibres alimentaires solubles Rendement = 91.33 %.	Amélioration de la stabilité thermique et de l'activité antibactérienne	(Chen, Zhang, Adhikari, & Wang, 2022)
<b>Carvacrol</b>	Isolat de protéine de farine de noix + gomme arabique Rendement = 90 %.	Forte capacité antioxydante et antibactérienne	(Sun, Cheng, Zhang, & Zang, 2022)
<i>Piper Sichuanense</i> , <i>Zingiber spp.</i> et <i>Illicium verum</i>	Isolat de protéine de quinoa + gomme arabique Rendement > 82 %.	La stabilité des trois HES a été considérablement améliorée	(Chen, Zhang, Mujumdar, & Wang, 2023)
<i>Zataria multiflora Boiss</i>	Gélatine + gomme arabique Rendement 78 %.	Amélioration de la capacité antioxydante et antibactérienne	(Khatibi, Ehsani, Nemati, & Javadi, 2021)
<i>Thymus spp.</i>	Gomme de cajou + gélatine Rendement 70.9 %.	Amélioration de la capacité antibactérienne	(Gonçalves, Duarte, Prata, & F. Rodrigues, 2021)



## Question de recherche et stratégie générale



## Questions de recherche et stratégie générale

Ma thèse est réalisée dans le cadre du projet interdisciplinaire MilkQua dont l'objectif majeur est d'améliorer la qualité et la sécurité des produits laitiers, en réduisant l'utilisation des antibiotiques dans les exploitations laitières. L'ambition de ce projet est entre autres de développer de nouvelles molécules « acceptables » et utilisables en élevage afin de diminuer l'usage des antibiotiques. L'objectif général de ma thèse est d'explorer l'utilisation potentielle d'HEs dans le traitement des mammites subcliniques chez les vaches laitières. Pour atteindre cet objectif, nous avons conduit une série d'expérimentations *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* pour évaluer les effets biologiques des HEs issues de plantes méditerranéennes sélectionnées par le consortium du projet MilkQua.

Trois axes principaux de recherche forment les trois chapitres de ce manuscrit (cf Figure 17). Un premier travail a été réalisé pour étudier l'effet de l'application locale de l'HETC sur les quartiers des vaches atteintes de mammites subcliniques, en vue d'évaluer son impact sur l'inflammation et la qualité du lait. Cette première expérimentation comprend des évaluations de la composition physico-chimique et nutritionnelle du lait et de la composition microbienne du lait et de la peau, ainsi que des mesures d'indicateurs inflammatoires dans le lait et le sang des vaches laitières. Cette étude nous a permis d'évaluer les propriétés antibactériennes et anti-inflammatoire de l'HETC *in vivo* sur des vaches présentant des signes de mammites subcliniques.

Dans un deuxième temps, en lien avec les résultats de la première étude, nous nous sommes orientés vers l'exploration des propriétés anti-inflammatoires et antibactériennes *in vitro* d'un ensemble d'HEs, comprenant l'HETC et son principal composé, le carvacrol. Des travaux menés dans le cadre du consortium MilkQua ont permis d'évaluer les effets anti-inflammatoires de 8 HEs sur le modèle cellulaire des macrophages humains THP-1 dotés d'un rapporteur NF- $\kappa$ B. En tenant compte des approches et des premiers résultats de ce travail, nous nous sommes concentrés spécifiquement sur l'étude des effets de l'HETC sur des cellules PBMC isolées à partir du sang de vaches laitières saines. Cette technique d'isolation a été mise en place dans le centre de Recherche St Antoine (UMR S 938) dirigée par Dr Michele SABBAH.



Enfin, nous nous sommes focalisés à mettre en place deux méthodes d'encapsulation, à savoir la coacervation complexe hétéroprotéique (HCC) et la nano-encapsulation dans le but d'étudier les effets de ces techniques sur les propriétés antibactériennes du carvacrol au vu des études antérieures sur l'HETC en lien avec mon travail.

Un travail en annexe est présenté dans ce document de thèse. Cette partie n'était pas initialement prévu dans le projet. Il s'agit d'une étude que nous avons développée, reposant sur des pratiques innovantes d'aromathérapie pratiquées et soutenues par certains éleveurs en France et dans le monde.

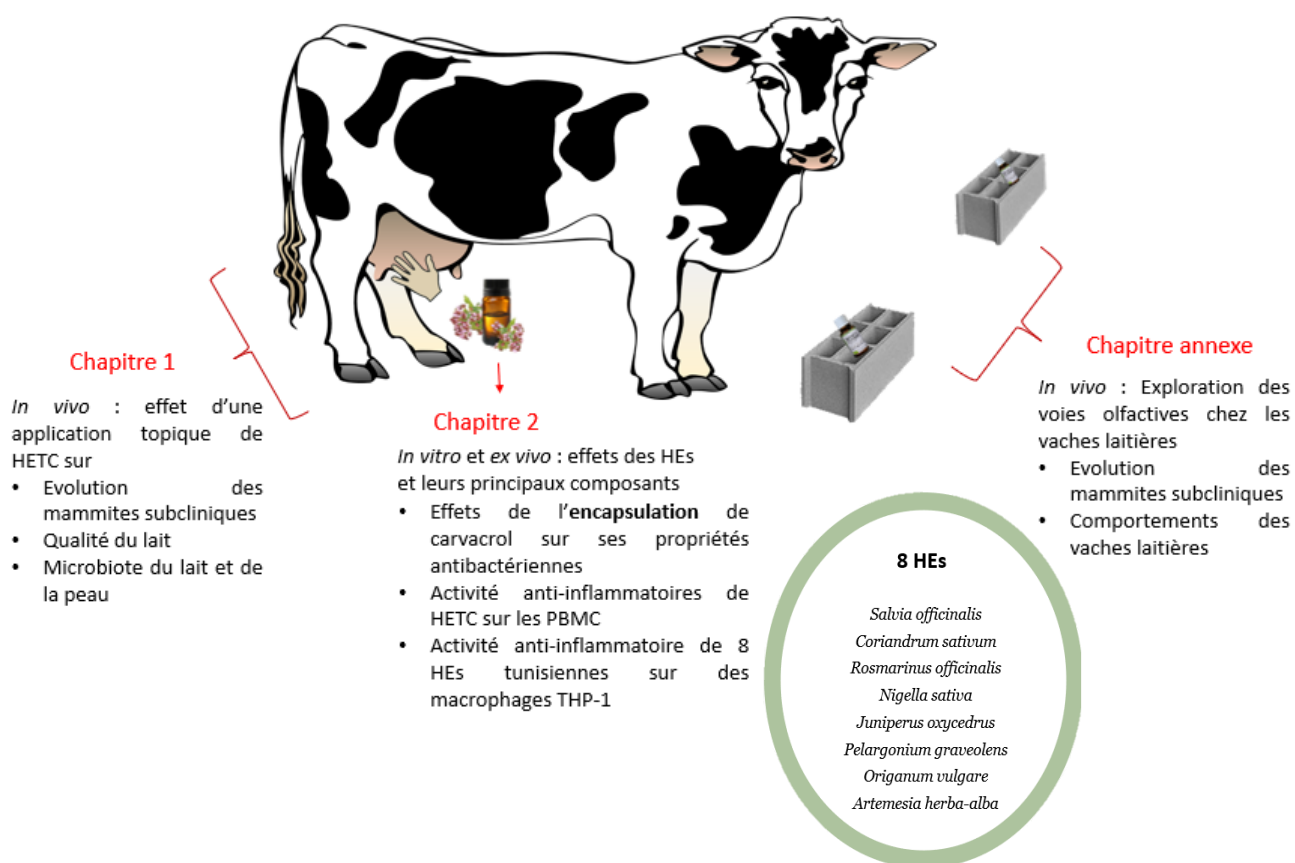


Figure 17 : Schéma récapitulatif de la stratégie générale.

HETC : Huile essentielle du thymus capitatus,

HEs : huiles essentielles,

PBMC : Cellules Mononucléaires du Sang Périphérique.

# Chapitre 1 : Effets d'une application cutanée de l'HETC sur l'inflammation et la qualité du lait chez les vaches atteintes de mammites subcliniques



## Chapitre 1 : Effets d'une application cutanée de l'HETC sur l'inflammation et la qualité du lait chez les vaches atteintes de mammites subcliniques

### 1. Introduction

L'objectif central de ce chapitre est d'évaluer les conséquences de l'application cutanée de l'HETC sur les quartiers des vaches laitières présentant des mammites subcliniques. Nous avons examiné l'impact de cette application sur plusieurs aspects, notamment l'inflammation de la glande mammaire, les microbiotes du lait et de la peau, ainsi que la qualité du lait.

En ce qui concerne les effets anti-inflammatoires de l'HETC, nous avons mesuré quatre biomarqueurs inflammatoires présents dans le lait : le CCS, la LF, l'interleukine 8 (IL-8) et l'haptoglobine (HP). Pour ce qui est des analyses du microbiote, nous avons utilisé le séquençage du gène 16S rRNA pour étudier les microbiotes du lait et de la peau. En parallèle, des méthodes classiques de culture bactériologique ont été employées pour l'analyse bactériologique du lait. En ce qui concerne la qualité du lait, nous avons évalué la composition en matière protéique et en matière grasse, réalisé des analyses lipidomiques et examiné les propriétés technologiques telles que la viscosité et le diamètre hydrodynamique des caséines. De plus, nous avons effectué des analyses sensorielles pour évaluer les caractéristiques organoleptiques du lait après l'application de l'HETC.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'Université de Milan qui a pris en charge les analyses des microbiotes du lait et de la peau ainsi que les analyses lipidomiques du lait.

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication intitulée « The effects of *Thymus capitatus* essential oil topical application on milk quality: a systems biology approach ». Elle a été soumise dans « Scientific report » en juillet 2023. Les principaux résultats et conclusions de ce travail sont synthétisés à la fin de ce chapitre.

### 2. Les effets d'une application topique de HETC sur la qualité du lait : une approche de biologie systémique

1 The effects of *Thymus capitatus* essential oil topical application on milk quality: a systems biology approach  
2  
3 Chiara Gini<sup>†1</sup>, Ralph Nehme<sup>†2,3</sup>, Elise Vanbergue<sup>2</sup>, Sergine Even<sup>3</sup>, Filippo Biscarini<sup>4</sup>, Sonia Andrés<sup>5</sup>, Lucie Rault<sup>3</sup>,  
4 Faustine Noel<sup>2</sup>, Valerie Hardit<sup>2</sup>, Said Bouhallab<sup>3</sup>, David M Pereira<sup>6</sup>, Riadh Ksouri<sup>7</sup>, Philippe Roussel<sup>2</sup>, Secundino  
5 López<sup>4,8</sup>, Paola Cremonesi<sup>4</sup>, Bianca Castiglioni<sup>4</sup>, Donatella Caruso<sup>9,10</sup>, Fiorenza Faré<sup>9,10</sup>, Manuela Fontana<sup>10</sup>,  
6 Fabrizio Ceciliani<sup>1</sup>, Latifa Abdennebi-Najar<sup>2,11\*</sup>.

7  
8 \* Corresponding author: [Latifa.najar@idele.fr](mailto:Latifa.najar@idele.fr)  
9

10 <sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

11 <sup>1</sup> Università degli Studi di Milano, Department of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Via dell'Università  
12 6, Lodi, Italy.

13 <sup>2</sup> Quality and Health Department, IDELE Institute, 149 rue de Bercy, 75595 Paris CEDEX 12, France.

14 <sup>3</sup> INRAE, Institut Agro, STLO, F-35042 Rennes, France.

15 <sup>4</sup> Institute of Agricultural Biology and Biotechnology, Department of Bioinformatics, Biostatistics, Genomics,  
16 IBBA-CNR, Milano, Italy.

17 <sup>5</sup> Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León, Finca Marzanas s/n, 24346 Grulleros, Spain.

18 <sup>6</sup> REQUIMTE/LAQV Laboratory of Pharmacognosy, Department of Chemistry Faculty of Pharmacy, University  
19 of Porto R Jorge Viterbo Ferreir 228, 4050-313 Porto, Portugal.

20 <sup>7</sup> Laboratory of Aromatic and Medicinal Plants, Biotechnology Center of Borj-Cédria, Hammam-Lif BP 901  
21 2050, Tunisia.

22 <sup>8</sup> Departamento de Producción Animal, Universidad de León, 24007 León, Spain.

23 <sup>9</sup> Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano, 20133 Milano,  
24 Italy.

25 <sup>10</sup> OMICs platform, Università degli Studi di Milano, 20133 Milano, Italy.

26 <sup>11</sup> Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Sorbonne University, INSERM UMR\_S\_938, 75020 Paris, France.

## 27    **ABSTRACT**

28    Essential oils (EO), are known for their antibacterial and anti-inflammatory properties. EO can be an  
29    alternative to reduce the use of antimicrobials in dairy cattle. While many studies have explored the  
30    beneficial properties of EO in vitro, their effects on milk quality and milk microbiota when applied directly to  
31    the udder skin remain relatively unknown. This study aimed to investigate the effects of *Thymus capitatus*  
32    EO (TCEO) on milk microbiota, lipidomic profile, quality, and inflammatory biomarkers in dairy cows. Udder  
33    skin microbiota was evaluated as well. Sixteen quarters from 12 Holstein cows were selected, and TCEO was  
34    topically applied to the udder skin twice daily for seven days. Milk and skin samples were collected before  
35    and after treatment for microbiota evaluation, lipidomic profiling, inflammatory biomarker quantification,  
36    and bacteriological analysis. The results showed no significant changes in microbiota composition due to EO  
37    treatment. TCEO had a limited impact on the milk lipidome, primarily affecting diacylglycerol components at  
38    T21. Inflammatory biomarkers, milk sensory properties, and quality were not affected by the treatment. Our  
39    study demonstrates that applying 10% TCEO on cow's quarters does not significantly alter milk quality or  
40    microbiota composition in milk and skin, suggesting its safe use in dairy cows.

41

## 42    **KEYWORDS**

43    Milk quality, essential oil, *Thymus capitatus*, microbiota, food safety.

44

## 45    **BACKGROUND**

46            Antimicrobial resistance (AMR) is a significant threat to humans and animals. In 2019 alone, AMR  
47    was responsible for 4.95 million deaths, and by 2050, it is expected to prematurely kill 10 million people  
48    annually (almost the 2020 rate of cancer deaths), with a consequent cost in terms of the economic output of  
49    3.4 trillion USD <sup>1</sup>. Although often unavoidable, antibiotic-based therapies are not always efficient, and the  
50    excessive use of antibiotics induces the development of AMR within the bacterial community <sup>2</sup>. Even though  
51    the interface of human-livestock AMR transmission is still discussed <sup>3</sup>, the WHO included it in the Sustainable  
52    Development Goals (SDGs) <sup>4</sup>. Alternative strategies and therapeutic approaches are required to reduce the

53 use of antibiotics in both humans and animals. Natural products, such as medicinal plants, essential oils (EO),  
54 and herbal extracts, are promising alternatives to antibiotics in animal husbandry <sup>5</sup>. Ethnoveterinary use of  
55 medicinal plants is already ongoing: for instance, 75% of small rural farms in the Eastern Cape Province of  
56 South Africa already use plants or herbal remedies to treat livestock <sup>6</sup>. This trend is expanding in developing,  
57 such as Ethiopia and Nepal, and developed countries, like Spain and Switzerland, among others <sup>7</sup>. The demand  
58 for these natural products is also increasing, especially in organic farms <sup>8</sup>, which currently occupy 1.6% of the  
59 world's agricultural lands, corresponding to 76.4 million hectares and a global market that reached 125 billion  
60 euros in 2021 <sup>9</sup>.

61 Several EO, like *Angelica sinensis*, *Gaultheria procumbens*, *Glycyrrhiza uralensis*, and *Thymus vulgaris*,  
62 which are commercialized as intramammary infusions (PhytoMast® <sup>10</sup>) or for external use (Master Mint ®),  
63 have been already included in animal husbandry routines <sup>11</sup>. Other EO, such as those extracted from  
64 *Lavandula angustifolia* and *Origanum vulgare*, were studied for their effects via intramammary infusion  
65 and/or external application at the quarter and demonstrated antibacterial activities against *Staphylococcus*  
66 spp, and *Streptococcus* spp <sup>12,13</sup>. In some cases, EO from *Origanum vulgare* and *Satureja montana* were  
67 investigated in their effects on milk, determining the antibacterial and antioxidant activity, as well as *Fumaria*  
68 *indica*, *Nepata cataria*, and *Adiantum capillus*, with promising results <sup>14,15</sup>.

69 However, to the best of the authors' knowledge, the literature is still poor in describing the effects  
70 of EO on milk quality and microbiological content, as well as their potential toxicity. This gap should be filled  
71 as lawmakers' organizations advocate responses to develop adequate regulations. The effects of EO at the  
72 systems biology level, including the microbiota, the metabolome/lipidome, and other omics, remain equally  
73 undisclosed <sup>16</sup>, although applying systems biology approaches to dairy science would likely provide critical  
74 information. This study focuses on the impact of *Thymus capitatus* essential oil (TCEO) topical application on  
75 the cows' mammary gland skin and milk. *Thymus capitatus* is a Mediterranean endemic and perennial shrub  
76 and ornamental plant that belongs to the *Lamiaceae* family <sup>17</sup>. Also known as *Satureja capitata* L.,  
77 *Coridothymus capitatus* (L.) Rchb. f., *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link, *Thymus marinosci* Ten., Spanish  
78 oregano or *Thymbra capitata* (L.) *Thymus capitatus* has been investigated for its essential oil's antioxidant,

antimicrobial, and antiviral properties <sup>18-26</sup>. When applied to the skin, TCEO seems to exert an anti-inflammatory function <sup>27</sup>, and this effect is worth investigating as well. This work aims to study in detail the impact of TCEO udder topical treatment on the milk and udder skin microbiota and on milk production and quality in a population of Holstein dairy cows. The milk quality assessment included sensory analysis and the evaluation of inflammatory markers in the milk.

84

85

## 86 **METHODS**

### 87 **Experimental design**

#### 88 *Animal selection and collection of milk samples*

Twelve Holstein cows, at the end of their lactation period, were selected in the INRAE experimental dairy farm of Méjusseume (Le Rheu, Brittany, France). The animals presented no clinical signs of infection and received no antibiotic treatment for at least 5 months before enrolment. Cows with recent clinical mastitis were not included in the study. The animals were divided into two groups (Control and Treated), similarly constituted considering the cows' parity. Cows had permanent access to pasture, and their diet was completed with 65% corn silage, 12.5% soybean 48 and 12.5% energy concentrate, and 10% alfalfa ad libitum (proportions are reported in % of dry matter). Milk was collected twice a day in a rotary milking parlor. Supplementary Table S1 presents the samples included in the experimental design, reporting animal parity, average somatic cell count (SCC), and microbiological results of the milk samples at the beginning of the study.

99

**Supplementary Table S1.** Table of data regarding animals selected for this study. Cows were identified with the code CT or TR depending on the belonging to the Control or Treated group, respectively, followed by an increasing group-dependent numbering. The samples were differentiated by adding a letter to the ID (A and B) in the cases of two quarters considered on the same animal.

104



Group	Control								Treated							
Animal ID	CT1A	CT1B	CT2A	CT2B	CT3	CT4	CT5	CT6	TR1A	TR1B	TR2A	TR2B	TR3	TR4	TR5	TR6
Parity	2			2	2	4	3	2	3			4	2	1	4	3
Average daily production in liters	25.3			14.1	16	18.1	21.5	21.8	17.2			13.9	21.9	21.2	24.6	16.5
Composite SCC × 10 <sup>3</sup> per ml	276			84	133	145	166	139	159			120	215	140	197	140
Microbiological content, number (cfu/ml)	Corynebacterium, >1 600	Corynebacterium, >1 600	CNS, >1 600	Microcococcus spp, 1 600	CNS, >1 600	CNS, >1 600	CNS, >1 600	CNS, >1 600	CNS, >1 600	CNS, 1 600	CNS, 83 0	CNS, 12 4	CNS, >1 600	CNS, >1 600	CNS, 1 600	CNS, 58 0

105

#### 106 Application of TCEO

107 A mixture of 0.5 g of TCEO was dissolved in 4.5 g of milking grease (Eutra, France) used as an excipient (10%  
108 TCEO in the mixing), was prepared beforehand, and stored in single-dose (5 g) opaque plastic containers at  
109 4°C. TCEO percentage was previously tested in a separate experiment, with 4 percentages of TCEO (2.5, 5,  
110 7.5, and 10%) applied on the udder: none of them caused the local or systemic reaction (data not shown),  
111 and therefore the highest concentration (10%) was chosen for this experiment. The mixture was applied after  
112 each milking (twice daily) for one week by massaging the udder manually while wearing rubber gloves. During  
113 the experimental period, the Treated group (6 cows; 8 quarters) was massaged with the mixture, while the  
114 Control group (6 cows; 8 quarters) was massaged with milking grease only.

115

#### 116 Milk sample collection

117 Milk was collected aseptically at days 0, 7, 21, and 28 (hereafter referred to as T0, T7, T21, and T28) before  
118 morning farm milking: after eliminating the first three foremilk streams of milk, teats were disinfected using  
119 70% alcohol<sup>28</sup>. Part of the collected samples was used immediately for analysis (SCC, bacteriological analysis,  
120 fat and protein content, casein micelles, and sensory analysis). The viscosity analysis, IL-8, Acute Phase  
121 Proteins (Haptoglobin (Hp) and Lactoferrin (LF), microbiota, and lipidome analysis were determined on milk  
122 after storage at -80° C.

123

#### 124 *Skin samples collection for microbiota determination*

125 The selected quarters were wiped with a humid tissue, then dried. Before milking and using a skin swab (R.  
126 Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Germany), an area of 1 cm<sup>2</sup> of the quarter was rubbed by slightly  
127 rotating the swab through an angle of 45° for 10 seconds. The skin microbiota was collected twice on T0,  
128 before TCEO application (T0A), after TCEO application (T0B), and once on T7. Further collections were  
129 avoided to circumvent environmental influence on the experiment.

130

#### 131 **Microbiota analysis**

132

#### 133 *Bacteriological Analyses*

134 Bacteriological cultures were performed according to the National Mastitis Council guidelines  
135 (<https://www.nmconline.org/nmc-protocols-guidelines-and-procedures/>). A composite sample of 10 ml of  
136 milk from the Treated udders was collected in a labeled aseptic container at T0, 7, 21, and 28. Briefly, cultures  
137 were incubated for 24 hours at 37 °C under aerobic conditions on blood agar (Columbia Agar containing 5%  
138 defibrinated sheep blood) for 48 hours at 37 °C under aerobic conditions. Gram stain, coagulase, catalase,  
139 and oxidase assays were performed on positive cultures. *Staphylococcus* spp. coagulase detection was  
140 performed with rabbit plasma <sup>29</sup>.

141

#### 142 *DNA extraction and 16S rRNA-gene sequencing of milk and skin microbiota*

143 DNA from milk samples was extracted following the protocol proposed by <sup>30</sup>. DNA from skin swab samples  
144 was extracted using a QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany), with minor modifications  
145 according to the manufacturer's protocol. The skin swabs requested to be dissolved in 200 µL of CD1 solution  
146 in the PowerBead Pro Tube and vortex on the TissueLyser II instrument (Qiagen, Hilden, Germany) for 3 min  
147 at maximum speed. In both cases, blank Controls (i.e., no DNA template added to the reaction) were  
148 performed, and DNA quality and quantity were assessed using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer  
149 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Sequencing for milk and skin samples was performed as

150 previously reported, with primers targeting the V3-V4 hypervariable regions of the 16S rRNA gene (forward:  
151 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3', reverse: 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')<sup>31</sup>. The 16S rRNA gene raw  
152 sequences obtained were deposited in UNIMI Dataverse.

#### 153 154 *Bioinformatic processing and statistical analysis of milk and skin microbiota*

155 After demultiplexing, paired-end reads from 16S rRNA-gene sequencing were quality-checked using the  
156 software package MultiQC<sup>32</sup>. Subsequently, analyses were performed using QIIME 1.9<sup>33</sup>, retrieved as a  
157 container used through Singularity<sup>34</sup> from the Docker hub (<https://hub.docker.com/r/fischuu/qiime-1.9.1>).  
158 The following steps and parameters were previously described by<sup>35</sup>. The SILVA database v. 132 was used for  
159 closed-reference Operational taxonomic unit (OTU) identification and quantification, with 97% cluster  
160 identity<sup>36</sup>. Quantified and classified OTUs were assembled into an OTU table from which OTUs with a total  
161 count lower than 10 in fewer than 2 samples were discarded: samples containing less than 500 reads per  
162 sample were discarded. Before downstream analysis, OTU counts were normalized for uneven sequencing  
163 depth by cumulative sum scaling (CSS,<sup>37</sup>).

#### 164 165 *Alpha- and beta-diversity of milk and skin swab samples*

166 The milk and skin microbial diversity was assessed within- (alpha diversity) and across- (beta diversity)  
167 samples with the adaptations required by the dataset as previously described in<sup>38</sup>. Briefly, filtered and  
168 normalized OTU tables (at the OTU level) were used to estimate all alpha and beta diversity indices. Within-  
169 sample microbial richness and diversity were calculated using Chao1, ACE, Shannon, Simpson and  
170 InvSimpson, Fisher, and Shannon indices for alpha diversity. On the other hand, Bray-Curtis dissimilarities  
171 were calculated to quantify the across-sample microbiota diversity<sup>39</sup>. Permutational analysis of variance  
172 approach (999 permutations<sup>40,41</sup>), as used to evaluate non-parametrically among groups (Treated vs. Control)  
173 and pairwise Bray-Curtis dissimilarities. OTU counts, and diversity indices derived were corrected for a  
174 baseline set on the first time point (T0) before statistical analysis, considering that samples at T0 cannot be  
175 affected by TCEO as no treatment was applied to quarters assigned to the Treated or Control groups.

176

177 *Statistical models for milk and skin samples microbiota analysis*

178 Differences between groups (Treated vs Control) along time points in terms of OTU abundances and diversity

179 indices were evaluated with the three following linear models:

180  $y_{ik} = \mu + \text{time point}_k + e_{ik},$  (1)

181  $y_{ij} = \mu + \text{treatment}_j + e_{ij},$  (2)

182  $y_{ikj} = \mu + \text{time point}_k + \text{treatment}_j + e_{ikj}$  (3)

183 where  $y_{ikj}$  is the abundance (counts) or index value for each taxonomy (OTU) and alpha and beta diversity  
184 metric per quarter i in time point k and treatment j; time point<sub>k</sub> is the effect of the categorical variable time  
185 point (4 classes); treatment<sub>j</sub> is the effect of the categorical variable treatment (2 classes);  $e_{kj}$  are the residuals  
186 of the model. Model (1) focuses on the influence of time on the milk and skin microbiota, while model (2)  
187 focuses on the effect of treatments: model (3) takes into consideration both time and treatment effects,  
188 allowing for an adjusted assessment of OTU counts and alpha diversity index values in the milk and skin  
189 microbiota.

190

191 **Milk quality**

192

193 *Fat and protein content*

194 Composite (four glands) milk samples (50 ml) from the whole milk were collected twice a week for 2 weeks  
195 before and 5 weeks after the first application of T0 during the morning milking to determine the proteins  
196 and fats content using Milkoscan<sup>TM</sup> (Foss electric, Hillerød, Denmark).

197

198 *Hydrodynamic diameters of casein micelles*

199 Particle size analysis of casein micelles was performed using Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Malvern,  
200 UK). Six samples of fresh milk were chosen randomly at T21 (3 from Treated quarters and 3 from the Control  
201 group) and were first skimmed by centrifugation at 4°C and filtered (0.8 µm pore size), then diluted 1/100

202 (v/v) in protein-free ultrafiltration permeate of the same milk. The refractive index used was 1.57, and the  
203 absorption index was 0.001 [32]. Every measurement was repeated 6 times.

204

#### 205 *Milk viscosity*

206 The viscosity measurements were carried out on skimmed (by centrifugation at 4°C) thawed milk at T0, 7, 21,  
207 and 28 from 4 randomly chosen samples (2 from the Control group and 2 from the Treated group) according  
208 to the method of <sup>42</sup>. Flow measurements were performed using a Low Shear 400 viscometer (Lamy Rheology,  
209 Champagne au Mont d'Or, France) using a Couette geometry (inner and outer radii = 5.5 and 6.0 mm  
210 respectively, shear rate = 2–120 s<sup>-1</sup>) at 20 °C.

211

#### 212 *Sensory analysis*

213 A panel of experts conducted the sensory evaluation of the milk to characterize the organoleptic quality of  
214 milk, selected, trained, and Controlled according to NF ISO 8586-2 and NF ISO 22935 (1, 2, 3). The sensory  
215 evaluation session was carried out on fresh whole milk or pasteurized milk of all the quarters collected on T7  
216 (stored and transported at 4°C). Pasteurization was achieved by heating the milk to the boiling point (100° C)  
217 for 5 minutes. The pasteurized milk was then served at a temperature between 40°C and 50 °C. Pasteurized  
218 and fresh milk were characterized by the visual and olfactory aspects, and only pasteurized milk was  
219 characterized by the taste aspects. In particular, the panelists rated the odours and aromas perceived in these  
220 products. They noted their intensity on a continuous scale scored from 0 to 10, where 0 refers to no  
221 perception of TCEO and 10 to an extremely high perception of TCEO. The sensory analysis proceedings and  
222 the room organization were previously described by <sup>43</sup>.

223

#### 224 *Lipidomic analysis*

225

##### 226 *Preparation of Milk Samples for Lipidomic Analysis: Lipid Extraction*

Two aliquots (100 µL) from each sample were added with internal standards (Splash™ Lipidomix® Internal Standards Avanti® Polar and a mix of 13C-Palmitic and 13C-Linoleic Acids at 50 µg/mL) extracted and separated as previously described [50]. Electrospray ionization and mass spectrometer conditions were set as presented in Supplementary Table S2.

**Supplementary Table S2:** ESI and mass spectrometer parameters.

Item	Lipidomic IDA POS	Lipidomic IDA NEG
Item	Lipidomic IDA POS	Lipidomic IDA NEG
Ionization	POS	NEG
Source temperature	350 °C	350 °C
Curtain Gas (CUR)	35	35
GS 1	55	55
GS 2	65	65
Ion Spray Voltage	4500 V	-4500 V
Declustering Potential (DP)	50 V	-50 V
Collision Energy	35V	-35V
Collision Energy Spread	15	15
TOF MS Mass Range	140-1500 Da	140-1500 Da
IDA acquisition Mass Range	50-1500 Da	50-1500 Da

*Lipid Data Processing and statistical analysis*

Data are expressed as the ratio of analyte to an internal standard area (1-phenoxy-2-propanol), and fatty acids are expressed as ng/mL of milk. Data processing was done using the untargeted data processing program MSDIAL (v. 4.24) with LipidBlast database (v. 68), as previously described by Ceciliani et al. <sup>44</sup>. This database contains 81 lipid classes, 377,313 molecules, and 554,041 spectra in positive polarity, and 94 lipid classes, 356,477 molecules, and 792,757 spectra in negative polarity. Statistical analysis was carried out using the MetabolAnalyst 5.0 Webtool, as previously described <sup>44</sup>. The analysis did not include variables containing more than 20% of missing values (i.e., values less than LOD) <sup>45</sup>. The Principal Component Analysis (PCA), the Partial Least-Squares Discriminant Analysis (PLS-DA), and the volcano plots and heatmaps were generated using MetaboAnalyst 5.0 web tool.

**Milk inflammatory parameters**

246

247 *Analysis of Acute Phase Proteins (APP) and Interleukin 8 in milk.*

248 Haptoglobin (Hp) and Lactoferrin concentration were measured using an in-house developed ELISA as  
249 previously described <sup>46</sup>. The inflammatory cytokine Interleukin 8 (IL-8) dosage in milk was carried out  
250 according to <sup>47</sup>. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 9.0.0 for Windows,  
251 GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)

252

253 *Somatic cell counts*

254 Composite (four glands) milk samples (50 ml) from the whole milk were collected twice a week for 5 weeks  
255 before and 5 weeks after the first application of T0 during the morning milking to perform the SCC using the  
256 flow cytometer Fossomatic (Foss electric, Hillerød, Denmark)

257

258 *Statistical analysis*

259 All data were expressed as mean  $\pm$  SEM. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.  
260 For the sensory analysis test, the levels of significance were determined using the Student's *t*-test. For the  
261 other milk quality parameters (Fat and protein content, hydrodynamic diameters of casein micelles and milk  
262 viscosity) one way ANOVA was used.

263 For the somatic cells count the levels of significance were determined using the (Type III ANOVA). For  
264 the IL-8 mesurmenets on way ANOVA vas used. For the other milk inflammatory parameters (APP and LF)  
265 two way ANOVA was used

266

267

## 268 **RESULTS**

269 The first part focused on analysing the microbial communities on skin and milk about TCEO treatment in a  
270 defined timespan, forerun by routine bacteriological analysis. The second part of the study was instead  
271 focused on determining if topical treatment with TCEO had any impact on milk quality by evaluating milk

272 composition, protein, and fat content (lipidomic), hydrodynamic diameters of casein micelles, milk viscosity,  
273 and sensory analysis. Related inflammatory parameters (including somatic cells, IL-8, and APP content) were  
274 presented in the final part.

275

276 **Part 1: Microbiota**

277

278 *MILK MICROBIOTA*

279

280 *Bacteriological Analysis of Milk Samples*

281 Table 1 presents the microbiological content of composite milk during the study and the total colony counts  
282 (cfu/mL). On day 28, no bacteria were identified in the milk of 4 quarters, 2 in each group. There were no  
283 statistically significant changes related to the TCEO application.

284

285 **Table 1:** Evolution of the bacteria species in milk from Control and Treated groups.

Quarter	Identification of the quarter	Day 0	Day 7	Day 21	Day 28
Control	CT1A	<i>Corynebacterium spp</i> (>1 600)	<i>Corynebacterium spp</i> (>1 600)	<i>Corynebacterium spp</i> (>1 600)	<i>Corynebacterium spp</i> (330)
	CT1B	<i>Corynebacterium spp</i> (>1 600)	<i>Corynebacterium spp</i> (>1 600)	<i>Corynebacterium spp</i> (>1 600)	<i>Corynebacterium spp</i> (330)
	CT2A	CNS(>1 600)	CNS (>1 600)	CNS (>1 600)	CNS (330)
	CT2B	<i>Micrococcus spp</i> (1 600)	Sterile	Sterile	Sterile
	CT3	CNS(>1 600)	CNS (>1 600)	CNS (>1 600)	CNS (>1 600)
	CT4	CNS (>1 600)	CNS (>1 600)	CNS (>1 600)	CNS (>1 600)
	CT5	CNS (>1 600)	CNS (>1 600)	Sterile	Sterile
	CT6	CNS (>1 600)	CNS (>1 600)	CNS (>1 600)	CNS (330)
Treated	TR1A	CNS (>1 600)	CNS (>1 600)	CNS (>1 600)	CNS (>1 600)
	TR1B	CNS (1 600)	Sterile	CNS (>1 600)	Sterile



---

TR2A	CNS (830)	CNS (332)	CNS (500)	CNS (332)
TR2B	CNS (124)	CNS (>1 600)	CNS (216)	CNS (34)
TR3	CNS (>1 600)	CNS (>1 600)	CNS (>1 600)	CNS (>1 600)
TR4	CNS(>1 600)	CNS (>1 600)	CNS (>1 600)	CNS (>1 600)
TR5	CNS (1 600)	CNS (>1 600)	CNS (>1 600)	CNS(1 330)
TR6	CNS (580)	CNS (332)	CNS (>1 600)	Sterile

---

CNS: coagulase-negative Staphylococci.

### *Microbiota analysis*

This part of the study determined the changes in the milk microbiota by meta-transcriptomics. Further in the text, the changes in skin microbiota after external topical treatment with EO are also presented.

### *Sequencing metrics of milk samples*

Sequencing the V3-V4 regions of the bacterial 16S rRNA gene of the 64 milk samples produced 2,871,971 assembled reads (joined R1-R2 paired-end reads). After quality filtering, 749,772 sequences were removed, leaving 2,122,199 sequences for subsequent analyses (77,4% average retention rate, maximum 99,9%, minimum 20,6%). On average, there were 33,159 ( $\pm 24,007$ ) sequences per sample in the Control group and 33,302 ( $\pm 23,780$ ) in the Treated group. The initial number of OTUs identified was 6,874; after filtering out OTUs with less than 10 counts in at least 2 samples, 1,880 distinct OTUs were left.

### *Milk core microbiota at phylum and genus level characterization*

Three main phyla were detected in the milk microbiota and shared within all the samples: *Actinobacteria* (11.7%), *Bacillota* (formerly named *Firmicutes*, 29.25%), and *Proteobacteria* (58.95%). At the genus level, 4 genera were detected as shared in the milk microbiota, including *Cutibacterium* (10,1%), *Halomonas* (8.31%), *Methylobacterium* (49.33%), and *Pseudomonas* (27.78%). The remaining 4.48% was composed of the "uncultured or unknown" group, which was artificially composed for the aim of the statistical analysis,

306 including all the genera that the database (SILVA v. 132) retrieved as "uncultured" or "uncultured bacterium"  
307 or "Other" or "uncultured organism" and similar.

308

309 *Alpha- and beta-diversities in milk microbiota*

310 The estimated alpha diversity indices for describing the richness, diversity, and evenness of the milk  
311 microbiota between the two experimental groups are reported in Supplementary Table S3. Once corrected  
312 for baseline equal to T0 (milk samples collected before treatment application), alpha indices were compared  
313 in 3 different linear models to assess their behavior i) over time points (within the group, equation (1)), ii)  
314 between treatments (within time point, equation (2)) and iii) between treatments accounting for a time point  
315 (equation (3)) as described in the materials and methods section. Figure 1 reports the scatterplots of i) the  
316 significance (P) of treatment at T7, T21, and T28 (Figure 1A), ii) the significance (P) of the time point within  
317 treatment (Figure 1B), iii) the significance (P) of time point and treatment from the model (3) (Figure 1C), for  
318 the different alpha diversity indices.

319

320 **Supplementary Table S3:** Alpha diversity values per index per time point for the microbiota of milk samples

321

Group	Time point	Observed	Chao1	Ace	Shannon	Simpson	Invsimpson	Fisher
Control	T0	470.2	563.2	552.1	4.9	0.9	50.8	128.1
	T7	374.8	461.4	452.7	4.5	0.9	43.9	100.0
	T21	291.2	361.2	347.6	3.4	0.8	12.1	69.8
	T28	203.3	248.3	243.2	3.1	0.8	12.0	43.1
Treated	T0	410.3	504.9	496.5	4.5	0.9	40.1	107.9
	T7	330.8	402.8	395.5	3.9	0.8	32.0	85.8
	T21	385.6	481.6	479.2	4.5	0.9	39.6	115.6
	T28	400.8	466.4	464.4	4.3	0.9	37.8	98.9

322

323

324 From model (1), the effect of time is significant: three indices (Shannon, Simpson, and InvSimpson) have a P  
325 < 0.05 on T21, and 6 indices in the significance range between 0.05-0.10 (Shannon, Observed\_otus, Simpson,  
326 Fisher, ACE, and Chao1) plus one index with a P < 0.05 in T28 (InvSimpson). From model (2), significance  
327 clusters similarly for Treated and Control groups, with 1 index (InvSimpson) belonging to T21, statistically  
328 significant in the 0.05-0.10. From model (3), treatment has a clear effect over time points, with six diversity  
329 indices found with P lower than 0.05 (Observed\_OTUs, Chao1, ACE, Shannon, InvSimpson, and Fisher) for the  
330 Treated group compared against the Control influenced by time effect.

331 The relationships between samples were assessed based on Bray-Curtis dissimilarities from the beta diversity  
332 analysis. Figure 1D shows the distribution of samples along the first two dimensions from the  
333 multidimensional scaling (MDS) of Bray-Curtis dissimilarities: a clustering was observed between time points  
334 ( $P = 0.01211$ ), while no clear clustering by treatment nor by animal or quarter was detected ( $P = 0.09531$ ,  $P$   
335  $= 0.06507$  and  $P = 0.16199$  from PERMANOVA between treatment, time, animals and quarters respectively,  
336 999 permutations).

337  
338 *Effects of the treatments and time points on milk microbiota at phyla and genera level.*

339 *Phyla.* Five main phyla were found in the milk microbiota with a relative abundance higher than 1% along  
340 time points (Figure 1E): *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Patensibacteria*.  
341 Nevertheless, only 3 (*Proteobacteria*, *Euryarchaeota*, and *Cyanobacteria*) were found to significantly differ  
342 along time points, interestingly decreasing all at T28 in the Treated group compared to the Control group  
343 (Figure 1G and 1H).

344  
345 **Figure 1:** Board of the milk microbiota analysis



346

347 A) Scatterplots of P-values from the model (1) evaluating the effects of treatment per time; B) Scatterplots  
 348 of P values from the model (2) the effect of time points within treatment; C) Scatterplots of Ps from the  
 349 model (3), or combined model In A), B), and C), Scatterplots refer to milk alpha-diversity indices (corrected  
 350 for baseline). The dashed line in red represents the significance threshold equal to 0.05, and in orange equal  
 351 to 0.10. D) MDS plot of Bray-Curtis dissimilarities based on the OTU table from the milk microbiota. The shape  
 352 of data points represents the two groups of quarters (Control vs. Treated with EO). Colours represent the  
 353 different time points instead. E) Boxplots of the distribution of phylum relative abundance higher than 1% in  
 354 the milk microbiota (all 64 samples together). F) Boxplots of the distribution of genera relative abundance  
 355 higher than 1% in the milk microbiota. Significantly abundant taxa in milk microbiota at phyla level: G)  
 356 Heatmap of the significance of taxa relative abundance in the milk microbiota at phyla level. H) Bar plot  
 357 representing the behaviour of the significantly different abundant phyla along time points: the scale in the x-  
 358 axis is the ratio of Treated against Controls. Please note that the scale of the graph makes *Proteobacteria* not  
 359 clear. Significantly abundant taxa in milk microbiota at genera level: I) heatmap of the significance of taxa

360 relative abundance in the milk microbiota at the genera level. J) Bar plot representing the behaviour of the  
 361 significantly different abundant genera along time points: the scale in the x-axis is the ratio of Treated against  
 362 Controls.  
 363

364 *Genera*. Thirty-four main genera were found in the milk microbiota with a relative abundance higher than  
 365 1% along time points (Figure 1F). Twenty-one genera were instead found to differ within time points in a  
 366 significant way: in particular, the genus *Sphingobium* and *Acinetobacter* were increased in the Treated group  
 367 compared to the Control group at T21 and T21 and T28, respectively. Interestingly, the genus *Romboutsia*  
 368 has a bimodal trend: it decreases in the Treated group compared to the Control group at T21 but increases  
 369 at T28 (Supplementary Table S4).  
 370

371 **Supplementary Table S4:** List of the genera belonging to the microbial milk community

Genus	Timepoint	P	Treated versus Control behaviour ratio
Fusobacterium	T0	1,39E+14	-1,51E+14
Methanosphaera	T0	2,08E+14	1,06E+14
Brachybacterium	T0	3,39E+14	-1,91E+14
Rhodococcus	T0	4,43E+14	-1,79E+14
Ruminococcus 1	T7	4,07E+14	-1,28E+13
Romboutsia	T21	8,50E+14	2,46E+14
Ruminococcaceae UCG-010	T21	7,63E+14	-1,45E+14
Nocardioides	T21	1,67E+14	8,91E+14
Acinetobacter	T21	2,72E+14	3,44E+14
Alkalibacterium	T21	3,61E+14	-1,57E+14
Lachnospiraceae NK4A136 group	T21	3,68E+14	-9,76E+14
Prevotellaceae UCG-003	T21	3,95E+14	-6,92E+14
Romboutsia	T28	2,56E+13	-2,35E+14
Bifidobacterium	T28	8,56E+14	-3,65E+13
Sphingobium	T28	1,16E+14	6,58E+14
Ruminococcus 1	T28	1,33E+14	-9,19E+14
Acinetobacter	T28	1,58E+14	1,35E+14
[Ruminococcus] gauvreauii group	T28	1,73E+14	-2,41E+14
[Eubacterium] coprostanoligenes group	T28	2,41E+14	-1,08E+14
Porphyromonas	T28	2,51E+14	-7,34E+14
[Eubacterium] nodatum group	T28	3,85E+14	-1,66E+14
Methanobrevibacter	T28	3,96E+14	-3,10E+14
Lachnospiraceae UCG-008	T28	4,07E+14	-6,54E+14
Pyramidobacter	T28	4,49E+14	-6,98E+14

372

373 The microbial milk community behaved significantly differently along two or more time points and described  
374 their behavior in the Treated group compared with the Control.

