

DÉTECTION ET QUANTIFICATION DE RÉSIDUS ANTIBACTÉRIENS DANS LA VIANDE DE *GALLUS GALLUS* APRÈS ADMINISTRATION D'UN ALIMENT COMPLÉMENTAIRE À BASE D'HUILES ESSENTIELLES

Ruppin Romaric¹, Mauvisseau Thierry¹, Mallem Yassine²

¹RESEAU CRISTAL - LABOVET LES ESSARTS - 28 rue des Sables, 85140 LES ESSARTS

²UPSP NP3 NUTRITION, PHYSIOPATHOLOGIE ET PHARMACOLOGIE, 2017.B146 -

Oniris, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, Nantes

Atlantique- 44307 NANTES

r.ruppin@reseaucristal.fr

RÉSUMÉ

L'utilisation d'aliments complémentaires à base d'huiles essentielles (HE) est de plus en plus fréquente en élevage de volaille pour réduire l'utilisation des antibiotiques. Ces substances pourraient générer l'apparition de résidus antibactériens dans la viande, potentiellement détectables par les tests utilisés à l'abattoir pour la recherche des résidus antibiotiques. Nous avons commencé par évaluer la sensibilité de ces tests aux composés antibactériens contenus dans cinq mélanges d'HE. Nous avons recherché et quantifié des résidus antibactériens dans la viande de poulets de chair ayant reçu des HE par Chromatographie en Phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse (CPG-SM). Un aliment complémentaire à base d'HE a été administré pendant cinq jours consécutifs à 13600 poulets certifiés atteints de colibacillose, *via* l'eau de boisson. Des animaux ont été prélevés avant traitement, à l'arrêt du traitement, puis 24h, 48h, 72h et 5 jours après (cinq animaux à chaque fois). Sur chaque animal prélevé, les muscles du bréchet et des cuisses ont été analysés par la méthode des 4 boîtes et le Premi®Test (N=50). Les cinq jus de viande de chaque jour de prélèvement ont été *poolés* et analysés par CPG-SM afin de rechercher le thymol, le carvacrol, le cinnamaldéhyde, majoritaires dans la spécialité. Les 50 échantillons testés ont donné des résultats négatifs par les deux méthodes de détection rapide ($p < 0,05$, modèle linéaire à effets mixtes). L'analyse des jus de viande par CPG-SM (N=5) a révélé la présence de 0,5 à 5 µg/kg de cinnamaldéhyde, carvacrol et thymol dans la viande, quel que soit le jour de prélèvement. Le Premi®Test et la méthode des 4 boîtes peuvent détecter les composés antibactériens des HE. Néanmoins, dans nos expériences aucun résidu de composé antibactérien n'a été détecté, suite à l'administration de notre aliment complémentaire à base d'huiles essentielles à des poulets atteints de colibacillose.

ABSTRACT

Detection and quantification of antibacterial residues in *Gallus gallus* meat after administration of a complementary food based on essential oils

The use of complementary food based on essential oils (EO) is increasingly common in poultry farming to reduce the use of antibiotics. These substances could lead to the appearance of antibacterial residues in meat, potentially detectable by the tests used at the slaughterhouse for the investigation of antibiotic residues. We began by evaluating the sensitivity of these tests to the antibacterial compounds contained in five EO mixtures. Antibacterial residues were investigated and quantified in meat of broilers fed with EO by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). A supplemental EO-based food was administered for five consecutive days to 13600 certified chickens with colibacillosis, *via* drinking water. Animals were sampled before treatment, stopped treatment, then 24h, 48h, 72h and 5 days after (five animals each time). On each animal sampled, breast and thigh muscles were analyzed by the 4-Plates method and the Premi®Test (N = 50). The five meat juices from each day of sampling were pooled and analyzed by GC-MS to search for the thymol, carvacrol, cinnamaldehyde, majority in the specialty. The 50 samples tested gave negative results by both methods of rapid detection ($p < 0.05$, Linear Mixed-effects model). Analysis of the meat juices by GC-MS (N = 5) revealed the presence of 0.5 to 5 µg/kg of cinnamaldehyde, carvacrol, and thymol in meat, regardless of the day of collection. The Premi® Test and the 4-Plates method appear to be able to detect the antibacterial compounds of EO, in very small quantities in meat, and therefore not detectable by them, following the administration of our complementary EO-based food for chickens with colibacillosis.