375

376 *Sequencing metrics of skin swab samples*

377

378 Sequencing the V3-V4 regions of the bacterial 16S rRNA gene of the 32 udder skin swabs samples produced  
379 675938 assembled reads (joined R1-R2 paired-end reads). After quality filtering, 105 300 sequences were  
380 removed, leaving 570 638 sequences for subsequent analyses (85.4 % average retention rate, maximum 98.1  
381 %, minimum 57.6 %). On average, the Control group had 17 421 ( $\pm$  9 085) sequences per sample and 17 832  
382 ( $\pm$ 9 029) in the Treated group. The initial number of OTUs identified was 11,255; after filtering out OTUs with  
383 less than 10 counts in at least 2 samples, 3326 distinct OTUs were left.

384

385 *Alpha-and beta- diversities in skin microbiota*

386

387 Figure 2 reports the scatterplots of i) the significance (P) of treatment at T0 and T7, (figure 2A), ii) the  
388 significance (P) of the time within treatments (Figure 2B), iii) the significance (P) of time and treatments from  
389 the model (3) (Figure 2C), for the different alpha diversity indices. Details about indices are reported in  
390 Supplementary Table S5.

391

392 **Supplementary Table S5:** Alpha diversity values per index per time point for the microbiota of udder skin  
393 samples

394

Time		Observed	Chao1	Ace	Shannon	Simpson	Invsimpson	Fisher
Treatment	point							
Control	T0	1230.75	1586.1	1625.0	5.3	0.9	44.8	354.4
Control	T7	1517.4	1872.8	1920.5	5.7	0.9	69.1	464.1
Treated	T0	1122.6	1509.6	1534.2	5.3	0.9	57.8	342.4
Treated	T7	1236.4	1461.2	1469.6	5.4	0.9	67.4	336.4

395 Three different linear models were used to compare alpha indices behaviors: i) over time (within the group,  
396 equation (1)), ii) between treatments (within time, equation (2)), and iii) between treatments accounting for  
397 time (equation (3)).

398

399 From model (1), the effect of time appears not significant when comparing T7 against T0, here used as the  
400 baseline. On the contrary, from the model (2), it is possible to see that considering treatments only, Control  
401 groups show significance while the Treated group did not (6 indices in  $P < 0.05$ : Observed\_OTUs, Chao1, ACE,  
402 Shannon, Simpson, and Fisher). From model (3), it was possible to observe that combining time and  
403 treatment effect, no significance is present, suggesting that the significance in Figure 2A is strictly related to  
404 treatment. Bray-Curtis dissimilarities method was used to assess the relationship between samples for the  
405 beta-diversity analysis: results showed that samples tend to cluster significantly by time point, while not per  
406 treatment nor when considering time and treatment effect together ( $p = 0.001$  for time, 0.311 for treatment  
407 and 0.18 for time and treatment combined effect, from PERMANOVA, 999 permutations).

408

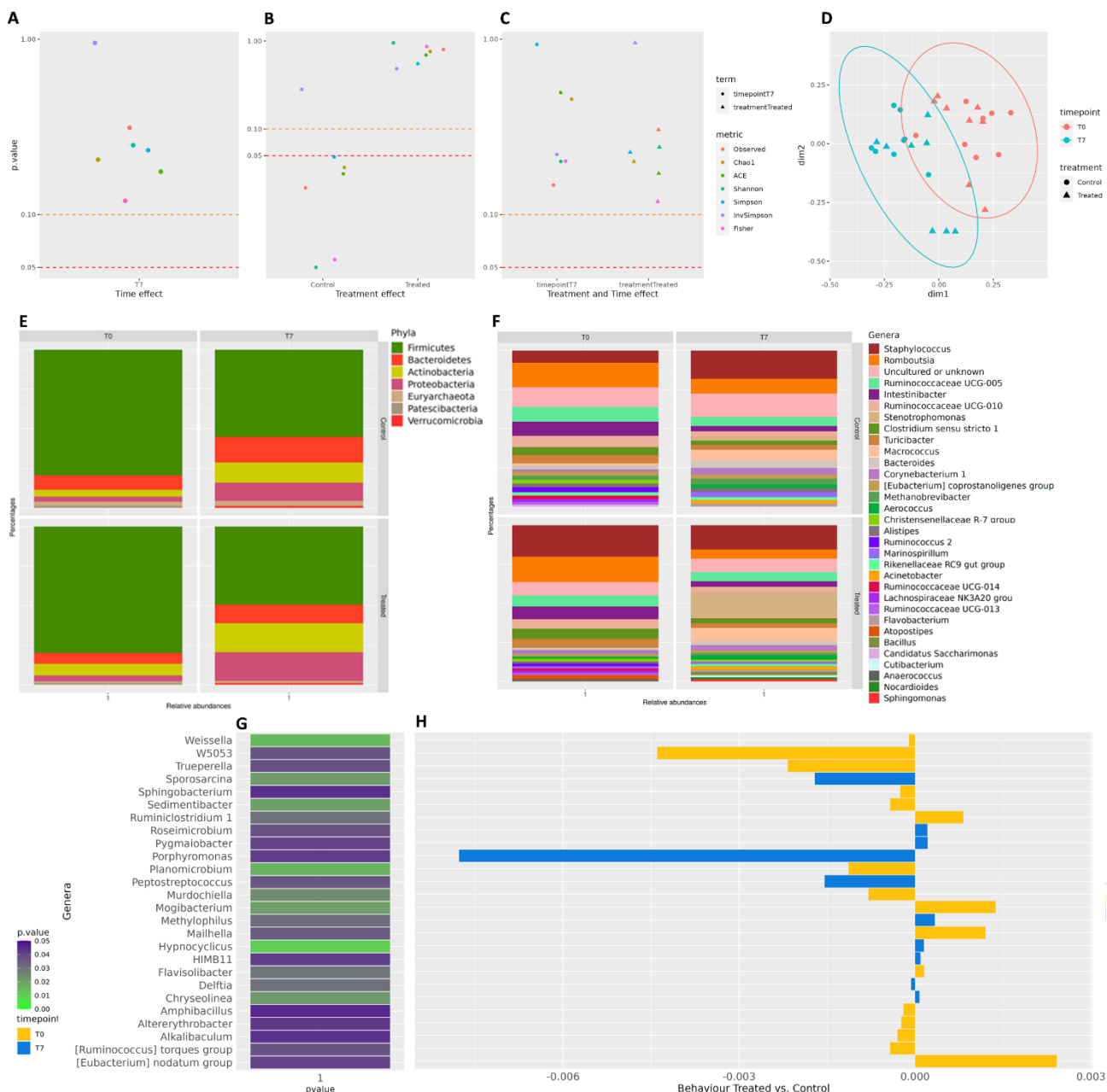
409 *Effects of the treatments and time points on skin microbiota at phyla and genera level.*

410

411 *Phyla.* Seven main phyla were found in the skin microbiota with a relative abundance higher than 1% along  
412 time points (Figure 2A): *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Euryarchaeota*,  
413 *Verrucomicrobia*, and *Patensibacteria*. However, no taxa had a significant difference along time points.

414

415 **Figure 2:** Board of the skin microbiota analysis



416

417

418 A) Scatterplots of Ps from the model (1) evaluating the effects of treatment per time; B) Scatterplots of Ps  
 419 from the model (2) the effect of time points within treatment; C) Scatterplots of Ps from the model (3), or  
 420 combined model. In A), B), and C), Scatterplots refer to skin alpha-diversity indices (corrected for baseline).  
 421 The dashed line in red represents the P threshold equal to 0.05, and in orange equal to 0.10. D) MDS plot of  
 422 Bray-Curtis dissimilarities based on the OTU table from the milk microbiota. The shape of data points  
 423 represents the two groups of quarters (Control vs. Treated with EO). Colours represent the different time  
 424 points instead. E) Boxplots of the distribution of phylum relative abundance higher than 1% in the skin  
 425 microbiota (all 64 samples together). F) Boxplots of the distribution of genera relative abundance higher than  
 426 1% in the skin microbiota (all 64 samples together). Significantly abundant taxa in milk microbiota: G)  
 427 heatmap of the P of taxa relative abundance in the milk microbiota at phyla level, H) Bar plot representing  
 428 the behaviour of the significantly different abundant phyla along time points, I) heatmap of the P of taxa  
 429 relative abundance in the skin microbiota at the genera level. J) Bar plot representing the behaviour of the  
 430 significantly different abundant genera along time points.

431



432 *Genera*. Thirty-one main genera were found in the skin microbiota with a relative abundance higher than 1%  
 433 along time points (Figure 2F). Twenty-six genera were significantly different along time points, of which 16  
 434 belonged to T0 and 10 belonged to T7 ([Supplementary Table S6](#)) (Figure 2G and 2H).

435

436 **Supplementary Table S6:** List of the genera belonging to the skin microbial community.

437

Genus	Timepoint	P	Treated behaviour against Control
Weissella	T0	0,01	-0,00010
Planomicrobium	T0	0,02	-0,00114
Sedimentibacter	T0	0,02	-0,00042
Mogibacterium	T0	0,02	0,00137
Murdochiella	T0	0,02	-0,00079
Flavisolibacter	T0	0,03	0,00016
Ruminiclostridium 1	T0	0,03	0,00082
Mailhella	T0	0,04	0,00120
[Ruminococcus] torques group	T0	0,04	-0,00042
W5053	T0	0,04	-0,00439
Trueperella	T0	0,04	-0,00217
[Eubacterium] nodatum group	T0	0,04	0,00242
Altererythrobacter	T0	0,04	-0,00023
Alkalibaculum	T0	0,04	-0,00030
Sphingobacterium	T0	0,04	-0,00025
Hypnocyclicus	T7	0,01	0,00015
Sporosarcina	T7	0,02	-0,00171
Chryseolinea	T7	0,02	0,00008
Delftia	T7	0,03	-0,00007
Methylophilus	T7	0,03	0,00034
Peptostreptococcus	T7	0,04	-0,00154
Roseimicrobium	T7	0,04	0,00021
Pygmaibacter	T7	0,04	0,00022
Porphyromonas	T7	0,04	-0,00777
HIMB11	T7	0,04	0,00009

438

439 This part of the study demonstrated that the milk and skin microbiota were limitedly changed after TCEO  
 440 treatment. Most of the changes in milk were found at T21, whereas skin changes were limited to the  
 441 microbiota measured immediately after the treatment with EO.

442

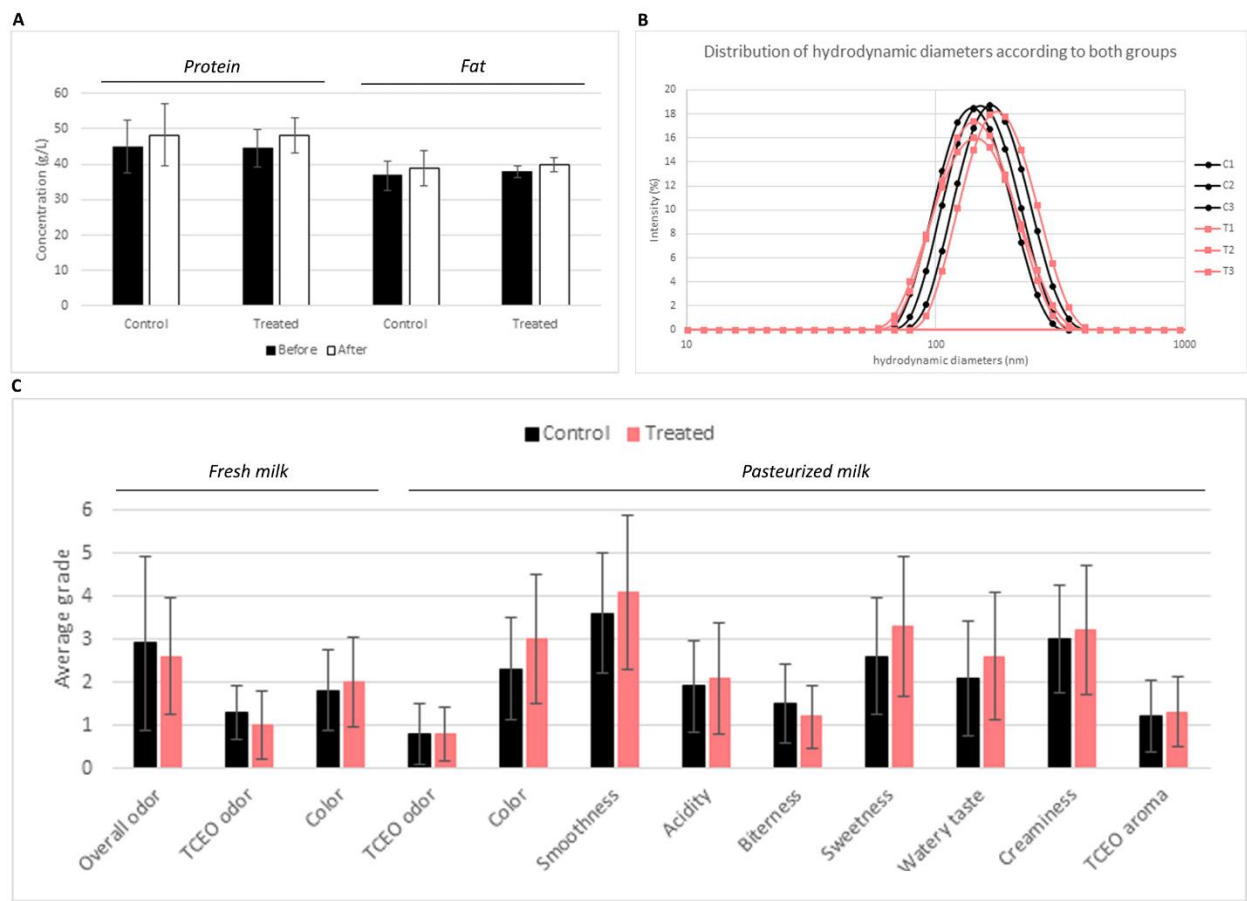
443 **Part 2: Milk Quality**

444     *Composition, physical and organoleptic properties*

445     The overall composition of milk was not affected by the treatment with TCEO. No-significant differences were  
446     detected in the fat or the protein content in milk, as shown in Figure 3A. Also, the effects on casein micelles  
447     and milk viscosity, two important physical parameters for milk processing, were evaluated. The average  
448     hydrodynamic diameter of the casein micelles varied between 140 and 170 nm. No significant difference was  
449     noticed between the 2 milk groups ( $p=0.05$ ) as shown in Figure 3B. The viscosity between samples from the  
450     same group (Treated or Control) varies from 2.2 to 3.4 mPa·s at 20 °C. No significant differences in viscosity  
451     were observed between the 2 groups of samples. The same conclusions were drawn concerning the  
452     organoleptic properties. The panel of experts didn't notice any significant difference in the milk samples'  
453     visual, olfactory, and taste aspects ( $P=0.05$ ). Figure 3C details the average score the panel of experts gave on  
454     the different kinds of milk (fresh and pasteurized).

455

456     **Figure 3:** Board of the milk quality evaluation.



457

458 A) Evolution of protein and fat content in the milk before and after the treatment for both groups. B)  
 459 Distribution of the hydrodynamic diameters of casein micelle in milk in both groups (C for the Control group  
 460 and T for the treatment group). Each curve corresponds to 1 sampled quarter (3 per condition). C)  
 461 Distribution of the average grades attributed by the panel of experts to fresh and pasteurized milk from  
 462 Control and Treated cows. No significant differences were observed between the 2 groups of samples  
 463 (P=0.05)

464  
 465 *Lipidome profile and analysis*

466  
 467 This study aimed to ascertain the changes in the untargeted milk lipidome. The lipidome was determined  
 468 following a liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry approach. More in detail, it  
 469 was possible to characterize the untargeted lipidome of milk, identifying 2450 lipid species. Only the species  
 470 over a cut-off of 5000 (684 species) were considered for further analysis. The lipids were classified into 18  
 471 classes, namely acyl steryl glycosides (ASG [10 species]), N-Acylethanolamine (NAE [25 species]),  
 472 triacylglycerols (TAG [23 species]), diacylglycerols (DAG [97 species]), monoacylglycerols (MAG [12 species]),  
 473 phosphatidylserine (PS [48 species]), sphingomyelin (SM [52 species]), phosphatidylinositol (PI [35 species]),  
 474 phosphatidylethanolamine (PE [128 species]), phosphatidylcholine (PC [82 species]),  
 475 lysophosphatidylethanolamine (LPE [14 species]), lysophosphatidylcholine (LPC [10 species]),  
 476 lysophosphatidylinositol (LPI [3 species]), ceramides (Cer [27 species]), hexosylceramides (HexCer [35  
 477 species]), galactosylceramide sulfate (SHexCer [18 species]), acylcarnitines (AcCarn [5 species]) and fatty  
 478 acids (FA [60 species]). A list of the species is also reported in Table 2.

479  
 480 **Table 2:** Number of species detected in milk from subclinical mastitis.

Class	Acronym	Number of species
acyl steryl glycosides	ASG	10
N-Acylethanolamine	NAE	25
triacylglycerols	TG	23
diacylglycerols	DG	97
monoacylglycerols	MG	12
phosphatidylserine	PS	48
sphingomyelin	SM	52
phosphatidylinositol	PI	35
phosphatidylethanolamine	PE	128
phosphatidylcholine	PC	82
lysophosphatidylethanolamine	LPE	14
lysophosphatidylcholine	LPC	10

lysophosphatidylinositol	LPI	3
ceramides	Cer	27
hexosylceramides	HexCer	35
galactosylceramide sulfate	SHexCer	18
acylcarnitines	AcCarn	5
fatty acids	FA	60

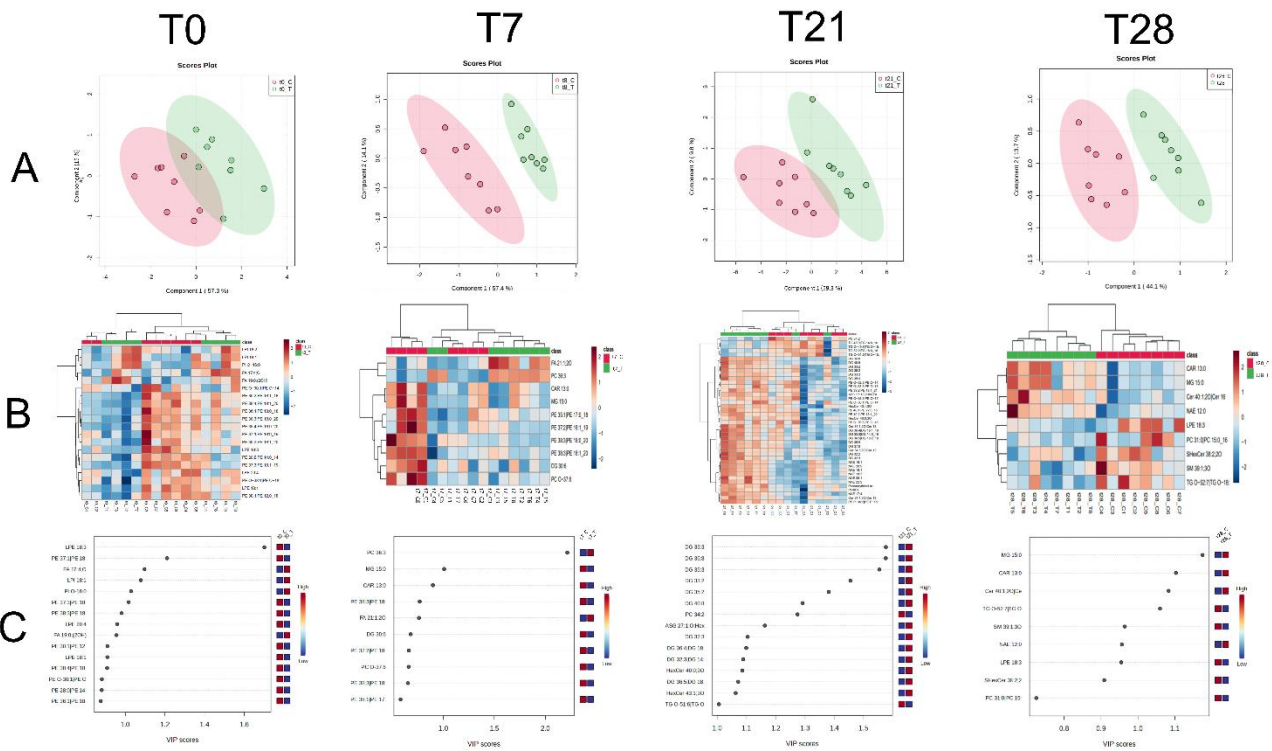
481

482

483 Figure 4 presents the Partial Least Squares - Discriminant Analysis (PLS-DA) that measured the difference in  
484 the milk lipidome from Treated and non-Treated mammary gland quarters along the time points T0, T7, T21,  
485 and T28 (Panel A). The results showed that the scatters of the two groups were limitedly separated across  
486 PC1 and PC2 at T0, indicating a quite homogeneity of the two groups. The effect of the treatment became  
487 more evident during the time, as presented in panel A. Panel B shows the Heat maps that include the  
488 important features identified as statistically significant ( $P < 0.05$ ) after a t-test. The most important lipids  
489 shown to be differentially abundant between Treated and Control quarters were presented in panels C as  
490 variable importance in the projection (VIP) score.

491

492 **Figure 4:**



493

494

495 At T7, most of the lipids that changed between EO Treated and Control groups (8 out of ten) had a lower  
496 concentration in the milk of Treated cows. Of the ten lipids whose abundance changed, the most noticeable  
497 feature is an increase of PC 36:3. At T21, 15 lipids changed their abundance: two decreased, and 13 increased  
498 with treatment. Most changes were reported in the family of diglycerides, namely DG 33:3, DG 36:8, DG 35:3,  
499 DG 33:2, DG 35:2, DG 40:8, and PC 34:2 (VIP score > 1). At 28, the effects of TCEO on milk lipidome were  
500 limited to only 9 lipids (four increased and five decreased their abundance), the most interesting feature  
501 being MG 15:0, which increased its abundance after TCEO.

502 In conclusion, the TCEO induced a limited impact on the untargeted milk lipidome. Besides little changes at  
503 T7, most were detected at T21 and were mostly limited to diacylglycerol components (DG). None of the  
504 differences observed between Treated and Control cows at T7, T21, or T28 were already observed at T0.

505

### 506 **Part 3: Milk inflammatory parameters**

507

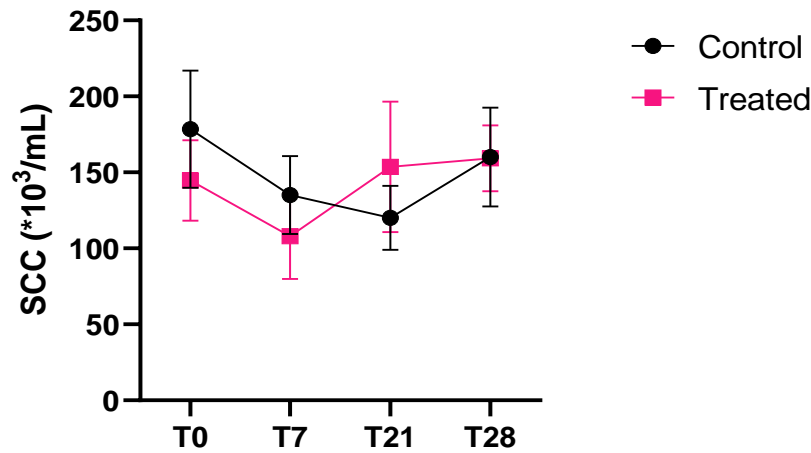
#### 508 *SCC of milk after TCEO treatment*

509 The changes in somatic cells in composite milk after TCEO are presented in Supplementary Figure S7. No  
510 statistically significant differences were detected after treating mammary gland quarters with TCEO (P=0.05).

511

512 **Supplementary Figure S7:** SCC (means + SEM) in composite milk after TCEO application

513

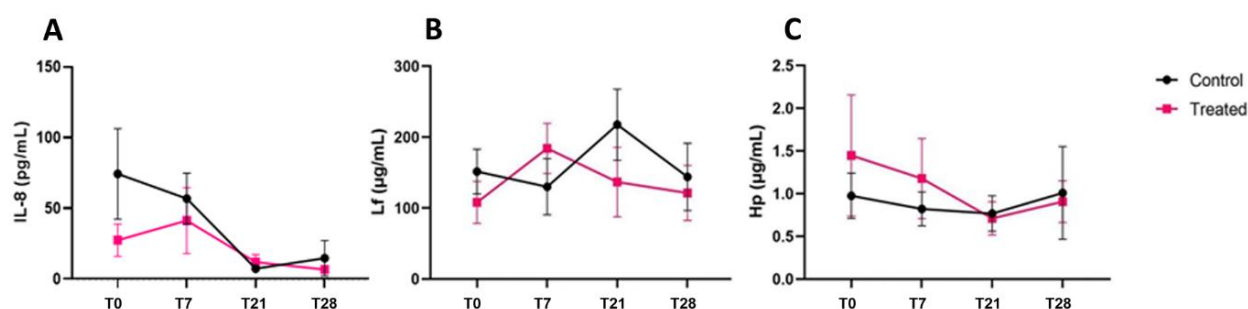


\*Values are presented as the number of Somatic cells x 10<sup>3</sup>.

*The milk concentration of IL-8 and the acute phase proteins LF and Hp*

The concentration of IL-8 was not homogeneous at T0. Only 2 milk samples from the Control and 3 from the Treated groups contained a concentration of IL-8 higher than 50 pg/mL. At the end of the experiment, the concentration of IL-8 decreased in both groups, as shown in Figure 5A, but this difference was not significant (P=0.05). As reported in Figure 5B, the concentrations of LF found in quarter milk ranged between 143 and 217 µg/mL. The concentrations of Hp ranged between 1 and 0.7 µg/mL for the Control group and 1.4 and 0.7 µg/mL for the Treated group as shown in Figure 5C, but did not show a significant interaction: however, significance was found in row factor (Two-way ANOVA, p = 0.01), suggesting the importance of time rather than treatment.

**Figure 5:** Panel of the milk inflammatory parameters.



A) Time course of the serum concentrations (means + SEM) of Interleukine 8 (IL-8)\*. B) Time course of the serum concentrations (means + SEM) of acute phase proteins Lactoferrin (Lf)\*. C) Time course of the serum concentrations (means + SEM) of acute phase proteins Haptoglobin (Hp)\*. \*In quarter milk all the 4 time points (T0, T7, T21, and T28).

The present study investigated the impact of topical treatment of the mammary gland with TCEO, unravelling its effects with a systems biology approach. The milk and skin microbiota changes were determined by microbiological analysis and uncultured microbiota analysis by NGS. The study further included milk quality investigation in terms of composition sensory analysis, viscosity, the hydrodynamic diameter of casein micelle evaluation, lipidomic profiling, and measurements of the significant markers of inflammation in milk.

The first part of the study investigated the potential changes in milk culturable microbiological content and the uncultured bacterial population of milk and skin after TCEO treatment. The treatment did not affect the milk's culturable microbiological content in a statistically significant way. Although these results were inconsistent with the *in vitro* studies that show antibacterial properties of TCEO<sup>10,12,13,16-19,48,49</sup>, it can be hypothesized that the surface treatment was less effective than the direct treatment in the teats previously cited in the literature. Different theories could justify this event: i) the oxidation and degradation of TCEO during the massage negatively affecting the TCEO antibacterial properties<sup>50</sup>, or ii) the concentration of TCEO that penetrated the quarter and arrived at the cistern was below the minimum inhibitory concentration (MIC) of the bacteria, or iii) TCEO was captured by the milk's fat. However, it is interesting that results from the culturable microbiological analysis and microbiota study were coherent, as the CNS signalled in the first analysis were then easily visible between the genera found with the microbiota analysis (Figure 1F). On the other hand, metagenomics analysis showed that the investigated treatment induced limited changes in the

553 uncultured milk microbiota: the significance in alpha diversity indexes referred in fact to time (Figure 1A, 3  
554 indices statistically significant at T21, and 6 indices with P between 0.05 and 0.1, plus 1 index with P lower  
555 than 0.05 at T28) and to group-related time effect (figure 1C, 6 indices statistically significant for treatment),  
556 suggesting that changes were related to time effect within the milk ecosystem, rather than to a treatment  
557 effect. Similarly, the species diversity between the two communities, described by Bray-Curtis dissimilarities  
558 analysis and statistically tested with PERMANOVA, showed significance only when related to time. The milk  
559 microbiota confirmed the substantial lack of significant changes between the two groups at both phyla and  
560 genus levels. Milk microbiota composition at the phylum level was consistent with previous reports <sup>51</sup>, with  
561 no significant treatment-related changes. However, it is possible to observe little changes at the genus level,  
562 mainly at T21 and T28, when considering T0 as the baseline. At T21, a decrease of *Eubacterium*  
563 *coprostanoligenes* and *Romboutsia* was found, and an increase of *Acinetobacter*, among others. The TCEO at  
564 T28 featured an opposite trend of *Romboutsia*, which increased and decreased *Ruminococcus 1*.  
565 *Acinetobacter* further increased: the *Acinetobacter* genus is related to clinical mastitis <sup>39</sup>, but still, small  
566 signals in inflammatory parameters were found, thus suggesting that the increase in the abundance of this  
567 genus has no practical consequences on the health status of the mammary gland. It could be interesting due  
568 to its influence on cheese production, as it is reported to influence, as an external contaminant linked with  
569 silage, cheese sensory characteristics <sup>52</sup>.

570 Similarly, *Brachybacterium*, *Corynebacterium*, and *Brevibacterium* were found to be initially lower in the  
571 Treated group but to increase to a non-significant difference between the two treatment groups in the  
572 following time points. This behaviour from these genera, previously signalled in literature for their benefit  
573 on milk and cheese production, suggests that EO treatment does not influence them. On the contrary, they  
574 seem advantaged, guaranteeing healthy dairy production. Coherently, this beneficial status could favour the  
575 use of milk for cheese production, as EO has already been reported as an effective preservative against  
576 *Listeria monocytogenes* spoilage <sup>53-55</sup>.

577 Similarly, changes in the uncultured bacterial population diversity at the skin level were limited, as  
578 shown by the statistically significant differences of alpha diversity indices only when related to treatment



579 (Figure 2B). Still, not when related to time nor when considering time and treatment effects together: it is  
580 important to consider that the application method could have influenced the skin microbiota more than the  
581 treatment itself. Bacterial species diversity between the two groups (Control and Treated) was equally  
582 significant only when related to treatment alone. Changes at phylum and genus levels between the Treated  
583 and Control groups were similarly limited: phyla did not present any significant change. In contrast, genera  
584 found increased in T7 were coherent results in literature in an optic of the not damaging effect of the EO <sup>56,57</sup>,  
585 also when already related with studies regarding EO <sup>58,59</sup>. In conclusion, these results show that TCEO udder  
586 application did not induce changes in the uncultured microbiota in milk and udder skin.

587         The second part of the study evaluated the effects of TCEO application on milk quality, including milk  
588 composition and sensory analysis. Concerning the physical properties of milk, the average casein micelle size  
589 and milk viscosity are, among others, critical physical parameters that affect the processing of milk into other  
590 milk-based products (cheese, yogurt, etc.). No significant difference was highlighted after the TCEO  
591 application, suggesting that TCEO did not interact with milk casein's biosynthesis known to influence the milk  
592 viscosity. The viscosity values (from 2.2 to 3.4 mPa·s at 20 °C) are slightly higher than that classically reported  
593 for skimmed bovine milk <sup>60</sup>. The high measured viscosity of some samples was attributed to the presence of  
594 coagulated residual fat particles that did not completely dissolve in milk upon thawing <sup>61</sup>.

595         Consistently with the limited changes reported for milk quality and microbial content, also  
596 untargeted lipidome, to which the third part of the study was dedicated, was limitedly affected by TCEO. As  
597 described for the microbiota, most differences were detected at T21 and T28, suggesting that TCEO may  
598 delay some slight changes mainly limited to diacylglycerols. Diacylglycerols are important milk components,  
599 accounting for about 2% of the milk fraction <sup>62</sup>. Diacylglycerols provide a crucial intermediate element before  
600 the final step of triglyceride synthesis in the biosynthesis of milk triglycerides. This step is catalysed by the  
601 enzyme diacylglycerol acyl-CoA acyltransferase 1 (DGAT1), a promising candidate gene for milk production  
602 traits. It would be interesting to ascertain if EO affected the enzyme's activity. It has been shown that feeding  
603 with EO induced changes in the Triacylglycerol (TAG) metabolism of other species as japanese quails <sup>63</sup>.

604 Further studies are required to ascertain if skin treatment with EO may fulfill the same function in the  
605 ruminant mammary gland.

606 As for completeness, this study evaluated milk inflammatory parameters in its fourth part: TCEO treatment  
607 partly affected the inflammation process, showing no changes in IL-8, a slight change in Hp, and a significant  
608 change in Lf. It is then possible to infer that other factors could have the results, while the treatment with  
609 TCEO did not alter the milk inflammatory status.

610 Nevertheless, our study presents some limitations as the effect of the TCEO on SCC was evaluated at  
611 the level of the mammary gland as a whole and not on a single quarter. This information would allow a more  
612 precise assessment of the impact of quarter skin treatment with TCEO on the Treated milk content.

613

## 614 **CONCLUSIONS**

615

616 TCEO topical application on the udder did not modify milk microbiota. At the concentration of 10%  
617 TCEO, no significant change was evidenced in skin microbiota or milk lipidomic. In addition, no modifications  
618 were observed in milk composition or physicochemical properties, and somewhat similar levels of  
619 inflammatory markers were detected in both Treated and Control animal milk quarters. These results suggest  
620 that *Thymus capitatus* at the concentration of 10% is safe and has no side effects on milk when used in dairy  
621 farms as an antimicrobial alternative. These effects must be considered preliminary since a more focused  
622 study on the single-quarter milk quality is required to attest to the safety of TCEO in healthy dairy cows.

623

## 624 **LIST OF ABBREVIATIONS**

625 AMR: Antimicrobial resistance

626 APP: Acute Phase Proteins

627 CNS: Coagulase-negative Staphylococci

628 EO: Essential oils

629 HP: Haptoglobin

630 IL-8: Interleukin 8

631 LF: Lactoferrin

632 MDS: Multidimensional scaling

633 P: Significance

634 SCC: Somatic cell count

635 TCEO: *Thymus capitatus* essential oils

636 OUT: Operational taxonomic unit

637 **DECLARATIONS**

638 **Ethics approval and consent to participate.**

639 The present study was approved by the French Ministry for Higher Education, Research and Innovation and  
640 the local institutional animal care and use committee (approval number: #2020011709229229).

641 The authors confirm that: (1) the reported experiments were conducted at Mejusseaume INRAE  
642 experimental farm under agreement for animal housing no. C-35–275–23; (2) all methods and animal  
643 treatment used in the study were performed according to the guidelines and regulations stated in Directive  
644 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes  
645 (<http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>). The study reported in the manuscript follows the  
646 recommendations in the ARRIVE guidelines (PLoS Biol 18(7): e3000411.  
647 <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411>).

648

## 649 **Availability of data and materials**

650 The milk and skin swab 16S rRNA gene sequencing datasets generated and analysed during the current study  
651 are available in the UNIMI Dataverse repository. A private URL for reviewers is hereby provided, while  
652 datasets will be disclosed upon article acceptance:

- 653 • Milk dataset: [https://dataverse.unimi.it/privateurl.xhtml?token=66717af9-daad-4466-8a2a-](https://dataverse.unimi.it/privateurl.xhtml?token=66717af9-daad-4466-8a2a-2d87b6593f93)  
654 [2d87b6593f93](https://dataverse.unimi.it/privateurl.xhtml?token=66717af9-daad-4466-8a2a-2d87b6593f93)
- 655 • Skinswabs dataset: [https://dataverse.unimi.it/privateurl.xhtml?token=6802248d-09f4-4967-bd7e-](https://dataverse.unimi.it/privateurl.xhtml?token=6802248d-09f4-4967-bd7e-7dd00e979e7a)  
656 [7dd00e979e7a](https://dataverse.unimi.it/privateurl.xhtml?token=6802248d-09f4-4967-bd7e-7dd00e979e7a)

657

## 658 **Competing interest**

659

660 The authors declare that they have no competing interests.

661

## 662 **Funding**

663

664 This work was funded by MUR (Direzione Generale dell'internazionalizzazione e della comunicazione  
665 Programma cooperazione internazionale PRIMA - Decreto Ministeriale 26 luglio 2016 n. 593) in the context  
666 of the MILKQUA-H2020-PRIMA 2018—Section 2.

667

## 668 **Author contributions**

669

670 LAN and FC contributed to the conception and design of the study. RN carried out the in vivo study with the  
671 help of EV. RN carried out the microbiology analyses. PC and BC sequenced the DNA microbiota samples. CG  
672 and FB carried out the bioinformatics analyses. CG performed the statistical analysis for the in vivo study.  
673 DC, FF, and MF conducted the lipidomic and relative biostatistical and bioinformatics analyses. CG and RN

674 edited the first draft of the manuscript. L.A.N, FC, SB, and SE critically revised the final manuscript. All authors  
675 contributed to writing, revising, and reading the manuscript before submission. The final version was  
676 approved by all authors.

677

## 678 **Acknowledgments**

679

680 The authors thank Professor Helga Sauerwein from Bonn University (Germany) for evaluating acute phase proteins  
681 (APP) and for the valuable support during the drafting of this paper. We thank all the technical support staff and  
682 animal facilities of Méjusseume (INRAE) for their help during the achievement of the study and the Laboratory  
683 of Technology of Villers Bocage (IDELE) for its technical assistance in studying milk quality.

684

## 685 **Bibliography**

686

- 687 1 *United Nations Environment Programme (2023). Bracing for Superbugs: Strengthening environmental action in the One Health response to antimicrobial resistance. Geneva Production: United Nations Environment Programme, <<https://www.unep.org/resources/superbugs/environmental-action> > (*
- 688 2 *Sharma, C. et al. Antimicrobial Resistance: Its Surveillance, Impact, and Alternative Management Strategies in Dairy Animals. Front Vet Sci 4, 237, doi:10.3389/fvets.2017.00237 (2017).*
- 689 3 *Muloi, D. et al. Are Food Animals Responsible for Transfer of Antimicrobial-Resistant Escherichia coli or Their Resistance Determinants to Human Populations? A Systematic Review. Foodborne Pathogens and Disease 15, 467-474, doi:10.1089/fpd.2017.2411 (2018).*
- 690 4 *Antimicrobial resistance: fact sheet on Sustainable Development Goals (SDGs): health targets, 15 April 2021, <<https://www.who.int/europe/publications/i/item/WHO-EURO-2017-2375-42130-58025>> (*
- 691 5 *Nehme, R. et al. Essential Oils in Livestock: From Health to Food Quality. Antioxidants 10, 330 (2021).*
- 692 6 *Masika, P. J. & Afolayan, A. J. Antimicrobial activity of some plants used for the treatment of livestock disease in the Eastern Cape, South Africa. Journal of Ethnopharmacology 83, 129-134, doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00242-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00242-8) (2002).*
- 693 7 *Upreti, Y., Karki, S., Poudel, R. C. & Kunwar, R. M. Ethnoveterinary use of plants and its implication for sustainable livestock management in Nepal. Front Vet Sci 9, 930533, doi:10.3389/fvets.2022.930533 (2022).*
- 694 8 *Mayer, M., Vogl, C. R., Amorena, M., Hamburger, M. & Walkenhorst, M. Treatment of organic livestock with medicinal plants: a systematic review of European*

- ethnoveterinary research. *Forsch Komplementmed* **21**, 375-386, doi:10.1159/000370216 (2014).
- 9 Willer, H., Schlatter, B. & Trávníček, J. *The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends 2023.*, <<http://www.organic-world.net/yearbook/yearbook-2023.html>> (2023).
- 10 Pinedo, P., Karreman, H., Bothe, H., Velez, J. & Risco, C. Efficacy of a botanical preparation for the intramammary treatment of clinical mastitis on an organic dairy farm. *Can Vet J* **54**, 479-484 (2013).
- 11 Abdelfattah, E. M. *et al.* 2019 Survey of Antimicrobial Drug Use and Stewardship Practices in Adult Cows on California Dairies: Post Senate Bill 27. *Microorganisms* **9**, 1507 (2021).
- 12 Cho, B.-W. *et al.* Therapeutic effect of oregano essential oil on subclinical bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean J Vet Res* **55**, 253-257, doi:10.14405/kjvr.2015.55.4.253 (2015).
- 13 Abboud, M., El Rammouz, R., Jammal, B. & Sleiman, M. In Vito and In Vivo Antimicrobial Activity of Two Essential Oils *Thymus Vulgaris* and *Lavendula Angustifolia* against Bovine *Staphylococcus* and *Streptococcus* Mastitis Pathogen. **4**, 975-983 (2015).
- 14 Kovačević, Z. *et al.* New Perspective of *Origanum vulgare* L. and *Satureja montana* L. Essential Oils as Bovine Mastitis Treatment Alternatives. *Antibiotics* **10**, 1460, doi:10.3390/antibiotics10121460 (2021).
- 15 Reshi, I., Sarkar, T., Malik, H., Muhee, A. & Shoukat, S. Efficacy of *Fumaria indica*, *Nepeta cataria* and *Adiantum capillus* Crude Aqueous Extracts in Comparison to Cefuroxime in Sub-clinical Case of Bovine Mastitis. *International Journal of Livestock Research*, **1**, doi:10.5455/ijlr.20170212032414 (2017).
- 16 Lopes, T. S. *et al.* Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. *Research in Veterinary Science* **131**, 186-193, doi:<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.025> (2020).
- 17 Bouyahya, A. *et al.* Ethnomedicinal use, phytochemistry, pharmacology, and food benefits of *Thymus capitatus*. *Journal of Ethnopharmacology* **259**, 112925, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112925> (2020).
- 18 Mkaddem, M. G. *et al.* Essential oil of *Thymus capitatus* Hoff. et Link. from Matmata, Tunisia: gas chromatography-mass spectrometry analysis and antimicrobial and antioxidant activities. *J Med Food* **13**, 1500-1504, doi:10.1089/jmf.2009.0117 (2010).
- 19 Bel Hadj Salah, K. *et al.* Activités antivirale et antioxydante in vitro d'huiles essentielles de *Thymus capitatus* (L.) Hoffmans. & Link de Tunisie. *Acta Botanica Gallica* **157**, 433-444, doi:10.1080/12538078.2010.10516220 (2010).
- 20 Biondi, D., Cianci, P., Geraci, C., Ruberto, G. & Piattelli, M. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from sicilian aromatic plants. *Flavour and Fragrance Journal* **8**, 331-337, doi:<https://doi.org/10.1002/ffj.2730080608> (1993).
- 21 Goren, A. C., Bilsel, G., Bilsel, M., Demir, H. & Kocabaş, E. E. Analysis of essential oil of *Coridothymus capitatus* (L.) and its antibacterial and antifungal activity. *Z Naturforsch C J Biosci* **58**, 687-690, doi:10.1515/znc-2003-9-1016 (2003).
- 22 Msaada, K. *et al.* Chemical Composition and Antioxidant Activities of Tunisian *Thymus capitatus* L. Methanolic Extract. *International Journal of Food Properties* **19**, 1381-1390, doi:10.1080/10942912.2015.1082138 (2016).
- 23 Benoutman, A. *et al.* Phytochemical Composition, Antioxidant and Antifungal Activity of *Thymus capitatus*, a Medicinal Plant Collected from Northern Morocco. *Antibiotics (Basel)* **11**, doi:10.3390/antibiotics11050681 (2022).
- 24 Benjemaa, M. *et al.* Nanoencapsulation of *Thymus capitatus* essential oil: Formulation process, physical stability characterization and antibacterial efficiency

- monitoring. *Industrial Crops and Products* **113**, 414-421, doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.062> (2018).
- 25 Fratini, F. *et al.* Evaluation of the in vitro antibacterial activity of some essential oils and their blends against *Staphylococcus* spp. isolated from episodes of sheep mastitis. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali* **32**, 407-416, doi:10.1007/s12210-021-00991-5 (2021).
- 26 Obeid, S. *et al.* The phase and charge of milk polar lipid membrane bilayers govern their selective interactions with proteins as demonstrated with casein micelles. *Journal of Colloid and Interface Science* **534**, 279-290, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.09.033> (2019).
- 27 Guimarães, A. G., Quintans, J. S. S. & Quintans-Júnior, L. J. Monoterpenes with Analgesic Activity—A Systematic Review. *Phytotherapy Research* **27**, 1-15, doi:<https://doi.org/10.1002/ptr.4686> (2013).
- 28 Wattenburger, K., Schmidt, R., Placheta, L., Middleton, J. R. & Adkins, P. R. F. Evaluation of 4 different teat disinfection methods prior to collection of milk samples for bacterial culture in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **103**, 4579-4587, doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17338> (2020).
- 29 Kerro Dego, O., Pacha, P. A., Gillespie, B. E. & Pighetti, G. M. Experimental *Staphylococcus aureus* Mastitis Infection Model by Teat Dipping in Bacterial Culture Suspension in Dairy Cows. *Animals (Basel)* **10**, doi:10.3390/ani10050751 (2020).
- 30 Cremonesi, P. *et al.* Raw Milk Microbiota Modifications as Affected by Chlorine Usage for Cleaning Procedures: The Trentingrana PDO Case. *Front Microbiol* **11**, 564749, doi:10.3389/fmicb.2020.564749 (2020).
- 31 Caporaso, J. G. *et al.* Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108 Suppl 1**, 4516-4522, doi:10.1073/pnas.1000080107 (2011).
- 32 Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S. & Käller, M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* **32**, 3047-3048, doi:10.1093/bioinformatics/btw354 (2016).
- 33 Caporaso, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* **7**, 335-336, doi:10.1038/nmeth.f.303 (2010).
- 34 Kurtzer, G. M., Sochat, V. & Bauer, M. W. Singularity: Scientific containers for mobility of compute. *PLOS ONE* **12**, e0177459, doi:10.1371/journal.pone.0177459 (2017).
- 35 Biscarini, F. *et al.* Rumen microbiome in dairy calves fed copper and grape-pomace dietary supplementations: Composition and predicted functional profile. *PLoS One* **13**, e0205670, doi:10.1371/journal.pone.0205670 (2018).
- 36 Yilmaz, P. *et al.* The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res* **42**, D643-648, doi:10.1093/nar/gkt1209 (2014).
- 37 Paulson, J. N., Stine, O. C., Bravo, H. C. & Pop, M. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat Methods* **10**, 1200-1202, doi:10.1038/nmeth.2658 (2013).
- 38 Ranilla, M. J. *et al.* Effects of *Thymbra capitata* essential oil on in vitro fermentation end-products and ruminal bacterial communities. *Sci Rep* **13**, 4153, doi:10.1038/s41598-023-31370-9 (2023).
- 39 Biscarini, F., Cozzi, P. & Orozco-Ter Wengel, P. Lessons learnt on the analysis of large sequence data in animal genomics. *Anim Genet* **49**, 147-158, doi:10.1111/age.12655 (2018).
- 40 Chao, A. & Lee, S.-M. Estimating the Number of Classes via Sample Coverage. *Journal of the American Statistical Association* **87**, 210-217, doi:10.1080/01621459.1992.10475194 (1992).

- 41 Ceciliani, F. *et al.* The untargeted lipidomic profile of quarter milk from dairy cows with subclinical intramammary infection by non-aureus staphylococci. *J Dairy Sci* **104**, 10268-10281, doi:10.3168/jds.2020-19975 (2021).
- 42 Doudiès, F. *et al.* Major Role of Voluminosity in the Compressibility and Sol-Gel Transition of Casein Micelle Dispersions Concentrated at 7 °C and 20 °C. *Foods* **8**, doi:10.3390/foods8120652 (2019).
- 43 Listrat, A. *et al.* What are the drivers of beef sensory quality using metadata of intramuscular connective tissue, fatty acids and muscle fiber characteristics? *Livestock Science* **240**, 104209, doi:<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104209> (2020).
- 44 Ceciliani, F. *et al.* Changes in the lipidome of water buffalo milk during intramammary infection by non-aureus Staphylococci. *Scientific Reports* **12**, doi:10.1038/s41598-022-13400-0 (2022).
- 45 Chong, J., Wishart, D. S. & Xia, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinformatics* **68**, e86, doi:10.1002/cpbi.86 (2019).
- 46 Hiss, S., Weinkauf, C., Hachenberg, S. & Sauerwein, H. Short communication: Relationship between metabolic status and the milk concentrations of haptoglobin and lactoferrin in dairy cows during early lactation. *J Dairy Sci* **92**, 4439-4443, doi:10.3168/jds.2008-1632 (2009).
- 47 Roussel, P. *et al.* Investigating the contribution of IL-17A and IL-17F to the host response during Escherichia coli mastitis. *Veterinary Research* **46**, 56, doi:10.1186/s13567-015-0201-4 (2015).
- 48 Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L. & Ferret, A. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J Dairy Sci* **90**, 2580-2595, doi:10.3168/jds.2006-644 (2007).
- 49 Winward, G. P., Avery, L. M., Stephenson, T. & Jefferson, B. Essential oils for the disinfection of grey water. *Water Research* **42**, 2260-2268, doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.12.004> (2008).
- 50 Hagnestam-Nielsen, C., Emanuelson, U., Berglund, B. & Strandberg, E. Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. *Journal of Dairy Science* **92**, 3124-3133, doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2008-1719> (2009).
- 51 Kfoury, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H. & Fourmentin, S. Encapsulation in cyclodextrins to widen the applications of essential oils. *Environmental Chemistry Letters* **17**, 129-143, doi:10.1007/s10311-018-0783-y (2019).
- 52 Giello, M. *et al.* Dynamics of bacterial communities during manufacture and ripening of traditional Caciocavallo of Castelfranco cheese in relation to cows' feeding. *Food Microbiol* **63**, 170-177, doi:10.1016/j.fm.2016.11.016 (2017).
- 53 Schubert, K. *et al.* Two coryneform bacteria isolated from the surface of French Gruyère and Beaufort cheeses are new species of the genus Brachybacterium: Brachybacterium alimentarium sp. nov. and Brachybacterium tyrofermentans sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 81-87, doi:10.1099/00207713-46-1-81 (1996).
- 54 Gori, K., Ryssel, M., Arneborg, N. & Jespersen, L. Isolation and identification of the microbiota of Danish farmhouse and industrially produced surface-ripened cheeses. *Microb Ecol* **65**, 602-615, doi:10.1007/s00248-012-0138-3 (2013).
- 55 Gérard, A. *et al.* Study of the microbial diversity of a panel of Belgian artisanal cheeses associated with challenge studies for Listeria monocytogenes. *Food Microbiol* **100**, 103861, doi:10.1016/j.fm.2021.103861 (2021).
- 56 Sorge, U. S., Binger, E. M., Scheffers, J. & Plummer, P. J. Short communication: Metagenomic evaluation of skin biopsies of udder sores in dairy cows. *J Dairy Sci* **102**, 11470-11475, doi:10.3168/jds.2018-15863 (2019).



- 57 Shi, F. *et al.* Static composting of cow manure and corn stalk covered with a  
membrane in cold regions. *Front Bioeng Biotechnol* **10**, 969137,  
doi:10.3389/fbioe.2022.969137 (2022).
- 58 Zhao, Y. *et al.* Feeding citrus flavonoid extracts decreases bacterial endotoxin and  
systemic inflammation and improves immunometabolic status by modulating  
hindgut microbiome and metabolome in lactating dairy cows. *Anim Nutr* **13**, 386-400,  
doi:10.1016/j.aninu.2023.03.007 (2023).
- 59 Basbas, C. *et al.* Effect of Intramammary Dry Cow Antimicrobial Treatment on Fresh  
Cow's Milk Microbiota in California Commercial Dairies. *Antibiotics* **11**, 963,  
doi:10.3390/antibiotics11070963 (2022).
- 60 Huppertz, T., Fox, P. F. & Kelly, A. L. High pressure-induced changes in the creaming  
properties of bovine milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **4**, 349-  
359, doi:[https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(03\)00057-2](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(03)00057-2) (2003).
- 61 Laosam, P., Pin, C. & Pakdeechanuan, P. Adjusting the initial milk pH before freezing  
affected physico-chemical properties of thawed goat milk. *Food Research* **6**, 475-481,  
doi:10.26656/fr.2017.6(2).302 (2022).
- 62 Månsson, H. L. Fatty acids in bovine milk fat. *Food Nutr Res* **52**,  
doi:10.3402/fnr.v52i0.1821 (2008).
- 63 Hussein, M. M. A., Abd El-Hack, M. E., Mahgoub, S. A., Saadeldin, I. M. & Swelum, A.  
A. Effects of clove (*Syzygium aromaticum*) oil on quail growth, carcass traits, blood  
components, meat quality, and intestinal microbiota. *Poultry Science* **98**, 319-329,  
doi:<https://doi.org/10.3382/ps/pey348> (2019).

### 3. Données complémentaires

Dans cette section sont indiquées la méthodologie adoptée pour la sélection des vaches pour l'étude *in vivo*, le choix de l'HETC parmi dix HEs incluses dans le projet MilkQua ainsi que des résultats complémentaires sur l'expression de quelques gènes inflammatoires des cellules PBMC suite à l'application de l'HETC.

#### 3.1. Matériels et méthodes

##### *3.1.1. Détection des mammites subcliniques et sélection et inclusion des 12 vaches laitières dans le protocole expérimentale*

À partir des 30 vaches laitières en fin de lactation présentes dans la ferme expérimentale Mejusseaume de l'INRAE (Le Rheu, Bretagne, France), nous avons sélectionné 12 vaches atteintes de mammites subcliniques. La sélection s'est appuyée sur deux critères essentiels. Le premier est le CCS dans le lait, qui devait dépasser le seuil de 100 000 cellules/ml sur trois comptages cellulaires effectués sur une période d'un mois (Sumon et al., 2020; Zhang et al., 2022). Le second est la présence d'un pathogène responsable de la mammite subclinique, révélée par une analyse bactériologique du lait par quartier. Grâce à cette analyse, nous avons pu identifier les quartiers touchés. À noter que les 12 vaches sélectionnées ne présentaient aucun symptôme de mammite clinique et n'avaient reçu aucun traitement antibiotique depuis au moins 5 mois avant leur inclusion dans l'étude.

Les animaux ont été répartis en deux groupes homogènes, à savoir le Groupe Témoin et le Groupe HE, présentant la même parité et ayant le même nombre de quartiers atteints de mammite subclinique.

##### *3.1.2. Sélection de l'huile essentielle de *Thymus capitatus**

La sélection de l'HETC a été effectuée après avoir testé l'activité antibactérienne de huit HEs méditerranéennes contre les deux bactéries, *E. coli* et *S. aureus*, isolées du lait des vaches atteintes de mammites. L'activité antibactérienne a été réalisée selon la méthode de (Vuddhakul, Bhoopong, Hayeebilan, & Subhadhirasakul, 2007) avec quelques modifications mineures. En résumé, 10 µL de chaque HE ont été déposés sur des disques stériles (diamètre

de 6 mm, papier Whatman N°5) et placés au centre de l'agar Mueller-Hinton (MH) inoculé par l'une des deux bactéries. Après une incubation à 37°C pendant 24 heures, le diamètre des zones d'inhibition autour de chaque disque a été mesuré. Le même protocole a été appliqué en testant les antibiotiques suivants : colistine, amoxicilline, ampicilline et céphalexine. Chaque expérience a été réalisée cinq fois et le diamètre moyen de la zone d'inhibition a été enregistré en millimètres.

### *3.1.3. Prise de sang jugulaire*

Avant le prélèvement de sang, la zone de ponction sur la peau de l'animal a été rigoureusement désinfectée à l'aide d'éthanol pour éliminer toute possibilité de contamination. Deux prélèvements aseptiques de la veine jugulaire ont été réalisés pour chaque vache : le premier à T0, juste avant le début du traitement, et le second à T8, le jour suivant la dernière application du traitement (7 jours après le début de l'expérimentation). Au total, 6 vaches ont été incluse dans cette analyse, réparties équitablement entre les 2 groupes (Témoin et HE).

### *3.1.4. Isolation des PBMC*

Les cellules PBMC ont été isolées à partir du sang jugulaire. Elles ont été préparées selon la méthode (Sulabh et al., 2019), avec quelques modifications. En résumé, 20 ml de sang dilué dans 10 ml de solution tampon phosphate-saline (PBS) (D8537 ; Sigma) sont introduite dans des tubes Falcon de 50 ml contenant 15 ml de Ficoll-Paque™ PLUS (Cytiva 17-1440-02). Une centrifugation a été réalisée à 400 × g pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules PBMC récupérées ont été lavées deux fois avec du PBS avant qu'elles soient mises en culture dans un milieu de culture RPMI-1640 (R8758 ; Sigma-Aldrich, Missouri, États-Unis) complété avec 10% de sérum « Fetal bovine serum » (FBS) décomplémenté, 1% d'une solution antimycotique et antibiotique (A5955, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) et 1% d'HEPES (Sigma Aldrich, H0887) pendant 24 heures. La viabilité cellulaire a été vérifiée par coloration au bleu trypan.

### 3.1.5. RT-PCR

L'analyse RT-PCR (Réaction en chaîne par polymérase avec transcription inverse) a été réalisée conformément à la méthode décrite par (Ferrand et al., 2022). L'expression génique a été normalisée par rapport aux deux références  $\beta$ -actine et GADPH. L'expression des gènes a été évaluée pour sept gènes inflammatoires : Interleukine 6 (IL-6), Interleukine 4 (IL-4), Interleukine 1 alpha (IL-1  $\alpha$ ), Cyclooxygenase-2 (Cox-2), Interleukine 2 beta (IL-2  $\beta$ ), Interleukine 12 beta (IL-12  $\beta$ ), Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ) et Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ). Les séquences des amorces utilisées sont indiquées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Les séquences des amorces sens et antisens.

Gènes	Numéro d'identification	Amorces sens	Amorces anti-sens
<b><math>\beta</math>-actin</b>	NM_173979.3	GGTTGGATCGAGCATTCCTCA	AAAAGCGATCACCTCCCCTG
<b>GADPH</b>	NM_001034034.2	CCGTAACCTTCTGTGCTGTGC	GGCGTGGACAGTGGTCATAA
<b>IL-6</b>	NM_173923.2	ACCCCAGGCAGACTACTTCT	CCCAGATTGGAAGCATCCGT
<b>IL-1 <math>\alpha</math></b>	NM_174092.1	TGAACGACGCCCTCAATCAA	AGCCTCAGTCCTCCCAAGAT
<b>Cox-2</b>	NM_174445	CTTCCTCCTGTGCCTGATGA	GTGAAAGCTGGTCCTCGTTC
<b>IL-12 <math>\beta</math></b>	NM_174356.1	CAAACCAGACCCACCCAAGA	GCATCCTTGTGGCATGTGAC
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	NM_173966.3	ACATACCTGCCACAAGG	ATGAGGTAAAGCCCGTCAGC
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	NM_174086.1	CTCCGGCCTAACTCTCTCCT	GGCCACCCCTTAGCTACATC

## 3.2. Résultats

### 3.2.1. Sélection de l'HETC

La Figure 18 met en évidence l'efficacité antibactérienne de l'HETC contre *E. coli* et *S. aureus*, avec des zones d'inhibition mesurant respectivement 25,33 mm et 36,83 mm, significativement supérieures à celles des autres composés testés ( $P=0,05$ , test t de Student). Par conséquent, l'HETC a été sélectionnée comme le candidat optimal dans le cadre de cette expérimentation.

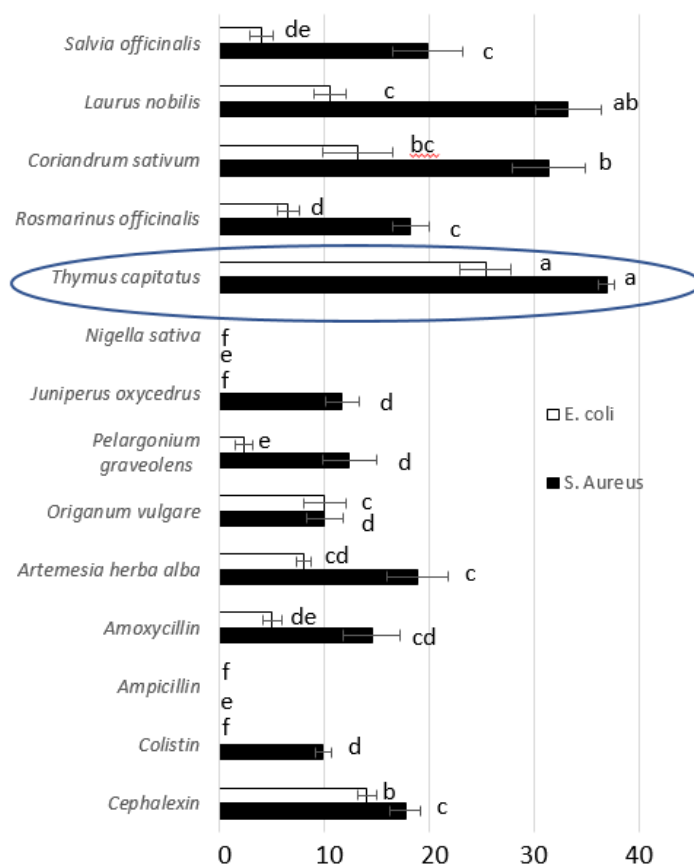


Figure 18 : Diamètre de la zone d'inhibition des 9 HEs tunisiennes et de 4 antibiotiques (Amoxicilline, Ampicilline, Colistine et Céphalexine) contre *E. coli* et *S. aureus*.

### 3.2.2. Expression des gènes inflammatoires

L'étude RT-PCR révèle qu'aucun effet significatif ( $p=0.05$ , test du chi) n'est observé sur l'expression des gènes inflammatoires, à savoir l'IL-6, l'IL-4, l'IL-1 $\alpha$ , la Cox-2, l'IL-2 $\beta$ , l'IL-12 $\beta$ , l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ , suite à l'application du HETC. La Figure 19 illustre l'expression normalisée de 6 gènes inflammatoires, confirmant cette absence d'effet significatif. Il est également important de noter l'ampleur considérable des écarts-types entre les individus au sein de chaque groupe.

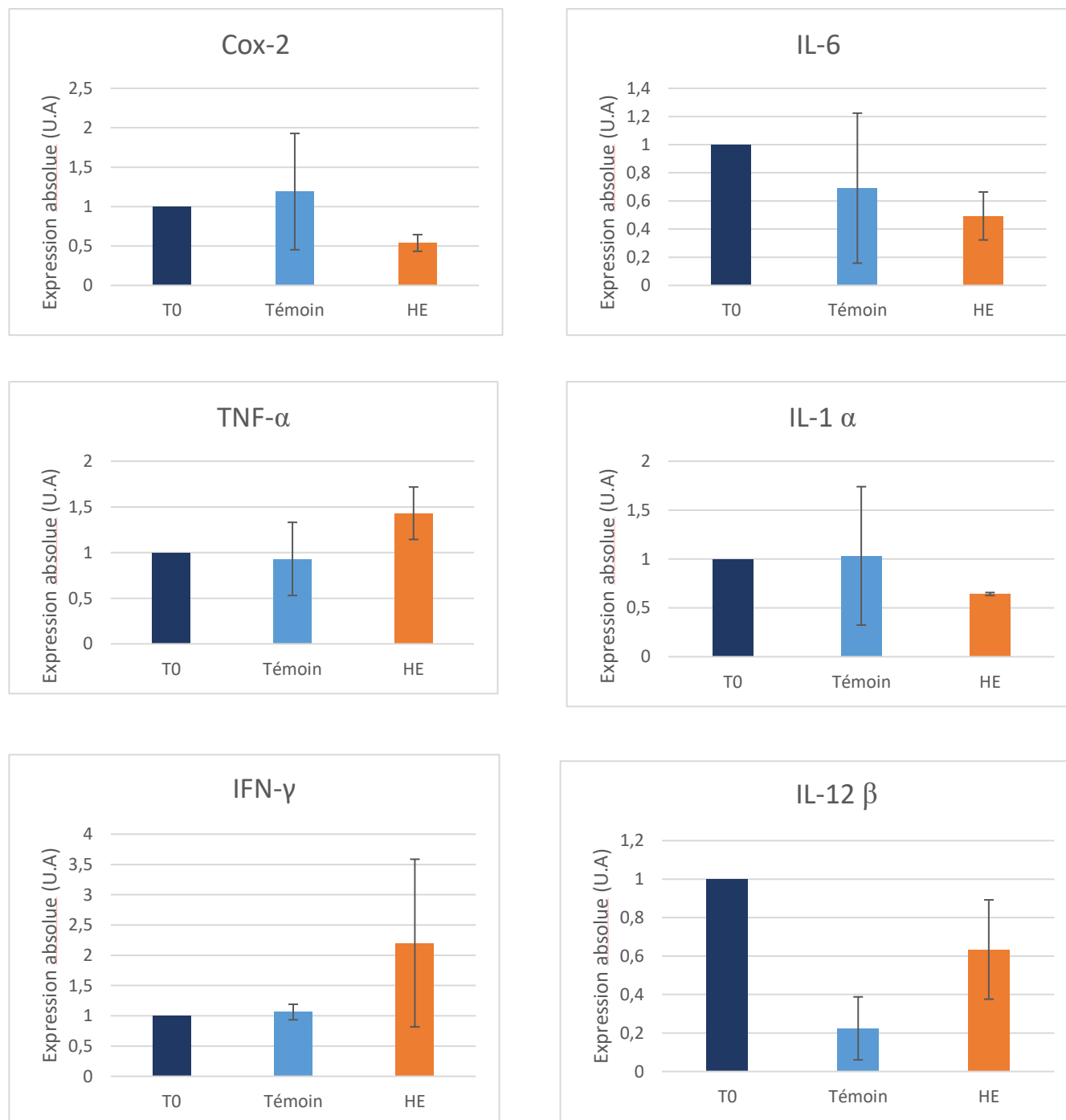


Figure 19 : Expression normalisée de 6 gènes inflammatoires Cox-2, IL-6, TNF-  $\alpha$ , IL-1  $\alpha$ , IFN-  $\gamma$  et IL-12  $\beta$  au jour 7 (le lendemain du dernier traitement) par rapport à T0 pour les 2 groupes (témoin et HE).

## 4. Discussion

La présente étude a évalué les effets d'une application topique de l'HETC sur des quartiers atteints de mammites subcliniques, en se concentrant sur trois aspects distincts, à savoir l'inflammation de la glande mammaire, les microbiotes du lait et de la peau, ainsi que la qualité du lait.

Tout d'abord, il est important de noter que le traitement à l'HETC n'a eu aucun effet sur les marqueurs inflammatoires, en particulier sur le CCS. Ce dernier n'a pas montré de diminution significative ( $P=0.05$ ) après l'application de l'HETC, maintenant une moyenne de 150 000 cellules/ml trois semaines après la dernière application, pour les deux groupes, à savoir le groupe VS et le groupe VM. Ces résultats indiquent que l'HETC n'a pas réussi à atténuer l'inflammation au niveau des quartiers mammaires. Il est intéressant de noter que nos résultats concordent avec ceux d'études antérieures menées par (Lefevre et al., 2008 ; Mohamed Walid et al., 2021), qui sont détaillées dans la section 3.2.2 de l'état de l'art. En ce qui concerne l'expression des gènes inflammatoires des cellules PBMC, le taux de l'IL-8 et la teneur en haptoglobine et en LF, nous avons observé une grande variation entre les individus appartenant au même groupe de vaches. Ces variations nous amènent à nous demander si ces facteurs reflètent véritablement l'état de l'inflammation de la glande mammaire. Dès lors, nous pouvons supposer que d'autres facteurs pourraient avoir influencé le teneur de ces quatre marqueurs.

De même, le traitement n'a pas affecté significativement la microbiologie du lait ( $p=0.05$ ). Les résultats obtenus étaient en contradiction avec plusieurs études *in vitro* montrant les propriétés antibactériennes du l'HETC (Benjemaa et al., 2018; Benjemaa et al., 2022; Bounatirou et al., 2007; El-Jalel, Elkady, Gonaïd, & El-Gareeb, 2018; Tagnaout et al., 2022). Nous avons avancé trois hypothèses pour expliquer ces résultats : la possible oxydation et dégradation de l'HETC pendant le massage aurait affecté ses propriétés antibactériennes (Hagnestam-Nielsen, Emanuelson, Berglund, & Strandberg, 2009), la concentration de l'HETC qui a pénétré dans le quartier serait inférieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI) des bactéries, l'HETC aurait été capturée par la matière grasse présente dans le lait. D'autres études sont nécessaires pour vérifier si les HEs en général et l'HETC en particulier sont capables de pénétrer la peau et atteindre la citerne de la glande mammaire. Rasool et al. ont

mélangé les HEs de lavande et d'eucalyptus avec du Dimethyl Sulphoxide avant de les appliquer sur les quartiers des vaches atteintes de mammites subcliniques. Leur suggestion est que l'ajout de Dimethyl Sulphoxide pourrait accroître la pénétrabilité des HEs dans la peau pour atteindre la citerne. L'analyse de la métagénomique a montré que le traitement testé induisait des changements limités dans le microbiote du lait et de la peau suggérant que les changements étaient liés à l'effet du temps au sein de l'écosystème du lait, plutôt qu'à un effet du traitement.

La dernière partie de l'étude a évalué les effets de l'application de l'HE sur la qualité du lait. En ce qui concerne les propriétés physiques du lait, la taille moyenne des micelles de caséine et la viscosité du lait sont, entre autres, des paramètres physiques importantes qui affectent la transformation du lait en d'autres produits à base de lait (fromage, yaourt, etc.). Aucune différence significative n'a été observée après l'application de l'HE, suggérant que l'HE n'interagit pas avec la biosynthèse de la caséine du lait, connue pour influencer la viscosité du lait.

Concernant l'analyse du lipidome du lait, la plupart des différences ont été détectées au J21 (2 semaines après la fin du traitement) et au J28 (3 semaines après la fin du traitement), suggérant que l'HE pourrait causer certains changements principalement limités aux diacylglycérols. Les diacylglycérols sont des composants importants du lait, représentant environ 2 % de la fraction lipidique du lait (Månsson, 2008). Le diacylglycérol est un élément intermédiaire dans la biosynthèse des triglycérides. Cette étape est catalysée par l'enzyme diacylglycérol acyl-CoA acyltransférase 1 (DGAT1). Il reste à vérifier si l'HETC a pu affecter l'activité de l'enzyme DGAT1. Hussein et al ont montré que l'HE de *Syzygium aromaticum* induisait des changements dans le métabolisme des triacylglycérols chez d'autres espèces, comme les caillies japonaises (Hussein, Abd El-Hack, Mahgoub, Saadeldin, & Swelum, 2019). D'autres études sont nécessaires pour déterminer si le traitement cutané à l'HETC peut réagir de la même façon chez les mammifères. Quant à l'analyse sensorielle, elle n'a montré aucune différence significative entre le lait issu des quartiers traités par l'HETC et les quartiers non traités suggérant une faible perméabilité de l'HE dans le quartier ou bien une dégradation rapide des molécules lors du massage ou dans le lait.



## 5. Conclusion

Nos travaux ont visé à évaluer les effets d'une application topique de l'HETC sur les mammites subcliniques et sur la qualité du lait. Cette application n'a eu aucun impact sur les mammites subcliniques, comme en témoignent le CCS et la présence de pathogènes responsables de cette inflammation dans le lait (SCN). De plus, cette application n'a pas entraîné de modifications significatives dans la qualité du lait, que ce soit au niveau de sa composition nutritionnelle, de ses caractéristiques sensorielles, de sa lipidomique ou de ses propriétés physicochimiques. Nous pouvons déduire que la consommation de lait issu de vaches traitées avec une application de HETC pourrait être sans risque avéré pour le consommateur, sous réserve de la réalisation des études de toxicologie appropriées concernant les résidus éventuels des HEs dans le lait. En outre, à une concentration de 10% de HETC, aucune modification significative n'a été observée dans le microbiote cutané et le microbiote du lait.

Plusieurs hypothèses ont été avancées, tout d'abord, la concentration d'HETC qui a pénétré la peau aurait été insuffisante (inférieure à la concentration minimale inhibitrice contre les pathogènes responsables des mammites). De plus, en raison du caractère lipophile des HEs, il est possible que l'HETC soit capturée par la matière grasse du lait, ce qui limiterait la biodisponibilité des molécules actives et leur activité. Enfin, l'oxydation des principes actifs de l'HETC lors du massage pourrait entraîner une dénaturation de leurs propriétés anti-inflammatoires et antibactériennes.

En raison de contraintes logistiques, réglementaires et financières, la répétition de cette étude *in vivo* en variant la concentration de l'HETC ou la durée de son application s'est avérée difficile. Face à ces défis, nous avons entrepris une autre expérience visant à explorer les effets de l'inhalation d'un panel de 12 HEs sur l'inflammation de la glande mammaire chez les vaches atteintes de mammites subcliniques (voir l'Annexe 6).

## Chapitre 2 : Études *in vitro* des effets anti-inflammatoires et antibactériens des huiles essentielles



## Chapitre 2 : Études *in vitro* des effets anti-inflammatoires et antibactériens des huiles essentielles

### 1. Introduction

Dans le cadre du projet MilkQua et de ma thèse, nous avons mené des études pour tester les activités anti-inflammatoire et antibactérienne *in vitro* d'un panel d'HEs comprenant l'HETC et son principal composé, le carvacrol.

Concernant l'activité anti-inflammatoire, une recherche *in vitro* a été menée, au laboratoire de l'université de pharmacie de Porto (UPFF) dirigé par le Pr David PEREIRA, pour évaluer l'activité comparée de plusieurs HEs incluses dans le projet MilkQua, à savoir la sauge (*Salvia officinalis*), la coriandre (*Coriandrum sativum*), le romarin (*Rosmarinus officinalis*), le cumin noir (*Nigella sativa*), le genévrier épineux (*Juniperus oxycedrus*), le géranium (*Pelargonium graveolens*), l'origan (*Origanum vulgare*) et l'armoise (*Artemisia herba-alba*). Ces essais ont été réalisés sur des macrophages THP-1 porteurs d'un rapporteur NF-κB dans le but de mieux comprendre les voies anti-inflammatoires des HEs et d'identifier celles dotées d'une puissante activité anti-inflammatoire.

Pour compléter ce travail, nous avons entrepris d'examiner les effets anti-inflammatoires de l'HETC et du carvacrol sur les cellules PBMC isolées du sang de vaches laitières. Ces cellules jouent un rôle crucial en tant que première ligne de défense contre les mammites. Notre choix s'est porté sur ce modèle cellulaire car plusieurs études antérieures ont montré des effets anti-inflammatoires du carvacrol sur d'autres modèles cellulaires comme les macrophages RAW 264.7, les cellules PC12 et les cellules HeLa (revue par (Imran et al., 2022)). En revanche, aucune recherche n'a été réalisée sur des PBMC issues des vaches laitières, dont le rôle dans l'immunité bovine contre la mammite est avéré. Cette étude sur les cellules PBMC nous a fourni des informations importantes concernant le potentiel préventif et curatif d'un traitement à base d'HETC, ce qui pourraient orienter de futurs projets d'expérimentations *in vivo*.

L'activité antibactérienne a été évalué en collaboration avec le centre de biotechnologie de Borj Cedria en Tunisie dirigé par le Professeur Riadh KSOURI. L'activité antibactérienne du

*Thymus capitatus* libre ou après encapsulation par nano-émulsification a été déterminée sur plusieurs pathogènes. Dans le cadre de ma thèse, une étude a été réalisée sur l'activité antibactérienne du carvacrol sous différentes formes : libre, nano-émulsifié ou après complexation aux protéines, sur deux souches pathogènes impliquées dans les mammites bovines.

## 2. Effets anti-inflammatoires des HES

Cette section présente deux études, l'une sur l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle du *Thymus capitatus* (HETC) et du carvacrol sur le modèle cellulaire PBMC, l'autre sur l'effet anti-inflammatoire d'HES sur les macrophages humains THP1.

### 2.1. Activité anti-inflammatoire de HETC et de son composé principal le carvacrol

Pour étudier les effets anti-inflammatoires, nous avons adopté deux stratégies afin d'évaluer à la fois les effets préventifs et curatifs de l'HETC et du carvacrol sur les cellules PBMC. La composition détaillée de l'HETC est présentée dans l'Annexe 5

#### 2.1.1. Matériels et méthodes

##### 2.1.1.1. Culture et stimulation des PBMC

La collecte de sang et l'isolement des cellules PBMC sont présentés dans les parties 3.1.3 et 3.1.4 du chapitre 1. Les PBMC isolées à partir de sang de vache sont mises en culture à une densité de  $1 \times 10^6$  cellules/ml dans des plaques de culture à 24 puits contenant du milieu de culture RPMI-1640 (R8758 ; Sigma-Aldrich, Missouri, États-Unis) complété avec 10% de sérum FBS décomplémenté, 1% d'une solution antimycotique et antibiotique (A5955, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) et 1% de Hepes (Sigma Aldrich, H0887). Les PBMC ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée de 5% de CO<sub>2</sub> (Ghaffari et al., 2021). Deux stratégies ont été adoptées afin d'étudier les effets anti-inflammatoires du HETC ou du carvacrol (Sigma-Aldrich, Missouri, États-Unis) : i. l'HETC ou le carvacrol ont été ajoutés pendant 6 heures avant l'ajout de 1 µg/ml de LPS (*E. coli* 0111:B4 ; L4391) pendant 16 heures ; ii. le LPS a été ajouté pendant 16 heures avant l'ajout de l'HETC ou du carvacrol pendant 6 heures. L'objectif de ces deux stratégies (Figure 20) est d'étudier les effets anti-inflammatoires curatifs et préventifs du HETC

et du carvacrol sur les cellules PBMC. Nous avons utilisé 50  $\mu$ M de dexaméthasone (Sigma Adrich, D4902) comme contrôle positif. Après la stimulation, les PBMC sont récupérées et mélangées avec du Trizol (Euromedex) et congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$  en vue de l'étude de l'expression des gènes par RT-PCR. À son tour, le milieu de culture est soumis à une centrifugation, le surnageant est récupéré et conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour les analyses protéiques par MILLIPLEX®.

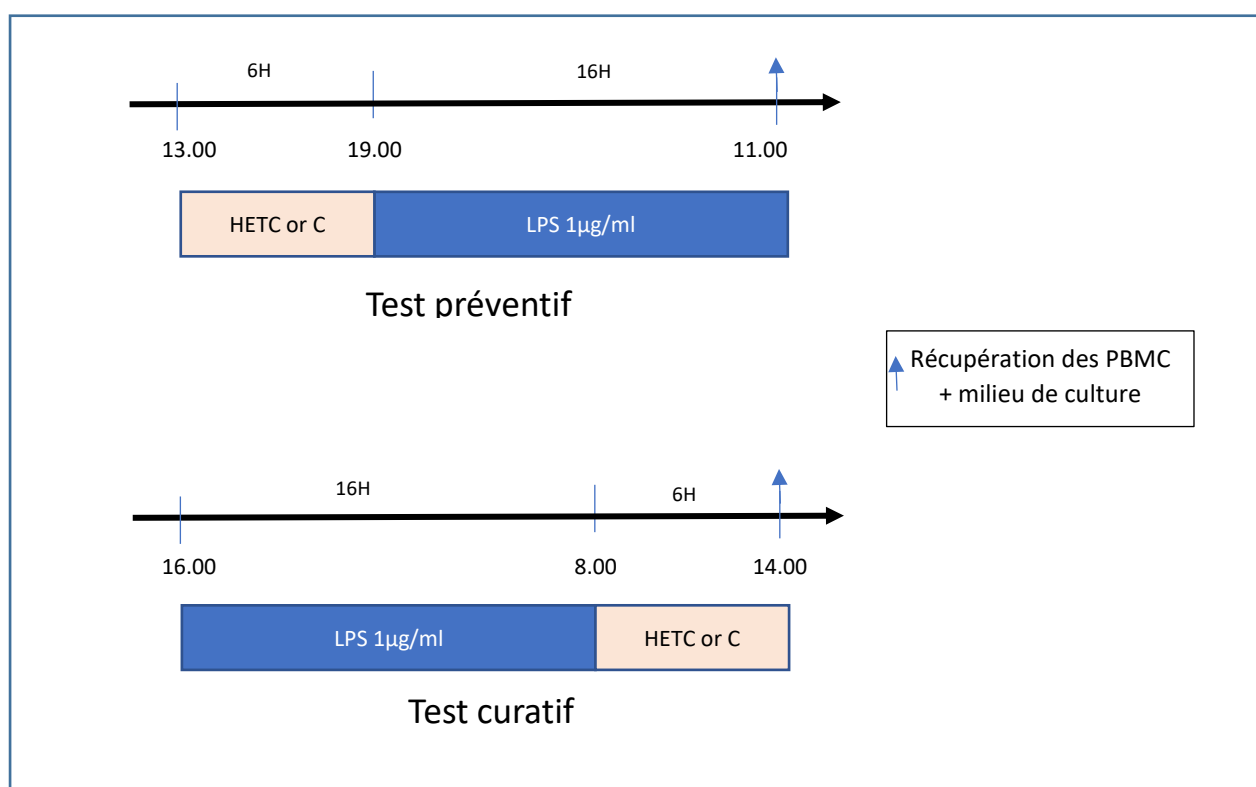


Figure 20 : Illustration des deux stratégies adoptées dans notre étude.  
 HETC ou C : Huile essentielle de *Thymus capitatus* ou carvacrol. LPS : Lipopolysaccharide provenant d'*E. coli* 0111:B4 ; L4391.

### 2.1.1.2. Évaluation de la toxicité des HETC et du carvacrol

Afin de détecter la concentration maximale non toxique d'HETC et du carvacrol, le test MTT est réalisé selon (Faraji et al., 2018) avec quelques modifications. En bref, les PBMC sontensemencées à une densité de 200 000 cellules/puits avec plusieurs concentrations d'HETC et du carvacrol pendant 24 heures. Après cette période, les cellules sont mélangées avec 50 $\mu$ L de solution MTT (4 mg/ml) puis incubé à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 4 heures. L'activité métabolique des cellules a été évaluée en fonction de leur capacité à réduire le tétrazolium MTT jaune en formazane. Ensuite, la solution est éliminée et les cristaux de formazane sont dissous dans 200 $\mu$ L de diméthylsulfoxyde (DMSO). La plaque est lue à une absorbance de 560nm dans un

lecteur de microplaques BioTek Instruments GmbH. L'expérience est répétée au moins trois fois, réalisée en triplicata.

### 2.1.1.3. Analyse RT-PCR

La RT-PCR est réalisée selon (Ferrand et al., 2022). L'expression génique est normalisée par rapport à la  $\beta$ -actine. La séquence des amorces utilisées est indiquée dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Les séquences des amorces sens et antisens.

Gènes	Accession number	Sense primers	Antisense primer
<b>B actin</b>	NM_173979.3	GGTTGGATCGAGCATTCCCA	AAAAGCGATCACCTCCCCTG
<b>IL-6</b>	NM_173923.2	ACCCCAGGCAGACTACTTCT	CCCAGATTGGAAGCATCCGT
<b>COX-2</b>	NM_174445	CTTCCTCCTGTGCCTGATGA	GTGAAAGCTGGTCCTCGTTC
<b>IL-8</b>	NM_173925.2	GACTTCCAAGCTGGCTGTTG	TTTGGGGTGGAAAGGTGTGG
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	NM_173966.3	ACATACCCTGCCACAAGG	ATGAGGTAAAGCCCGTCAGC

### 2.1.1.4. MILLIPLEX® bovine magnetic bead panel multiplex

La méthode MILLIPLEX® bovine est utilisée afin de doser les différentes cytokines et chimiokine secrétées dans le milieu de culture par les PBMC. Cette méthode est décrite par (Guinan & Lopez, 2020) : un kit 15-plex (BCYT1-33 K; EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) contenant des anticorps des interleukines (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, l'antagoniste du récepteur de l'IL-36, l'interféron (IFN)- $\gamma$ , la protéine inflammatoire des macrophages (MIP)-1 $\alpha$ , l'IP-10, la protéine chimiokine du macrophage (MCP)-1, la MIP-1 $\beta$ , le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF)-A et le facteur de nécrose tumorale (TNF)- $\alpha$  est utilisé.

## 2.1.2. Résultats

### 2.1.2.1. Cytotoxicité de l'HETC et du carvacrol

Le test MTT a été réalisé pour déterminer la concentration maximale non toxique d'HETC et de carvacrol sur les PBMC. Les résultats de cytotoxicité sont représentés dans la Figure 21. Le

carvacrol présente une toxicité à partir de 5 µg/ml, tandis que le HETC présente une toxicité à partir de 31,2 µg/ml.

Afin d'assurer la viabilité des PBMC, la concentration choisie pour l'HETC et le carvacrol était 10 fois plus faible que les concentrations obtenues à partir du test MTT. Pour le carvacrol, la concentration choisie était de 0,5 µg/ml, tandis que 3 µg/ml ont été choisis pour le HETC.

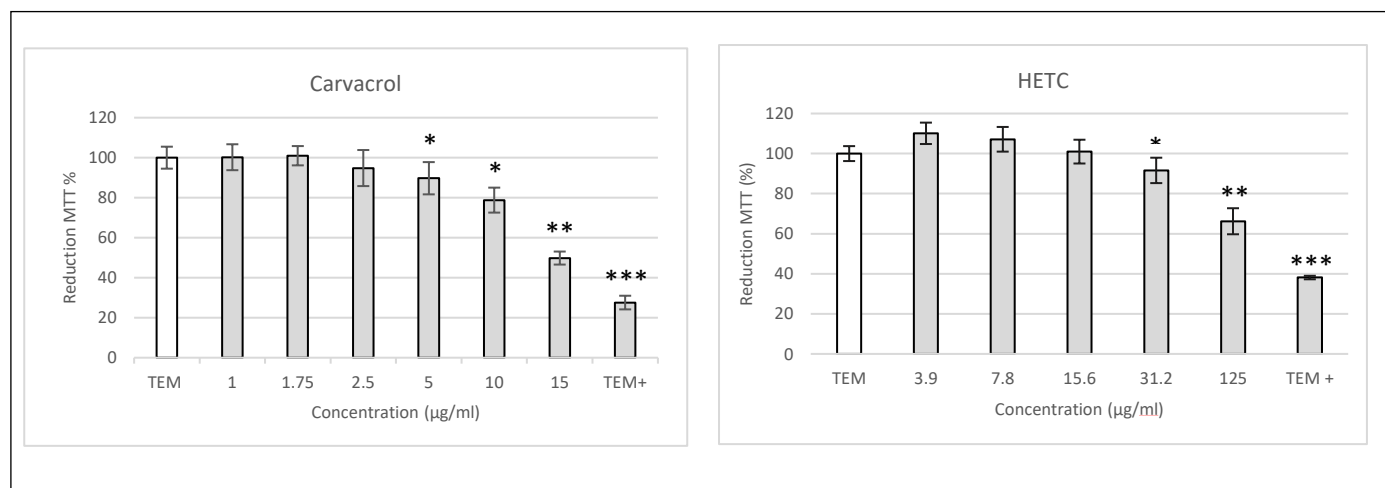


Figure 21 : Viabilité des PBMC traitées avec des concentrations croissantes d'huile essentielle de *Thymus capitatus* (HETC) et de carvacrol (C) évaluée par le test MTT.

\*  $p < 0.5$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 2.1.2.2.Expression des gènes

La Figure 22 illustre les effets préventifs de l'HETC et du carvacrol, sur l'expression de trois gènes inflammatoires. Les résultats ont montré que l'HETC et le carvacrol réduisaient significativement l'expression du gène COX-2 exclusivement. Il est à noter que la dexaméthasone (le témoin positif) diminuait avec succès l'expression des trois gènes, COX-2, IL-6 et TNF- $\alpha$ . Il est aussi intéressant de préciser que le carvacrol et l'HETC ne réduisent pas l'expression des deux gènes inflammatoires, IL-6 et TNF- $\alpha$ . Pour des raisons logistiques, nous n'avons pas pu étudié l'effet curatif de ces composés sur l'expression de l'IL-8.