INTRODUCTION

La colibacillose est une maladie majeure en élevage avicole, et notamment en élevage de poulets de chair. Les moyens de lutte passent en général par une antibiothérapie et ont généré l'apparition de nombreuses résistances. Sous l'influence des consommateurs, des instances politiques, et de la communauté scientifique, une volonté de rechercher des traitements alternatifs aux antibiotiques s'est développée, et les huiles essentielles (HE) sont une des réponses possibles à cette demande.

Les propriétés antibactériennes des HE, notamment sur *E.coli* sont bien connues et confirmées par des études *in vitro* et *in vivo*. Les avancées scientifiques permettent de comprendre en partie le mécanisme d'action des différentes molécules anti-infectieuses, comme le carvacrol, le thymol, l'eugénol ou le cinnamaldéhyde. En revanche, les données sur leur métabolisme et leur toxicité sont beaucoup moins disponibles en médecine vétérinaire.

Le statut réglementaire des HE pose aujourd'hui problème. Néanmoins, utilisées dans le cadre du traitement d'une maladie comme la colibacillose, en lieu et place des antibiotiques, elles pourraient être considérées comme des médicaments vétérinaires. Or, un médicament vétérinaire utilisé sur des animaux producteurs de denrées à destination humaine, doit nécessairement avoir un temps d'attente (TA) et une limite maximale de résidus (LMR). Actuellement, aucune donnée n'existe pour les huiles essentielles, et encore moins pour un mélange d'HE.

Enfin, le respect des LMR dans les viandes, passe par la recherche des résidus de médicaments à activité antibactérienne dans les denrées, notamment à l'abattoir. On utilise des tests de détection rapide et qualitative (Premi®test et méthode des 4 boîtes) réalisés sur le terrain puis des tests de confirmation et quantification de résidus (Chromatographies et spectrométrie de masse), réalisés en laboratoire. Les données de sensibilité et spécificité de ces tests pour la recherche d'antibiotiques et de leurs résidus sont bien documentées dans la plupart des denrées. Concernant les huiles essentielles, ces données commencent à apparaître pour le lait, mais ne sont pas disponibles pour la viande et les œufs de volaille.

Nous avons donc essayé de déterminer la sensibilité du Premi®Test et de la méthode des 4 boîtes aux composés antibactériens présents dans les HE, lors d'une étude *in vitro*, non développée ici. Le second objectif était, après administration d'un aliment complémentaire à base d'HE à des volailles, de déterminer si le composant antibactérien de ce mélange pouvait être retrouvé et quantifié dans la viande à l'arrêt du traitement. Ceci dans le but de fournir des éléments sur le métabolisme et l'élimination de ces molécules et de pouvoir discuter de l'intérêt ou non d'une LMR et d'un TA pour celles-ci.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1 Choix des huiles essentielles administrées

Nous avons décidé de travailler avec un mélange d'huiles essentielles réputées antibactériennes vis-à-vis d'*E.coli* et que nous utilisons classiquement sur le terrain dans cette indication. Le produit contient à titre d'exemple de l'HE d'écorce de cannelle de Chine, de l'HE de clou de girofle et de l'HE de thym vulgaire à thymol. Le produit a ensuite été analysé par chromatographie en phase gazeuse (CPG) pour déterminer les composants majoritaires, qui seront par la suite recherchés dans la viande des volailles ayant reçu le produit. Il en est ressorti que ce produit contient 33 % de cinnamaldéhyde, 18 % de thymol et 15 % de para-cymène, qui seront donc les trois composants recherchés par la suite.

1.2 Critères d'inclusion des élevages et des animaux

Pour être inclus dans l'étude, les poulets de chair ne devaient avoir reçu aucun traitement antibiotique ou à base d'HE depuis leur naissance. Aucun critère portant sur le type de production (label, standard, certifié) ou sur le sexe des animaux n'a été retenu. Des animaux devaient avoir été autopsiés et un vétérinaire devait diagnostiquer des lésions colibacillaires. Une analyse bactériologique devait enfin prouver la présence d'*E.coli* dans l'élevage, peu importe le sérotype incriminé. Enfin, un Phytogramme® était réalisé et devait montrer que la bactérie isolée dans l'élevage, était bien sensible *in vitro* au mélange d'HE que nous voulions tester.