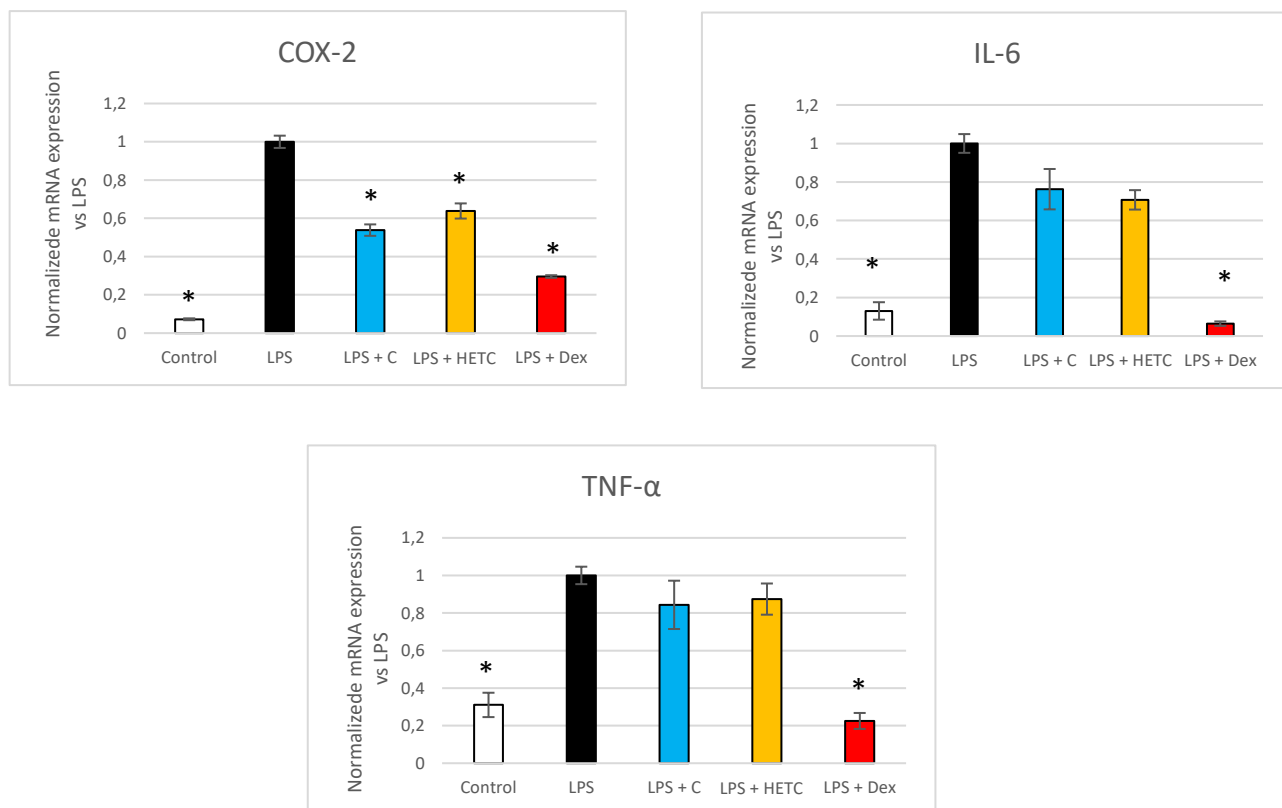


Figure 22 : Effets préventifs de l'huile essentielle de *Thymus capitatus* et du carvacrol sur l'expression des ARNm de COX-2, IL-6 et TNF- $\alpha$  induite par LPS.

Les données de RT-PCR ont été normalisées au gène de référence, la  $\beta$ -actine. Les PBMC ont été traitées pendant 16 heures avec du LPS (1  $\mu$ g/ml), avec ou sans préincubation avec l'HETC ou le carvacrol pendant 6 heures.

LPS : lipopolysaccharide ; C : Carvacrol ; Dex : Dexaméthasone (50  $\mu$ M). \*  $p < 0,5$ .

La Figure 23 met en évidence les effets curatifs de l'HETC et du carvacrol. Conformément à son effet préventif, la dexaméthasone, agissant en tant que contrôle positif, a efficacement réduit l'expression des gènes évalués, à savoir COX-2, IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$ . En revanche, l'HETC et le carvacrol ont présenté une réduction significative de l'expression des gènes IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$ , tandis que leur impact sur l'expression du gène COX-2 n'était pas statistiquement significatif (contrairement aux effets préventifs).

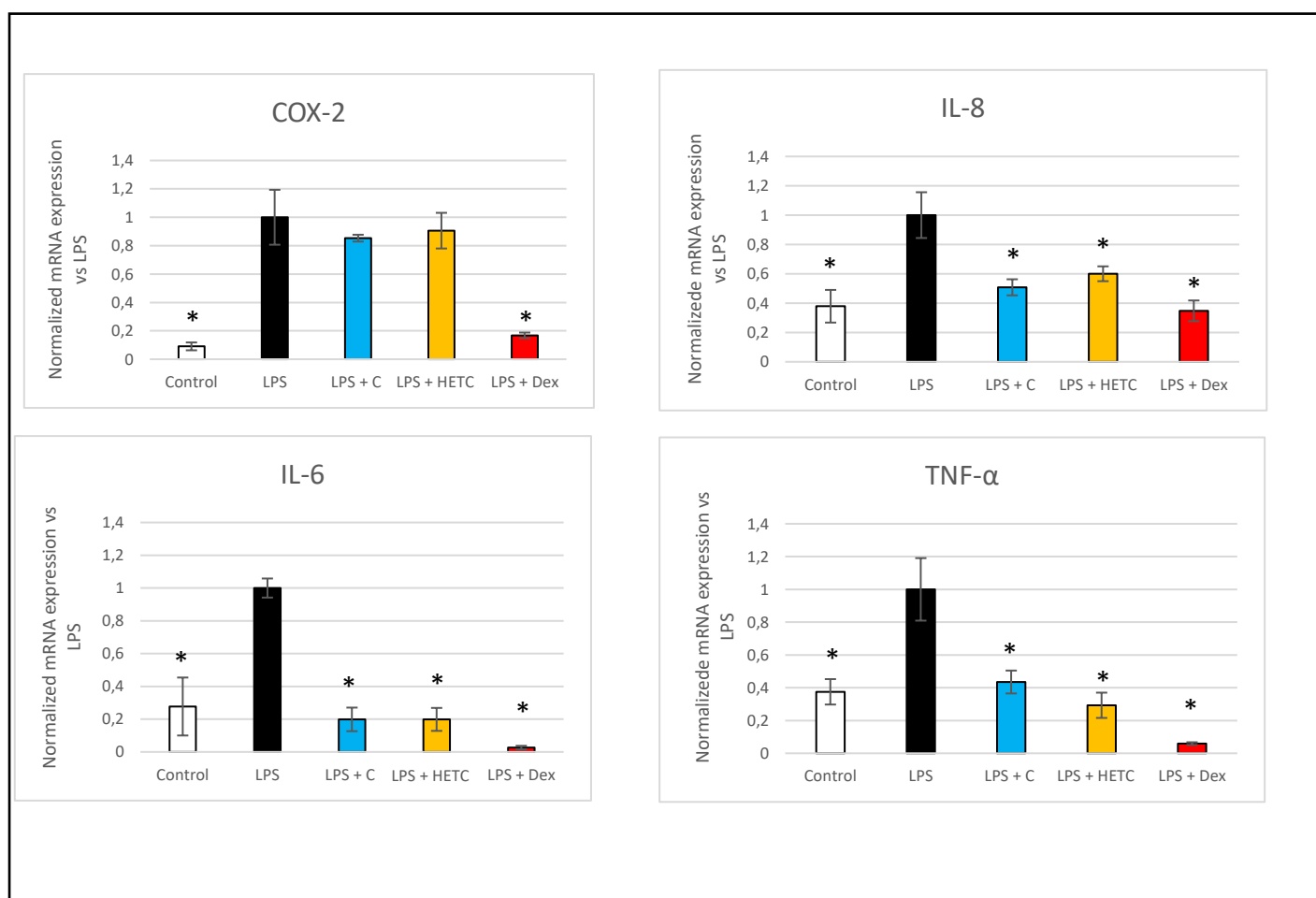


Figure 23 : Effets curatifs de l'huile essentielle de *Thymus capitatus* (HETC) et du carvacrol (C) sur l'expression des ARNm de COX-2, IL-8, IL-6 et TNF- $\alpha$  induite par LPS.

Les données de RT-PCR ont été normalisées au gène de référence, la  $\beta$ -actine. Les PBMC ont été traitées pendant 16 heures avec du LPS (1  $\mu$ g/ml), avant l'ajout de HETC ou de Carvacrol pendant 6 heures.

LPS : Lipopolysaccharide ; C : Carvacrol ; Dex : Dexaméthasone (50  $\mu$ M). \*  $p < 0,5$ .

### 2.1.2.3. Dosage des cytokines par MILLIPLEX®

Dans cette étude nous avons analysé les niveaux d'expression de 15 cytokines et chimiokines, médiateurs de l'inflammation. Les résultats montrent que le LPS a induit une augmentation significative de la sécrétion de l'ensemble des protéines dosées ce qui est conforme aux résultats de l'étude de l'expression des gènes. En revanche, contrairement aux études d'expression de gènes, les traitements par la dexaméthasone, l'HETC et le carvacrol n'ont eu aucun effet significatif sur la modification des niveaux d'expression de ces protéines. La Figure 24 ci-dessous illustre la concentration d'IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  mesurée en présence ou en absence de HETC et du carvacrol dans le cas préventif.

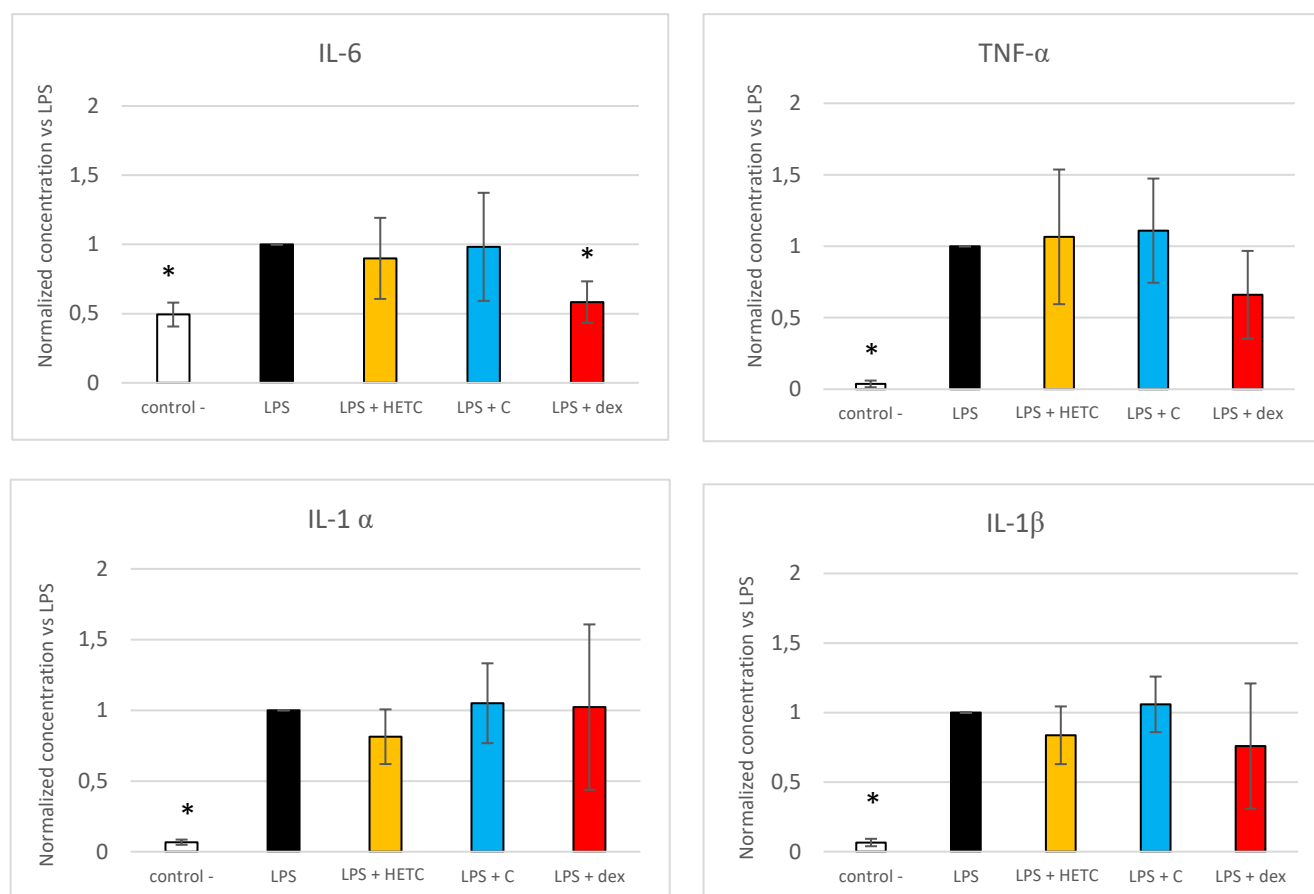


Figure 24 : Effets préventifs de l'huile essentielle de *Thymus capitatus* et du carvacrol sur la sécrétion des protéines IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1  $\alpha$  et IL-1 $\beta$  induites par le LPS.

Les PBMC ont été traitées pendant 16 heures avec du LPS (1  $\mu$ g/ml), avec ou sans pré-incubation avec le HETC ou le carvacrol pendant 6 heures.

LPS : lipopolysaccharide ; C : Carvacrol ; HETC : huile essentielle de *Thymus capitatus* ; Dex : Dexaméthasone (50  $\mu$ M). \*  $p < 0.05$ .

### 2.1.3. Discussion

L'HETC et le carvacrol présentent des propriétés anti-inflammatoires qui se traduisent par une réduction de l'expression des gènes clefs de l'inflammation sur les cellules PBMC issues de vaches laitières. Les effets anti-inflammatoires du carvacrol et d'autres principes actifs des HES ont été démontrés dans plusieurs publications et sur différents modèles cellulaires (De Sousa et al., 2023). À notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée pour évaluer l'activité anti-inflammatoire de l'HETC. En revanche, plusieurs études ont été menées sur son principal composé, le carvacrol. Une étude menée par Li et al. a montré que ce composé réduisait la production de cytokines inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-8, dans les « rheumatoid arthritis Fibroblast-like synoviocytes cells » (RA-FLSs) stimulées par du LPS. Selon les auteurs, le carvacrol bloquerait l'activation du récepteur de type Toll-like 4 (TLR4),

ce qui entraînerait l'activation du facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B) et/ou les voies p38 et ERK1/2 (Li, Xu, Gu, Liu, & Tian, 2019). Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant des cellules de leucémie monocyttaire comme modèle fiable, où le carvacrol avait montré des effets anti-inflammatoires en bloquant l'activation de l'inflammasome NLRP3 par le biais des voies caspase-1 induites par l'ATP (Leu, Chen, & Guh, 2019). Contrairement à nos résultats sur les PBMC, une réduction de l'expression de COX-2 dans les cellules de macrophages humains U937 stimulées par le LPS et le carvacrol ont été rapportés (Hotta et al., 2010).

Concernant le dosage des cytokines par MILLIPLEX®, les résultats de notre étude sont en contradiction avec l'expression génique obtenue par RT-PCR. Cette disparité peut être expliquée par une différence de délai de réponse des PBMC : les gènes ont montré des changements d'expression plus rapidement que l'arrêt de la sécrétion des protéines inflammatoires. Cela explique la présence de ces protéines même après 24 heures d'incubation, un laps de temps probablement non suffisant pour identifier des modifications concernant la sécrétion des protéines, même dans les conditions où la dexaméthasone est ajoutée (Y. Liu, Beyer, & Aebersold, 2016). De plus, la quantification des cytokines a été réalisée 24 heures après le début de l'expérience ce qui veut dire que nous n'avons dosé que l'accumulation des cytokines sécrétées pendant cette période. Afin de mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire du HETC et du carvacrol par dosage de cytokines, il serait pertinent d'effectuer une série de mesures de cytokines à très court terme (suite au challenge de LPS) et à d'autres moments afin de construire une cinétique de dosage (Jovanovic et al., 2015). Selon une autre hypothèse, la non-concordance des résultats géniques avec les résultats protéiques observés dans notre essai serait liée à un faible niveau de stabilité des ARNm et/ou des modifications de leur régulation post transcriptionnelle par d'autres facteurs ou cytokines (Fenton, 1992; Takeshita, Gage, Kishimoto, Vredevoe, & Martínez-Maza, 1996).

## 2.2. Activité anti-inflammatoire des huiles essentielles méditerranéennes et de leurs principaux composés chez les macrophages THP-1

Nous avons également évalué et comparé la capacité de plusieurs HEs à inhiber l'activation de NF- $\kappa$ B en utilisant des macrophages humains THP-1 porteurs d'un rapporteur NF- $\kappa$ B. Le but était d'identifier celles dotées d'une puissante activité anti-inflammatoire pouvant éventuellement jouer un rôle dans le traitement des mammites.

Des analyses plus approfondies ont été menées sur les HEs qui ont montré une plus grande efficacité dans l'inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B. Nous avons ainsi examiné l'expression des ARNm par RT-PCR de quatre cytokines inflammatoires (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et COX-2) chez les macrophages THP-1 stimulés par du LPS. Nous avons par ailleurs dosé les cytokines dans le milieu de culture par ELISA ou Western Blot et évalué l'inhibition de l'activité de la caspase-1 en utilisant l'essai Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay.

Pour mieux comprendre les effets anti-inflammatoires des HEs sélectionnées, la méthode GC-MS a été utilisée pour analyser leur composition chimique et donc identifier les deux principaux composés de chacune des HEs. Par la suite, ces derniers ont été testés individuellement ou en mélange binaire pour déterminer leur contribution aux effets anti-inflammatoires observés chez les HEs brutes.

Parmi les différentes HEs testées, trois d'entre elles, plus spécifiquement les HEs de coriandre, de géranium et d'absinthe, ont été identifiées comme les plus efficaces pour inhiber l'activation de NF- $\kappa$ B. De plus, elles ont montré une capacité à réduire de plus de 50 % l'expression des ARNm de l'IL-6, de l'IL-1 $\beta$ , du TNF- $\alpha$  et de la COX-2 dans les macrophages THP-1 stimulés par le LPS.

De même, les deux principaux composés qui représentent plus de 50 % de chaque HE ont été testés à des concentrations équivalentes à celles présentes dans chaque HE. Les résultats ont montré que le composé principal, ou même une combinaison des deux principaux composés, pouvaient expliquer les effets anti-inflammatoires observés dans les HEs brutes.

Par ailleurs, les HEs sélectionnées ont également démontré une inhibition de plus de 50 % de l'activité de la caspase-1, un marqueur de l'inflammation. Cependant, cet effet ne peut pas être attribué aux principaux composés, à l'exception de  $\beta$ -citronellol présent dans l'huile de géranium (avec une inhibition de 40 %), ce qui suggère la possible présence de composés mineurs jouant un rôle dans l'inhibition de la caspase-1, en plus des synergies potentielles avec les composés majeurs.

Ce travail a été publié dans le journal "Food Research International" (Pereira et al., 2023). Il est disponible sous la référence : <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112678>

### 3. Étude des effets antibactériens du carvacrol après encapsulation

#### 3.1. Introduction

Comme rapporté dans plusieurs publications (Gholamhosseinpour et al., 2023; Hien & Dao, 2021; Jiang et al., 2023; Ntalli et al., 2023; Osanloo et al., 2022; Pilog et al., 2022; Pinto et al., 2023; Torshabi et al., 2023), l'encapsulation des molécules bioactives est une solution proposée dans tous les secteurs d'applications pour l'amélioration des activités antibactériennes observées.

Au sein du projet MilkQua, deux stratégies ont été adoptées afin d'évaluer l'effet d'encapsulation des HEs sur leurs propriétés antibactériennes. La première stratégie, menée par le Centre de Biotechnologie de Borj-Cédria (Tunisie), consistait à évaluer l'effet de l'encapsulation par nano-émulsion de l'HETC sur ses propriétés antioxydantes et antibactériennes. Les résultats sont publiés sous forme d'un article scientifique intitulé « Essential Oil Stabilisation by Response Surface Methodology (RSM): Nanoemulsion Formulation, Physicochemical, Microbiological, and Sensory Investigations » dans la revue « Molecules » (Benjemaa et al., 2022). Les résultats ont montré que l'encapsulation améliore significativement les propriétés antioxydantes et antibactériennes de l'HETC. Ce travail a été publié dans le journal « Molecules » (Benjemaa et al., 2022). Il est disponible sous la référence : <https://doi.org/10.3390/molecules27217330>

En résumé, pour optimiser l'encapsulation de l'HETC dans une nano-émulsion stable présentant le plus faible diamètre de gouttelettes, une étude RSM a été appliquée. Les conditions optimales de préparation étaient les suivantes : le pourcentage d'émulsifiant (Tween 20) dans la phase continue (eau) était de 7 % ; le temps d'agitation était de 0 minute ; le temps de sonication était de 0 minute ; et le pourcentage de la phase dispersée (HETC + Huile de maïs) était de 5 %. La réponse prédite (Y) était de 270 nm. Le diamètre moyen des gouttelettes des nano-émulsions obtenues s'est avéré être de  $260,8 \pm 1,52$  nm, ce qui était proche de la valeur prédite par le modèle issu de la RSM.

Les résultats ont également mis en évidence des améliorations significatives de la capacité à neutraliser le radical DPPH après l'encapsulation de l'HETC. De plus, l'efficacité antimicrobienne de l'HETC a été considérablement augmentée, avec une inhibition de la croissance de *Salmonella typhimurium* 17 fois plus élevée que celle observée avec l'HETC libre.

Pour compléter ce travail, nous nous sommes intéressés dans cette partie de la thèse à comparer deux méthodes d'encapsulation, la nano-émulsion et la complexation du carvacrol aux protéines afin de déterminer leurs effets respectifs sur les activités antibactériennes. Deux bactéries responsables des mammites, à savoir *E. coli* (P4) et *S. aureus* (NB305) ont été ciblées.

### 3.2. Propriétés antibactériennes du carvacrol libre, nano-émulsionné et complexé avec des protéines

## Research note

### Antibacterial properties of free, nanoemulsified and protein-complexed carvacrol

R. Nehme<sup>1,2</sup>, L. Abdennebi-Najar<sup>1,3</sup>, L. Rault<sup>2</sup>, M.-B. Maillard<sup>2</sup>, S. Even<sup>2</sup>, S. Andrés<sup>4</sup>, F. Rousseau<sup>2</sup>, D.M. Pereira<sup>5</sup>,  
F. Ceciliani<sup>7</sup>, R. Ksouri<sup>6</sup>, S. Bouhallab<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Quality and Health Department, IDELE Institute, 149 rue de Bercy, 75595 Paris CEDEX 12, France.

<sup>2</sup> INRAE, Institut Agro, STLO, 65 rue de Saint Briec, F-35042 Rennes, France.

<sup>3</sup> Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Sorbonne University, INSERM UMR-S 938, 75020 Paris, France.

<sup>4</sup> Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-Universidad de León, Finca Marzanas s/n, 24346 Grulleros, Spain.

<sup>5</sup> REQUIMTE/LAQV Laboratory of Pharmacognosy, Department of Chemistry Faculty of Pharmacy, University of Porto, R. Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal.

<sup>6</sup> Laboratory of Aromatic and Medicinal Plants, Biotechnology Center of Borj-Cédria, Hammam-Lif BP 901 2050, Tunisia.

<sup>7</sup> Università degli Studi di Milano, Department of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Via dell'Università 6, Lodi, Italy.

#### Keywords

Carvacrol, antibacterial, encapsulation, nanoemulsion, protein-complexation.



27   **ABSTRACT**

28   Essential oils (EOs) are aromatic compounds known for their potent anti-inflammatory and antibacterial  
29   properties. However, these molecules are susceptible to degradation when exposed to external conditions,  
30   such as light and oxygen. Numerous studies have reported the protective effects of encapsulation on  
31   sensitive bioactives, such as EOs.

32   The aim of this study was to investigate the antibacterial activity of different formulations of carvacrol, the  
33   primary compound found in various EOs. We evaluated the activity of free carvacrol, protein-complexed  
34   carvacrol, and nano-emulsified carvacrol against two selected pathogenic bacteria: *Staphylococcus aureus* (a  
35   Gram+ strain) and *Escherichia coli* (a Gram- strain).

36   Free carvacrol exhibited antibacterial activity against both tested bacteria, with comparable minimum  
37   inhibitory concentrations of 380 µg/mL for *S. aureus* and 370 µg/mL for *E. coli*. However, encapsulation  
38   through nano-emulsification, resulting in nano-droplets ranging from 100 to 240 nm, did not improve the  
39   observed antibacterial effect.

40   Remarkably, attempts to encapsulate carvacrol in heteroprotein complex coacervates, formed by mixing  
41   lactoferrin and β-lactoglobulin (two oppositely charged proteins), were unsuccessful. Ongoing studies aim to  
42   understand the reasons behind this ineffectiveness of heteroprotein complex coacervates, despite the strong  
43   affinity between carvacrol and lactoferrin, in contrast to what has been reported regarding the effectiveness  
44   of protein-polysaccharide complex coacervates.

45

46

47

48

49

50

51

## 52 INTRODUCTION

53 Essential oils (EOs) are defined as aromatic, colourless, volatile liquid mixtures derived from plant materials  
54 and named after the corresponding plants. They represent less than 5% of the vegetable dry matter [1,2].  
55 These natural compounds, are produced by the secondary metabolism of herbs and/or spices and their  
56 constituents find extensive use not only in cosmetic and perfume industries [3] but also in human  
57 consumption as functional food (nutraceuticals, biopolymers) and food additives (flavourings, antioxidant  
58 and antimicrobial) [4]. Owing to their antimicrobial and antioxidant properties, EOs also have applications in  
59 medical (15%) and agri-food (29%) sectors [5]. The identification of their components in the 19th century  
60 contributed to the development of their applications namely in the pharmaceutical industry [6]. Among the  
61 different natural sources, Thyme essential oil (EO) is gaining a wide interest in food industry for its potential  
62 as antiseptic capacities, as well as for being Generally Recognized as Safe (GRAS) [7]. A phenolic  
63 monoterpenoid, carvacrol, constitutes the major component of Thyme EO which represents more than 70%  
64 of the total EO components of the genus *Thymus Capitatus* [8]. In fact, carvacrol represents the main  
65 component of several EOs as *Thymus vulgaris* L [9], *Lippia graveolens*[10] and numerous other EOs [11].  
66 However, EOs molecules present some physical properties limiting their value in phytosanitary and  
67 veterinary products or in the food industry. Their sensitivity arises from their intricate composition of volatile  
68 and delicate compounds. They are particularly vulnerable to external factors such as light, heat and oxygen,  
69 which can compromise their stability and therapeutic properties [12]. Light exposure, especially UV radiation,  
70 can trigger photooxidation and alter the chemical makeup of EOs, leading to changes in aroma and potential  
71 loss of efficacy [13,14]. Elevated temperatures can accelerate the degradation process, while exposure to  
72 oxygen can cause oxidation and potentially render the oil less potent [15,16].  
73 Given these limitations, encapsulation has emerged as a valuable solution [1,17,18]. Through encapsulation,  
74 EOs are entrapped within protective matrices that shield them from environmental conditions [19]. In  
75 principle, encapsulation extend the shelf life of EOs, maintain their potency, and enable controlled release,  
76 addressing the inherent sensitivity of EOs [20,21]. However, the impact of encapsulation on their  
77 antibacterial activity remains a topic of debate, with numerous publications reporting a significant increase

78 in their antibacterial effect regardless of the used encapsulation method [22-29]. Emulsification and complex  
79 coacervation are among the most proposed efficient technologies for encapsulation and protection of  
80 bioactives [1].

81 Nanoemulsion, which allows the increase of the active surface area by reducing the size of the droplets, is a  
82 classical method of encapsulation that is used to encapsulate various types of molecules, including EOs [30].  
83 Encapsulation through complex coacervation involves the phase separation of two oppositely charged  
84 biomacromolecules, leading to the creation of micro-droplets termed coacervates. Complex coacervates  
85 notably formed by mixing proteins and polysaccharides, has found broad application in encapsulating diverse  
86 substances, including EOs [31-33]. Heteroprotein complex coacervation (HPCC) is a subtype of complex  
87 coacervation where the biomacromolecules solely consist of mixed proteins. Several research groups  
88 including ours have studied the formation of coacervates between various oppositely charged proteins [34].  
89 Indeed, HPCC, formed between two milk proteins, lactoferrin and  $\beta$ -lactoglobulin, has shown its effectiveness  
90 for the encapsulation of hydrophilic molecules such as vitamin B9 [35]. However, no prior research has  
91 studied the potential of the encapsulation of volatile compounds using the HPCC or their simple complexation  
92 to food proteins. The major part of the publications in this field report that encapsulation significantly  
93 enhances the antibacterial activity of EOs and derived components [22-29]. Our group participated to this  
94 active research field by showing the increase (+9 to +61 %) of *Thymus Capitatus* EO activity against several  
95 pathogenic bacteria and yeast after nanoemulsification [36]. As our work is part of a European Prima project  
96 on the use of EO for the treatment of bovine subclinical mastitis, we selected strains from bacterial species  
97 involved in this infection. The current study aimed to determine the antibacterial activity of different forms of  
98 carvacrol against two selected pathogenic species, *E. coli* (Gram- strain) and *S. aureus* (Gram+ strain). Free,  
99 nanoemulsified and protein-complexed carvacrol were compared.

100

## 101 MATERIAL AND METHODS

### 102 Reagents

103 Pure carvacrol solution (C), Tween 80 and 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) buffer were purchased  
104 from Sigma-Aldrich (M8250 USA). Brain heart infusion medium (BHI; pH 7.4, BD, Le Pont de Claix, France)  
105 and Mueller Hinton medium (MH; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) were used as culture media. Pure  
106 milk bovine proteins, Beta lactoglobulin (BLG; industrial preparation source) and Lactoferrin (LF; Fonterra  
107 Cooperative Group), known to form complex coacervates [35].

108

## 109 ***Bacteriological tests***

### 110 *Selection of bacteriological strain*

111 Initially, we chose to study three strains of *S. aureus*: RF122, NB305, O11, as well as two strains of *E. coli*: P4,  
112 K08. These five strains were isolated from cow's milk and stored in liquid nitrogen. For subsequent  
113 bacteriological analyses, we selected the most sensitive Gram+ and Gram- strains to carvacrol (lowest  
114 minimum inhibitory concentration MIC). To identify the strain of each bacterial species that has the lowest  
115 MIC, a quantitative bacteriological analysis is conducted (the method is explained in the 'Quantitative Study'  
116 section). Initially, we assumed that complex heteroprotein coacervation was only possible at concentrations  
117 of 600 µg/mL. Thus, in order to compare the antibacterial activity of free carvacrol and encapsulated  
118 carvacrol, it was necessary for the encapsulation concentrations to be around this value (as beyond this  
119 concentration, we observed the formation of aggregates instead of coacervates).

120

### 121 *Qualitative study*

122 The qualitative test was done according to Biswas et al. [37]. In brief, 5 wells were made in Mueller Hilton  
123 agar plates, inoculated with  $1.5 \times 10^8$  cfu/mL of one of the two strains of bacteria (*S. aureus* or *E. coli*). 50 µL  
124 of aliquots of each test extract were added in every well. Controls were established for each bacterial strain  
125 by using pure solvents without carvacrol. The plates were incubated 24 hrs at 37 °C Inhibition zones were  
126 measured using a ruler. The obtained results were the average of at least three independent experiments.

### 127 *Quantitative study*

128 Precultures were prepared by incubating 50  $\mu$ L of the bacterial sample in 5 mL of Brain heart infusion medium  
129 (BHI) at 37°C with agitation for 24 hours. From the precultures, we prepared a stock solution of bacterial  
130 suspension in Mueller Hinton medium (MH) containing a final concentration of  $5 \times 10^5$  cfu/mL. To determine  
131 the MIC four concentration of different forms of carvacrol were tested: 100, 200, 300 and 600  $\mu$ g/mL (initially,  
132 high concentrations of carvacrol ranged from 50 to 3600  $\mu$ g/mL were tested to select the more sensitive  
133 strains). The MIC is then identified as the lowest concentration at which no visible growth of microorganisms  
134 was observed [38].

135

## 136 **Protein complexation and encapsulation of carvacrol**

### 137 *Stock solution*

138 The characteristics and the preparation of these proteins were done according to Chapeau et al. [35] with  
139 slight modifications: In brief bovine LF and BLG stock solutions were prepared by solubilizing the protein  
140 powders in 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) buffer diluted at 10 mM in milli-Q water and their  
141 pH was adjusted to pH 5.5, showed to be the optimal pH value for complex coacervation. The protein  
142 solutions were filtered through a 0.45  $\mu$ m membrane. The exact protein concentrations were determined by  
143 absorbance at 280 nm (UVmc<sup>2</sup> spectrometer, Safas, Monaco) using 1.47 and 0.96 L.g<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> as extinction  
144 coefficients for LF and BLG respectively. Carvacrol was diluted in pure ethanol. LF, BLG and Carvacrol stock  
145 solutions were stored at 4°C.

146

### 147 *Protein binding by Intrinsic fluorescence assay*

148 In order to determine de relative interaction affinity of carvacrol with the proteins and consequently, the  
149 mixing order for HPCC, the binding of carvacrol to individual proteins was first determined by fluorescence  
150 spectroscopy. The fluorescence was done according to Montovani et al [35] : The intrinsic fluorescence of  
151 the protein was measured using a FluoroMax-Plus spectrophotometer (HORIBA, Japan). The excitation  
152 wavelength was set to 276 nm, and emission spectra were recorded from 290 to 450 nm with a 5 nm  
153 excitation and emission width. A 2 mL solution of diluted single protein was placed in a quartz cuvette and

154 then titrated with 10 successive injections of 10  $\mu\text{L}$  of carvacrol with varying carvacrol/protein molar ratios  
 155 ranging from 0 to 8. Each titration was performed three times to ensure accuracy and reliability of the  
 156 measurements.

157 The fluorescence quenching data were analysed according to Stern Volmer (Eq. (1)).

$$158 \quad \frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1)$$

159 **F<sub>0</sub>** represents the fluorescence intensity in the absence of a quencher;

160 **F** represents the fluorescence intensity in the presence of the quencher;

161 **k<sub>q</sub>** represents the bimolecular quenching constant;

162 The fluorophore's lifetime in the absence of a quencher is represented by  **$\tau_0$** , with a value of  $10^{-8}$  seconds;

163 **[Q]** denotes the total concentration of the quencher;

164 **K<sub>SV</sub>** represents the Stern-Volmer quenching constant.

165

166 In addition, to determine the number of fluorophore populations in LF and their susceptibility to carvacrol,  
 167 the fluorescence quenching data was analyzed using the modified Stern-Volmer equation. (Eq. (2)).

$$168 \quad \frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a \times K_{SV} \times [Q]} + \frac{1}{F_0 - F} \quad (2)$$

169 **f<sub>a</sub>** represents the fraction of the initial fluorescence that can be accessed by the quencher;

170 **K<sub>SV</sub>** is the effective quenching constant applicable to the accessible fluorophore.

171

172 The quenching of LF fluorescence by carvacrol was analysed according to the Scatchard representation (Eq.  
 173 (3)).

$$174 \quad f_i \frac{[Pt]}{[Q]} = nK_b [Pt] - K_b f_i [Pt] \quad (3)$$

$$175 \quad \text{Where } f_i = \frac{F - F_0}{F_{\infty} - F_0}$$

176 **K<sub>b</sub>** : The equilibrium binding constant ;

177 **Pt** : represents total protein concentration ;

178 **f<sub>i</sub>** : is the fraction of protein fluorescence that can be quenched by the ligand ;

179  $F_{\infty}$  : is fluorescence intensity value at saturation ;

180  $n$  : represents the number of binding sites.

181

## 182 *Experimental solutions*

183 The concentration of BLG and LF for optimal coacervation was determined according to chapeau et al. [35].

184 The optimized concentrations were used to test the ability of LF-BLG coacervates to entrap carvacrol. LF

185 (0.05mM) was firstly mixed with different concentration of carvacrol (0-5mM). After 10 min equilibration,

186 BLG (0.5mM) was added to the solution. The max percentage of ethanol in the mixture was 5%.

187

## 188 *Turbidity measurements*

189 Turbidity measurements were done according to chapeau et al. [35]. In brief the turbidity ( $\tau$ ) was performed

190 with the spectrometer UVmc<sup>2</sup> (Safas, Monaco) at 600 nm.  $\tau$  was calculated using the relation:  $\tau \text{ (cm}^{-1}\text{)} = 2.303$

191  $\times A_{600\text{nm}}/l$ ,  $l$  is the light path length ( $l=1\text{cm}$ ). Turbidity was measured over 30 min and repeated at least 3 times.

192 The objective of this measurement was to determine the maximum concentration of carvacrol at which

193 complex coacervation was still detected.

194

## 195 *Phase Contrast Microscopy of co-Assembled protein structures*

196 Optical microscopy was used to monitor the morphology of protein assembly (soluble complexes,

197 coacervates or aggregates) in the presence of various carvacrol concentrations. The presence of aggregates,

198 coacervates, or the absence of supra-molecular structures was determined using an optical microscope

199 (Olympus BX51TF, Olympus, Hamburg, Germany) at a magnification of  $\times 40$ . At the time of the maximal

200 turbidity, a 10 $\mu\text{L}$  sample of the Carvacrol-LF BLG solutions was taken and immediately observed. The samples

201 and observations were performed three times for each solution to ensure the reliability of the results [35].

202

## 203 *Quantification of carvacrol*

204 To determine the carvacrol encapsulation yield during HPCC experiment, the supernatant and the dense  
205 phase of co-assembly were separated by centrifugation (Heraeus Biofuge Primo, Thermo Scientific, Waltham,  
206 MA, USA) at 28 000 g for 30 min. Non-encapsulated carvacrol recovered in the supernatant was quantified  
207 by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) as mentioned by Pogačić et al [39]. Briefly,  
208 A Perkin Elmer Turbomatrix HS-40 trap automatic headspace sampler with trap enrichment was used to  
209 extract volatiles. Aliquots of 2.5 grams from the supernatant were placed into 22 mL PerkinElmer vials  
210 equipped with polytetrafluoroethylene (PTFE)/silicone septa. The samples underwent a 15-minute  
211 equilibration at 65 °C. Subsequently, the vials were pressurized for 1 minute at 207 kPa using helium as the  
212 carrier gas. This was achieved by inserting a needle through the septum. A Tenax™ trap, maintained at 35 °C,  
213 was loaded for 2.3 minutes. During this time, the pressure dropped through the trap, allowing the adsorption  
214 and concentration of analytes from the headspace onto the trap. This loading process was repeated twice  
215 for each vial trap. To remove adsorbed water, helium was purged through the trap for 3 minutes (dry purge).  
216 The trap was then heated to 250 °C for 0.1 minute and backflushed at 164 kPa, causing desorption of the  
217 analytes. These analytes were subsequently transferred to the gas chromatograph (GC) through a transfer  
218 line held at 150 °C, with an injection time of 0.6 minutes. The trap was maintained at 250 °C for 10 minutes.  
219 The percentage of the encapsulated carvacrol was calculated using the relation:  
220  $\text{Percentage of encapsulation (\%)} = (\text{carvacrol (T0)} - \text{non encapsulated carvacrol}) \times 100 / \text{carvacrol (T0)}$ , where  
221 carvacrol (T0) is the initial concentration of carvacrol added to LF.

222

## 223 ***Nano emulsification***

### 224 *Nanoemulsion Parameters*

225 Carvacrol was encapsulated in the form of an oil-in-water (O/W) nanoemulsion. Two types of nanoemulsions  
226 were compared: The first one (emulsion A) consisted of a binary mixture of carvacrol (7 mg/mL) and canola  
227 oil (5% v/v), while the continuous phase was made up of aqueous solutions of 10mM MES buffer, pH 5.5 and  
228 2.5% of Tween 80 (v/v). The second type (emulsion B) consisted of a mixture of carvacrol (7 mg/mL) and pure  
229 ethanol (1% v/v), with the same continuous phase. The encapsulation process was carried out using an



230 UltraTurrax agitator (IKA-T25 digital, IKA®-Werke, Staufen, Germany) operated at 15,000 rpm for 2 minutes.

231 A zetasizer nano ZS (Malvern Instrument, Worcestershire, UK) was used to determine the droplet size in the

232 formed emulsions [40]. The measurements were carried out at 20 °C, and every measurement were repeated

233 three times.

234

235 **RESULTS**

236 The initial section of the study primarily reports the antibacterial effects of free carvacrol (without

237 encapsulation). Then the encapsulation of carvacrol by two distinct methods: HPCC and nanoemulsion are

238 described. Finally, the impact of carvacrol encapsulation on its antibacterial properties is described.

239

240 ***Anti-bacterial activity of free carvacrol***

241 The antibacterial activity of free carvacrol was tested on five pathogenic strains selected from among the

242 most prevalent species of gram-positive and gram-negative bacteria implicated in inflammatory infections in

243 dairy cows. Table 1 reports the antibacterial activity of free carvacrol, expressed as MIC, on five pathogenic

244 bacterial strains. As expected, MIC varied from one strain to another, in the range between 300 and 1200

245 µg/ml independently of tested bacterial species.

246 The two strains, NB305 (*S. aureus*) and P4 (*E. coli*), were the most sensitives one to carvacrol with the lowest

247 MIC values, i.e.  $380 \pm 58$  µg/mL and  $370 \pm 56$  µg/mL respectively. These sensitive stains were selected for the

248 comparative antibacterial efficacy experiments of free or encapsulated carvacrol.

249

250

251 **Table 1:** Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of carvacrol against three strains of *S. aureus*: NB305,

252 RF122, and O11, as well as two strains of *E. coli*: P4 and K08

STRAINS	MIC ± SEM
<i>S. aureus</i> : RF122	800 µg/mL
<i>S. aureus</i> : NB305	$380 \pm 58$ µg/mL
<i>S. aureus</i> : O11	1200 µg/mL

<b>E. coli : P4</b>	370 ± 56 µg/mL
<b>E. coli : K08</b>	1200 µg/mL

253

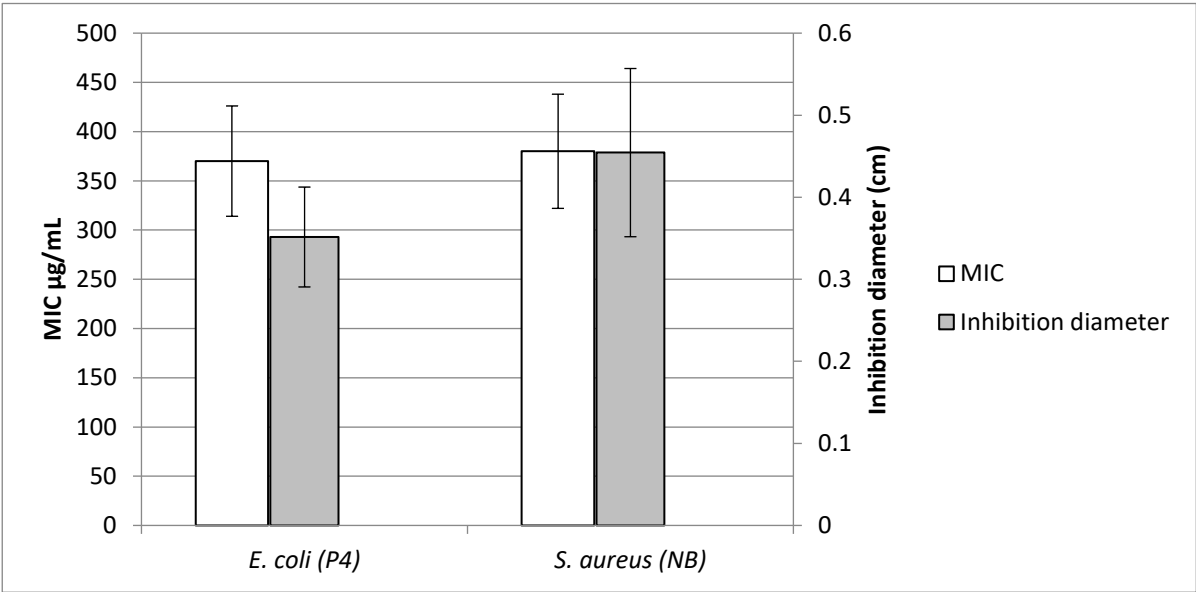
254 The antibacterial activity of carvacrol against the two selected stains was studied using two bacteriological

255 tests. Figure 1 compares the results obtained from the two quantitative (MIC) and qualitative (inhibition

256 diameter) tests. The two strains have roughly the same MIC and an inhibition diameter ranging between 0.35

257 and 0.45 cm for *E. coli* and *S. aureus*, respectively

258



259

260 **Figure 1** : Minimum inhibitory concentration (MIC) of carvacrol and its inhibition zone diameter *against E.*

261 *coli* (strain P4) and *S. aureus* (strain NB). Data represent the mean ± SEM of three independent experiments

262 performed in duplicate. The inhibition diameters were evaluated after adding 50 µL of a carvacrol at 7

263 mg/mL in MES solution containing 1 % of ethanol.

264

265 **Protein complexation and encapsulation of carvacrol**

266 *Complexation of carvacrol with individual proteins*

267 Fluorescence spectroscopy was used to determine the relative affinity between carvacrol, and the two

268 proteins used to form complex coacervates. This allows to determine the complexation ability of the two

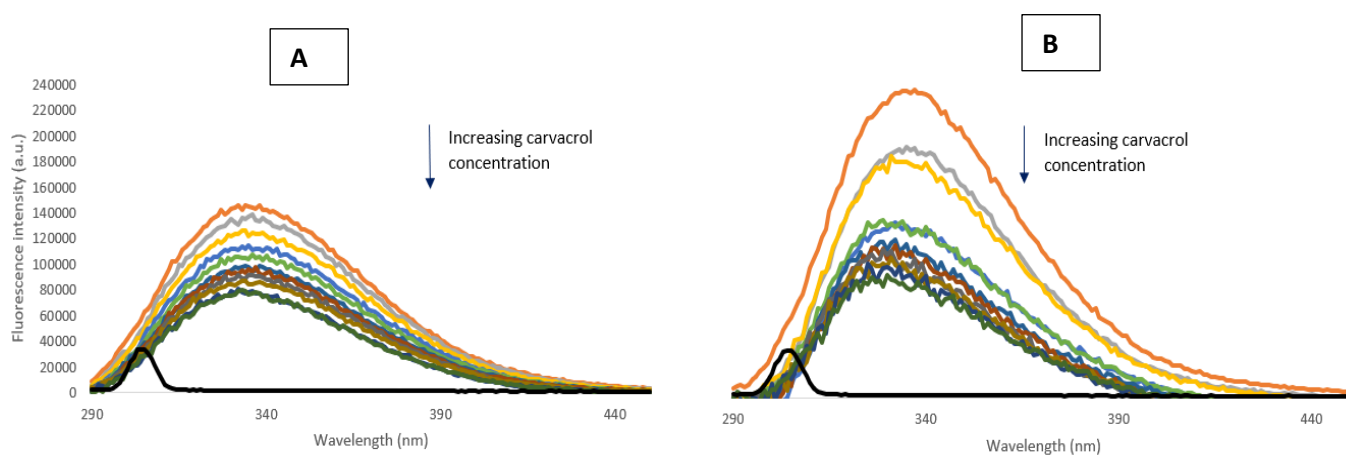
269 proteins and to define the mixing order during HPCC. The fluorescence emission spectra of LF or BLG solution

270 at pH 5.5 (the optimal conditions for coacervation) was measured during titration experiments with

271 increasing concentrations of carvacrol (carvacrol/protein molar ratios from 0 to 8 µM). **Figure 2** presents the

272 typical obtained fluorescence emission spectra during titration. After excitation at 276 nm, the maximum  
273 emission wavelength of LF was recorded at 332 nm, the maximum emission wavelength of the proteins. The  
274 wavelength of maximum fluorescence intensity did not change after carvacrol addition in the presence of  
275 ethanol (**Figure 2 A**). Conversely, we checked that the addition of 5% v/v of ethanol had no impact on the  
276 size of the protein as shown in **Figure 3** for LF. For LF, the fluorescence intensity exhibited a gradual decrease  
277 as the concentration of carvacrol increased, indicating a quenching mechanism. Furthermore, a tendency to  
278 reach a plateau value was observed, suggesting a saturation point in the quenching process. No significant  
279 red or blue shift of the emission spectrum was detected. These experimental data were fitted to reduce the  
280 carvacrol-LF interaction.

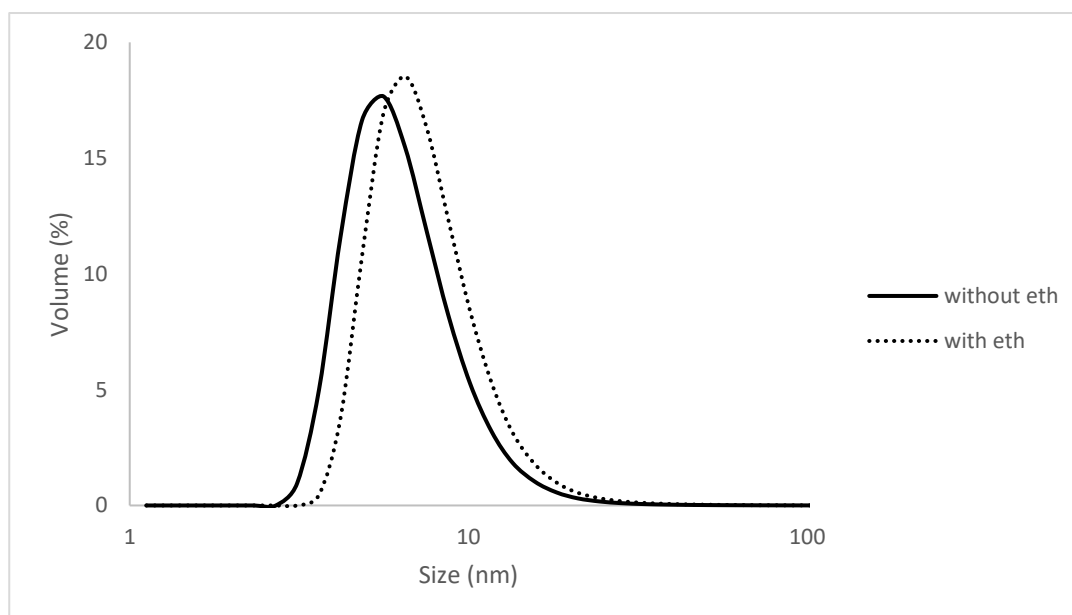
281



282

283 **Figure 2** : Fluorescence emission spectra of 0.1  $\mu\text{M}$  lactoferrin (A) and 0.1  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Lactoglobuline (B) in MES  
284 buffer pH 5.5 in the absence and the presence of increasing concentration of carvacrol (from 0 to 0.8  $\mu\text{M}$ ),  
285 at 25°C. The black line corresponds to the fluorescence spectrum of carvacrol at 0.8  $\mu\text{M}$  in MES buffer  
286 containing 5% (v/v) ethanol (the concentration of ethanol at the end of titration).

287



**Figure 3** : Particle size distribution of Lactoferrin (LF) at a concentration of 100  $\mu\text{M}$ . Full lines correspond to LF in 10 mM of MES buffer at pH 5.5. Dashed lines correspond to the particle size distribution of LF in 10 mM of MES buffer at pH 5.5 containing 5% (v/v) ethanol.

Figure 4 A and B show the Stern-Volmer and the modified Stern-Volmer plots of the fluorescence quenching of LF in the presence of carvacrol. The extracted binding parameters are given in

## Table 2.

The fluorescence ratio  $F_0/(F_0-F)$  versus  $1/[Q]$  for LF/carvacrol presented a linear evolution of both Stern-Volmer and modified Stern-Volmer plots and the fraction accessible to quencher ( $f_a$ ) was lower than 1.0. According to the correspondence  $K_{SV} = k_q\tau_0$  in Eq. (1), the values of  $k_q$  had a magnitude order of  $10^{14} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , which is higher than the typical diffusion-controlled limit ( $\sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).

Figure 4 C shows the linear Scatchard plots of LF and carvacrol interactions in the presence of ethanol. The binding constant ( $K_b$ ) of carvacrol to LF under these experimental conditions was deduced to be around  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , indicating a very high binding affinity. An interaction stoichiometry of two binding sites for carvacrol per LF molecule was found.

308

309

310

311

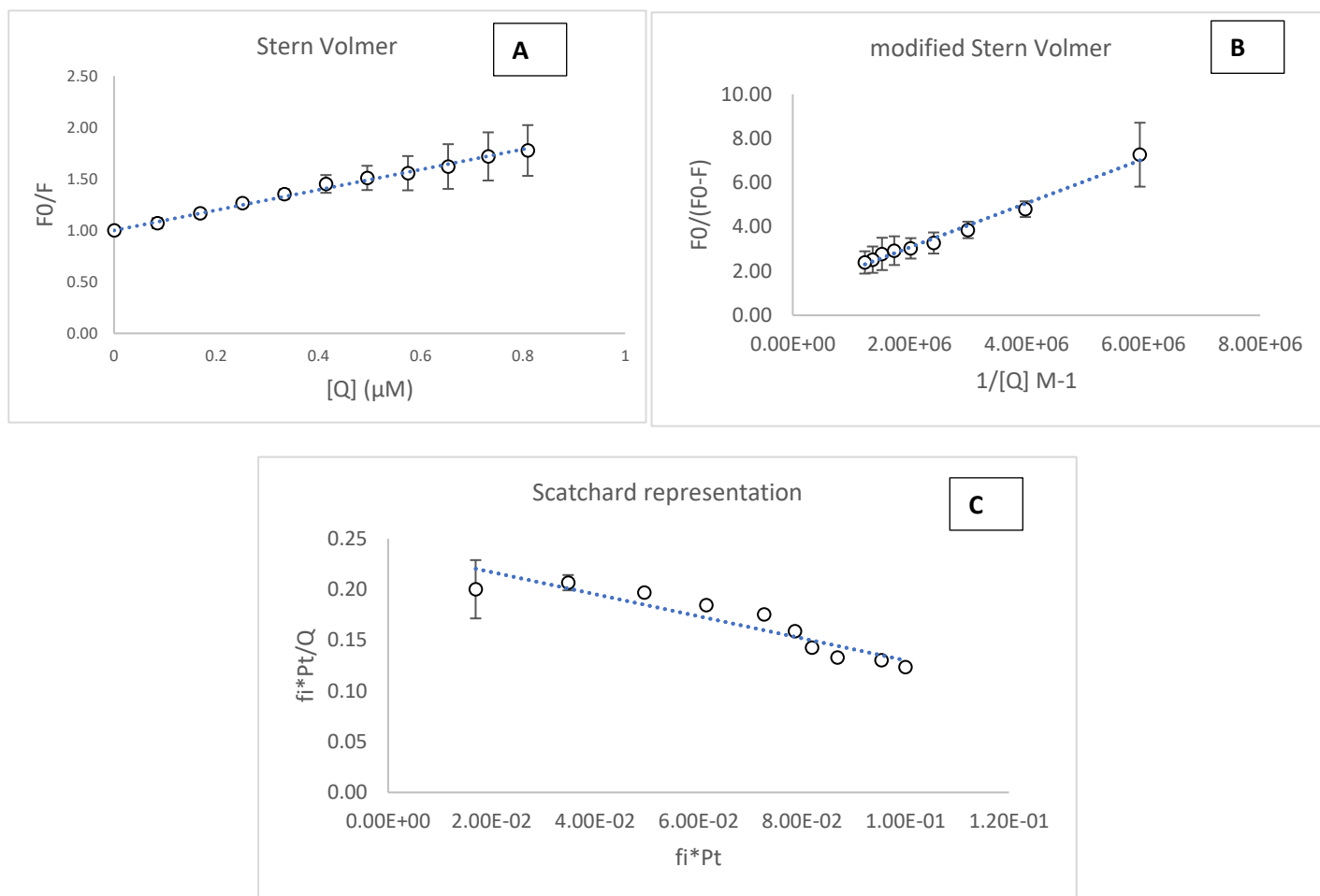
312

313

314

315

316



317

318

319

320

321

322

323

**Figure 4 :** Interaction between LF (0.1 μM) and carvacrol (from 0 to 0.8 μM) in the presence of ethanol. A: Stern-Volmer plots of the quenching of LF by carvacrol at pH 5.5. B: Modified Stern-Volmer plots of the quenching of LF by carvacrol at pH 5.5. C: Derived Scatchard plots of LF by carvacrol at pH 5.5. Data represent the mean ± SEM of three independent experiments.

326

**Table 2:** Binding parameters of LF/carvacrol in the presence of ethanol\*

Fa <sup>a</sup>	K <sub>SV</sub> (× 10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	K <sub>q</sub> (× 10 <sup>13</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	K <sub>b</sub> (× 10 <sup>9</sup> M <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
0.93 ± 0.03	1.07 ± 0.015	9.65 ± 0.25	1.08 ± 0.15

\* Mean and standard deviation of three replicates (n = 3).

<sup>a</sup>: Parameters obtained through data fitting of the fluorescence quenching of LF/carvacrol, using the Stern-

Volmer and modified Stern-Volmer equations.

330

331 <sup>b</sup>: Parameter obtained through data fitting of the fluorescence quenching of LF/carvacrol, using the Scatchard  
332 representation.

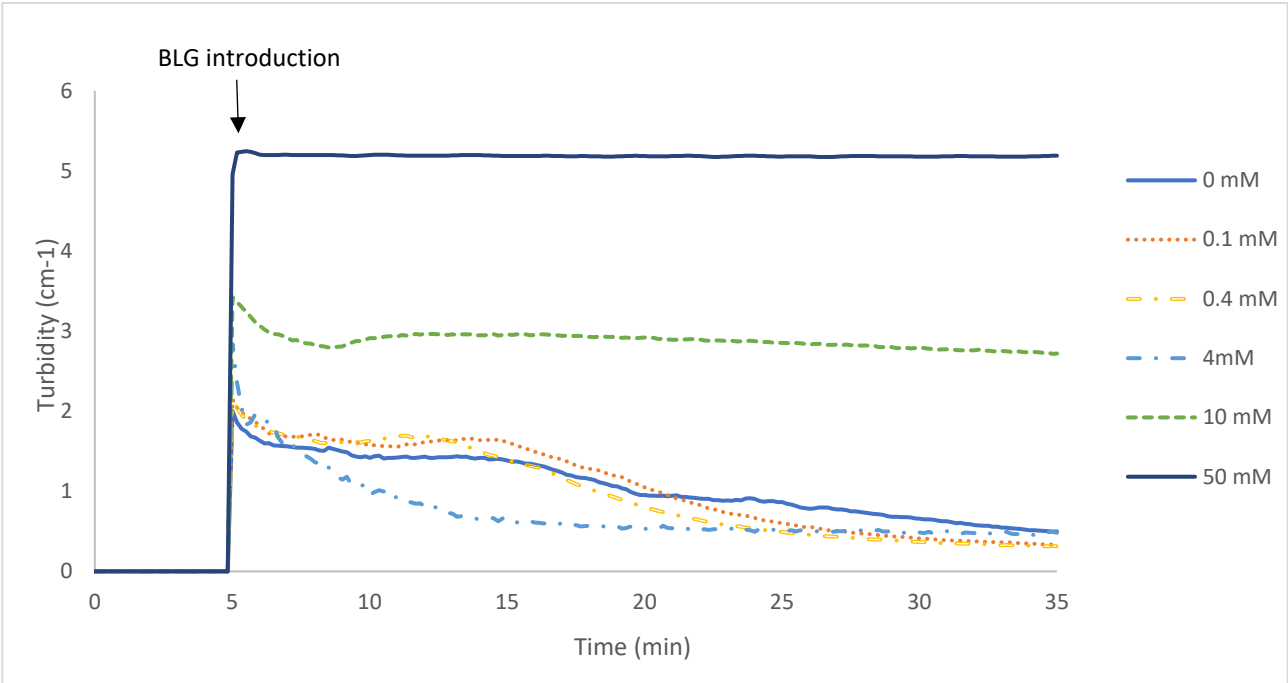
333 Figure 2 B shows the evolution of the fluorescence spectra of carvacrol and BLG. The same data treatment  
334 showed lower binding affinity of carvacrol to BLG compared to LF. However, the fluorescence data were less  
335 consistent across repetitions with BLG, and more experiences are needed to quantify the interaction  
336 parameters. As shown in Figure 2 B, it is interesting to note the blue shift of the maximum fluorescence for  
337 BLG during titration experiment, indicating less polar environment for the protein fluorophores. From these  
338 results, we deduce that, in contrast to LF, the binding of carvacrol induced a structural change of BLG  
339 structure. Isothermal titration calorimetry experiments are planned to confirm the relative affinity of  
340 carvacrol for the two proteins BLG and LF.

341

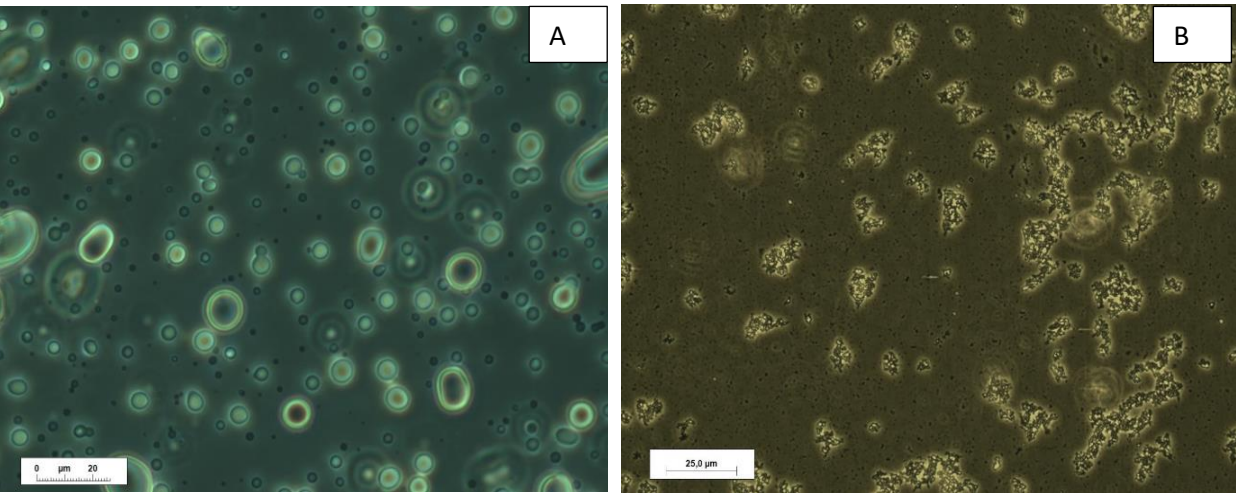
#### 342 *LF-BLG co-assemblies in the presence of carvacrol*

343 Given the higher affinity of carvacrol towards LF, we first incubate carvacrol with LF before adding LBG to  
344 form carvacrol-proteins assemblies. Figure 5 shows the observed spontaneous increase and evolution of  
345 solution turbidity as a function of carvacrol concentrations. Upon the addition of BLG to the carvacrol + LF  
346 mixture, turbidity increased across all ratios. These elevated turbidity levels indicate the occurrence of co-  
347 assembly in the Carvacrol-LF-BLG solutions. To establish a connection between these turbidity profiles and  
348 the shape of formed supra-molecular structures, phase contrast microscopy was used. Figure 6 displays  
349 microscopic images obtained through phase contrast microscopy analysis of two solutions with high and low  
350 concentration of carvacrol at maximum turbidity. Two distinct turbidity profiles and supra-molecular  
351 structures can be identified. Solutions with high carvacrol content (higher than 10 mM) exhibited a gradual  
352 and slow increase in turbidity, reaching a maximum asymptotic value. These profiles corresponded to the  
353 formation of large aggregates (Figure 6B). In contrast, solutions with lower carvacrol contents (less than 4  
354 mM) experienced a sudden and significant increase in turbidity upon the addition of BLG, followed by a  
355 gradual decrease towards a minimum asymptotic value. These profiles correspond to the formation of  
356 spherical droplets, typical structures of complex coacervates (Figure 6A). Based on these results, the

357 concentration of carvacrol chosen for further study corresponds to 4 mM (600µg/mL). Unfortunately, after  
358 GC-MS quantification of carvacrol, the entrapment yield of carvacrol into protein coacervates was lower than  
359 20% under the better experimental conditions.



360  
361 **Figure 5** : Turbidity kinetics of LF-BLG co-assembly in the presence of carvacrol at 6 concentrations of  
362 carvacrol (from 0 to 50 mM) obtained at pH=5.5 and at 20°C. In this study, BLG/LF molar ratio of 10 was used.

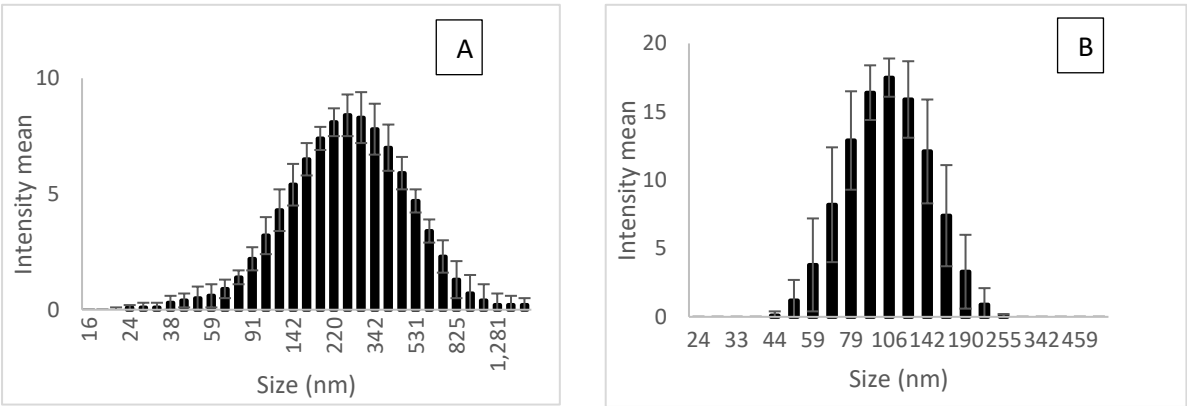


375  
**Figure 6** : Phase contrast microscopy (x40) of LF-BLG co-assembly in the presence of carvacrol at two concentrations  
of carvacrol 4 mM (A) and 10 mM (B), obtained at pH=5.5 and at 20°C.

376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400

**Nanoemulsion**

Nanoemulsion of carvacrol in the presence of tween 80 as surfactant was performed either after addition of carvacrol to canola oil (emulsion A) or carvacrol in ethanol (emulsion B) **Figure 7** shows the droplet size distribution of both prepared nanoemulsions A and B. The nanoemulsion A exhibited an average diameter of 242 nm ± 19 nm, whereas nanoemulsion B displayed a significantly smaller average diameter of 101 nm ± 11 nm. Hence, the formulation containing canola oil exhibited a broader distribution, indicating a wider range of droplet sizes, compared to nanoemulsion formed in ethanol, which has a narrower distribution curve.



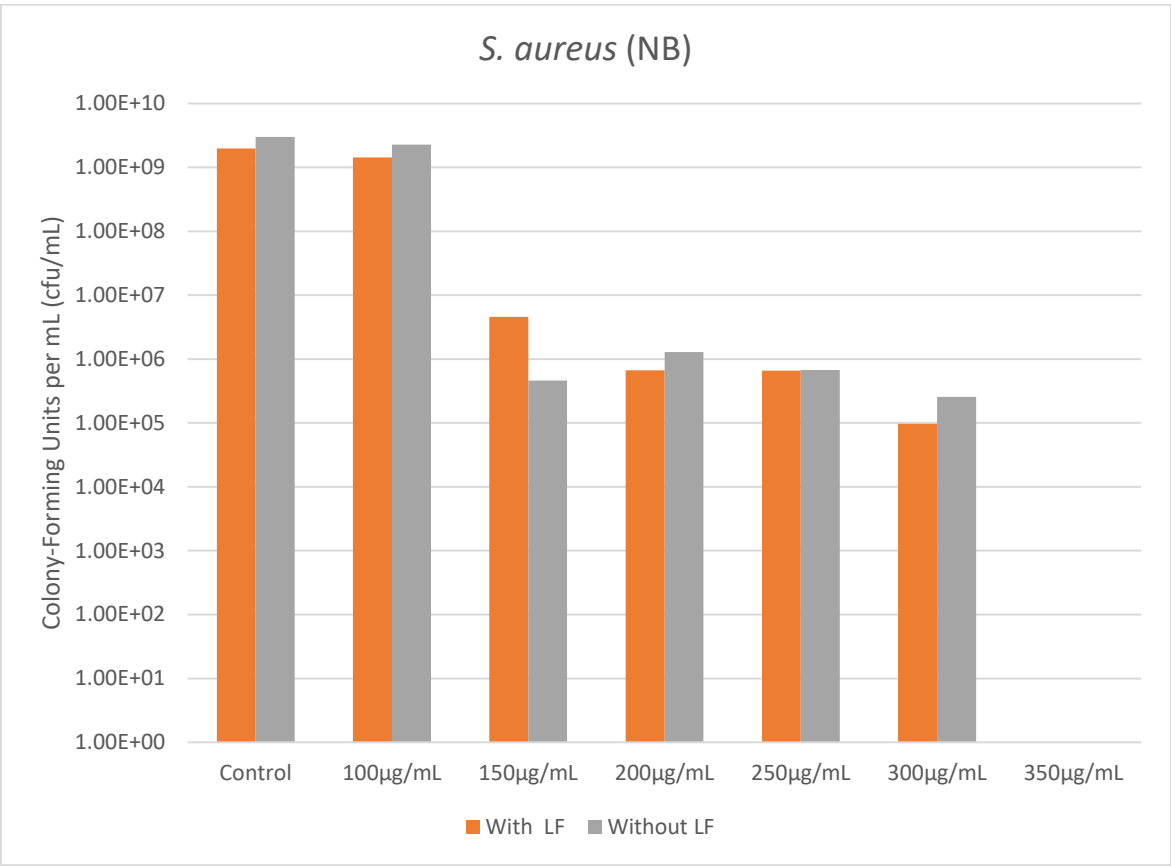
**Figure 7 :** Diameter distribution of droplets in two prepared emulsions using a nanosizer. (A) : consisted of a binary mixture of carvacrol (7 mg/mL) and canola oil (5% v/v); (B): consisted of a mixture of carvacrol (7 mg/mL) and pure ethanol (1% v/v). The continuous phase for the two emulsions consisted in an aqueous solution of MES at 10mM and 2.5% of Tween 80 (v/v). Data represent the mean ± SEM of three independent experiments.

**Antibacterial activity of complexed or nanoemulsified carvacrol**

Due to a low encapsulation yield through LF-BLG HPCC (<20%), we were unable to test the antibacterial activity of the coacervates due to the low concentration of carvacrol and the high concentration of proteins required to reach the active concentration threshold of carvacrol. On the other hand, we have tested the antibacterial activity of carvacrol complexed to individual proteins in comparison to free carvacrol. As illustrated in Figure 8 for lactoferrin-carvacrol complex, no significant modification or improvement of the



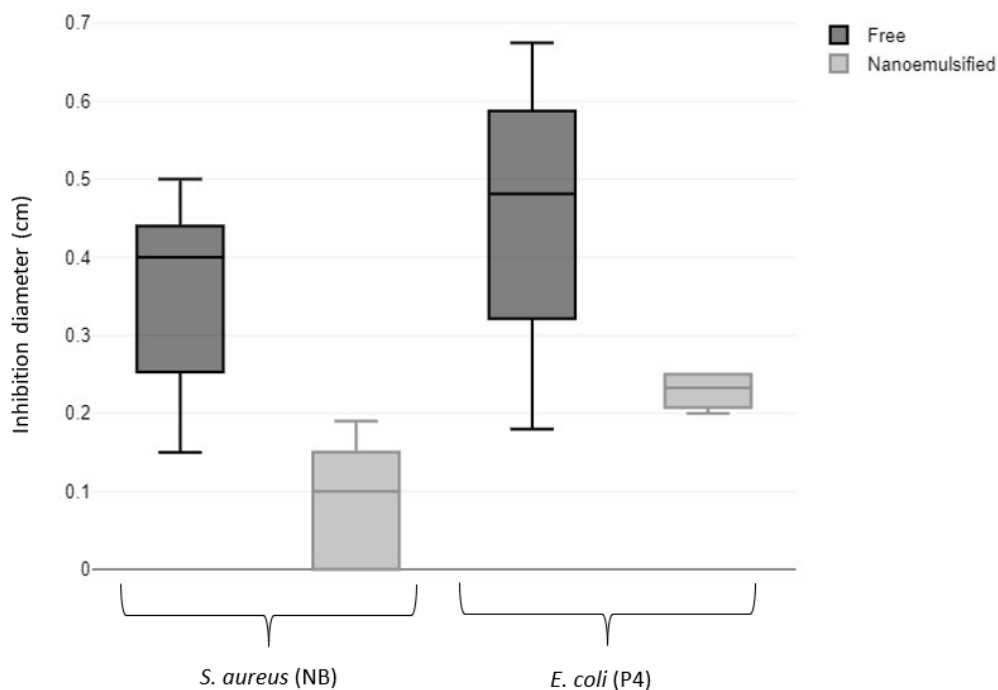
antibacterial activity was detected after complexation with the two proteins. Similar Minimum inhibitory concentration as for free carvacrol was obtained for LF-carvacrol complex and this for the tested bacteria.



**Figure 8 :** Minimum inhibition concentration of carvacrol. Inhibition power of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) growth after 24 hours incubation with increasing concentrations of free or complexed to lactoferrin at 1 mg/mL.

**Figure 9** shows the compared antibacterial activity of free or nanocapsulated carvacrol -nanoemulsion in ethanol) against the two strains of *E. coli* (*P4*) and *S. aureus* (*NB*). The figure presents a boxplot comparing the inhibition diameter of carvacrol in both free and encapsulated forms. Surprisingly, a decrease in antibacterial activity towards the two strains was obtained after nanoemulsification of carvacrol under used experimental conditions. When the nanoemulsion prepared in canola oil (nanoemulsion A) was tested, no significant inhibition zone was detected This was confirmed by the very high MIC (> 600 µg/ml) obtained for this nanoemulsion. These results indicate that, compared to free form, nanoencapsulation of carvacrol decreased significantly its antibacterial activities towards the pathogenic bacteria under used experimental conditions.

417



418

419

420 **Figure 9:** Boxplot of the inhibition diameter of carvacrol (free or encapsulated) against *E. coli* (P4) and *S.*  
421 *aureus* (NB) of three independent experiments. The inhibition diameters were evaluated after adding 50  $\mu$ L  
422 of free or emulsified carvacrol at 7 mg/mL.

423

## 424 DISCUSSION

425 In complement to our work on the benefits of *Thymus Capitatus* EO and its antibacterial properties [20,21],  
426 the present work focuses on one of its main components, carvacrol. The antibacterial activity of carvacrol in  
427 its free, protein-complexed or nanoemulsified forms was evaluated targeting two pathogenic strains selected  
428 from those associated with bovine mastitis *S. aureus* (NB) and *E. coli* (P4). Subsequently, we found that free  
429 carvacrol inhibits the growth of these two pathogens, with MIC value slightly higher for *S. aureus* strain ( $380 \pm 58 \mu\text{g/ml}$ ) compared to that for *E. coli* ( $370 \pm 56 \mu\text{g/ml}$ ). The antibacterial effects of EOs are attributed to  
430 their ability to disrupt bacterial cell walls and membranes, leading to morphological destruction [41].  
431 However, it's difficult to conclude about the efficiency of given EOs or derived pure component towards  
432 Gram- versus Gram+ pathogens. Various parameters such as, the used EO, its formulation, the evaluation  
433

method, the experimental conditions, play a key role and opposite efficiency can be observed [36,42].

Surprisingly, the nanoemulsification of carvacrol did not enhance its antibacterial effects in our experimental conditions. We found opposite results, with a decrease of inhibition diameter as well as an increased of minimal inhibitory concentration after nanoencapsulation of carvacrol on both studied strains.

A significant number of published works show that regardless of the encapsulation method, nanoemulsions of any type of EO improved their antibacterial properties, regardless of the nature of the tested bacteria [22-29]. Similarly, some studies have shown that the nanoemulsion of carvacrol increased its antibacterial properties : Cacciatore et al. reported that the encapsulation of carvacrol into nanoparticles produced from chia and flaxseed mucilage enhances its antibacterial properties against food pathogens such as *salmonella* spp and *Listeria monocytogenes* [43]. Felício et al showed that the nanoemulsion of carvacrol in the presence of 9% HLB11 surfactant increased the antibacterial capacity of carvacrol against *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, and *Salmonella* spp [44]. The reported enhanced antibacterial effects of EOs were attributed to several factors. Firstly, encapsulation creates a protective barrier that facilitates controlled release, thereby prolonging the antibacterial effects of the EOs. Secondly, encapsulation improves solubility and increases the bioavailability of EOs, which results in better dispersion, thus causing an enhanced efficiency in their antibacterial action. [45-47]. Subtle change caused by applied protocol (MES buffer, relative concentration, and nature of surfactant) could be at the origin of the lowest activity of nanoemulsified carvacrol obtained in the present work. Comparative study with already published work is in progress to validate our finding.

Numerous studies have shown the effectiveness of encapsulation of various EOs by complex coacervation made from a mixture of proteins (soy or bean proteins, milk proteins, gelatine, etc.) and polysaccharides (Arabic gum, sodium alginate, chia seed mucilage, etc) [31-33,48-52]. Here we explored for the first time the efficiency of complex coacervates made from oppositely charged proteins LF and BLG to entrap carvacrol. Our previous work showed the effectiveness of LF-BLG complex coacervates for the encapsulation and protection of high concentration of vitamin B9, a hydrophilic molecule [35]. It seems that this is not the case with a hydrophobic and volatile component such as carvacrol. A specific interaction and retention on

459 polysaccharidic chains could explain the acceptable encapsulation yield reported with protein-  
460 polysaccharides complex coacervates.

## 461 **CONCLUSIONS**

462 In conclusion, this study focused on evaluating the antibacterial activity of carvacrol in its various forms,  
463 including free carvacrol, protein-complexed or nanoencapsulated carvacrol, against pathogenic strains  
464 associated with bovine mastitis. Free carvacrol exhibited strong inhibitory effects on both *S. aureus* (NB) and  
465 *E. coli* (P4) strains. Surprisingly, our results showed that nano-emulsification of carvacrol did not enhance its  
466 antibacterial effects but rather led to a decreased inhibition diameter and an increased MIC. This contrasts  
467 with many published works that generally report improved antibacterial properties when EOs, as complex  
468 mixtures, were nanoemulsified. Furthermore, we explored the efficiency of complex coacervation of  
469 carvacrol using oppositely charged proteins LF and BLG. This approach was not as so effective as in previous  
470 work with complex coacervates formulated from proteins-polysaccharides mixtures. In our ongoing research,  
471 we aim to further validate our findings and explain their origin through a comparative study with previously  
472 published work.

473

## 474 **Acknowledgments & additional information**

475 This research was funded under MilkQua project, H2020-PRIMA 2018 and by ANRT through a CIFRE PhD funding.

476

## 477 **Competing interest statement**

478 The authors declare no competing interests.

479

## 480 **Bibliography**

- 481 1. Nehme R, Andrés S, Pereira RB, et al. Essential Oils in Livestock: From Health to Food  
482 Quality. *Antioxidants*. 2021;10(2):330.
- 483 2. Pereira RB, Rahali FZ, Nehme R, et al. Anti-inflammatory activity of essential oils from  
484 Tunisian aromatic and medicinal plants and their major constituents in THP-1  
485 macrophages. *Food Research International*. 2023 2023/05/01/;167:112678.

3. Chiocchio I, Mandrone M, Tomasi P, et al. Plant Secondary Metabolites: An Opportunity for Circular Economy. *Molecules*. 2021 [cited. DOI:10.3390/molecules26020495]
4. Zengin H, Baysal AH. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Thyme and Clove Essential Oils and Application in Minced Beef. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2015;39(6):1261-1271.
5. Ríos J-L. Chapter 1 - Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined. In: Preedy VR, editor. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 3-10.
6. Mucha W, Witkowska D. The Applicability of Essential Oils in Different Stages of Production of Animal-Based Foods. *Molecules*. 2021;26(13):3798.
7. Espitia PJP, Avena-Bustillos RJ, Du W-X, et al. Physical and Antibacterial Properties of Açaí Edible Films Formulated with Thyme Essential Oil and Apple Skin Polyphenols. *Journal of Food Science*. 2014;79(5):M903-M910.
8. Althunibat O, Qaralleh H, Abboud M, et al. Effect of Thymol and Carvacrol, the Major Components of *Thymus capitatus* on the Growth of *Pseudomonas aeruginosa* 2016.
9. Fachini-Queiroz FC, Kummer R, Estevão-Silva CF, et al. Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;2012:1-10.
10. Pilau MR, Alves SH, Weiblen R, et al. Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011;42(4):1616-1624.
11. Friedman M. Chemistry and Multibeneficial Bioactivities of Carvacrol (4-Isopropyl-2-methylphenol), a Component of Essential Oils Produced by Aromatic Plants and Spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014 2014/08/06;62(31):7652-7670.
12. Tian Q, Zhou W, Cai Q, et al. Concepts, processing, and recent developments in encapsulating essential oils. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2021 2021/02/01;30:255-271.
13. Marques HMC. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*. 2010;25(5):313-326.
14. Reyes-Jurado F, Franco-Vega A, Ramírez-Corona N, et al. Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. *Food Engineering Reviews*. 2015 2015/09/01;7(3):275-297.
15. Turek C, Stintzing FC. Stability of Essential Oils: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2013;12(1):40-53.
16. Mahanta BP, Bora PK, Kemprai P, et al. Thermolabile essential oils, aromas and flavours: Degradation pathways, effect of thermal processing and alteration of sensory quality. *Food Research International*. 2021 2021/07/01;145:110404.
17. Soliman EA, El-Moghazy AY, El-Din MSM, et al. Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and *in vitro* Evaluation of Antifungal Activity. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*. 2013;Vol.03No.01:8.
18. Reis DR, Ambrosi A, Luccio MD. Encapsulated essential oils: A perspective in food preservation. *Future Foods*. 2022 2022/06/01;5:100126.
19. Zhu Y, Li C, Cui H, et al. Encapsulation strategies to enhance the antibacterial properties of essential oils in food system. *Food Control*. 2021 2021/05/01;123:107856.
20. Benjemaa M, Neves MA, Falleh H, et al. Nanoencapsulation of *Thymus capitatus* essential oil: Formulation process, physical stability characterization and antibacterial efficiency monitoring. *Industrial Crops and Products*. 2018 2018/03/01;113:414-421.

21. BenJemaa M, Rahali FZ, Falleh H, et al. Essential Oil Stabilisation by Response Surface Methodology (RSM): Nanoemulsion Formulation, Physicochemical, Microbiological, and Sensory Investigations. *Molecules*. 2022 [cited. DOI:10.3390/molecules27217330]
22. Torshabi M, MoadabShoar Z, Negahban M. Preparation of Citrus reticulata peel nano-encapsulated essential oil and in vitro assessment of its biological properties. *European Journal of Oral Sciences*. 2023;131(2):e12924.
23. Gholamhosseinpour A, Hashemi SMB, Jafarpour D. Nanoemulsion of satureja sahendica bornm essential oil: antibacterial and antioxidant activities. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2023 2023/02/01;17(1):317-323.
24. Jiang H, Zhong S, Schwarz P, et al. Antifungal activity, mycotoxin inhibitory efficacy, and mode of action of hop essential oil nanoemulsion against Fusarium graminearum. *Food Chemistry*. 2023 2023/01/30;400:134016.
25. Pinto LDA, Machado FP, Esteves R, et al. Characterization and Inhibitory Effects of Essential Oil and Nanoemulsion from Ocotea indecora (Shott) Mez in Aspergillus Species. *Molecules*. 2023;28(8):3437.
26. Ntalli N, Zochios G, Nikolaou P, et al. Carlina acaulis essential oil nanoemulsion for managing Meloidogyne incognita. *Industrial Crops and Products*. 2023 2023/03/01;193:116180.
27. Osanloo M, Firoozian S, Abdollahi A, et al. Nanoemulsion and nanogel containing Artemisia dracunculus essential oil; larvicidal effect and antibacterial activity. *BMC Research Notes*. 2022;15(1).
28. Hien LTM, Dao DTA. Antibacterial Activity of Black Pepper Essential Oil Nanoemulsion Formulated By Emulsion Phase Inversion Method. *Curr Res Nutr Food Sci*. 2021;10(1).
29. Pilon P, Chuesiang P, Mishra DK, et al. Characteristics and antimicrobial activity of microfluidized clove essential oil nanoemulsion optimized using response surface methodology [<https://doi.org/10.1111/jfpp.16886>]. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2022 2022/12/01;46(12):e16886.
30. Barradas TN, de Holanda e Silva KG. Nanoemulsions of essential oils to improve solubility, stability and permeability: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 2021 2021/04/01;19(2):1153-1171.
31. Plati F, Paraskevopoulou A. Hemp protein isolate – gum Arabic complex coacervates as a means for oregano essential oil encapsulation. Comparison with whey protein isolate – gum Arabic system. *Food Hydrocolloids*. 2023 2023/03/01;136:108284.
32. Liu X, Xue F, Adhikari B. Encapsulation of essential oils using hemp protein isolate–gum Arabic complex coacervates and evaluation of the capsules. *Sustainable Food Technology*. 2023;1(3):426-436.
33. Sun J, Cheng Y, Zhang T, et al. Microencapsulation of Carvacrol by Complex Coacervation of Walnut Meal Protein Isolate and Gum Arabic: Preparation, Characterization and Bio-Functional Activity. *Foods*. 2022;11(21):3382.
34. Croguennec T, Tavares GM, Bouhallab S. Heteroprotein complex coacervation: A generic process. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2017 2017/01/01;239:115-126.
35. Chapeau A-L, Tavares GM, Hamon P, et al. Spontaneous co-assembly of lactoferrin and  $\beta$ -lactoglobulin as a promising biocarrier for vitamin B9. *Food Hydrocolloids*. 2016 2016/06/01;57:280-290.
36. Benjemaa M, Rahali FZ, Falleh H, et al. Essential Oil Stabilisation by Response Surface Methodology (RSM): Nanoemulsion Formulation, Physicochemical, Microbiological, and Sensory Investigations. *Molecules*. 2022;27(21):7330.
37. Biswas B, Rogers K, McLaughlin F, et al. Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on Two Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *International Journal of Microbiology*. 2013 2013/10/20;2013:746165.

38. Kowalska-Krochmal B, Dudek-Wicher R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*. 2021;10(2):165.
39. Pogačić T, Maillard MB, Leclerc A, et al. A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. *Food Microbiol*. 2015 Apr;46:145-153.
40. Lee J, Lee Y, Kim J, et al. Formulation of microemulsion systems for transdermal delivery of aceclofenac. *Archives of Pharmacal Research*. 2005 2005/09/01;28(9):1097-1102.
41. Alsakhawy SA, Baghdadi HH, El-Shenawy MA, et al. Encapsulation of thymus vulgaris essential oil in caseinate/gelatin nanocomposite hydrogel: In vitro antibacterial activity and in vivo wound healing potential. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022 2022/11/25;628:122280.
42. Oulkheir S, Aghrouh M, Mourabit F, et al. Antibacterial Activity of Essential Oils Extracts from Cinnamon, Thyme, Clove and Geranium Against a Gram Negative and Gram Positive Pathogenic Bacteria. *Journal of Diseases and Medicinal Plants*. 2017 01/06;3:1-5.
43. Cacciatore FA, Maders C, Alexandre B, et al. Carvacrol encapsulation into nanoparticles produced from chia and flaxseed mucilage: Characterization, stability and antimicrobial activity against *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*. 2022 2022/12/01;108:104116.
44. Motta Felício I, Limongi de Souza R, de Oliveira Melo C, et al. Development and characterization of a carvacrol nanoemulsion and evaluation of its antimicrobial activity against selected food-related pathogens. *Lett Appl Microbiol*. 2021 Mar;72(3):299-306.
45. Zhao Y, Wang Y, Zhang Z, et al. Advances in Controllable Release Essential Oil Microcapsules and Their Promising Applications. *Molecules*. 2023 Jun 25;28(13).
46. Shakya N, Budha Chettri S, Joshi S, et al. Utilization of Fmoc-3F-PHE hydrogel for encapsulation of *Zanthoxylum armatum* and *Cinnamomum camphora* oil for enhancing their antibacterial activity. *BMC Research Notes*. 2022 2022/08/12;15(1):278.
47. Mukurumbira AR, Shellie RA, Keast R, et al. Encapsulation of essential oils and their application in antimicrobial active packaging. *Food Control*. 2022 2022/06/01;136:108883.
48. Qiu L, Zhang M, Adhikari B, et al. Microencapsulation of Rose Essential Oil Using Perilla Protein Isolate-Sodium Alginate Complex Coacervates and Application of Microcapsules to Preserve Ground Beef. *Food and Bioprocess Technology*. 2023 2023/02/01;16(2):368-381.
49. Hernández-Nava R, López-Malo A, Palou E, et al. Encapsulation of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) by complex coacervation between gelatin and chia mucilage and its properties after spray drying. *Food Hydrocolloids*. 2020 2020/12/01;109:106077.
50. Qiu L, Zhang M, Adhikari B, et al. Microencapsulation of rose essential oil in mung bean protein isolate-apricot peel pectin complex coacervates and characterization of microcapsules. *Food Hydrocolloids*. 2022 2022/03/01;124:107366.
51. Chen K, Zhang M, Adhikari B, et al. Microencapsulation of Sichuan pepper essential oil in soybean protein isolate-Sichuan pepper seed soluble dietary fiber complex coacervates. *Food Hydrocolloids*. 2022 2022/04/01;125:107421.
52. Chen K, Zhang M, Mujumdar AS, et al. Encapsulation of different spice essential oils in quinoa protein isolate-gum Arabic coacervates for improved stability. *Carbohydrate Polymers*. 2023 2023/01/15;300:120250.

## 4. Conclusion

### 4.1. Propriétés anti-inflammatoires des HEs

Grâce à nos deux expériences, nous avons évalué les effets anti-inflammatoires d'un panel d'HEs, tout d'abord, ceux de l'HETC et du carvacrol sur les PBMC issues des vaches laitières, puis ceux de huit HEs sur des macrophages THP1.