Le Phytogramme® est un outil complémentaire qui permet d'orienter la décision thérapeutique du vétérinaire, en mesurant *in vitro* la sensibilité d'un germe donné à différents mélanges d'HE. Pour ce faire, des puits sont creusés dans une gélose de Mueller-Hinton. Cette boîte de gélose estensemencée en surface avec la bactérie à tester. Chacun des puits est rempli avec un mélange d'HE à tester. Après 24h d'incubation, si le mélange d'HE est efficace sur la bactérie, on observe une zone circulaire sans colonies bactériennes autour du puits, appelée diamètre d'inhibition (DI). Ce diamètre est mesuré, en sachant que plus il est important, plus la bactérie est considérée sensible au produit testé.

Sur ces critères, un seul élevage de 13600 poulets de chair certifiés, âgés de 37 jours, a été recruté.

1.3 Modalités d'administration des traitements et de prélèvement des échantillons

Le produit à base d'HE a été administré *via* l'eau de boisson à la dose de 1L de produit pour 1000L d'eau consommée par les animaux sur 24h. Ceci correspond aux doses classiques efficaces et utilisées dans le traitement des colibacilloses sur le terrain. La durée totale de traitement était de 5 jours consécutifs. Avant la mise en place de celui-ci, 2 animaux témoins négatifs ont été prélevés, autopsiés et les muscles du bréchet et des cuisses ont été récupérés et congelés (-20°C) en attendant la fin de la période de prélèvement. Dès la fin du 5^e jour de traitement, les 5 premiers animaux ont été prélevés aléatoirement dans l'ensemble du bâtiment (J0). 5 autres ont été prélevés 24h (J1) après l'arrêt du traitement puis 48h (J2), 72h (J3) et 5 jours après (J5), pour un total de 25 poulets à analyser. Sur chaque animal, les muscles du bréchet et des cuisses ont été récupérés, mis en sachet de congélation, identifiés par individu et par jour de prélèvement, puis congelés pour regrouper les analyses. Enfin, les sérums sanguins des 5 animaux prélevés à J0 ont été congelés également afin d'être analysés et d'évaluer la biodisponibilité des composants antibactériens du produit à base d'HE.

1.4 Détection par les tests rapides de résidus antibactériens dans la viande

Sur chacun des échantillons, le Premi®Test et la méthode des 4 boîtes ont été réalisés. Le Premi®Test est vendu sous forme de kits prêts à l'emploi. Chaque échantillon de viande est pressé pour récupérer 100 µL de jus de viande. Ces 100 µL sont déposés dans le tube, au contenu violet, préalablement identifié et on laisse incubé 10 minutes à température ambiante. Le tube est ensuite rincé à l'eau du robinet trois fois de suite, puis fermé avec le film fourni dans le kit, et mis à incuber 3 à 4h dans l'incubateur dédié, à 64°C. Un tube témoin négatif, c'est-à-dire n'ayant pas reçu de jus de viande, est mis en incubation également. Une fois ce dernier devenu jaune (donc négatif), on procède à la lecture. Si le jus de viande testé contient des résidus antibactériens en quantité suffisante, ils empêchent le développement de la bactérie contenue dans le tube (*Bacillus stearothermophilus*) : le tube reste violet. Dans le cas contraire, la bactérie se développe, acidifie le milieu et le tube devient jaune. Au total, 27 échantillons de muscle de bréchet (25 animaux testés + 2 témoins) et 27 échantillons de muscle de cuisse ont été testés (N=54).

Le protocole de la méthode des 4 boîtes est protégé par l'Anses et interdit de diffusion (sauf dérogation). Chaque échantillon de viande à tester est découpé sous forme de rondelle de 6 mm de diamètre et 2 mm d'épaisseur à l'aide d'un emporte-pièce. 4 boîtes de gélose contenant une bactérie à une concentration standardisée et à un pH donné sont

préparées : *Bacillus subtilis* à pH 6 (boîte 1), pH 7,4 (boîte 2), pH 8 (boîte 3) et *Micrococcus luteus* à pH 8 (boîte 4). Deux rondelles de chaque échantillon sont déposées sur chacune des 4 boîtes (6 rondelles maximum par boîte), puis celles-ci sont mises à incuber à 37°C (boîtes 1, 2 et 3) ou 42°C (boîte 4) pendant 24h. Si un diamètre d'inhibition (DI) supérieur à 2mm apparaît autour de l'échantillon, le test est positif aux résidus antibactériens. Au total 54 échantillons ont été testés deux fois sur chaque boîte (N=216).