Le but de la première expérimentation était d'évaluer si l'HETC et le carvacrol pouvaient potentiellement contribuer à la prévention ou au traitement de la mammite. À notre connaissance, aucune étude n'a été décrite rapportant la capacité anti-inflammatoire des HEs sur des cellules PBMC et notamment celles issues de vaches laitières.

Les résultats de cette étude, mis en évidence par RT-PCR, ont indiqué que l'HETC et le carvacrol présentent des propriétés anti-inflammatoires, qui se traduisent par une réduction de l'expression des gènes clefs de l'inflammation. Cependant, ces effets n'ont pas été validés par la méthode MILLIPLEX®, suggérant une régulation post-transcriptionnelle plus complexe. Une étude de cinétique de sécrétion des cytokines sur des cellules PBMC serait intéressante à mener. Il serait également pertinent de répéter ces essais en utilisant des échantillons de PBMC provenant de vaches laitières atteintes de mammites, afin d'obtenir des informations plus spécifiques sur l'efficacité de l'HETC et du carvacrol dans des conditions pathologiques réelles, et ainsi approfondir nos connaissances sur les mécanismes anti-inflammatoires de l'HETC dans le traitement des mammites bovines.

Cette étude confirme l'effet anti-inflammatoire de l'HETC et du carvacrol dans le contexte des mammites. Cependant, il convient de rappeler que cette propriété n'a pas été observée dans notre expérimentation *in vivo*, menée sur les quartiers mammaires de vaches atteintes de mammites subcliniques. Nous pouvons faire le parallèle avec la curcumine, sur laquelle l'HETC a démontré des effets anti-inflammatoires prometteurs *in vitro*, mais dont l'efficacité *in vivo* n'a pas été pleinement établie. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette disparité, notamment la nature hydrophobe de la molécule, sa dégradation rapide, et la question de sa perméabilité, comme mentionné dans la revue de (Peng et al., 2021).

Il serait intéressant de tester les HEs de coriandre, de géranium et d'armoise sur les cellules PBMC des vaches laitières. En effet, ces trois HEs ont montré une forte capacité d'inhibition de la caspase-1 (sur des macrophages THP1) qui joue un rôle clé dans le processus



d'inflammation et dans la régulation de la réponse immunitaire innée de l'organisme. Cette action anti-inflammatoire semble être attribuable aux principaux composés de chacune de ces huiles, notamment le linalol pour la coriandre et le  $\beta$ -citronellol pour le géranium. En revanche, les principaux composés de l'armoise, l' $\alpha$ -thuyone et le camphre, n'ont pas manifesté d'activité anti-inflammatoire individuelle, mais leur combinaison a montré une action synergique responsable des propriétés anti-inflammatoires de l'armoise. De plus, seul le  $\beta$ -citronellol, parmi les principaux composés, a été capable d'inhiber l'activation de la caspase-1 dans les macrophages THP-1 stimulés par le LPS. Les HEs de coriandre, de géranium et d'armoise présentent un potentiel considérable en tant qu'agents anti-inflammatoires pour la médecine humaine et vétérinaire. Une perspective intéressante serait d'explorer ces effets sur des PBMC bovines stimulées par le LPS pour mieux comprendre leur impact dans un contexte physiologique plus proche des mammites bovines.

Sur ce système cellulaire de macrophages humains, l'huile essentielle de *Thymus capitatus* (HETC) étudié sur les cellules PBMC, n'était pas parmi les plus actives mais montrait une réduction de 20 % l'activation de NF- $\kappa$ B.

#### 4.2. Encapsulation des HEs et activité antibactérienne

Concernant l'encapsulation des HEs, deux stratégies ont été adoptées. La première consistait à encapsuler l'HETC par nano-émulsion (5% de la phase dispersée) en utilisant le Tween 20 (7% de la phase continue aqueuse). Les différents paramètres de cette nano-émulsion sont issus de la Réponse de Surface Méthodologie (RSM). C'est une méthode d'optimisation des relations souvent complexes entre plusieurs variables d'entrée (pourcentage d'émulsifiant, pourcentage de la phase dispersée, temps de sonication et temps d'agitation par ultraturrax) et une variable de réponse (taille des gouttelettes de nano-émulsion). Nous avons observé la formation spontanée d'une nano-émulsion (tailles de gouttelettes voisine de 260 nm). L'encapsulation de l'huile essentielle par cette nano-émulsification a amplifié notamment l'activité antibactérienne contre plusieurs microorganismes (*S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* et *Pseudomonas aeruginosa* et également *Candida albicans*).

L'activité antibactérienne a également été testée sur le carvacrol pur soit libre, complexé aux protéines ou nano-émulsifié. L'activité antibactérienne du carvacrol a été évaluée sur deux

souches de pathogènes associées à la mammite bovine, *S. aureus* (N.b) et *E. coli* (P4). De manière surprenante, et contrairement à l'émulsification du *Thymus capitatus*, l'encapsulation du carvacrol par nano-émulsion n'a pas renforcé ses effets antibactériens. Pourtant, un nombre significatif d'études montrent que la nano-émulsion du carvacrol augmente son activité antibactérienne. Cacciatore et al. décrivent que l'encapsulation du carvacrol dans des nanoparticules produites à partir de mucilage de chia et de lin améliore ses propriétés antibactériennes contre des agents pathogènes alimentaires tels que *Salmonella spp* et *Listeria monocytogenes* (Cacciatore et al., 2022). Felício et al. soulignent que la nano-émulsion du carvacrol en présence de 9% de tensioactif HLB11 augmente la capacité antibactérienne du carvacrol contre *E. coli*, *P. aeruginosa* et *Salmonella spp* (Motta Felício et al., 2021).

De nombreuses études ont montré que la coacervation complexe obtenue par mélange de protéines et de polysaccharides améliore la protection et l'activité des HEs (Chen et al., 2022; Chen et al., 2023; Hernández-Nava et al., 2020; X. Liu et al., 2023; Plati & Paraskevopoulou, 2023; Qiu et al., 2022, 2023; Sun et al., 2022). Aucune de ces études ne mentionne en revanche l'encapsulation dans un système de coacervation purement protéique. Ceci pourrait être lié en partie au faible rendement d'encapsulation que nous avons obtenue ici pour le carvacrol lors de son encapsulation dans des gouttelettes (coacervats) formées par assemblage entre deux protéines, BLG et LF. Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux expliquer ces résultats et tenter d'améliorer le faible rendement de l'encapsulation d'une molécule volatile telle le carvacrol.

La complexation du carvacrol avec les protéines individuelles ou après coacervation complexe hétéroprotéique n'a pas conduit à l'amélioration de ses propriétés antibactériennes. Contrairement aux rendements élevés rapportés dans la littérature lors des encapsulations par des mélanges protéines-polysaccharides, l'origine du faible rendement obtenu pendant la coacervation complexe dans un système purement protéique reste à élucider. Par ailleurs, la forte affinité du carvacrol vis-à-vis de la lactoferrine (LF) pourrait induire une faible disponibilité et diffusion du carvacrol expliquant la faible activité de ce complexe.

En perspective, il serait intéressant d'évaluer l'activité antibactérienne des nano-émulsions de carvacrol en modifiant la nature ou la concentration de l'émulsifiant utilisé, ce qui pourrait apporter une meilleure compréhension des résultats obtenus.



# Conclusion générale et perspectives



## Conclusion générale et perspectives

L'objectif de ma thèse était d'évaluer l'effet de l'utilisation d'HEs, notamment celle du *Thymus capitatus*, dans le traitement des mammites subcliniques chez les vaches laitières ainsi que l'impact sur la qualité du lait, au travers d'une approche combinant l'*in vivo* et l'*in vitro*. C'est un travail de nature pluridisciplinaire avec des expérimentations touchant divers domaines, notamment la zootechnie, l'immunologie, la microbiologie, la biologie moléculaire et cellulaire, le génie des procédés, et dans une moindre mesure, l'éthologie.

Dans le premier chapitre, nous avons présenté les résultats *in vivo* sur l'évaluation de l'application topique de l'HETC sur des vaches atteintes de mammites subcliniques, en examinant l'impact sur la qualité du lait, les microbiotes du lait et de la peau, ainsi que l'évolution de l'inflammation liée à la mammite. L'ensemble des résultats ont été présentés dans un article qui a été soumis à la revue "Scientific Report".

Nous avons essentiellement montré que l'application cutanée d'HETC n'affectait pas la qualité du lait, y compris sa composition, ses caractéristiques sensorielles, sa lipidomique et ses propriétés physico-chimiques. De plus, à une concentration de 10 % d'HETC, aucune modification significative n'a été observée ni sur le microbiote cutané ni sur le microbiote du lait, ce qui témoigne de l'innocuité de cette HE lorsqu'elle est appliquée par massage sur l'animal à cette concentration.

En ce qui concerne les marqueurs inflammatoires, notamment le comptage des cellules somatiques dans le lait, aucun effet significatif n'a été observé avec ce traitement, les niveaux étant restés relativement similaires entre les vaches traitées et les vaches témoins. Par conséquent, dans les conditions appliquées, le traitement à base d'HETC n'a pas montré de toxicité (sous réserve de la réalisation d'études de toxicologie appropriées concernant les éventuels résidus d'HETC dans le lait). Cependant, il est important de noter qu'il n'a pas non plus présenté d'effet curatif sur les mammites subcliniques. Plusieurs questions demeurent ouvertes, notamment concernant le mode de traitement, les doses à préconiser et l'efficacité de l'HETC dans un système *in vivo*.

En raison de contraintes temporelles, budgétaires et réglementaires, il n'a pas été possible de reproduire l'expérimentation animale en modifiant les conditions opératoires notamment de dose et de durée d'application. En revanche, nous avons entrepris une expérience visant à reproduire des pratiques couramment utilisées par les éleveurs en aromathérapie, afin d'avoir la possibilité de tester plusieurs huiles en même temps et d'apporter une preuve de concept. À notre connaissance, aucune étude de ce genre n'a été menée sur le modèle bovin. Les principaux résultats de ce travail sont présentés en Annexe 6, avec le protocole expérimental original que nous avons mis en place, ainsi que les résultats préliminaires obtenus. Nous envisageons également une collaboration avec l'INRAE de Jouy-en-Josas (Christine Baly, UMR BRIDE) pour poursuivre ce travail et comprendre les mécanismes mis en place en utilisant un modèle rongeur.

Dans le chapitre 2, nous avons présenté les résultats des études *in vitro* sur les effets anti-inflammatoires de plusieurs HEs méditerranéennes et de leurs principaux composés bioactifs. Dans la première étude, réalisée sur des macrophages humains THP-1 porteurs d'un rapporteur NF- $\kappa$ B, des effets anti-inflammatoires notables ont été observés, notamment pour les huiles de coriandre, de géranium et d'armoise. De plus, l'étude des principaux composés de chaque HE testée sur ce modèle cellulaire a révélé que le principal composé de chaque huile ou le mélange binaire des deux principaux composés pouvait reproduire les effets anti-inflammatoires observés dans les HEs brutes. Ces résultats mettent en évidence l'importance de prendre en compte les effets combinatoires des molécules sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et suggèrent des perspectives prometteuses pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques contre la mammite subclinique.

L'étude de l'activité anti-inflammatoires de l'huile essentielle du *Thymus capitatus* a été approfondie en utilisant, pour la première fois, les PBMC comme modèle cellulaire. Les résultats de cette étude ont montré que l'HETC, ainsi que le carvacrol, présentent des effets anti-inflammatoires en modulant l'expression des gènes COX-2, IL-6, IL-8 et TNF $\alpha$  des PBMC. Des travaux sont envisagés entre l'Idel-LPAM et l'INSERM afin de compléter les apports de ce travail et le valoriser.

Dans la seconde partie de ce chapitre, nous avons exposé les résultats des études menées sur l'impact de l'encapsulation de l'HETC et de son principal composé, le carvacrol, sur les propriétés antibactériennes. L'encapsulation est un moyen efficace de protéger les HEs contre

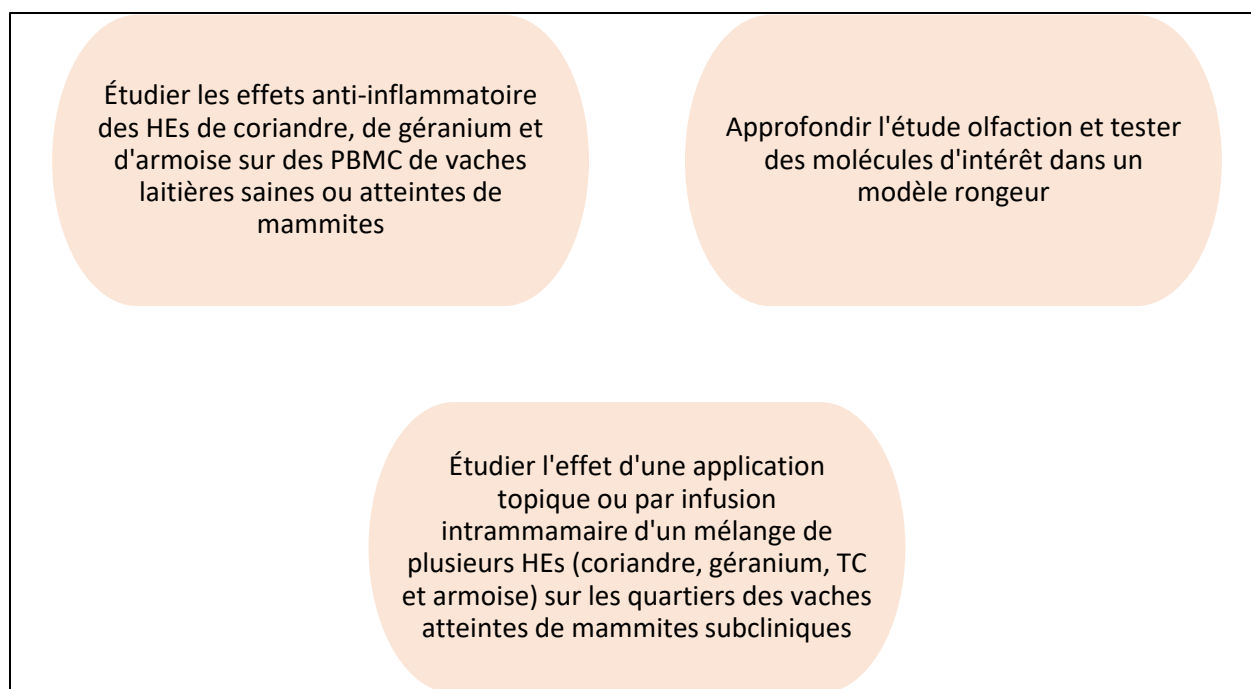
la dégradation et de leur conférer une meilleure durée de vie. Pour ce faire, deux techniques d'encapsulation ont été étudiées : la nano-encapsulation et la complexation aux protéines.

D'une manière inattendue, la nano-encapsulation réduit les propriétés antibactériennes du carvacrol vis-à-vis de deux pathogènes utilisées, *S. aureus* et *E. coli*. Ce résultat contraste avec celui que nous avons obtenu dans le cadre du projet MilkQua sur l'HETC. En effet l'encapsulation par nano-émulsification améliore significativement l'efficacité antibactérienne de l'huile entière et ceci vis-à-vis de plusieurs pathogènes (*Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), etc.) (Benjemaa et al., 2022). Plusieurs phénomènes peuvent expliquer cette divergence, notamment les paramètres de la nano-émulsion (nature et concentration du tensioactif) ainsi que les souches bactériennes utilisées dans ces deux études. En ce qui concerne la coacervation complexe, le très faible rendement d'encapsulation obtenu avec les molécules utilisées (deux protéines : lactoferrine et  $\beta$ -lactoglobuline) ne permet pas de proposer cette méthode pour l'encapsulation du carvacrol, contrairement à la coacervation complexe formée entre protéine et polysaccharide (Guo et al., 2022; Sun et al., 2022).

Bien que l'HETC aie démontré des propriétés anti-inflammatoires et antibactériennes *in vitro*, il convient de noter que ces caractéristiques n'ont pas été observées dans nos études menées *in vivo* sur les vaches laitières atteintes de mammites subcliniques, dans les conditions de traitement utilisées. Des études complémentaires (

Figure 25) sont nécessaires pour parvenir à des conclusions définitives concernant ce sujet d'intérêt pour les éleveurs. En effet, ces derniers utilisent désormais un nombre considérable d'HEs dans l'élevage bovin, ce qui souligne l'importance de poursuivre la recherche pour mieux comprendre leur efficacité et leurs applications potentielles en tant que substituts.





*Figure 25 : Pistes et perspectives envisageables basées sur les résultats du traitement des mammites subcliniques.*

Au travers nos travaux pluridisciplinaires réalisés, nous pensons apporter une contribution significative à la compréhension de l'utilisation des HEs pour le traitement des mammites subcliniques ainsi que les limites associées. Ce travail met en évidence la complexité de l'approche et l'importance de poursuivre les investigations pour approfondir notre compréhension des mammites subcliniques et de l'usage des HEs. Bien que nous n'ayons pas encore trouvé de réponses définitives à la question de recherche initiale, ce travail ouvre des perspectives pour de futures recherches. Les prochains travaux pourraient explorer plus en détail les mécanismes spécifiques par lesquels les HEs interagissent avec les agents responsables de ces mammites, ainsi que d'autres protocoles d'encapsulation pour améliorer leur efficacité. En continuant d'explorer ces domaines, nous espérons trouver des réponses plus précises et développer des stratégies, alternatives aux antibiotiques, et efficaces pour le traitement des mammites subcliniques.

## Valorisation de la thèse



## Valorisation de la thèse

### ➤ Articles

**Nehme, R.**, Andrés, S., Pereira, R. B., Ben Jemaa, M., Bouhallab, S., Ceciliani, F., . . . Abdennebi-Najar, L. (2021). Essential Oils in Livestock: From Health to Food Quality. *Antioxidants*, 10(2), 330. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/2/330>

**Benjemaa, M.**, Rahali, F. Z., Falleh, H., Beji-Serairi, R., Megdiche-Ksouri, W., Hamrouni, I., Hammami, M., **Nehme, R.**, . . . Ksouri, R. (2022). Essential Oil Stabilisation by Response Surface Methodology (RSM): Nanoemulsion Formulation, Physicochemical, Microbiological, and Sensory Investigations. *Molecules*, 27(21), 7330. doi:10.3390/molecules27217330

**Pereira, R. B.**, Rahali, F. Z., **Nehme, R.**, Falleh, H., Jemaa, M. B., Sellami, I. H., . . . Pereira, D. M. (2023). Anti-inflammatory activity of essential oils from Tunisian aromatic and medicinal plants and their major constituents in THP-1 macrophages. *Food Research International*, 167, 112678. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112678>

**Gini, C.**, **Nehme, R.**, Vanbergue, E., Even, S., Biscarini, F., Andrés, S., . . . Abdennebi-Najar, L. The effects of *Thymus capitatus* essential oil topical application on milk quality: a systems biology approach. Submitted in *Scientific Reports*

Nehme, R., Abdennebi-Najar, L., Rault, L., Maillard, MB., Even, S., Andrés, S., Ksouri, R., D.M. Pereira, R. B., Ben Jemaa, M., Bouhallab, S. Antibacterial properties of free, nanoemulsified and protein-complexed carvacrol. En cours de rédaction

➤ **Présentations orales**

Nehme, R., Vanbergue, E., Even, S., Falleh, H., Ksouri, R., Bouhallab, S., Abdennebi-Najar, L. Evaluation of the antibacterial and anti-inflammatory effects of *Thymus Capitatus* against mastitis, 74<sup>th</sup> The European Federation for Animal Science or EAAP, 5 to 8 September 2022, Porto (Portugal)

Nehme, R., Vanbergue, E., Even, S., Falleh, H., Ksouri, R., Bouhallab, S., Abdennebi-Najar, L. Antibacterial and anti-inflammatory effects of *Thymus Capitatus* and its major components against subclinical mastitis in dairy cows, Le réseau de recherche à l'international "Galactinnov", 8 November 2022, Rennes (France)

Nehme, R., Vanbergue, E., Even, S., Falleh, H., Ksouri, R., Bouhallab, S., Abdennebi-Najar, L. L'effet d'une application de l'huile essentielle Thym à carvacrol sur l'évolution des mammites subcliniques chez les vaches laitières, Space, 15 septembre 2022, Rennes (France)

➤ **Posters**

Nehme, R., Vanbergue, E., Even, S., Falleh, H., Ksouri, R., Bouhallab, S., Abdennebi-Najar, L. Evaluation of the antibacterial and anti-inflammatory effects of *Thymus Capitatus* against mastitis, **4èmes rencontres internationales** « Lait vecteur de développement », 6 à 8 mars 2023, Tunis (Tunisie)

Nehme, R., Michelet, C., Aupiais, A., Vanbergue, E., Rampin, O., Bouhallab, S., Abdennebi-Najar L. Effects of olfactory exposure to twelve Essential Oils (EOs) on behavior and health of cows with subclinical mastitis. 74<sup>th</sup> The European Federation for Animal Science or EAAP, 26 August to 1 September 2023, Lyon (France)

## Liste des annexes



## Liste des annexes

### Annexe 1 : Tableau représentant les différents *Work packages* (WP) du projet MilkQua

The working plan of MILKQUA			
WP	WP Title	Leader	Aims and concept
1	Coordination and Management	IDELE	Management
2	Innovative QMP Practices in Tunisia	IDELE	Have status in Tunisia
3	<i>In vitro</i> evaluation of bioactive molecules and extracts	UPFF	<i>In vitro</i> biological effects of plants and their relative bioactive compounds
4	<i>In vivo</i> evaluation of bioactive molecules and extracts	CSIC	<i>In vivo</i> effects of traditional and medicinal plants on cow's performance and mastitis prevention
5	System biology assessment of the effects of EO after <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> studies	UMIL	Metabolomics, proteome, microbiome, microRNAome
6	Milk and dairy products processing and consumer studies	STLO	Assessing the interest and the benefit of EO on the quality of milk and dairy products
7	Consumer assessment of milk practices and studies of sensorial properties and consumer acceptance of enriched EOs UHT milk	LPAM	Assessing knowledge, attitude and practices of Tunisian consumer toward milk and dairy products and their acceptance of EO enriched milk.
8	Communication and dissemination	IDELE	Communicating and disseminating MILKQUA results



## Annexe 2 : Les objectifs des deux Work Packages 4 et 6

WP number	4	Lead beneficiary				CSIC				
WP title	In vivo evaluation of bioactive molecules and extracts									
Participant nr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Short name of participant	IDELE	<u>CSIC</u>	STLO	UPFF	LPAF	LPAM	UMIL	ENMV	OEP	Danone
Person months per participant	29.1	7.8			22.4			5.5		
Start month	5			End month	32					

**Objectives**

- 1) Definition of the methodology, standard operating protocols and quality strategy to perform *in vivo* feeding experiments, thus having comparable results across different partners involved in these trials (T4.1).
- 2) Performing *in vivo* feeding trials using essential oils (the best options according to WP3, task 3.3) included in the milk replacer of newborn dairy calves to collect both data (feed efficiency) and samples (plasma and faeces) to be transferred to WP5 in order to determine the effects on the health status during the replacement phase of EOs administered during early life (metabolic programming) (T4.2).
- 3) *In vivo* trials using EOs extracted from naturally growing woody and herbaceous species to evaluate their curative effect when applied directly on the udder with mastitis in association or not to antibiotics (Small and large scale studies in both France and Tunisia) (T4.3).

*IDELE effort considers the presence of a PhD shared with P3/STLO, this corresponds to 18PM on WP4.*

*LPAF effort consider the presence of a PhD this corresponds to 18 PM on WP4.*

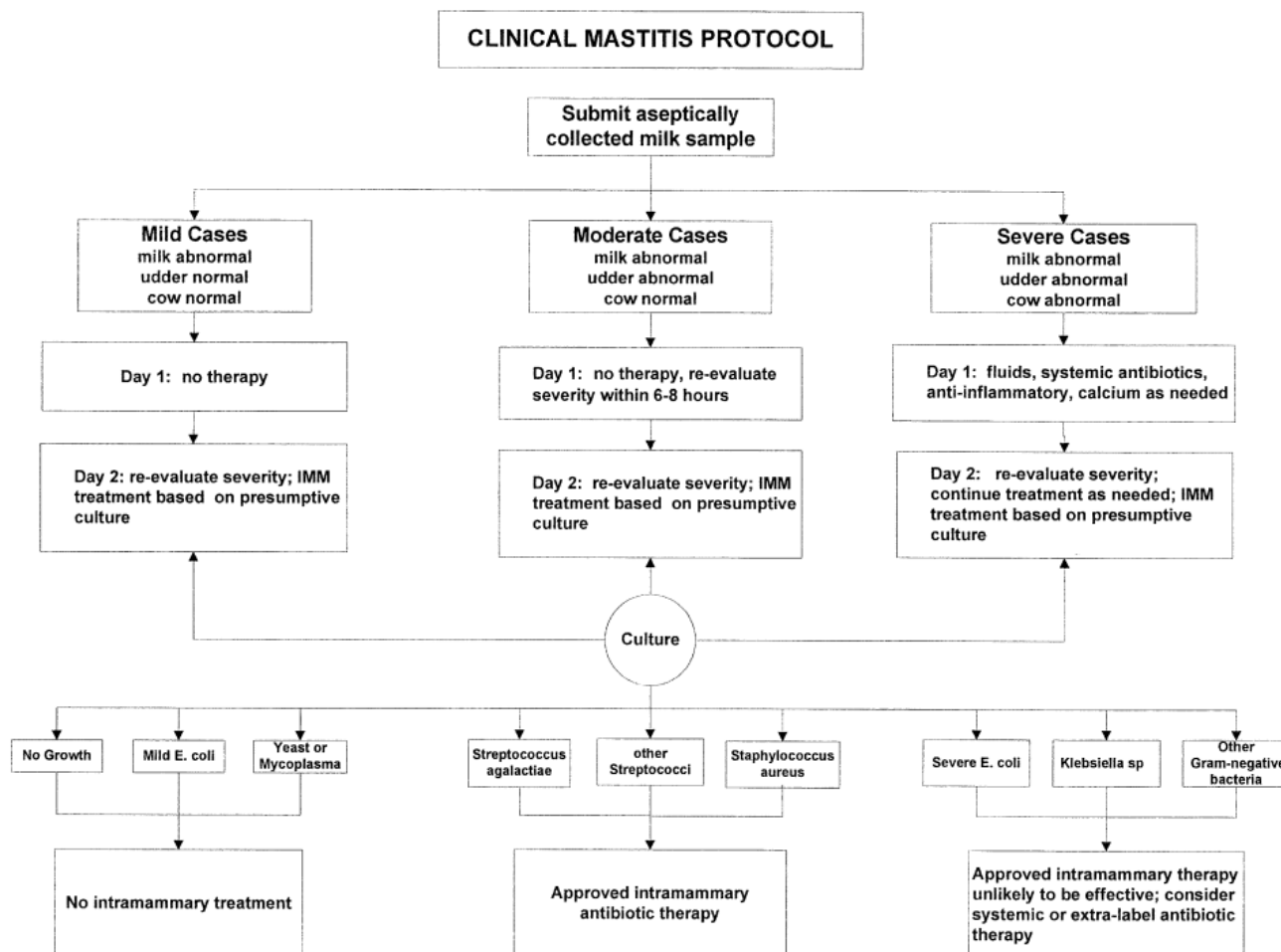
WP number	6	Lead beneficiary			STLO					
WP title	Milk and dairy product processing studies									
Participant nr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Short name of participant	IDELE	CSIC	STLO	UPFF	LPAF	LPAM	UMIL	ENMV	OEP	Danone
Person months per participant	1		13			4				
Start month	12			End month			30			

**Objectives**

We will evaluate the interest and the benefit of adding essential oils on the quality and stability of milk and its derived processed products. Two innovative encapsulation strategies of EOs will be compared. Analysis of milk obtained from the *in vivo* trials (WP4) and subsequent derived processed dairy products (flavour, bioactivity, composition) will be performed in connexion with WP4 and WP7 activity of EOs and bioactive extracts, and their detailed mechanism of action.

## Annexe 3 : Exemple de protocole de thérapie clinique des mammites basée sur la culture bactériologique

Source : (Roberson, 2003)



## Annexe 4 : Liste des huiles essentielles autorisées en médecine vétérinaire (extrait du tableau 1 du règlement LMR)

Source : Phytothérapie et Huiles Essentielles : réglementation Chambre d'agriculture France

Substance pharmacologiquement active	Espèce animale	Autres dispositions
Angelicae radix aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Anisi aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Carvi aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Caryophylli aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Cinnamomi cassiae aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Cinnamomi ceylanici aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Citri aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Citronellae aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Coriandri aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Cupressi aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
Eucalypti aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Foeniculi aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Lauri folii aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Lavandulae aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
Melissae aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Menthae arvensis aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Menthae piperitae aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Myristicae aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	À n'utiliser que sur l'animal nouveau-né
Rosmarini aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-
Terebinthinae aetheroleum* rectificatum	Toutes les espèces productrices d'aliments	Pour usage topique uniquement
Thymi aetheroleum*	Toutes les espèces productrices d'aliments	-

### Annexe 5 : *Thymus capitatus*

Fournisseur : Center of Biotechnology of Borj Cedria (LPAM)

#### Principaux composés – chromatographie phase gazeuse

N°	Compound	% of total volatiles
1	$\alpha$ -thujene	1.49 $\pm$ 0.06
2	$\alpha$ -pinene	0.71 $\pm$ 0.01
3	Camphene	0.21 $\pm$ 0.00
4	$\beta$ -myrcene	1.42 $\pm$ 0.05
5	l-Phellandrene	0.30 $\pm$ 0.00
6	$\alpha$ -terpinene	1.84 $\pm$ 0.07
7	p-cymene	7.06 $\pm$ 0.15
8	$\beta$ -phellandrene	0.55 $\pm$ 0.01
9	$\gamma$ -terpinene	7.58 $\pm$ 0.16
10	Linalool	1.95 $\pm$ 0.07
11	Borneol	0.57 $\pm$ 0.01
12	Cyclohexen-1-ol	0.91 $\pm$ 0.02
13	Thymol	0.24 $\pm$ 0.00
14	Carvacrol	70.62 $\pm$ 1.07
15	Caryophyllene	4.55 $\pm$ 0.08
	<b>Total</b>	<b>100</b>

## Annexe 6 : Effets de l'exposition olfactive à 12 huiles essentielles sur le comportement et la santé des vaches laitières atteintes de mammites subcliniques

### 1. Introduction

L'effet de l'inhalation des HEs sur la santé intéresse de plus en plus les chercheurs (Figure 26). Plusieurs études ont été réalisées sur des humains, des souris et des rats (cf Tableau 8), démontrant les effets positifs (relaxant, anti-inflammatoire, antidépresseur, anti-stress...) de cette inhalation sur la santé et le système nerveux.

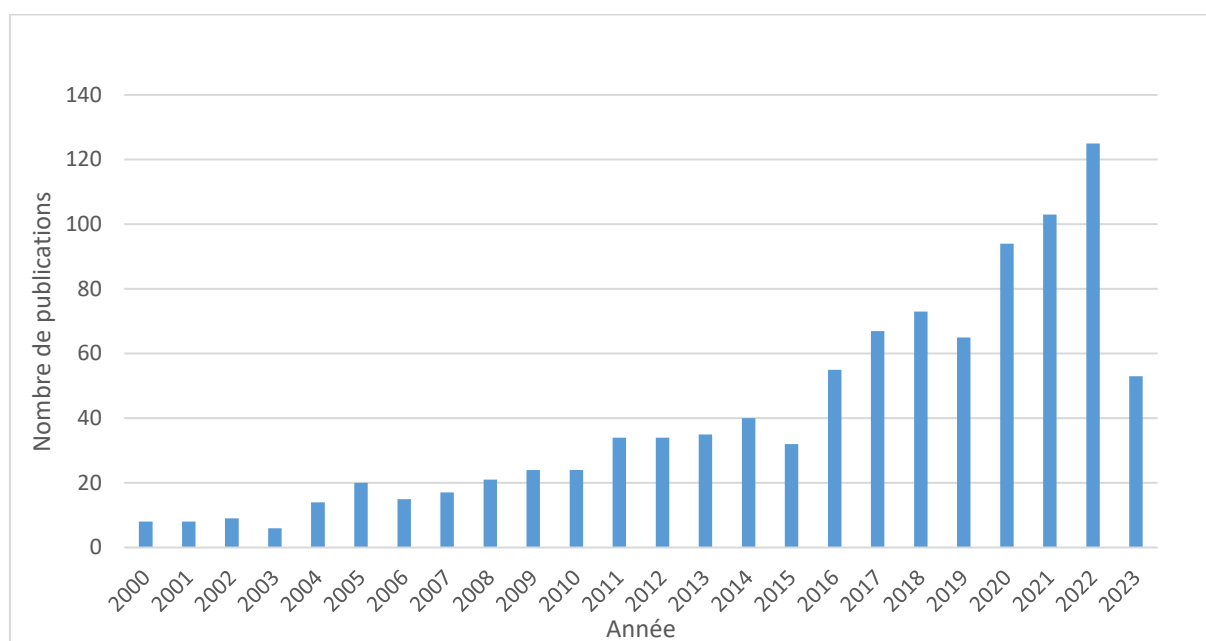


Figure 26 : Graphique de répartition du nombre d'articles contenant « inhalation essential oils » selon l'année de publication (2007-2023).  
Source: Webofscience.com

Tableau 8 : Liste de neuf publications sur l'impact de l'inhalation des HEs sur la santé.

HES	Espèces	Résultats	Sources
<b><i>Acorus gramineus</i></b>	Souris	Agit sur le système nerveux central via le système $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) → effet apaisant et relaxant sur le cerveau par le biais du système GABA.	(Koo et al., 2003)
<b><i>Asarum heterotropoides</i></b>	Rats	Réduit l'expression des hormones de libération de la corticotropine (CRF) dans le noyau paraventriculaire et la tyrosine hydroxylase (TH) dans le locus coeruleus → antidépresseurs	(Park et al., 2015)
<b><i>Coriandrum sativum L.</i></b>	Rats	Améliore l'altération de la mémoire spatiale induite par Amyloïde $\beta$ (1-42) en atténuant le stress oxydatif dans l'hippocampe → amélioration cognitive	(Cioanca, Hritcu, Mihasan, & Hancianu, 2013)
<b><i>Coriandrum sativum L.</i></b>	Rats	Contrebalance l'anxiété, la dépression et le stress oxydatif dans les conditions de la maladie d'Alzheimer	(Cioanca, Hritcu, Mihasan, Trifan, & Hancianu, 2014)
<b><i>Lavandula angustifolia Mill</i></b>	Humains	Soulage la douleur et la sensation de résidu urinaire après une chirurgie du cancer colorectal	(Yu & Seol, 2017)
<b><i>Melissa officinalis</i></b>	Rats	Agit sur le système nerveux central via le système GABA → effet anti-agitation et antidépresseur	(Abuhamdah et al., 2010)
<b><i>Piper guineense</i></b>	Rats	Activité sédatrice et activité tranquillisante.	(Tankam & Ito, 2013)
<b><i>Kaemferia galangal</i></b>	Rats	Diminue les niveaux de cholestérol et de triglycérides dans le sang	(Batubara, Assaat, Irawadi, Mitsunaga, & Yamauchi, 2014)
<b><i>Rosmarinus officinalis L, Citrus lemon, Citrus sinensis, &amp; Lavandula angustifolia, L.vera, L. officinalis</i></b>	Souris	Les niveaux cérébraux d'Amyloïde $\beta$ , le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), avaient légèrement augmenté → prévention et traitement de la maladie d'Alzheimer	(Okuda, Fujita, Takada-Takatori, Sugimoto, & Urakami, 2020)

Dans cette étude, nous avons testé une nouvelle méthode originale pour le traitement des mammites subcliniques, basée sur des pratiques décrites et encouragées par certains éleveurs, mais dont la preuve de concept n'a jamais été testée auparavant chez les vaches. Le but de cette expérimentation est d'étudier l'effet de l'inhalation des HEs sur l'inflammation de la glande mammaire des vaches atteintes de mammites subcliniques, et d'étudier le comportement de vaches laitières vis-à-vis de ce panel d'HEs.

L'avantage d'une telle méthode, si elle s'avérait concluante, serait de s'affranchir des limites imposées par la réglementation sur l'utilisation directe des HEs (voir partie 3.3 de l'état de l'art) et de pouvoir tester un large panel d'HEs en un temps record. Notre hypothèse, quant à l'efficacité d'une telle méthode, est que l'inhalation d'HEs via la voie olfactive modulerait l'expression de certains gènes (via des processus épigénétiques) au niveau des systèmes nerveux central et limbique (émotionnel) et pourrait ainsi diminuer la sécrétion de certains marqueurs de stress, comme le cortisol, et inhiber des processus pro-inflammatoires en lien avec la mammite subclinique (Koyama & Heinbockel, 2020).

Aucune étude scientifique n'a été menée sur l'inhalation des HEs par des vaches laitières. Pour définir un protocole expérimental, nous nous sommes basés sur l'article de (Rørvang, Jensen, & Nielsen, 2017) qui ont développé un test pour déterminer la capacité olfactive des vaches laitières à réagir à des odeurs complexes telles que le café et le jus d'orange. Nous avons également pris en compte les pratiques actuelles d'éleveurs français, notamment celles du « Groupement d'Interventions et d'Entraide Zone Verte ».

Dans ce chapitre, nous présentons d'abord le matériel et les méthodes utilisés dans cette expérimentation, puis nous exposons les résultats préliminaires et les conclusions de cette étude.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Choix des vaches laitières

L'étude a porté sur 29 vaches dont 19 étaient atteintes de mammites subcliniques. L'identification des vaches atteintes est détaillée dans le paragraphe *Détection des mammites subcliniques et sélection des 12 vaches laitières* de la partie 3.1 du chapitre 1. En résumé, la

sélection s'est appuyée sur deux critères essentiels. Le premier est le CCS dans le lait, qui devait dépasser le seuil de 100 000 cellules/ml, sur trois comptages cellulaires effectués sur une période d'un mois. Le second est la présence d'un pathogène responsable de la mammites subclinique révélée par une analyse bactériologique du lait. L'identification des quartiers atteints est réalisée en se basant sur les résultats bactériologiques, ainsi que sur le CCS effectué par quartier.

## 2.2. Sélection des douze huiles essentielles

Les HEs sélectionnées pour ce protocole sont issues des pratiques actuelles d'éleveurs français et sont présentées dans le Tableau 9. Ce tableau met en avant la molécule majoritaire, son pourcentage dans l'HE et la famille chimique à laquelle elle appartient. Les composés détaillés de chacune de ces douze HEs sont données dans les

Annexe 7 à Annexe 17.

Tableau 9 : Les douze HEs sélectionnées pour l'expérimentation.

HE	Molécule majoritaire	Pourcentage de la molécule majoritaire	Famille chimique de la molécule majoritaire
<i>Laurus nobilis</i>	1,8-cinéole	51%	Oxyde terpénique
<i>Cinnamosma fragrans</i>	1,8-cinéol	36%	Oxyde terpénique
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1,8-cinéol	44%	Oxyde terpénique
<i>Zingiber officinalis</i>	$\alpha$ -Zingibérène	29%	Sesquiterpène
<i>Rosmarinus officinalis verbenone</i>	$\alpha$ -Pinène	39%	Monoterpène
<i>Pinus ponderosa</i>	$\beta$ -pinène	39%	Monoterpène
<i>Thymus capitatus</i>	Carvacrol	71%	Phénol



<b><i>Eucalyptus citriodora</i></b>	Citronellal	65%	Aldéhyde terpénique
<b><i>Lavandula angustifolia</i></b>	Acétate de linalyle	36%	Ester
<b><i>Coriandrum sativum</i></b>	Linalol	64%	Monoterpenol
<b><i>Pelargonium graveolens</i></b>	$\beta$ -citronellol	37%	Monoterpenol
<b><i>Artemisia herba alba</i></b>	$\beta$ -Thujone	38%	Cétones

### 2.3. Détermination des sous-groupes et de la hiérarchie sociale

La détermination de l'organisation hiérarchique du lot de vaches utilisé dans cette expérimentation est nécessaire. Il faut s'assurer que le choix d'une vache pour une HE donnée est bien lié à son attirance pour cette HE et n'est pas affecté par son rang hiérarchique par rapport aux autres vaches du lot.

Des observations ont été d'abord réalisées sur les 29 vaches afin de détecter les sous-groupes par la méthode des plus proches voisins (des vaches qui restent normalement ensemble tout le long de la journée). Ces sous-groupes sont normalement formés par des vaches qui ont été élevées ensemble et qui sont devenues des animaux familiers.

La hiérarchie sociale a été identifiée dans chaque sous-groupe trouvé. Pour identifier l'ordre hiérarchique, un seau de concentré a été amené au milieu d'une parcelle. Les vaches qui se sont approchées les premières ont été considérées comme dominantes. Les animaux ont été filmés pendant toute la durée du test. Le comportement de chaque animal du lot a été noté pour déterminer le rang hiérarchique de chaque vache.

### 2.4. Protocole olfaction

#### 2.4.1. Parcelle et HEs

Les douze flacons contenant les HEs ont été ouverts et déposés individuellement dans des parpaings disposés sur une parcelle homogène mesurant 3 600 m<sup>2</sup> (chaque côté mesurant 60

mètres de long). Les parpaings contenant les HEs ont été regroupés en fonction des familles chimiques respectives (1 zone par famille d'huile, nombre de famille total 8). Entre chaque zone, un parpaing vide a été inséré. Chaque parpaing a été espacé de 7 mètres l'un de l'autre, afin de garantir une distance suffisante pour éviter toute interférence olfactive (cf Figure 27). Le protocole a été exécuté sur deux jours consécutifs aux mêmes heures (J0 et J1), de 9h00 à 11h30. Lors de la deuxième journée d'expérimentation, nous avons modifié la disposition des HEs en réarrangeant leurs positions, tout en maintenant les huiles regroupées par famille.

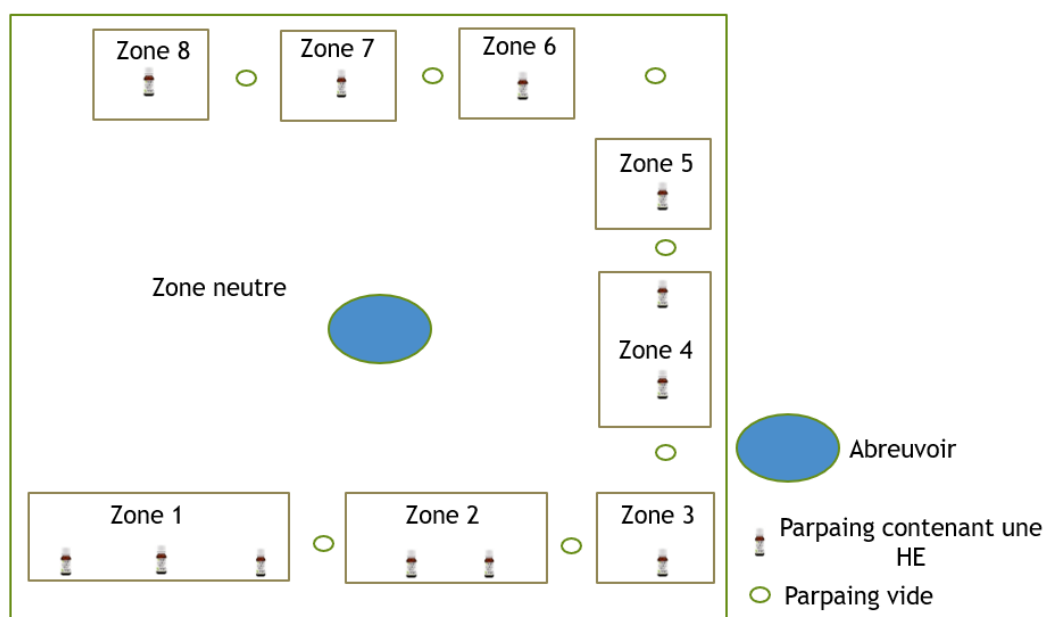


Figure 27 : Répartition spatiale des huiles essentielles (HEs) en zones en fonction de la famille chimique de leur principal composé.

#### 2.4.2. Étape d'habitation

Avant d'entamer le protocole, une phase d'habitation a été entreprise pour familiariser les vaches avec le parcours et les parpaings. L'objectif est d'éviter que ces éléments influencent le comportement étudié ultérieurement. Cette étape consiste à suivre le même protocole, mais sans introduire les douze HEs dans les parpaings. L'étape d'habitation s'est déroulée les jours J-2 et J-1, soit les deux jours précédant le début du protocole principal.

### 2.4.3. Première étape du protocole

À J0, la première étape débute par l'arrivée des vaches sur la parcelle. Les 29 vaches se déplacent à leur rythme le long d'un couloir délimité par un fil de clôture (voir Figure 28). Les HEs ont été déposées dans les parpaings, séparées par des parpaings vides, le long de ce couloir. L'objectif de cette étape était d'amener les vaches à prendre connaissance de toutes les HEs déposées le long de la parcelle, avant d'arriver au centre de la parcelle.

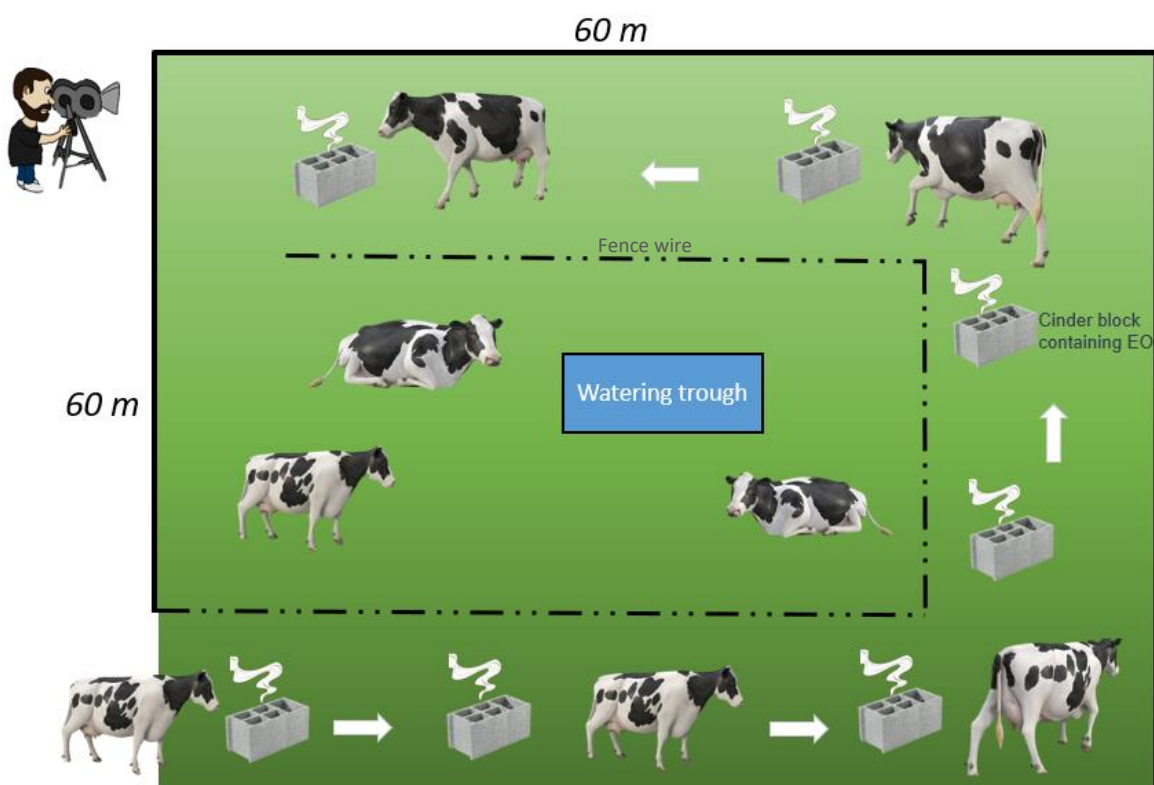


Figure 28 : Schéma de la première étape du protocole.

### 2.4.4. Seconde étape du protocole

Dans cette étape, une fois les vaches au centre de la parcelle, le fil de clôture est retiré de la parcelle (Figure 29). Les comportements des vaches ont été observés à partir de ce moment-là en utilisant la méthode du « scan samplings ». Un balayage (consistant à noter la position debout/couchée, l'activité et la localisation de chaque animal) a été effectué par trois observateurs toutes les 2 à 5 minutes. Les observateurs étaient positionnés en hauteur dans des postes d'observation pour repérer aisément tous les animaux. Cette étape a duré 2 heures.

Le jour suivant (J1), le même protocole a été exécuté tout en ajustant les positions des HEs conformément aux explications fournies dans la section « *Parcelle et HEs* ».

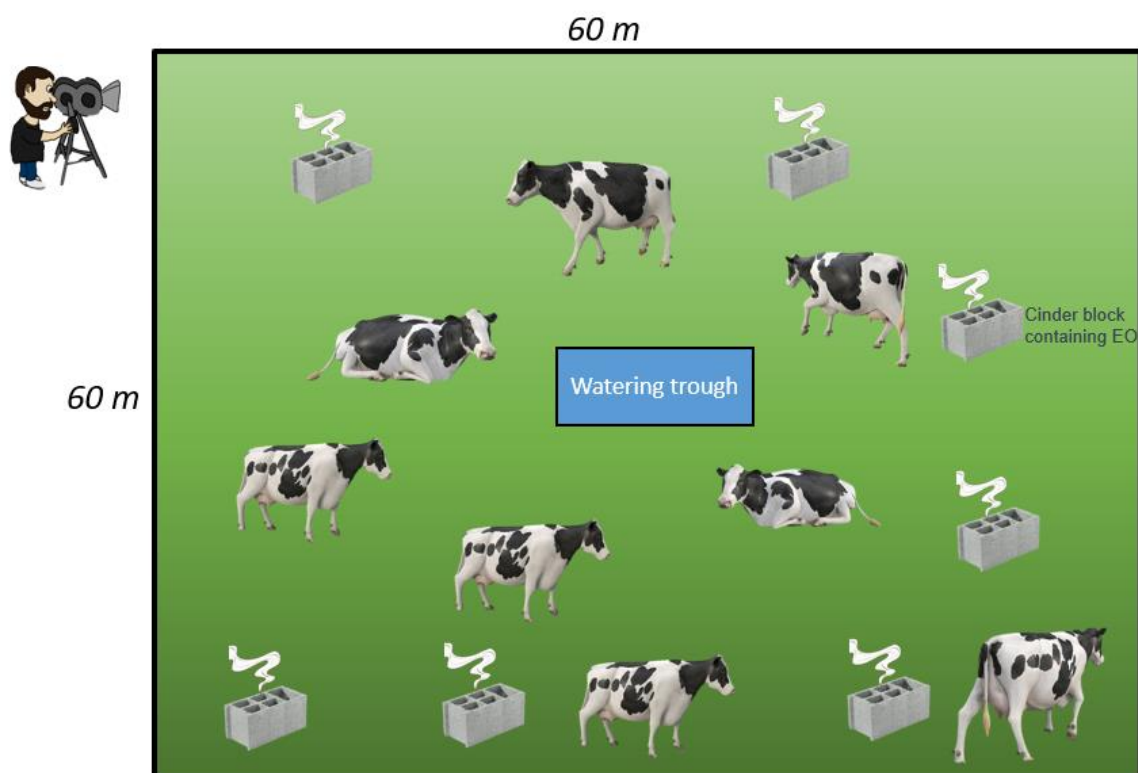


Figure 29 : Schéma de la seconde étape du protocole.

## 2.5. Prélèvement et mesures

Le lait a été collecté trois fois de manière aseptique pour l'analyse bactériologique du lait : 7 jours avant le début de l'expérimentation, à J0 de l'expérimentation avant le début du protocole et 21 jours après la fin de l'expérimentation (désignés ci-après par J-7, J0 et J22). Ces prélèvements ont été réalisés avant la traite matinale à la ferme, après l'élimination des trois premiers jets de lait, les trayons ont été désinfectés à l'aide d'alcool à 70 % (Wattenburger, Schmidt, Placheta, Middleton, & Adkins, 2020). Les analyses bactériologiques du lait sont détaillées dans la partie matériel et méthodes de l'article "The effects of *Thymus capitatus* essential oil topical application on milk quality: a systems biology approach" évoqué dans le chapitre 1. Pour le CCS sur l'ensemble du lait, quatre analyses ont été réalisées avant le début de l'expérimentation et sept autres après cette dernière. Nous avons réalisé d'autres analyses de CCS, cette fois par quartier (quatre prélèvements avant J0 et deux après l'expérimentation). Enfin, des prélèvements sanguins ont été effectués à J-1 et à J1 (à la fin de

l'expérimentation) pour le dosage du cortisol sanguin (dosage par radioimmunosoréage (RIA - détection isotopique)).

### 3. Résultats préliminaires et discussions

Dans cette partie, nous présentons les résultats de cette expérimentation en deux volets : le premier sur les comportements des vaches laitières et le second sur l'inflammation de la glande mammaire et le cortisol sanguin.

#### 3.1. Étude de comportements

##### *3.1.1. Analyse comparative de l'intérêt des vaches envers les HEs*

Concernant l'analyse des vidéos, une description minutieuse a été élaborée pour chaque vache, couvrant les deux jours d'expérimentation. Cette description détaillée des vidéos a ensuite permis de réviser les données des balayages réalisés par les observateurs durant l'expérimentation. L'analyse des vidéos a été réalisée par Cléa Michelet, stagiaire en master pendant cinq mois auprès de notre équipe.

À la suite de ces analyses, il est ressorti que les vaches atteintes de mammites (VM) montrent une tendance plus marquée à s'approcher des HEs pour les sentir par rapport aux vaches saines (VS) comme l'illustre le Tableau 10. En effet, 74 % des vaches atteintes de mammites ont au moins senti une HE, tandis que seulement 40 % des vaches saines ont montré une réaction à au moins une HE. Néanmoins, les résultats ne sont pas significatifs (test de Fisher avec  $p = 0.05$ ).

La Figure 30 met en évidence que le groupe VM a consacré en moyenne deux fois plus de temps que le groupe VS à explorer et sentir une ou plusieurs HEs avec une variabilité très importante au sein de chaque groupe. Toutefois, il est important de noter que malgré ces observations, les résultats n'ont pas révélé de différence statistiquement significative entre les groupes (test de Wilcoxon avec  $p = 0.05$ ). Il est intéressant de souligner qu'aucune corrélation n'a été établie entre l'ordre hiérarchique des vaches laitières et leur intérêt à sentir les HEs.

Tableau 10 : Pourcentage de vaches ayant inhalé au moins une HE dans les deux groupes : vaches atteintes de mammites (VM) et vaches saines (VS).

Comportement	Groupe VM	Groupe VS
Vaches qui ont senti au moins une HE à J0	58%	30%
Vaches qui ont senti au moins une HE à J1	42%	40%
Vaches qui ont senti au moins une HE à J0 et J1	74%	40%

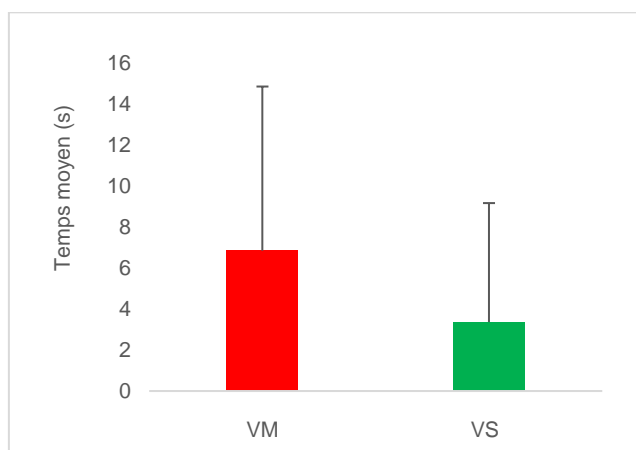


Figure 30 : Temps moyen consacré par chaque groupe de vaches à inhaler une ou plusieurs HEs. Vaches atteintes de mammites (VM) et vaches saines (VS).

### 3.1.2. Étude de répétabilité

Dans cette étude, nous voulions explorer l'hypothèse de l'attractivité des vaches envers les mêmes HEs sur 2 jours consécutifs (entre J0 et J1). Pour cela et afin de garantir que cette répétition soit liée à la nature des HEs et non leur positionnement dans la zone d'expérimentation, nous avons répété la manipulation en modifiant les positions des HEs à J1.

Les résultats ont montré que parmi les vaches qui se sont rapprochées des HEs à J0, aucune d'entre elles ne s'est approchée de la même HE lors du deuxième jour. Cela suggère une absence de préférence particulière pour une HE au cours de cette expérimentation.

### 3.1.3. Les huiles essentielles et leurs familles chimiques

La Figure 31 présente les pourcentages de vaches laitières qui ont senti chacune des 8 familles chimiques exposées dans la parcelle au cours des deux jours consécutifs d'expérimentation. Nous observons que les VM n'ont jamais manifesté d'attrait envers les cétones (*Artemisia herba alba*), tandis que les VS n'ont jamais montré d'intérêt ni pour les monoterpènes (*Rosmarinus officinalis verbenone* et *Pinus ponderosa*), ni pour les monoterpénols (*Coriandrum sativum* et *Pelargonium graveolens*). Ces résultats suggèrent qu'en fonction de l'état de santé de l'animal nous avons observé une préférence des animaux envers différentes familles chimiques d'HEs. Cependant, il est important de noter que cette hypothèse mérite d'être réexaminée et approfondie.

Il est également intéressant de noter qu'indépendamment de leur état de santé, aucune des vaches ne s'est approchée des HEs de *Coriandrum sativum* et de *Laurus nobilis*.

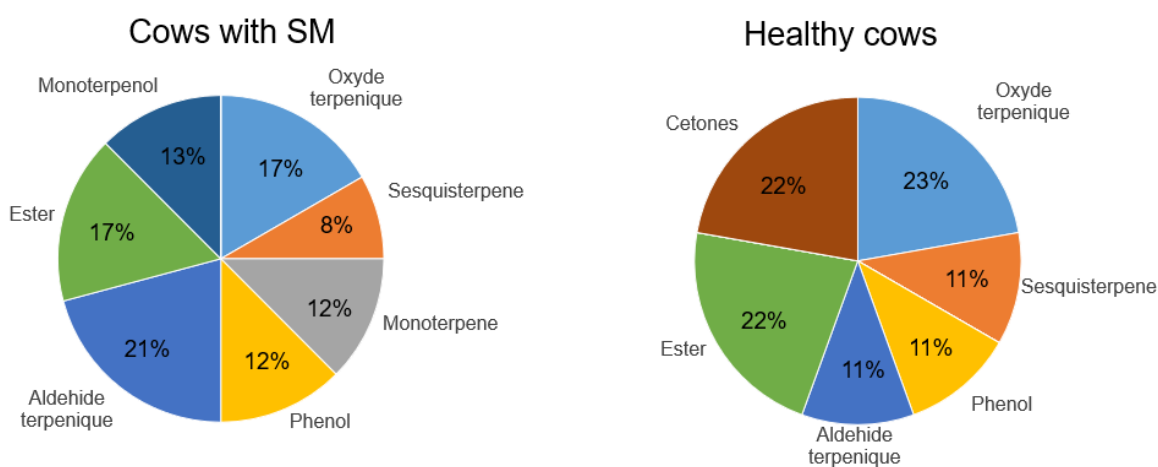


Figure 31 : Répartition des familles chimiques d'huiles essentielles senties par les deux groupes de vaches.

### 3.2. Étude physiologique

#### 3.2.1. Évolution du cortisol sanguin

Contrairement à nos attentes, les résultats ont montré une augmentation du niveau de cortisol plasmatique chez l'ensemble des vaches y compris celles qui ne se sont pas approchées des HEs au cours de ces deux jours (cf Figure 32) (test de Wilcoxon,  $p = 0.05$ ). Parmi les explications potentielles, nous envisageons notamment l'implication de facteurs extérieurs à cette étude. L'expérimentation se déroulant à l'extérieur, d'autres facteurs auraient pu interférer et provoquer cette élévation (bruit de tracteur, passages fréquents ; etc.). Nous supposons aussi qu'une forte concentration des HEs aurait provoqué une modification du cortisol sanguin comme cela a été démontrée dans l'étude menée sur le gibbon lar et le lémur à col roux, qui ont présenté une augmentation de leur taux de cortisol suite à un enrichissement du milieu avec des HEs (Vaglio et al., 2021). Des dosages de cortisol au niveau du poil et/ou du lait auraient été plus adéquats pour savoir si l'exposition aux HEs induisait ou pas une situation de stress chronique chez les animaux.

Ces résultats suggèrent que l'effet des HEs sur le taux de cortisol peut être complexe et que des facteurs externes pourraient également jouer un rôle dans les variations observées. Une analyse plus approfondie est nécessaire pour déterminer la cause précise de cette augmentation de cortisol et son lien éventuel avec les HEs.

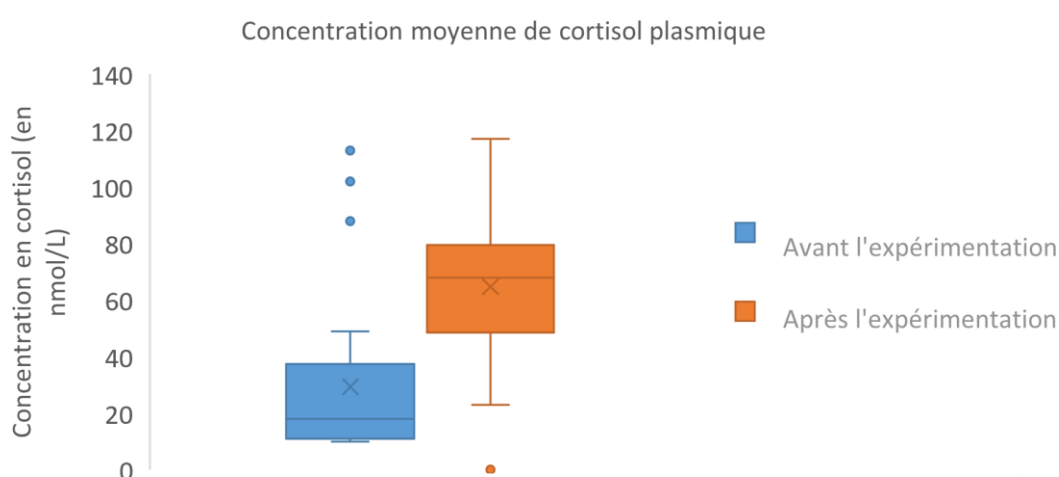


Figure 32 : Évolution du taux de cortisol sanguin moyen des 29 vaches laitières avant et après l'expérimentation.



### 3.2.2. Évolution de CCS et de la bactériologie dans le lait

Nous n'avons détecté aucune différence significative (t test,  $p=0.05$ ) ni sur l'évolution de CCS comme la montre la Figure 33, ni la bactériologie du lait (Annexe 18).

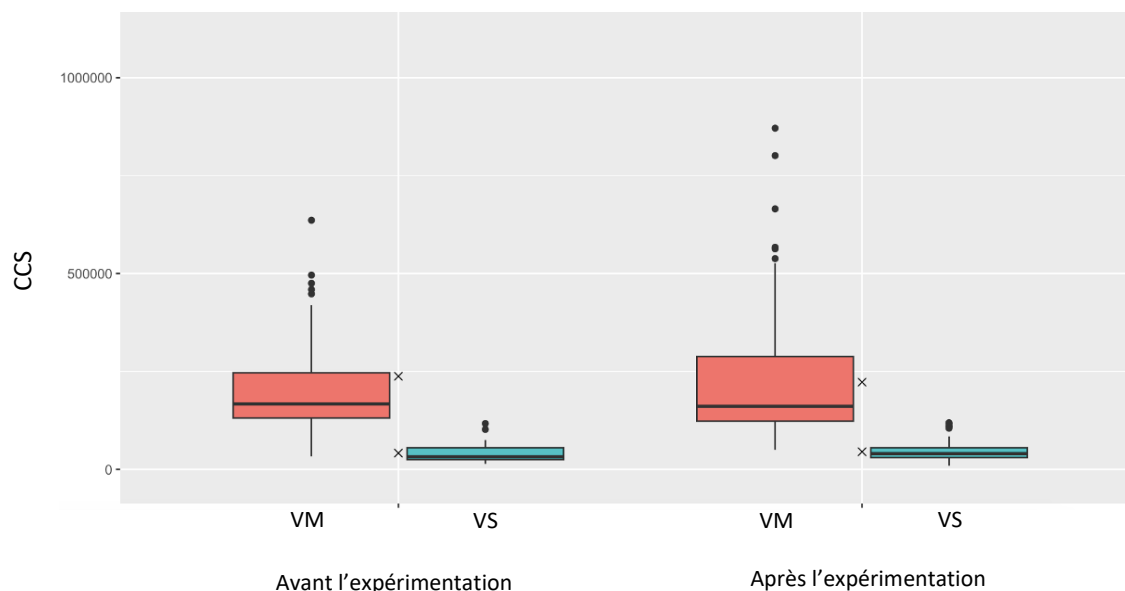


Figure 33 : Boxplot de l'évolution de nombre de cellules somatiques (CCS) dans le lait en fonction de la période de prélèvement chez les vaches atteintes de mammites subcliniques (VM) et les vaches saines (VS).

## 4. Conclusion

Cette étude préliminaire a montré une différence de comportement entre les VS et VM en réponse à une exposition à un panel de douze HEs fortement utilisées par les éleveurs pour traiter les mammites subcliniques. Les VM semblaient préférer sentir les HEs et les apprécier davantage (temps de l'olfaction) que les VS. À ce stade, il n'existe aucune relation de cause à effet entre l'exposition aux HEs et le niveau de cortisol observé dans le troupeau. D'autres études sont nécessaires pour déterminer les causes de cette augmentation. De plus, aucun effet n'a été observé sur la guérison des VM.

Il serait intéressant de reproduire l'expérience en prolongeant la durée d'exposition des vaches laitières aux HEs, en diminuant le nombre d'HEs auxquelles les vaches sont exposées et en utilisant des méthodes basées sur l'utilisation de capteurs de volatils spécialement conçus pour détecter et mesurer les composés volatils présents dans l'air. Cela permettrait ainsi d'affiner notre étude (analyse du diamètre de diffusion des HEs et vérification de la préférence des vaches pour ces HEs).

### Annexe 7 : *Laurus nobilis*

Fournisseur : Herbes et traditions

Désignation	Laurier noble bio
Référence	2315
Nom botanique	<i>Laurus nobilis</i>
Pays d'origine	Balkans
Partie de la plante	Feuilles
Mode d'obtention	Distillation à la vapeur d'eau
Lot	B22C_B24D

#### Qualité

Propriétés organoleptiques	Résultat
Aspect	Liquide mobile
Couleur	Incolore à jaune
Odeur	Caractéristique, camphrée

Propriétés physico-chimiques à 25°C	Résultat
Densité	0,9097
Indice de réfraction	1,463
Pouvoir rotatoire	-15,3°

#### Principaux composés – chromatographie phase gazeuse

Composés	Teneur (%)
1,8-cinéol	50,70
Terpenyl acétate	9,08
Sabinène	7,09
$\alpha$ -pinène	5,61
$\beta$ -pinène	4,30
Terpinène-4-ol	3,25
$p$ -cymène	1,91
Limonène	1,64
$\alpha$ -terpinéol	1,54
$\gamma$ -terpinène	1,23
Linalol	1,04
<b>Total</b>	<b>87,39</b>

## Annexe 8 : *Cinnamosma fragrans*

Fournisseur : Herbes et traditions

Désignation	Saro bio
Référence	3260
Nom botanique	<i>Cinnamosma fragrans</i> Baillon
Pays d'origine	Madagascar
Partie de la plante	Feuilles
Mode d'obtention	Distillation à la vapeur d'eau
Lot	B36D_B37E

### Qualité

Propriétés organoleptiques	Résultat
Aspect	Liquide limpide
Couleur	Jaune très pâle
Odeur	Aromatique, montante, caractéristique

Propriétés physico-chimiques à 25°C	Résultat
Densité	0,8835
Indice de réfraction	1,466
Pouvoir rotatoire	+13°

### Principaux composés – chromatographie phase gazeuse

Composés	Teneur (%)
Cinéol 1,8 (Eucalyptol)	35,93
D-limonène	13,68
Linalol	7,06
β-pinène	6,75
Sabinène	4,97
α-pinène	4,46
β-caryophyllène	3,19
Terpinène-4-ol	2,97
β-myrcène	2,95
γ-terpinène	2,23
α-terpinéol	1,75
Acétate de terpényle	1,65
Cis-β-ocimène	1,42
α-terpinène	1,35
α-humulène	1,33
<b>Total</b>	<b>91,69</b>

### Annexe 9 : *Rosmarinus officinalis*

Fournisseur : Center of Biotechnology of Borj Cedria (LPAM)

#### Principaux composés – chromatographie phase gazeuse

N°	Compound	% of total volatiles
1	Tricyclene	0.19 ± 0.01
2	α-thujene	0.31 ± 0.02
3	α-pinene	12.77 ± 0.56
4	Camphene	5.00 ± 0.20
5	β-pinene	7.17 ± 0.09
6	β-myrcene	1.03 ± 0.03
7	δ-3-carene	0.18 ± 0.01
8	α-terpinene	0.22 ± 0.01
9	p-cymene	2.20 ± 0.06
10	D-limonene	2.21 ± 0.03
11	1,8-cineole	46.37 ± 0.79
12	γ-terpinene	0.37 ± 0.03
13	α-terpinolene	0.22 ± 0.01
14	Linalool	0.69 ± 0.06
15	Camphor	9.97 ± 0.14
16	Borneol	2.94 ± 0.06
17	Terpineol	0.86 ± 0.04
18	α-Terpineol	1.91 ± 0.05
19	Bornyl acetate	0.67 ± 0.03
20	α-copaene	0.27 ± 0.01
21	Caryophyllene	3.23 ± 0.09
	<b>Total</b>	<b>99.78%</b>

Annexe 10 : *Zingiber officinalis*

Fournisseur : Herbes et traditions

Désignation	Gingembre bio
Référence	2130
Nom botanique	<i>Zingiber officinalis</i>
Pays d'origine	Madagascar
Partie de la plante	Rhizome
Mode d'obtention	Entraînement à la vapeur d'eau
Lot	A40B_A44C_A48E2_B16A_B17 A

## Qualité

Propriétés organoleptiques	Résultat
Aspect	Liquide mobile limpide
Couleur	Jaune pâle à jaune ambré
Odeur	Caractéristique, épicée, poivrée, citronnée

Propriétés physico-chimiques à 25°C	Résultat
Densité	0,880
Indice de réfraction	1,4888
Pouvoir rotatoire	-27,15°

## Principaux composés – chromatographie phase gazeuse

Composés	Teneur (%)
$\alpha$ -Zingibérène	28,81
$\beta$ -sesquiphellandrène	10,38
Camphène	7,97
1,8-cinéole + $\beta$ -phellandrène	7,37
Géranial	5,14
E,E- $\alpha$ -farnésène	5,08
$\beta$ -Bisabolène	4,04
$\alpha$ -curcumène	3,85
$\alpha$ -Pinène	2,73
Néral	2,57
Germacrène D	1,46
Limonène	1,45
$\gamma$ -Muuroolène	1,18
Bornéol	1,11
$\beta$ -Myrcène	1,06
<b>Total</b>	<b>84,20</b>

Annexe 11 : *Rosmarinus officinalis*

Fournisseur : Herbes et traditions

Désignation	Romarin à verbénone bio
Référence	3155
Nom botanique	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.
Pays d'origine	Afrique du Sud
Partie de la plante	Sommités fleuries
Mode d'obtention	Distillation à la vapeur directe
Lot	B07A_B36A

## Qualité

Propriétés organoleptiques	Résultat
Aspect	Liquide
Couleur	Jaune
Odeur	Fraîche et typique

Propriétés physico-chimiques à 25°C	Résultat
Densité	0,8949
Indice de réfraction	1,472
Pouvoir rotatoire	+24,8°

## Principaux composés - chromatographie phase gazeuse

Composés	Teneur (%)
$\alpha$ -pinène	38,77
Acétate de bornyle	9,35
Camphène	6,76
Verbénone	5,70
1.8 cinéole + $\beta$ -phellandrène	5,08
Limonène	4,45
Camphre	4,41
Bornéol	4,29
p-cymène	2,14
Linalol	2,07
Géraniol	1,96
Pinadiène	1,46
$\beta$ -myrcène	1,28
$\beta$ -pinène	1,01
<b>Total</b>	<b>88,73</b>

Annexe 12 : *Pinus ponderosa*

Fournisseur : Herbes et traditions

Désignation	Pin de Patagonie
Référence	3035
Nom botanique	<i>Pinus ponderosa</i>
Pays d'origine	Argentine
Mode d'obtention	Distillation à la vapeur d'eau et à basse pression
Lot	Z30D_A10B6_A14C_A23E2_A26C_A48A2_B01E_B02B

## Qualité

Propriétés physico-chimiques	Résultat
Densité	0,8923
Indice de réfraction	1,485

## Principaux composés – chromatographie phase gazeuse

Composés	Teneur (%)
$\beta$ -pinène	38,92
Méthyl chavicol (estragol)	24,98
$\delta$ -3 carène	14,63
$\alpha$ -pinène	8,86
Limonène	2,08
$\beta$ -myrcène	1,38
<b>Total</b>	<b>90,85</b>

### Annexe 13 : *Eucalyptus citriodora*

Fournisseur : Herbes et traditions

Désignation	Eucalyptus citronné bio
Référence	1801
Nom botanique	Eucalyptus citriodora
Pays d'origine	Madagascar
Partie de la plante	Feuille
Mode d'obtention	Entraînement à la vapeur d'eau
Lot	B24D_B26A_B33A

#### Qualité

Propriétés organoleptiques	Résultat
Aspect	Liquide
Couleur	Incolore à jaune pâle
Odeur	Citronnée, piquante, zestée

Propriétés physico-chimiques à 25°C	Résultat
Densité	0,8723
Indice de réfraction	1,455
Pouvoir rotatoire	1,5°

#### Principaux composés - chromatographie phase gazeuse

Composés	Teneur (%)
Citronellal	64,71
Isopulégol	8,67
Citronellol	7,24
Néo-isopulégol	4,50
β-caryophyllène	1,42
<b>Total</b>	<b>86,54</b>



Annexe 14 : *Lavandula angustifolia*

Fournisseur : Herbes et traditions

Désignation	Lavande fine bio
Référence	2320
Nom botanique	<i>Lavandula angustifolia</i>
Pays d'origine	France
Partie de la plante	Sommité fleurie
Mode d'obtention	Entraînement à la vapeur d'eau
Lot	B34A

## Qualité

Propriétés organoleptiques	Résultat
Aspect	Liquide limpide
Couleur	Jaune clair
Odeur	Caractéristique, lavandée, très légèrement camphrée

Propriétés physico-chimiques à 25°C	Résultat
Densité	0,8857
Indice de réfraction	1,461
Pouvoir rotatoire	-8°

## Principaux composés - chromatographie phase gazeuse

Composés	Teneur (%)
Acétate de linalyle	35,91
Linalol	27,64
Terpinène-4-ol	5,28
<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimène	3,64
Acétate de lavandulyle	3,59
<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimène	3,08
Trans- $\beta$ -farnésène	1,80
Acétate de 1-octen-3-yle	1,44
Lavandulol	0,97
1,8-cinéole	0,67
$\alpha$ -terpinéol	0,37
Camphre	0,25
Limonène	0,23
$\beta$ -phellandrène	0,09
<b>Total</b>	<b>84,96</b>

### Annexe 15 : *Coriandrum sativum*

Fournisseur : Center of Biotechnology of Borj Cedria (LPAM)

#### Principaux composés – chromatographie phase gazeuse

N°	Compound	% of total volatiles
1	$\alpha$ -pinene	7.26 $\pm$ 0.22
2	Camphene	1.23 $\pm$ 0.07
3	Sabinene	0.29 $\pm$ 0.01
4	$\beta$ -pinene	0.48 $\pm$ 0.03
5	$\beta$ -myrcene	0.63 $\pm$ 0.05
6	o-cymene	5.91 $\pm$ 0.15
7	D-Limonene	3.02 $\pm$ 0.09
8	$\gamma$ -terpinene	2.94 $\pm$ 0.09
9	Linalool oxide	3.53 $\pm$ 0.12
10	Linalool	64.10 $\pm$ 0.68
11	Camphor	5.50 $\pm$ 0.12
12	Terpenediol	0.37 $\pm$ 0.03
13	$\alpha$ -terpineol	0.62 $\pm$ 0.05
14	Geraniol	0.78 $\pm$ 0.06
15	Geranyl acetate	3.35 $\pm$ 0.10
	<b>Total</b>	<b>100</b>

### Annexe 16 : *Pelargonium graveolens*

Fournisseur : Center of Biotechnology of Borj Cedria (LPAM)

Principaux composés – chromatographie phase gazeuse

N°	Compound	% of total volatiles
1	$\alpha$ -pinene	0.63 $\pm$ 0.03
2	Linalool	4.59 $\pm$ 0.08
3	Rose Oxide	1.31 $\pm$ 0.05
4	Non identified	0.55 $\pm$ 0.02
5	Non identified	2.29 $\pm$ 0.06
6	Menthone	5.67 $\pm$ 0.092
7	$\beta$ -citronellol	36.88 $\pm$ 0.45
8	Geraniol	15.02 $\pm$ 0.16
9	$\alpha$ -citral	0.6 $\pm$ 0.02
10	Citronellyl formate	8.74 $\pm$ 0.10
11	Geraniol formate	3.22 $\pm$ 0.07
12	$\alpha$ -cubebene	0.61 $\pm$ 0.02
13	$\alpha$ -copaene	0.64 $\pm$ 0.03
14	$\beta$ -bourbonene	1.64 $\pm$ 0.06
15	Caryophyllene	1.65 $\pm$ 0.06
16	Geranyl acetate	0.74 $\pm$ 0.03
17	Germacrene-D	1.53 $\pm$ 0.06
18	$\delta$ -cadinene	2.25 $\pm$ 0.06
19	Butanoic acid	1.00 $\pm$ 0.05
20	Phenyl Tiglate 2	1.40 $\pm$ 0.06
21	8-epi- $\gamma$ -eudesmol	6.40 $\pm$ 0.09
22	Indene	1.18 $\pm$ 0.06
23	Geranyl tiglate	1.39 $\pm$ 0.05
	<b>Total</b>	<b>99.93</b>

### Annexe 17 : *Artemisia herba alba*

Fournisseur : Center of Biotechnology of Borj Cedria (LPAM)

#### Principaux composés – chromatographie phase gazeuse

N°	Compound	% of total volatiles
1	Camphene	1.38 ± 0.06
2	<i>p</i> -Cymene	0.89 ± 0.03
3	1,8-Cineole	5.69 ± 0.11
4	Filifolone	1.97 ± 0.07
5	β-thujone	38.27 ± 0.53
6	α-Thujone	11.58 ± 0.17
7	1-terpineol	0.67 ± 0.02
8	Chrysanthenone	6.76 ± 0.10
9	<i>Trans</i> -Verbenol	1.77 ± 0.05
10	Camphor	11.88 ± 0.20
11	<i>Trans</i> -1,2-Dihydroperillaldehyde	0.73 ± 0.08
12	Pinocarvone	0.71 ± 0.04
13	endo-Borneol	2.07 ± 0.06
14	4-Terpineol	0.75 ± 0.03
15	Piperitone	0.60 ± 0.01
16	Bornyl acetate	5.08 ± 0.09
17	Sabinyol acetate	7.24 ± 0.10
18	Germacrene-D	0.90 ± 0.03
19	Bicyclogermacrene	0.64 ± 0.01
	<b>Total</b>	<b>99.58</b>

## Annexe 18 : L'analyse bactériologique du lait issue des quartiers atteints de mammites subcliniques

ARG : Arrière gauche, AVG : Avant gauche, AVD : Avant droite, ARD : Arrière droite, SCN : *staphylococcus* coagulase négatif

N°Vache	Trayon	J0 rep 1		J0 rep 2		J21	
		Dénombrement	Identification	Dénombrement	Identification	Dénombrement	Identification
5210	AVD	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	>300	<i>Bacillus spp</i>
	AVG	> 100	SCN SCN SCN	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	>300	<i>Bacillus spp</i>
	ARD	4	SCN	56	<i>Bacillus spp</i>	19	<i>Bacillus spp</i>
	ARG	NA	<i>Bacillus spp</i>	10	<i>Bacillus spp</i>	4	SCN
5291	AVD	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	>100	<i>Bacillus spp</i>	5	<i>Bacillus spp</i>
6203	AVD	224	SCN	112	SCN	17	SCN
	AVG	228	SCN	>300	SCN	39	SCN
6212	AVG	13	SCN	30	SCN	42	SCN
	ARD	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	41	<i>Bacillus spp</i>	25	<i>Bacillus spp</i>
	ARG	37	SCN	>300	SCN	240	SCN
6232	AVD	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	78	SCN
	AVG	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	>200	<i>Bacillus spp</i>
	ARG	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	>300	<i>Bacillus spp</i>
6240	AVD	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	5 >300	SCN <i>Bacillus spp</i>
	AVG	Tapis	<i>Bacillus spp</i> Non entérobactérie	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	6 >300	SCN <i>Bacillus spp</i>
	ARD	> 100 10	SCN Entérobactérie	Tapis	SCN	>300	SCN
	ARG	Tapis	SCN	Tapis	SCN	Tapis	SCN <i>Bacillus spp</i>
6248	AVD	Tapis	<i>Streptococcus uberis</i>	Tapis	SCN	Tapis	SCN
	AVG	Tapis	<i>Streptococcus</i> SCN	Tapis	SCN	Tapis	SCN
	ARD	Tapis	SCN	Tapis	<i>Streptococcus uberis</i>	Tapis	<i>Streptococcus uberis</i>
	ARG	> 400	<i>Streptococcus uberis</i>	Tapis	SCN	Tapis	SCN
6253	AVD	> 100	SCN	163	SCN	53	SCN
	AVG	> 100	SCN	>300	SCN	>300	SCN
	ARD	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	>100	SCN <i>Bacillus spp</i>	94	<i>Bacillus spp</i>
	ARG	> 100	SCN	>300	SCN	Tapis	SCN
7243	AVD	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	8	SCN	51	<i>Bacillus spp</i>
	AVG	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	4	SCN	>100	<i>Bacillus spp</i>

## Liste des annexes

	ARD	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	>300	<i>Bacillus spp</i>	>200	<i>Bacillus spp</i>
	ARG	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	91	SCN	Tapis	SCN
8316	AVG	> 400	SCN	>300	SCN	>300	SCN
	ARD	Tapis	SCN	>300	SCN	>300	SCN
	ARG	Tapis	SCN	>300	SCN	Tapis	SCN
8317	AVG	> 400	SCN	>300	SCN	>300	SCN
8325	ARD	5	SCN	Stérile	/	Stérile	/
8330	AVD	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	>200	<i>Bacillus spp</i>
	AVG	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	>300	<i>Bacillus spp</i>	>200	<i>Bacillus spp</i>
	ARD	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	>300	<i>Bacillus spp</i>	>300	<i>Bacillus spp</i>
	ARG	NA	<i>Bacillus spp</i>	Stérile	/	Stérile	/
8335	AVD	1	<i>Bacillus spp</i>	74	SCN	Stérile	/
	AVG	Tapis	SCN	>300	<i>Bacillus spp</i>	Tapis	<i>Bacillus spp</i>
8358	ARG	3	SCN	Stérile	/	Stérile	/
8367	AVG	16 1	SCN SCN	Stérile	/	Polycontaminé	/
	ARG	88 2	SCN Non entérobactérie	>300	SCN	Stérile	/
9209	AVG	9 Tapis	SCN <i>Bacillus spp</i>	>300	<i>Bacillus spp</i>	>200	<i>Bacillus spp</i>
	ARD	NA	SCN	15	<i>Bacillus spp</i>	Stérile	/
9217	ARG	10 Tapis	SCN Entérobactérie	Stérile	/	39	SCN
9229	ARD	176	SCN	>300	SCN	>300	SCN
9249	AVG	39 1	SCN SCN	Stérile	/	Stérile	/
	ARD	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	107	<i>Bacillus spp</i>	147	<i>Bacillus spp</i>
	ARG	1	<i>Bacillus spp</i>	>300	<i>Bacillus spp</i>	Stérile	
9254	AVG	132	SCN	144	SCN	>300	SCN
	ARG	> 100	SCN	>300	SCN	>300	SCN
9260	ARG	4	SCN	Stérile	/	Stérile	/
9264	ARD	> 100	SCN	Stérile	/	Stérile	/
9272	AVD	1	Entérobactérie	6	<i>Bacillus spp</i>	Tapis	SCN
	AVG	Tapis	SCN	Tapis	SCN	Tapis	SCN
	ARD	> 100	SCN	>300	SCN	>300	SCN
	ARG	4 Tapis	SCN <i>Bacillus spp</i>	Tapis	<i>Bacillus spp</i>	>300	SCN



## Références bibliographiques





## Références bibliographiques

- Abboud, M., El Rammouz, R., Jammal, B., & Sleiman, M. (2015). In Vito and In Vivo Antimicrobial Activity of Two Essential Oils Thymus Vulgaris and Lavendula Angustifolia against Bovine Staphylococcus and Streptococcus Mastitis Pathogen. *4*, 975-983.
- Abuhamdah, S., Huang, L., Elliott, M. S. J., Howes, M.-J. R., Ballard, C., Holmes, C., . . . Chazot, P. L. (2010). Pharmacological profile of an essential oil derived from Melissa officinalis with anti-agitation properties: focus on ligand-gated channels. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *60*(3), 377-384. doi:10.1211/jpp.60.3.0014
- Addis, M. F., Tanca, A., Uzzau, S., Oikonomou, G., Bicalho, R. C., & Moroni, P. (2016). The bovine milk microbiota: insights and perspectives from -omics studies. *Molecular BioSystems*, *12*(8), 2359-2372. doi:10.1039/C6MB00217J
- Aiemsaaard, J., Aiumlamai, S., Aromdee, C., Taweethaisupapong, S., & Khunkitti, W. (2011). The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on Staphylococcus aureus DMST 4745. *Research in Veterinary Science*, *91*(3), e31-e37. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.01.012>
- Ameni, G., Bayissa, B., Zewude, A., Degefa, B. A., Mohteshamuddin, K., Kalaiah, G., . . . Tibbo, M. (2022). Retrospective study on bovine clinical mastitis and associated milk loss during the month of its peak occurrence at the National Dairy Farm in the Emirate of Abu Dhabi, United Arab Emirates. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*. doi:10.3389/fvets.2022.1070051
- Anema, S. G., & de Kruif, C. G. (2014). Complex coacervates of lactotransferrin and  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, *430*, 214-220. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.05.036>
- Anses. (2021). *Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2020. Rapport annuel. Anses-ANMV*, 89 p. . Retrieved from
- Barbiroli, A., Iametti, S., & Bonomi, F. (2022). Beta-Lactoglobulin as a Model Food Protein: How to Promote, Prevent, and Exploit Its Unfolding Processes. *Molecules*, *27*(3), 1131. doi:10.3390/molecules27031131
- Batubara, I. I., Assaat, L. D., Irawadi, T. T., Mitsunaga, T., & Yamauchi, K. (2014). *EFFECT OF SNIFFING OF KENCUR (KAEMFERIA GALANGAL) ESSENTIAL OILS IN RATS*.
- Bauman, D. E., McGuire, M., & Harvatine, K. (2011). Mammary Gland, Milk Biosynthesis and Secretion: Milk Fat. In (pp. 352-358).
- Becker, F., Spengler, K., Reinicke, F., & Heider-van Diepen, C. (2023). Impact of essential oils on methane emissions, milk yield, and feed efficiency and resulting influence on the carbon footprint of dairy production systems. *Environmental Science and Pollution Research*, *30*(17), 48824-48836. doi:10.1007/s11356-023-26129-8
- Benjemaa, M., Neves, M. A., Falleh, H., Isoda, H., Ksouri, R., & Nakajima, M. (2018). Nanoencapsulation of Thymus capitatus essential oil: Formulation process, physical stability characterization and antibacterial efficiency monitoring. *Industrial Crops and Products*, *113*, 414-421. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.062>
- Benjemaa, M., Rahali, F. Z., Falleh, H., Beji-Seraïri, R., Megdiche-Ksouri, W., Hamrouni, I., . . . Ksouri, R. (2022). Essential Oil Stabilisation by Response Surface Methodology (RSM): Nanoemulsion Formulation, Physicochemical, Microbiological, and Sensory Investigations. *Molecules*, *27*(21), 7330. doi:10.3390/molecules27217330
- Bokkhim, H., Bansal, N., Grøndahl, L., & Bhandari, B. (2013). Physico-chemical properties of different forms of bovine lactoferrin. *Food Chem*, *141*(3), 3007-3013. doi:10.1016/j.foodchem.2013.05.139