1.5 Quantification des résidus par CPG-SM

Les jus de viande de chaque jour de prélèvement ont été regroupés et envoyés en analyse CPG-SM au laboratoire ITEIPMAI (Chemillé 49) pour une quantification du cinnamaldéhyde, du thymol et du para-cymène (3 molécules majoritaires de la spécialité), du carvacrol et de l'eucalyptol (molécules témoins négatifs non apportées par le produit). Au total 1 pool témoin négatif, et 4 pools tests ont été analysés (un par jour de prélèvement), de 15 mL de jus de viande chacun (N=5).

Les 5 sérums prélevés sur les animaux à J0 ont également été regroupés et analysés par CPG-SM.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Sur les 54 Premi®Test réalisés, la totalité se sont révélés négatifs pour la recherche de résidus antibactériens, peu importe le jour de prélèvement ou le muscle prélevé (Figure 1). De la même manière, toutes les expériences menées avec la méthode des 4 boîtes ont fourni des résultats négatifs quel que soit le jour du prélèvement ou le muscle analysé (Figure 2).

Les analyses par CPG-SM ont montré que le cinnamaldéhyde, le thymol mais également le carvacrol sont présents à l'état des traces (0,5 à 5 µg/kg) sur l'ensemble des échantillons analysés y compris les témoins négatifs (Figure 3A et 3B). Or ces trois molécules sont utilisées comme substances aromatiques et additifs en alimentation des volailles, ce qui peut expliquer qu'on les retrouve même sur les témoins négatifs. Quoiqu'il en soit, il n'y a pas d'accumulation et d'augmentation de la concentration de ces trois molécules dans les muscles du bréchet et des cuisses dans les 5 jours suivants l'arrêt du traitement. Le para-cymène, bien que majoritaire dans le produit administré, n'est pas retrouvé, que ce soit dans les 5 pools de jus de viande ou dans le sérum des animaux.

Une étude *in vitro* réalisée en parallèle, sur le seuil de sensibilité du Premi®Test et de la méthode des 4 boîtes à cinq aliments complémentaires à base d'HE, a montré que ces derniers réagissent au minimum à une quantité de 2,5 mg d'HE (Ruppin et al., 2018). De plus, une autre étude sur le Delvo®Test

(identique au Premi®Test mais adapté au lait) a montré un seuil de sensibilité au thymol, carvacrol et cinnamaldéhyde de 1 à 2 mg/kg (O'Donnell et al., 2011). La seule donnée disponible concernant la méthode des 4 boîtes est le seuil le plus bas aux résidus d'antibiotiques : 50 µg/kg (Diez et al., 2009). Nos résultats semblent donc cohérents, les tests de détection rapide s'étant tous révélés négatifs car les résidus sont présents en quantité trop faible dans les échantillons testés, ou du moins en quantité bien inférieure aux seuils de détection des deux tests utilisés.

En 2015, l'EFSA a publié une étude sur les résidus de carvacrol, thymol et cinnamaldéhyde après utilisation d'un aliment complémentaire (100 mg/kg) contenant ces trois molécules. Les résultats sont similaires aux nôtres, avec des traces de ces molécules n'excédant pas 5 µg/kg dans la viande (EFSA FEEDAP, 2015). Il faut rappeler que certains aliments consommés au quotidien peuvent contenir jusqu'à 122 mg/kg de cinnamaldéhyde (barre de céréale à la cannelle). Ces traces de résidus (50000 fois inférieures) semblent donc garantir une sécurité d'utilisation du produit à base d'HE testé pour l'animal et le consommateur. Néanmoins, nous n'avons utilisé qu'un seul produit, dans un seul élevage et à une seule dose, ce qui ne permet pas de généraliser nos résultats. Ils doivent être confirmés et validés dans d'autres élevages, à différentes doses et avec d'autres produits à base d'HE.

Une étude cinétique complémentaire paraît indispensable pour analyser parfaitement nos résultats. En effet, on ne connaît pas la biodisponibilité des composants antibactériens que nous avons recherchés par CPG-SM. D'autre part, si ces molécules sont liées à d'autres molécules dans le

sérum ou la viande, il est possible que nous n'ayons pas pu les doser complètement et sous-estimer leur concentration.