- Bouhallab, S., & Croguennec, T. (2014). Spontaneous Assembly and Induced Aggregation of Food Proteins. In M. Müller (Ed.), *Polyelectrolyte Complexes in the Dispersed and Solid State II: Application Aspects* (pp. 67-101). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M. G., Faleiro, L., Rejeb, M. N., Neffati, M., . . . Pedro, L. G. (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chemistry*, 105(1), 146-155. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.059>
- Bruno, D. R. (2010). *Mastitis, Mammary Gland Immunity, and Nutrition*.
- Cacciatore, F. A., Maders, C., Alexandre, B., Barreto Pinilla, C. M., Brandelli, A., & da Silva Malheiros, P. (2022). Carvacrol encapsulation into nanoparticles produced from chia and flaxseed mucilage: Characterization, stability and antimicrobial activity against *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 108, 104116. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104116>
- Caneschi, A., Bardhi, A., Barbarossa, A., & Zaghini, A. (2023). Plant Essential Oils as a Tool in the Control of Bovine Mastitis: An Update. *Molecules*, 28(8), 3425. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/8/3425>
- Cha, E., Bar, D., Hertl, J. A., Tauer, L. W., Bennett, G., González, R. N., . . . Gröhn, Y. T. (2011). The cost and management of different types of clinical mastitis in dairy cows estimated by dynamic programming. *Journal of Dairy Science*, 94(9), 4476-4487. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2010-4123>
- Chapeau, A. L., Miranda-Tavares, G., Hamon, P., Croguennec, T., Bouhallab, S., & Poncelet, D. (2015, 2015-09-02). *Spontaneous co-assembly of proteins for encapsulation of a hydrophilic vitamin*.
- Charton, C. (2017). *Caractérisation de l'adaptation de la glande mammaire des vaches laitières à l'allongement de l'intervalle entre traites*. Agrocampus Ouest, Retrieved from <https://theses.hal.science/tel-01661382> (2017NSARB292)
- Chen, K., Zhang, M., Adhikari, B., & Wang, M. (2022). Microencapsulation of Sichuan pepper essential oil in soybean protein isolate-Sichuan pepper seed soluble dietary fiber complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 125, 107421. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107421>
- Chen, K., Zhang, M., Mujumdar, A. S., & Wang, M. (2023). Encapsulation of different spice essential oils in quinoa protein isolate-gum Arabic coacervates for improved stability. *Carbohydrate Polymers*, 300, 120250. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120250>
- Cheng, W. N., & Han, S. G. (2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review. *Asian-Australas J Anim Sci*, 33(11), 1699-1713. doi:10.5713/ajas.20.0156
- Cho, B.-W., Cha, C.-N., Lee, S.-M., Kim, M.-J., Park, J.-Y., Yoo, C.-Y., . . . Lee, H.-J. (2015). Therapeutic effect of oregano essential oil on subclinical bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean J Vet Res*, 55(4), 253-257. doi:10.14405/kjvr.2015.55.4.253
- Cioanca, O., Hritcu, L., Mihasan, M., & Hancianu, M. (2013). Cognitive-enhancing and antioxidant activities of inhaled coriander volatile oil in amyloid  $\beta$ (1-42) rat model of Alzheimer's disease. *Physiology & Behavior*, 120, 193-202. doi:<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.08.006>
- Cioanca, O., Hritcu, L., Mihasan, M., Trifan, A., & Hancianu, M. (2014). Inhalation of coriander volatile oil increased anxiolytic-antidepressant-like behaviors and decreased oxidative status in beta-amyloid (1-42) rat model of Alzheimer's disease. *Physiology & Behavior*, 131, 68-74. doi:<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.04.021>
- Cobirka, M., Tancin, V., & Slama, P. (2020). Epidemiology and Classification of Mastitis. *Animals (Basel)*, 10(12). doi:10.3390/ani10122212
- Colombo, T. (2022). *État des lieux de l'utilisation de la phytothérapie et de l'homéopathie pour le traitement des métrites chez la vache laitière et essai d'un traitement sur le terrain*. Retrieved from <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03856295>
- Corona-Gómez, L., Hernández-Andrade, L., Mendoza-Elvira, S., Suazo, F. M., Ricardo-González, D. I., & Quintanar-Guerrero, D. (2022). In vitro antimicrobial effect of essential tea tree oil(*Melaleuca*

- alternifolia), thymol, and carvacrol on microorganisms isolated from cases of bovine clinical mastitis. *Int J Vet Sci Med*, 10(1), 72-79. doi:10.1080/23144599.2022.2123082
- Corre, C. (2018). *L'utilisation de l'aromathérapie dans les élevages français : état des lieux, efficacité et limites*. Retrieved from Sciences du Vivant [q-bio] (hal-02788515):
- Croguennec, T., Tavares, G. M., & Bouhallab, S. (2017). Heteroprotein complex coacervation: A generic process. *Advances in Colloid and Interface Science*, 239, 115-126. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.06.009>
- De Sousa, D. P., Damasceno, R. O. S., Amorati, R., Elshabrawy, H. A., De Castro, R. D., Bezerra, D. P., . . . Lima, T. C. (2023). Essential Oils: Chemistry and Pharmacological Activities. *Biomolecules*, 13(7), 1144. doi:10.3390/biom13071144
- Derakhshani, H., Fehr, K. B., Sepehri, S., Francoz, D., De Buck, J., Barkema, H. W., . . . Khafipour, E. (2018). Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *Journal of Dairy Science*, 101(12), 10605-10625. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2018-14860>
- Derakhshani, H., Fehr, K. B., Sepehri, S., Francoz, D., De Buck, J., Barkema, H. W., . . . Khafipour, E. (2018). Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *J Dairy Sci*, 101(12), 10605-10625. doi:10.3168/jds.2018-14860
- Devi, N., Sarmah, M., Khatun, B., & Maji, T. K. (2017). Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science*, 239, 136-145. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.05.009>
- El-Jalel, L. F. A., Elkady, W. M., Gonaïd, M. H., & El-Gareeb, K. A. (2018). Difference in chemical composition and antimicrobial activity of *Thymus capitatus* L. essential oil at different altitudes. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 156-160. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fjps.2017.12.004>
- El-Sayed, A., & Kamel, M. (2021). Bovine mastitis prevention and control in the post-antibiotic era. *Tropical Animal Health and Production*, 53(2), 236. doi:10.1007/s11250-021-02680-9
- European Centre for Disease, P., Control, European Food Safety, A., & European Medicines, A. (2021). Third joint inter-agency report on integrated analysis of consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals in the EU/EEA. *EFSA Journal*, 19(6), e06712. doi:<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6712>
- Faraji, M., Nabizadeh, R., Naddafi, K., Pourpak, Z., Alizadeh, Z., Rezaei, S., & Mesdaghina, A. (2018). Cytotoxicity of airborne particulate matter (PM10) from dust storm and inversion conditions assessed by MTT assay. 3, 135-142.
- Farrell, H. M., Jr., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., . . . Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk--sixth revision. *J Dairy Sci*, 87(6), 1641-1674. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6
- Fenton, M. J. (1992). Review: transcriptional and post-transcriptional regulation of interleukin 1 gene expression. *Int J Immunopharmacol*, 14(3), 401-411. doi:10.1016/0192-0561(92)90170-p
- Ferrand, N., Fert, A., Morichon, R., Radošević-Robin, N., Zaoui, M., & Sabbah, M. (2022). WISP2/CCN5 Suppresses Vasculogenic Mimicry through Inhibition of YAP/TAZ Signaling in Breast Cancer Cells. *Cancers*, 14(6), 1487. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/6/1487>
- Garro-Aguilar, Y., Fernández, R., Calero, S., Noskova, E., Gulak, M., De La Fuente, M., . . . Barreda-Gómez, G. (2023). Acute Stress-Induced Changes in the Lipid Composition of Cow's Milk in Healthy and Pathological Animals. *Molecules*, 28(3), 980. doi:10.3390/molecules28030980
- Gaucheron, F. (2011). Milk and dairy products: a unique micronutrient combination. *J Am Coll Nutr*, 30(5 Suppl 1), 400s-409s. doi:10.1080/07315724.2011.10719983
- Ghaffari, S., Torabi-Rahvar, M., Aghayan, S., Jabbarpour, Z., Moradzadeh, K., Omidkhoda, A., & Ahmadbeigi, N. (2021). Optimizing interleukin-2 concentration, seeding density and bead-to-cell ratio of T-cell expansion for adoptive immunotherapy. *BMC Immunology*, 22(1), 43. doi:10.1186/s12865-021-00435-7

- Gholamhosseinpour, A., Hashemi, S. M. B., & Jafarpour, D. (2023). Nanoemulsion of satreja sahendica bornm essential oil: antibacterial and antioxidant activities. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(1), 317-323. doi:10.1007/s11694-022-01615-8
- Goetz, C. (2018). *Caractérisation de molécules antibiofilm produites par des souches de staphylocoques isolées dans des cas de mammite bovine*: Université de Montréal.
- Gonçalves, N. D., Duarte, M. C. T., Prata, A. S., & F. Rodrigues, R. A. (2021). Antimicrobial Activity of Cashew Gum–Gelatin Coacervates as a Food Ingredient. *ACS Agricultural Science & Technology*, 1(6), 597-605. doi:10.1021/acsagascitech.1c00089
- Goulart, D. B., & Mellata, M. (2022). Escherichia coli Mastitis in Dairy Cattle: Etiology, Diagnosis, and Treatment Challenges. *Front Microbiol*, 13, 928346. doi:10.3389/fmicb.2022.928346
- Guénic, M. L., & Coll. (2014). Médecines alternatives en élevage laitier en Bretagne et éléments d'évaluation. Synthèse d'étude. Chambres d'agriculture de Bretagne, 4 pages.
- Guiadeur, M., BALLOT, N., BELLENOT, D., HARDIT, V., SULPICE, P., MARTIN, G., . . . FAURIAT, A. (2020). AROMAM Evaluation en élevage de l'efficacité d'un mélange d'huiles essentielles pour le soin des mammites cliniques chez la vache laitière. *Renc. Rech. Ruminants*, 25 doi:[https://journées3r.fr/IMG/pdf/sante\\_-\\_20201105.pdf](https://journées3r.fr/IMG/pdf/sante_-_20201105.pdf)
- Guinan, J., & Lopez, B. S. (2020). Generating Bovine Monocyte-Derived Dendritic Cells for Experimental and Clinical Applications Using Commercially Available Serum-Free Medium. *Frontiers in Immunology*, 11. doi:10.3389/fimmu.2020.591185
- Guo, Q., Li, S., Du, G., Chen, H., Yan, X., Chang, S., . . . Yuan, Y. (2022). Formulation and characterization of microcapsules encapsulating carvacrol using complex coacervation crosslinked with tannic acid. *LWT*, 165, 113683. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113683>
- Gurpret, K., & Singh, S. K. (2018). Review of Nanoemulsion Formulation and Characterization Techniques. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(5). doi:10.4172/pharmaceutical-sciences.1000422
- Hagnestam-Nielsen, C., Emanuelson, U., Berglund, B., & Strandberg, E. (2009). Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. *Journal of Dairy Science*, 92(7), 3124-3133. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2008-1719>
- Håkansson, A., Trägårdh, C., & Bergenståhl, B. (2009). Dynamic simulation of emulsion formation in a high pressure homogenizer. *Chemical Engineering Science*, 64(12), 2915-2925. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ces.2009.03.034>
- Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., & Hogeveen, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly*, 29(1), 18-31. doi:10.1080/01652176.2007.9695224
- Hellec, F., Manoli, C., & Joybert, M. d. (2021). Alternative Medicines on the Farm: A Study of Dairy Farmers' Experiences in France. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. doi:10.3389/fvets.2021.563957
- Heringstad, B., Klemetsdal, G., & Ruane, J. (2000). Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science*, 64(2), 95-106. doi:[https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(99\)00128-1](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(99)00128-1)
- Hernández-Nava, R., López-Malo, A., Palou, E., Ramírez-Corona, N., & Jiménez-Munguía, M. T. (2020). Encapsulation of oregano essential oil (Origanum vulgare) by complex coacervation between gelatin and chia mucilage and its properties after spray drying. *Food Hydrocolloids*, 109, 106077. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106077>
- Herve, L. (2017). *L'exfoliation des cellules épithéliales mammaires : mécanismes de régulation, rôle dans la détermination du nombre de cellules dans la glande mammaire et influence sur la production laitière*. AGROCAMPUS OUEST, Retrieved from <https://hal.inrae.fr/tel-02787106> (2017NSARB304)
- Hien, L. T. M., & Dao, D. T. A. (2021). Antibacterial Activity of Black Pepper Essential Oil Nanoemulsion Formulated By Emulsion Phase Inversion Method. *Curr Res Nutr Food Sci*, 10(1). doi:<http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.10.1.26>



- Hillerton, J. E. (2020). Whatever happened to mastitis pathogenesis? *Journal of Dairy Research*, 87(3), 273-276. doi:10.1017/S0022029920000746
- Hotta, M., Nakata, R., Katsukawa, M., Hori, K., Takahashi, S., & Inoue, H. (2010). Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPARalpha and gamma and suppresses COX-2 expression. *J Lipid Res*, 51(1), 132-139. doi:10.1194/jlr.M900255-JLR200
- Huijps, K., Lam, T. J. G. M., & Hogeveen, H. (2008). Costs of mastitis: facts and perception. *Journal of Dairy Research*, 75(1), 113-120. doi:10.1017/S0022029907002932
- Hussein, M. M. A., Abd El-Hack, M. E., Mahgoub, S. A., Saadeldin, I. M., & Swelum, A. A. (2019). Effects of clove (*Syzygium aromaticum*) oil on quail growth, carcass traits, blood components, meat quality, and intestinal microbiota. *Poultry Science*, 98(1), 319-329. doi:<https://doi.org/10.3382/ps/pey348>
- Imran, M., Aslam, M., Alsagaby, S. A., Saeed, F., Ahmad, I., Afzaal, M., . . . Islam, S. (2022). Therapeutic application of carvacrol: A comprehensive review. *Food Science & Nutrition*, 10(11), 3544-3561. doi:<https://doi.org/10.1002/fsn3.2994>
- Jadhao, A., & Bhardwaj, A. (2021). An overview of subclinical mastitis in dairy cattle. *Indian Journal of Animal Health, Online*. doi:10.36062/ijah.2021.04521
- Jiang, H., Zhong, S., Schwarz, P., Chen, B., & Rao, J. (2023). Antifungal activity, mycotoxin inhibitory efficacy, and mode of action of hop essential oil nanoemulsion against *Fusarium graminearum*. *Food Chemistry*, 400, 134016. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134016>
- Jovanovic, M., Rooney, M. S., Mertins, P., Przybylski, D., Chevrier, N., Satija, R., . . . Regev, A. (2015). Immunogenetics. Dynamic profiling of the protein life cycle in response to pathogens. *Science*, 347(6226), 1259038. doi:10.1126/science.1259038
- K, S., & Kumar, A. (2022). Nanoemulsions: Techniques for the preparation and the recent advances in their food applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 76, 102914. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102914>
- Kang, Z., Chen, S., Zhou, Y., Ullah, S., & Liang, H. (2022). Rational construction of citrus essential oil nanoemulsion with robust stability and high antimicrobial activity based on combination of emulsifiers. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 80, 103110. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103110>
- Karuniawati, H., Hassali, M., Ismail, W., Taufik, T., & Suryawati, S. (2021). Antibiotic use in animal husbandry: A mixed-methods study among general community in Boyolali, Indonesia. *International Journal of One Health*, 7, 122-127. doi:10.14202/IJOH.2021.122-127
- kerro Dego, O. (2020). Bovine Mastitis: Part I. In.
- Khan, M. Z., Wang, J., Ma, Y., Chen, T., Ma, M., Ullah, Q., . . . Liu, S. (2023). Genetic polymorphisms in immune- and inflammation-associated genes and their association with bovine mastitis resistance/susceptibility. *Frontiers in Immunology*, 14. doi:10.3389/fimmu.2023.1082144
- Khatibi, S. A., Ehsani, A., Nemati, M., & Javadi, A. (2021). Microencapsulation of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil by complex coacervation using gelatin and gum arabic: Characterization, release profile, antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(10), e15823. doi:<https://doi.org/10.1111/jfpp.15823>
- Kirchhelle, C. (2018). Pharming animals: a global history of antibiotics in food production (1935–2017). *Palgrave Communications*, 4(1), 96. doi:10.1057/s41599-018-0152-2
- Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Ross, R. P., Hill, C., & Meaney, W. (2008). Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *Journal of Dairy Research*, 75(3), 365-373. doi:10.1017/S0022029908003373
- Koo, B.-S., Park, K.-S., Ha, J.-H., Park, J. H., Lim, J.-C., & Lee, D.-U. (2003). Inhibitory Effects of the Fragrance Inhalation of Essential Oil from *Acorus gramineus* on Central Nervous System. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(7), 978-982. doi:10.1248/bpb.26.978
- Koyama, S., & Heinbockel, T. (2020). The Effects of Essential Oils and Terpenes in Relation to Their Routes of Intake and Application. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1558. doi:10.3390/ijms21051558

- Krömker, V., & Leimbach, S. (2017). Mastitis treatment—Reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(S3), 21-29. doi:<https://doi.org/10.1111/rda.13032>
- Kumar, M., Bishnoi, R. S., Shukla, A. K., & Jain, C. P. (2019). Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review. *Prev Nutr Food Sci*, 24(3), 225-234. doi:10.3746/pnf.2019.24.3.225
- Lefevre, C., Kammerer, M., Guenic, M., Roussel, P., Alby, C., Linclau, O., . . . Bareille, N. (2008). Le traitement des mammites cliniques de la vache laitière par des huiles essentielles. *Innovations Agronomiques*, 4, 79-83.
- Les 10 menaces pour la santé mondiale en 2019 selon l'OMS. (2019). Retrieved from <https://unric.org/fr/les-10-menaces-pour-la-sante-mondiale-en-2019-selon-loms/>
- Les mammites j'anticipe. (2023). Retrieved from <https://les-mammites-j-anticipe.com/informations/chiffres-cles/>
- Leu, W. J., Chen, J. C., & Guh, J. H. (2019). Extract From *Plectranthus amboinicus* Inhibit Maturation and Release of Interleukin 1 beta Through Inhibition of NF-kappa B Nuclear Translocation and NLRP3 Inflammasome Activation. *Frontiers in Pharmacology*, 10. doi:10.3389/fphar.2019.00573
- Li, Y., Xu, J. Z., Gu, C. X., Liu, G. L., & Tian, K. (2019). Carvacrol suppresses inflammatory responses in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(5), 8169-8176. doi:10.1002/jcb.28098
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(1), 17023. doi:10.1038/sigtrans.2017.23
- Liu, X., Xue, F., & Adhikari, B. (2023). Encapsulation of essential oils using hemp protein isolate–gum Arabic complex coacervates and evaluation of the capsules. *Sustainable Food Technology*, 1(3), 426-436. doi:10.1039/d3fb00004d
- Liu, Y., Beyer, A., & Aebersold, R. (2016). On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell*, 165(3), 535-550. doi:10.1016/j.cell.2016.03.014
- Lopes, T. S., Fussieger, C., Theodoro, H., Silveira, S., Pauletti, G. F., Ely, M. R., . . . Streck, A. F. (2023). Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus chromogenes* isolated from bovine mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. doi:10.1007/s42770-023-01031-0
- Lund, M., & Jönsson, B. (2005). On the Charge Regulation of Proteins. *Biochemistry*, 44(15), 5722-5727. doi:10.1021/bi047630o
- Manriquez, D., Costa, M., Ferchiou, A., Raboisson, D., & Lhermie, G. (2022). Multi-Criteria Decision Analysis for Assessing Social Acceptance of Strategies to Reduce Antimicrobial Use in the French Dairy Industry. *Antibiotics (Basel)*, 12(1). doi:10.3390/antibiotics12010008
- Månsson, H. L. (2008). Fatty acids in bovine milk fat. *Food Nutr Res*, 52. doi:10.3402/fnr.v52i0.1821
- Mardones, L., & Villagrán, M. (2020). Lactose Synthesis. In *Lactose and Lactose Derivatives* (pp. 104): IntechOpen.
- Matalanis, A., Jones, O. G., & McClements, D. J. (2011). Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1865-1880. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.04.014>
- Maurya, A., Singh, V. K., Das, S., Prasad, J., Kedia, A., Upadhyay, N., . . . Dwivedy, A. K. (2021). Essential Oil Nanoemulsion as Eco-Friendly and Safe Preservative: Bioefficacy Against Microbial Food Deterioration and Toxin Secretion, Mode of Action, and Future Opportunities. *Frontiers in Microbiology*, 12. doi:10.3389/fmicb.2021.751062
- McManaman, J. L., & Neville, M. C. (2003). Mammary physiology and milk secretion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(5), 629-641. doi:[https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(03\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(03)00033-4)
- Megha, K. B., Joseph, X., Akhil, V., & Mohanan, P. V. (2021). Cascade of immune mechanism and consequences of inflammatory disorders. *Phytomedicine*, 91, 153712. doi:<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153712>
- Mohamed Walid, H., Hadeif, A., Meklati, F., Hamlaoui, M., Alleg, M., & Ghouila, B. (2021). In vivo effect of *Origanum vulgare* essential oil on microbiological quality of raw milk from subclinical

- mastitis affected cows. *The Journal Agriculture and Forestry*, 67, 83-98. doi:10.17707/AgricultForest.67.3.07
- Motta Felício, I., Limongi de Souza, R., de Oliveira Melo, C., Gervázio Lima, K. Y., Vasconcelos, U., Olímpio de Moura, R., & Eleamen Oliveira, E. (2021). Development and characterization of a carvacrol nanoemulsion and evaluation of its antimicrobial activity against selected food-related pathogens. *Lett Appl Microbiol*, 72(3), 299-306. doi:10.1111/lam.13411
- Mubarack, H. M., Doss, A., Dhanabalan, R., & Venkataswamy, R. (2011). Activity of Some Selected Medicinal Plant Extracts Against Bovine Mastitis Pathogens. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10, 738-741. doi:10.3923/javaa.2011.738.741
- Mucha, W., & Witkowska, D. (2021). The Applicability of Essential Oils in Different Stages of Production of Animal-Based Foods. *Molecules*, 26(13), 3798. doi:10.3390/molecules26133798
- Nehme, R., Andrés, S., Pereira, R. B., Ben Jemaa, M., Bouhallab, S., Cecilian, F., . . . Abdennebi-Najar, L. (2021). Essential Oils in Livestock: From Health to Food Quality. *Antioxidants*, 10(2), 330. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/2/330>
- Nickerson, S. C. (1995). Milk production: Factors affecting milk composition. In F. Harding (Ed.), *Milk Quality* (pp. 3-24). Boston, MA: Springer US.
- Nickerson, S. C., & Akers, R. M. (2011). *Mammary Gland: Anatomy. Pages 328–337 in Encyclopedia of Dairy Sciences. 2nd ed. Vol. 3. J. W. Fuquay, P. F. Fox, and P. L. H. McSweeney, ed. Academic Press Inc., London, UK.*
- Ntalli, N., Zochios, G., Nikolaou, P., Winkiel, M., Petrelli, R., Bonacucina, G., . . . Benelli, G. (2023). Carlina acaulis essential oil nanoemulsion for managing Meloidogyne incognita. *Industrial Crops and Products*, 193, 116180. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.116180>
- Oikonomou, G., Addis, M. F., Chassard, C., Nader-Macias, M. E. F., Grant, I., Delbès, C., . . . Even, S. (2020). Milk Microbiota: What Are We Exactly Talking About? *Frontiers in Microbiology*, 11. doi:10.3389/fmicb.2020.00060
- Okuda, M., Fujita, Y., Takada-Takatori, Y., Sugimoto, H., & Urakami, K. (2020). Aromatherapy improves cognitive dysfunction in senescence-accelerated mouse prone 8 by reducing the level of amyloid beta and tau phosphorylation. *PLoS One*, 15(10), e0240378. doi:10.1371/journal.pone.0240378
- Oliver, S. P., & Murinda, S. E. (2012). Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 28(2), 165-185. doi:10.1016/j.cvfa.2012.03.005
- Osanloo, M., Firoozian, S., Abdollahi, A., Hatami, S., Nematollahi, A., Elahi, N., & Zarenezhad, E. (2022). Nanoemulsion and nanogel containing Artemisia dracunculus essential oil; larvicidal effect and antibacterial activity. *BMC Research Notes*, 15(1). doi:10.1186/s13104-022-06135-8
- P. Siva, S., & Ho, Y. K. (2022). Modeling the Adsorption of Polydispersed Cellulose Nanocrystals on Emulsion Oil Droplets during Their Simultaneous Breakage and Coalescence. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 61(11), 3983-4000. doi:10.1021/acs.iecr.1c03946
- Pang, M., Sun, L., He, T., Bao, H., Zhang, L., Zhou, Y., . . . Wang, R. (2017). Molecular and virulence characterization of highly prevalent Streptococcus agalactiae circulated in bovine dairy herds. *Veterinary Research*, 48(1), 65. doi:10.1186/s13567-017-0461-2
- Paramasivam, R., Gopal, D. R., Dhandapani, R., Subbarayalu, R., Elangovan, M. P., Prabhu, B., . . . Muthupandian, S. (2023). Is AMR in Dairy Products a Threat to Human Health? An Updated Review on the Origin, Prevention, Treatment, and Economic Impacts of Subclinical Mastitis. *Infection and Drug Resistance*, Volume 16, 155-178. doi:10.2147/idr.s384776
- Parham, S., Kharazi, A. Z., Bakhsheshi-Rad, H. R., Nur, H., Ismail, A. F., Sharif, S., . . . Berto, F. (2020). Antioxidant, Antimicrobial and Antiviral Properties of Herbal Materials. *Antioxidants*, 9(12), 1309. doi:10.3390/antiox9121309
- Park, H.-J., Lim, E.-J., Zhao, R. J., Oh, S. R., Jung, J. W., Ahn, E.-M., . . . Yang, C. H. (2015). Effect of the fragrance inhalation of essential oil from Asarum heterotropoides on depression-like behaviors in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 43. doi:10.1186/s12906-015-0571-1



- Pejsak, Z., Kaźmierczak, P., Butkiewicz, A. F., Wojciechowski, J., & Woźniakowski, G. (2023). Alternatives to zinc oxide in pig production. *Pol J Vet Sci*, 26(2), 319-330. doi:10.24425/pjvs.2023.145033
- Peng, Y., Ao, M., Dong, B., Jiang, Y., Yu, L., Chen, Z., . . . Xu, R. (2021). Anti-Inflammatory Effects of Curcumin in the Inflammatory Diseases: Status, Limitations and Countermeasures. *Drug Design, Development and Therapy, Volume 15*, 4503-4525. doi:10.2147/dddt.s327378
- Pereira, R. B., Rahali, F. Z., Nehme, R., Falleh, H., Jemaa, M. B., Sellami, I. H., . . . Pereira, D. M. (2023). Anti-inflammatory activity of essential oils from Tunisian aromatic and medicinal plants and their major constituents in THP-1 macrophages. *Food Research International*, 167, 112678. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112678>
- Petit, S. (2013). *Dictionnaire des médicaments vétérinaires et des produits de santé animale commercialisés en France 2013* (18 ed.): Point Vétérinaire.
- Pilong, P., Chuesiang, P., Mishra, D. K., & Siripatrawan, U. (2022). Characteristics and antimicrobial activity of microfluidized clove essential oil nanoemulsion optimized using response surface methodology. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(12), e16886. doi:<https://doi.org/10.1111/jfpp.16886>
- Pinto, L. D. A., Machado, F. P., Esteves, R., Farias, V. M., Köptcke, F. B. N., Ricci-Junior, E., . . . Keller, L. A. M. (2023). Characterization and Inhibitory Effects of Essential Oil and Nanoemulsion from *Ocotea indecora* (Shott) Mez in *Aspergillus* Species. *Molecules*, 28(8), 3437. doi:10.3390/molecules28083437
- Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Myllys, V., & Honkanen-Buzalski, T. (2004). Bovine Mastitis in Finland 2001—Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance. *Journal of Dairy Science*, 87(8), 2433-2441. doi:10.3168/jds.s0022-0302(04)73366-4
- Plati, F., & Paraskevopoulou, A. (2023). Hemp protein isolate – gum Arabic complex coacervates as a means for oregano essential oil encapsulation. Comparison with whey protein isolate – gum Arabic system. *Food Hydrocolloids*, 136, 108284. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108284>
- Puvača, N., Tufarelli, V., & Giannenas, I. (2022). Essential Oils in Broiler Chicken Production, Immunity and Meat Quality: Review of *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, and *Rosmarinus officinalis*. *Agriculture*, 12(6), 874. doi:10.3390/agriculture12060874
- Qiu, L., Zhang, M., Adhikari, B., & Chang, L. (2022). Microencapsulation of rose essential oil in mung bean protein isolate-apricot peel pectin complex coacervates and characterization of microcapsules. *Food Hydrocolloids*, 124, 107366. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107366>
- Qiu, L., Zhang, M., Adhikari, B., & Chang, L. (2023). Microencapsulation of Rose Essential Oil Using Perilla Protein Isolate-Sodium Alginate Complex Coacervates and Application of Microcapsules to Preserve Ground Beef. *Food and Bioprocess Technology*, 16(2), 368-381. doi:10.1007/s11947-022-02944-8
- Rahchamani, R., Noori, S., & Bayat kouhsar, J. (2023). Antibacterial effect of essential oils of peppermint and pennyroyal on major bovine mastitis bacteria. *New Findings in Veterinary Microbiology*, 6(1), 64-75. doi:10.22034/nfvm.2023.385595.1175
- Rainard, P. (2017). Mammary microbiota of dairy ruminants: fact or fiction? *Veterinary Research*, 48(1), 25. doi:10.1186/s13567-017-0429-2
- Rainard, P., Gilbert, F. B., & Germon, P. (2022). Immune defenses of the mammary gland epithelium of dairy ruminants. *Frontiers in Immunology*, 13. doi:10.3389/fimmu.2022.1031785
- Rani, S., Singh, H., & Ram, C. (2022). Efficacy and mechanism of carvacrol with octanoic acid against mastitis causing multi-drug-resistant pathogens. *Braz J Microbiol*, 53(1), 385-399. doi:10.1007/s42770-021-00639-4
- Rasool, S., Farooq, M. U., Ahmad, S. S., Avais, M., Abbas, S., & Ambreen, N. (2021). Effect of Essential Oils of *Eucalyptus Globulus* and *Lavandula Hybrid* as Teat Dips to Control Subclinical Mastitis in Friesian Dairy Cattle. *Eur. J. Med. Vet. Sci.-Nov*, 2, 0100014EJMVS.

- Rattez, C. (2017). *Les mammites subcliniques en élevage bovin laitier : antibiothérapie et alternatives*. Université de Rouen UFR de Médecine et de Pharmacie, Retrieved from <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01643830/document> (01643830)
- Remy, D. (2010). *Les mammites*: France Agricole.
- Ríos, J.-L. (2016). Chapter 1 - Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined. In V. R. Preedy (Ed.), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (pp. 3-10). San Diego: Academic Press.
- Roberson, J. R. (2003). Establishing treatment protocols for clinical mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 19(1), 223-234, viii. doi:10.1016/s0749-0720(02)00071-3
- Roess, A. A., Winch, P. J., Akhter, A., Afroz, D., Ali, N. A., Shah, R., . . . the Bangladesh Projahnmo Study, G. (2015). Household Animal and Human Medicine Use and Animal Husbandry Practices in Rural Bangladesh: Risk Factors for Emerging Zoonotic Disease and Antibiotic Resistance. *Zoonoses and Public Health*, 62(7), 569-578. doi:<https://doi.org/10.1111/zph.12186>
- Rollin, E., Dhuyvetter, K. C., & Overton, M. W. (2015). The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Preventive Veterinary Medicine*, 122(3), 257-264. doi:<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.11.006>
- Romero, J., Benavides, E., & Meza, C. (2018). Assessing Financial Impacts of Subclinical Mastitis on Colombian Dairy Farms. *Frontiers in Veterinary Science*, 5. doi:10.3389/fvets.2018.00273
- Rørvang, M. V., Jensen, M. B., & Nielsen, B. L. (2017). Development of test for determining olfactory investigation of complex odours in cattle. *Applied Animal Behaviour Science*, 196, 84-90. doi:<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.07.008>
- Roussel, P., N Ballot, P. Gautier, R. Bore, & Jurquet, J. (2020). *Le tarissement des vaches laitières en France : état des lieux 2015-2017* Retrieved from Renc. Rech. Ruminants:
- Schmitt, C., & Turgeon, S. L. (2011). Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1), 63-70. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.10.001>
- Schukken, Y., Chuff, M., Moroni, P., Gurjar, A., Santisteban, C., Welcome, F., & Zadoks, R. (2012). The "Other" Gram-Negative Bacteria in Mastitis. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 28, 239-256. doi:10.1016/j.cvfa.2012.04.001
- Seegers, H., Billon, D., Fourichon, C., & Hortet, P. (2002). *Evaluation de la pertinence économique du traitement de mammites subcliniques en cours de lactation chez la vache laitière*. Retrieved from
- Serieys, F. (2006). *Impact de facteurs épidémiologiques, zootechniques, de conduite d'élevage et de prix sur l'intérêt économique du traitement en lactation des mammites subcliniques*. Retrieved from Renc. Rech. Ruminants:
- Sharma, S., Sinha, M., Kaushik, S., Kaur, P., & Singh, T. P. (2013). C-Lobe of Lactoferrin: The Whole Story of the Half-Molecule. *Biochemistry Research International*, 2013, 271641. doi:10.1155/2013/271641
- Shi, Y., Zhang, M., Chen, K., & Wang, M. (2022). Nano-emulsion prepared by high pressure homogenization method as a good carrier for Sichuan pepper essential oil: Preparation, stability, and bioactivity. *LWT*, 154, 112779. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112779>
- Singh, A., Kisku, U., Bhakat, C., Mohammad, A., Chatterjee, A., Mandal, A., . . . Dutta, T. (2022). Management of Sub-clinical Mastitis for Better Yield in Dairy Animals: A Review. *Acta Scientifica Veterinary Sciences*, 2582-3183. doi:10.31080/ASVS.2022.04.0517
- Singh, Y., Meher, J. G., Raval, K., Khan, F. A., Chaurasia, M., Jain, N. K., & Chourasia, M. K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 252, 28-49. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>
- Soares, L. d. S., Milião, G. L., Tonole, B., de Souza, G. B., Soares, N. d. F. F., Teixeira, A. V. N. d. C., . . . de Oliveira, E. B. (2019). Chitosan dispersed in aqueous solutions of acetic, glycolic, propionic or lactic acid as a thickener/stabilizer agent of O/W emulsions produced by ultrasonic homogenization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 59, 104754. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104754>

- Sordillo, L. M. (2018). Mammary Gland Immunobiology and Resistance to Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 34(3), 507-523. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.07.005>
- Sulabh, S., Panigrahi, M., Ahmad, S. F., Varshney, R., Verma, A., Baba, N. A., . . . Bhushan, B. (2019). Peptidoglycan and Lipoteichoic Acid Induces Differential mRNA Response of Immune-Related Genes in PBMC of Crossbred, Tharparkar Cattle and Murrah Buffalo. *Animal Biotechnology*, 30(2), 166-174. doi:10.1080/10495398.2018.1461633
- Sumon, S., Parvin, M. S., Ehsan, M. A., & Islam, M. T. (2020). Relationship between somatic cell counts and subclinical mastitis in lactating dairy cows. *Vet World*, 13(8), 1709-1713. doi:10.14202/vetworld.2020.1709-1713
- Sun, J., Cheng, Y., Zhang, T., & Zang, J. (2022). Microencapsulation of Carvacrol by Complex Coacervation of Walnut Meal Protein Isolate and Gum Arabic: Preparation, Characterization and Bio-Functional Activity. *Foods*, 11(21), 3382. doi:10.3390/foods11213382
- Tagnaout, I., Zerkani, H., Hadi, N., El Moumen, B., El Makhoukhi, F., Bouhrim, M., . . . Zair, T. (2022). Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of *Thymus broussonetii* Boiss and *Thymus capitatus* (L.) Hoffmann and Link Essential Oils. *Plants (Basel)*, 11(7). doi:10.3390/plants11070954
- Takeshita, S., Gage, J. R., Kishimoto, T., Vredevoe, D. L., & Martínez-Maza, O. (1996). Differential regulation of IL-6 gene transcription and expression by IL-4 and IL-10 in human monocytic cell lines. *J Immunol*, 156(7), 2591-2598.
- Tankam, J. M., & Ito, M. (2013). Inhalation of the Essential Oil of *Piper guineense* from Cameroon Shows Sedative and Anxiolytic-Like Effects in Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(10), 1608-1614. doi:10.1248/bpb.b13-00491
- Tavares, G. M., Croguennec, T., Hamon, P., Carvalho, A. F., & Bouhallab, S. (2015). Selective coacervation between lactoferrin and the two isoforms of  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 48, 238-247. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.027>
- Tavares, T. D., Antunes, J. C., Padrão, J., Ribeiro, A. I., Zille, A., Amorim, M. T. P., . . . Felgueiras, H. P. (2020). Activity of Specialized Biomolecules against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*, 9(6), 314. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/6/314>
- Tiseo, K., Huber, L., Gilbert, M., Robinson, T. P., & Van Boeckel, T. P. (2020). Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals from 2017 to 2030. *Antibiotics (Basel)*, 9(12). doi:10.3390/antibiotics9120918
- Tomanić, D., Božin, B., Čabarkapa, I., Kladar, N., Radinović, M., Maletić, M., & Kovačević, Z. (2022). Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activity of Two Different Essential Oils Against Mastitis Associated Pathogens. *Acta Veterinaria*, 72(1), 45-58. doi:doi:10.2478/acve-2022-0004
- Tomanić, D., Samardžija, M., & Kovačević, Z. (2023). Alternatives to Antimicrobial Treatment in Bovine Mastitis Therapy: A Review. *Antibiotics (Basel)*, 12(4). doi:10.3390/antibiotics12040683
- Torshabi, M., MoadabShoar, Z., & Negahban, M. (2023). Preparation of Citrus reticulata peel nano-encapsulated essential oil and in vitro assessment of its biological properties. *European Journal of Oral Sciences*, 131(2), e12924. doi:<https://doi.org/10.1111/eos.12924>
- Vaglio, S., Kaburu, S. S. K., Pearce, R., Bryant, L., McAuley, A., Lott, A., . . . Accorsi, P. A. (2021). Effects of scent enrichment on behavioral and physiological indicators of stress in zoo primates. *American Journal of Primatology*, 83(5), e23247. doi:<https://doi.org/10.1002/ajp.23247>
- Vanderhaeghen, W., Piepers, S., Leroy, F., Van Coillie, E., Haesebrouck, F., & De Vlieghe, S. (2014). Invited review: effect, persistence, and virulence of coagulase-negative Staphylococcus species associated with ruminant udder health. *J Dairy Sci*, 97(9), 5275-5293. doi:10.3168/jds.2013-7775
- Vuddhakul, V., Bhoopong, P., Hayeebilan, F., & Subhadhirasakul, S. (2007). Inhibitory activity of Thai condiments on pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Microbiology*, 24(4), 413-418. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.04.010>

- Wang, Y., Li, M., Wen, X., Tao, H., Wang, K., Fu, R., . . . Ni, Y. (2023). Conformational changes and the formation of new bonds achieving robust nanoemulsions by electrostatic interactions between whey protein isolate and chondroitin sulfate. *Food Hydrocolloids*, 136, 108263. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108263>
- Wani, S., Haq, U., Parray, O., Nazir, Q., Nazir, A., Mushtaq, M., . . . Yattoo, D. M. (2022). A Brief Analysis of Economic Losses Due to Mastitis in Dairy Cattle. *The Indian veterinary journal*, 90, 27-31.
- Wattenburger, K., Schmidt, R., Placheta, L., Middleton, J. R., & Adkins, P. R. F. (2020). Evaluation of 4 different teat disinfection methods prior to collection of milk samples for bacterial culture in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 103(5), 4579-4587. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17338>
- Williamson, J., Callaway, T., Rollin, E., & Ryman, V. (2022). Association of Milk Somatic Cell Count with Bacteriological Cure of Intramammary Infection—A Review. *Agriculture*, 12(9), 1437. doi:10.3390/agriculture12091437
- Winther, A. R., Narvhus, J. A., Smistad, M., da Silva Duarte, V., Bombelli, A., & Porcellato, D. (2022). Longitudinal dynamics of the bovine udder microbiota. *Animal Microbiome*, 4(1), 26. doi:10.1186/s42523-022-00177-w
- Yan, Y., Kizilay, E., Seeman, D., Flanagan, S., Dubin, P. L., Bovetto, L., . . . Schmitt, C. (2013). Heteroprotein Complex Coacervation: Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin and Lactoferrin. *Langmuir*, 29(50), 15614-15623. doi:10.1021/la4027464
- Yong, S. X. M., Song, C. P., & Choo, W. S. (2021). Impact of High-Pressure Homogenization on the Extractability and Stability of Phytochemicals. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4. doi:10.3389/fsufs.2020.593259
- Yu, S. H., & Seol, G. H. (2017). *Lavandula angustifolia* Mill. Oil and Its Active Constituent Linalyl Acetate Alleviate Pain and Urinary Residual Sense after Colorectal Cancer Surgery: A Randomised Controlled Trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1-7. doi:10.1155/2017/3954181
- Zhang, J., Li, W., Tang, Y., Liu, X., Zhang, H., Zhou, Y., . . . Yu, Y. (2022). Testing Two Somatic Cell Count Cutoff Values for Bovine Subclinical Mastitis Detection Based on Milk Microbiota and Peripheral Blood Leukocyte Transcriptome Profile. *Animals (Basel)*, 12(13). doi:10.3390/ani12131694
- Zheng, J., Tang, C.-h., & Sun, W. (2020). Heteroprotein complex coacervation: Focus on experimental strategies to investigate structure formation as a function of intrinsic and external physicochemical parameters for food applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 284, 102268. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102268>

**Titre :** Intérêt de l'utilisation de l'huile essentielle de *Thymus capitatus* en élevage bovin laitier et impact sur la qualité du lait

**Mots clés :** huiles essentielles, mammites subcliniques, encapsulation, activité antibactérienne, activité anti-inflammatoire

**Résumé :** La mammite bovine est une préoccupation majeure dans les élevages bovins. Elle est causée par des agents pathogènes contagieux ou environnementaux. Les coûts économiques liés aux mammites sont importants. Le traitement principal reste basé sur l'usage d'antibiotiques dont l'utilisation excessive contribue au développement de la résistance aux antimicrobiens, ce qui représente une menace sérieuse pour la santé publique. Des alternatives, comme l'utilisation d'huiles essentielles (HEs), sont nécessaires pour limiter l'antibiothérapie. Cette thèse a pour objectif de tester l'efficacité des HEs sur les mammites et d'évaluer leurs effets sur la qualité du lait. L'approche *in vitro* sur des cellules humaines a montré que plusieurs HEs de plantes méditerranéennes possèdent des activités anti-inflammatoires efficaces. L'HE de *Thymus capitatus* (HETC) et son principal

composé, le carvacrol, sont également en mesure de diminuer l'inflammation sur des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) isolées à partir de sang de vaches. Leurs effets antibactériens sont aussi démontrés sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. De plus, l'activité antibactérienne d'HETC est améliorée par nano-émulsion, contrairement à celle du carvacrol. Les tests *in vivo*, par application topique de 10% d'HETC, sont moins concluants. Aucune amélioration de la mammite n'a été démontrée. Néanmoins, la qualité du lait et son microbiote restent préservés. Tenant compte de ces résultats, d'autres études sont nécessaires pour optimiser le traitement à base d'HEs sur la mammite et évaluer de nouvelles voies d'application sur les vaches laitières.

**Title :** The benefits of using *Thymus capitatus* essential oil in dairy cattle farming and its impact on milk quality

**Keywords :** essential oils, subclinical mastitis, encapsulation, antibacterial and anti-inflammatory activities.

**Abstract :** Bovine mastitis is a major concern in cattle farming, and it can be caused by contagious or environmental pathogens. The costs associated with mastitis are significant. The current primary treatment is the use of antibiotics whose excessive use contributes to the development of antimicrobial resistance, posing a serious threat to public health. New alternatives, such as the use of essential oils (EOs), are needed to limit antibiotic therapy. This study aims to test the effectiveness of EOs on mastitis and evaluate their effects on milk quality. *In vitro* testing on human cells has shown that several EOs from Mediterranean plants have effective anti-inflammatory activities. Specifically, *Thymus*

*capitatus* essential oil (TCEO) and its major component, carvacrol, are able to reduce inflammation in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from cow blood. Their antibacterial properties are also demonstrated on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The antibacterial activity of TCEO is significantly enhanced by nano-emulsion, unlike that of carvacrol. *In vivo* tests, through topical application of 10% TCEO, are less conclusive, with no demonstrated improvement of mastitis. However, milk quality and microbiota remain preserved. Considering these results, further studies are needed to optimize EOs-based treatment for mastitis and to evaluate new application methods on dairy cows.