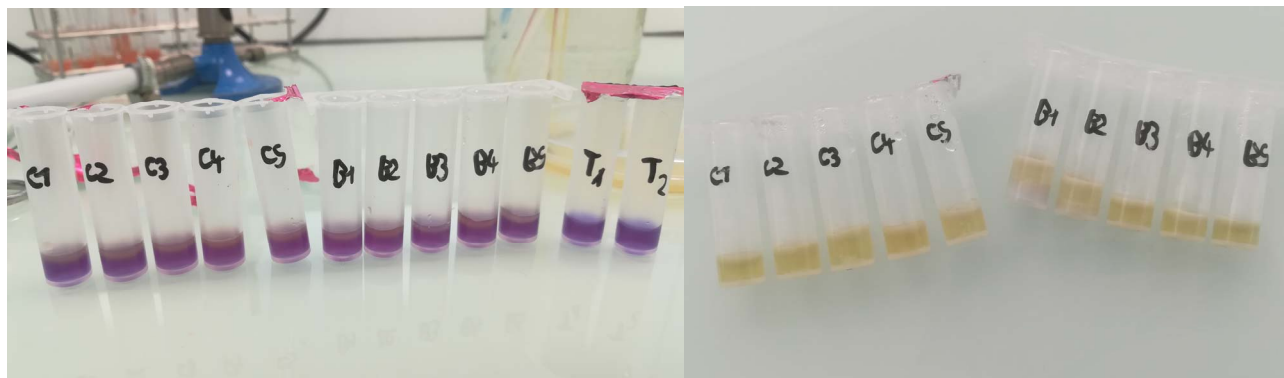
CONCLUSION

Le produit à base d'HE, à la dose utilisée, ne semble pas générer de résidus antibactériens (carvacrol, thymol, cinnamaldéhyde) en quantité significative, ceux-ci étant retrouvés à l'état de traces et apportés en partie par l'aliment dans les échantillons testés. La sécurité pour le consommateur semble donc être respectée et une LMR ne semble pas nécessaire. Le Premi®Test et la méthode des 4 boîtes, bien que capables de réagir aux molécules antibactériennes des HE, ont un seuil de sensibilité trop élevé pour détecter de si faibles quantités de résidus antibactériens.

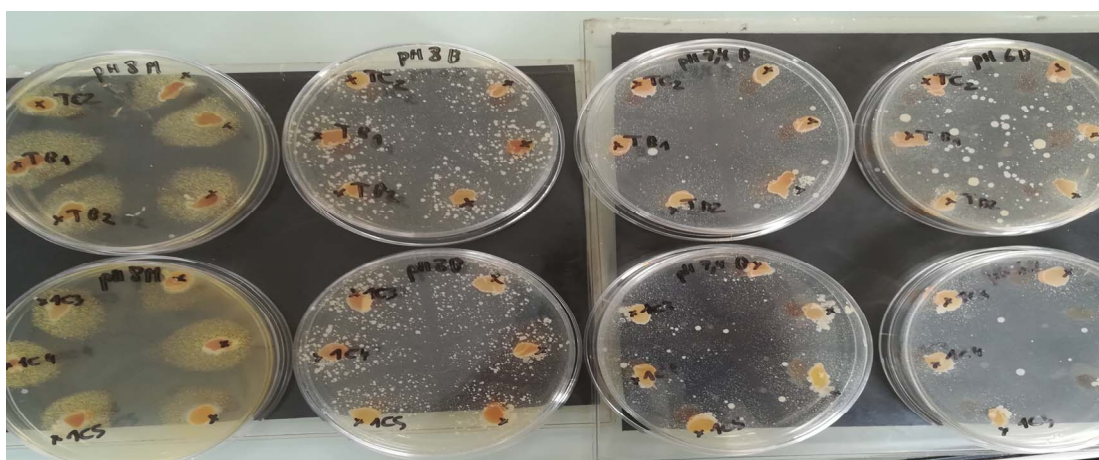
Il s'agit d'une étude préliminaire, dont les résultats doivent être confirmés, dans d'autres élevages et avec d'autres produits, et associés avec une étude cinétique qui paraît indispensable. L'association des deux permettrait de pouvoir apporter des éléments de discussion et de réflexion sur la nécessité de LMR pour les produits à base d'HE. Ceci correspond à une demande réitérée par l'Anses en avril 2018, mais répondrait à une interrogation plus globale des différents acteurs de la filière avicole. Une association avec des stations expérimentales, les LNR et les GDS pourrait permettre de recruter plus facilement les élevages, réaliser des analyses plus nombreuses et ainsi fournir des données à une plus large échelle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

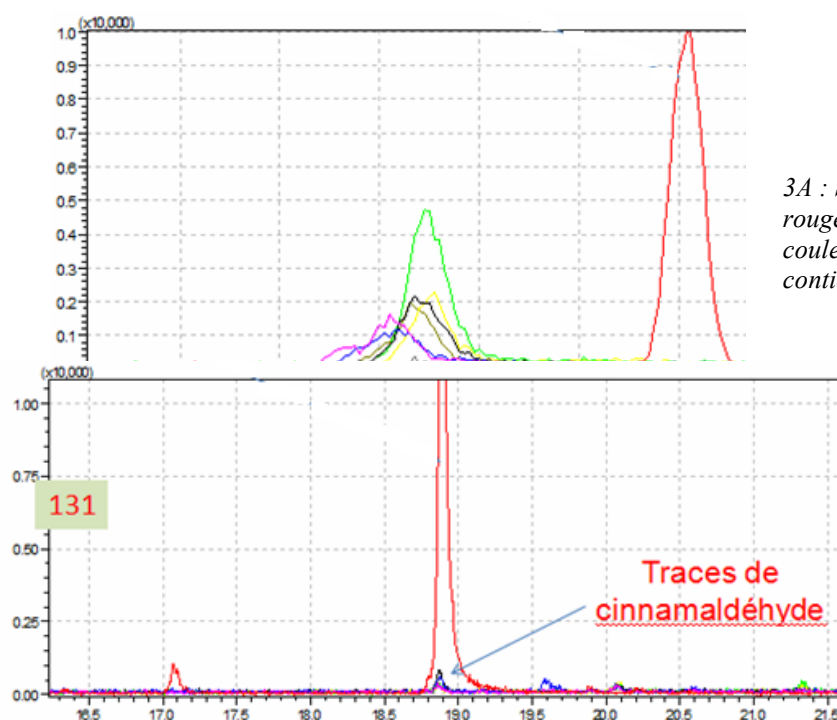
- Diez P., Medina E., Martín M. and Calderón V., (2009).** Validation of the five-plate screening test for the detection of antibiotic residues in food. Estimation of the limit of detection. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 16, pp. 109-130.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) (2015).** Scientific Opinion on the safety and efficacy of XTRACT® Evolution-B, Code X60-6930 (carvacrol, cinnamaldehyde and capsicum oleoresin), as a feed additive for chickens for fattening. *EFSA Journal*, 13(2):4011, pp. 18.
- O'Donnell, Stacey L., (2011).** The Efficacy of Antibiotic Residue Screening Tests for the Detection of Natural Antimicrobials in Milk. *Master's Theses* pp. 30-46. 175.
[EN LIGNE] http://digitalcommons.uconn.edu/gs_theses/175 consulté le 14/11/2018
- Ruppin R. (2018).** Recherche de résidus antibactériens dans la viande de Gallus gallus après administration d'un aliment complémentaire à base d'huiles essentielles dans le cadre de l'accompagnement d'une colibacillose. *Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine de Nantes, Oniris : Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'alimentation Nantes Atlantique*. 120 p

Figure 1 : Résultats des tests Premi®Test

*A gauche, tubes contenant 100 μ L de jus de viande avant incubation /
A droite les mêmes tubes après incubation : le jaune indique un résultat négatif*

Figure 2 : Résultats des expériences avec la méthode des 4 boîtes

*Ligne du haut : les bactéries (jaune et blanc) poussent au contact des échantillons témoins négatifs (cuisse et bréchet)
Ligne du bas : les bactéries poussent également au contact des échantillons de cuisses prélevés à l'arrêt du traitement :
le résultat est donc négatif*

Figure 3 : Exemples de résultats obtenus suite aux analyses CPG-SM sur les jus de viande

3A : Spectrogramme obtenu pour l'eucalyptol (pic rouge = témoin positif). Il n'y a pas de pics de couleurs sous le témoin positif : les échantillons ne contiennent pas d'eucalyptol.

3B : Spectrogramme obtenu pour le cinnamaldéhyde (pic rouge = témoin positif). On observe des petits pics de couleur (un par jour de prélèvement) sous le témoin positif : les échantillons contiennent des traces de cinnamaldéhyde (5 μ g/kg)