

EFFETS ANTIBACTERIENS ET SUR L'AMELIORATION DES PERFORMANCES D'UN MELANGE D'ACIDES ORGANIQUES, D'UNE SUBSTANCE PHYTOCHIMIQUE ET D'UNE SUBSTANCE PERMEABILISANTE CHEZ LE POULET DE CHAIR

Urbaityte Renata¹, Pasteiner Sigrid¹, Rouault Mickaël¹, Tenier Christian² et Guilherme Perazzo³

¹BIOMIN Holding GmbH - Industriestrasse, 21 - 3130 HERZOGENBURG (Autriche)

²BIOMIN France - Parc Technologique du Zoopôle, 5 rue Jean Rostand - 22440 PLOUFRAGAN (France)

³UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA - Cidade Universitária - 58000-000 JOAO PESSOA (Brésil)
christian.tenier@biomin.net

RÉSUMÉ

L'objectif de ces essais consiste à démontrer qu'un mélange d'acides organiques (AO), d'une substance phytochimique (Ph) et d'une substance perméabilisante (PS) inhibe la croissance de bactéries pathogènes, et, par conséquent, influence positivement les performances chez les poulets de chair (l'inhibition des bactéries limitant l'utilisation des nutriments par ces mêmes bactéries, les nutriments restent donc disponibles pour l'hôte). Dans l'essai *in vitro*, plusieurs souches bactériennes ont été cultivées et utilisées pour des essais sur micro-plaques : *Salmonella enteritidis* (SE), *Salmonella typhimurium* (ST), *E. coli* O55:K59 (B5):H (ECO55) et *E. coli* O128:H2 (ECO128). Les AO ont inhibé la croissance des souches SE, ST, ECO55 et ECO128 de 53,5, 59,3, 55,2 et 33,3% respectivement, alors que l'ajout de Ph a inhibé la croissance de SE, ST et des deux souches d'*E. coli* de 99,0, 99,8 et 100,0% respectivement. Après réduction des concentrations d'AO et de Ph dans le milieu, l'inhibition moyenne de la croissance de SE, ST, ECO55 et ECO128 par les AO et la Ph est de 6,9, 3,9, 29,5 et 2,3%, respectivement, alors qu'avec l'ajout de la PS, elle est de 86,2, 100,0, 70,5 et 100,0% respectivement. Un autre essai portant sur 300 poulets de chair et d'une durée de 42 jours a été mené afin de mesurer les effets sur les performances de croissance d'un aliment commercial, seul ou supplémenté soit en AO, Ph et PS à une dose de 1 kg/t d'aliment, soit en bacitracine de zinc et acidifiant à une dose de 150ppm et 0,5kg/t d'aliment respectivement. Le poids vif final et le gain moyen quotidien ont été significativement augmentés ($P < 0,05$) dans le groupe supplémenté avec le mélange d'AO, de Ph et de PS par comparaison avec le groupe témoin. En conclusion, l'addition d'un mélange d'AO, de Ph et de PS a permis d'inhiber *in vitro* la croissance de bactéries pathogènes et d'améliorer les performances de croissance chez le poulet de chair.

ABSTRACT

Effects of a mixture of organic acids, phytochemical and permeabilizing substance on the growth inhibition of bacteria and performance of broilers

Purpose of the experiments was to investigate if a mixture of organic acids (AO), a phytochemical (Ph) and a permeabilizing substance (PS) inhibits growth of pathogenic bacteria and thus positively influences broiler performance as host does not have to compete with bacteria for nutrients. For the *in vitro* trial *Salmonella enteritidis* (SE), *Salmonella typhimurium* (ST), *E. coli* O55:K59 (B5):H (ECO55) and *E. coli* O128:H2 (ECO128) were cultivated and used for a microplate assay. Growth inhibition of SE, ST, ECO55 and ECO128 by AO was 53.5, 59.3, 55.2 and 33.3%, respectively, while the addition of the Ph inhibited the growth of SE, ST and the two *E. coli* strains by 99.0, 99.8 and 100.0%. After adjusting the medium by reducing AO and Ph concentration growth inhibition of SE, ST, ECO55 and ECO128 by AO and the Ph was 6.9, 3.9, 29.5 and 2.3%, respectively, while the addition of PS inhibited growth by 86.2, 100.0, 70.5 and 100.0%, respectively. The effects of feeding a commercial diet or the same diet supplemented with AO, Ph and PS at 1kg/t of feed or with zinc bacitracin plus acidifier at 150ppm and 0.5kg/t of feed, respectively, on growth performance of broilers were investigated using 300 broilers in a 42 day experiment. Final body weight and daily weight gain was significantly ($P < 0.05$) increased in group receiving diet supplemented with the blend of AO, Ph and PS compared to birds in the control group. In conclusion, the addition of AO, Ph and PS inhibited growth of bacteria *in vitro* and improved growth performance of broilers.

INTRODUCTION

Les facteurs de croissance antibiotique (AGPs) ont été utilisés pendant plusieurs dizaines d'années en productions animales. Cependant, peu de temps après apparaissaient les premières souches de bactéries antibiorésistantes chez les animaux destinés à la consommation humaine (Starr et Reynolds, 1951; Barnes, 1958), générant des inquiétudes quant au risque de développement d'une antibiorésistance chez l'homme. Néanmoins, il reste essentiel de limiter les contaminations bactériennes qui ont aussi un coût en élevage. Les bactéries de la flore intestinale sont directement en compétition avec l'hôte pour l'utilisation des nutriments, elles peuvent sécréter des composés toxiques et initier des réponses immunitaires et inflammatoires, particulièrement dans le tractus gastro-intestinal (Dibner et Richards, 2005). De par leurs effets antimicrobiens, les acides organiques présentent un intérêt en tant qu'alternative aux AGPs. D'une part, l'utilisation d'acides organiques permet de réduire le pH, inhibant ainsi la croissance des micro-organismes pathogènes. D'autre part, les acides organiques sous forme non dissociée peuvent pénétrer dans la cellule bactérienne et détruire ses fonctions cellulaires vitales (Hansen *et al.*, 2007). Les substances phytochimiques sont des substances chimiques produites par des plantes aux propriétés protectrices et préventives. Par exemple, le cinnamaldéhyde (CA) est une substance phytochimique qui possède des propriétés antimicrobiennes. Il perturbe l'activité de la protéine FtsZ impliquée dans la division cellulaire des bactéries pathogènes : le CA se lie à la protéine FtsZ, perturbant son assemblage en filaments puis en anneau Z inhibant de cette façon le processus de division cellulaire (Domadia *et al.*, 2007). Cependant, bien qu'il existe des alternatives naturelles aux AGPs, lutter contre les bactéries Gram-négatif reste un défi. Les bactéries Gram-négatif possèdent une membrane cellulaire externe, qui agit comme une barrière et empêche l'entrée de composés toxiques dans la cellule qui pourraient détruire ses fonctions vitales (Cánovas *et al.*, 2005). Cette membrane externe peut être endommagée par des substances perméabilisantes (PS) qui rendent les cellules bactériennes sensibles aux composés toxiques (Alakomi, 2007). L'objectif de la présente étude consiste à évaluer l'effet synergique de différentes substances antimicrobiennes naturelles *in vitro* et tester l'efficacité de cette combinaison sur les performances de croissance de poulets de chair.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Essai in vitro

Les effets d'un mélange d'acides (MA; acides acétique, propionique et formique), de CA (Cinnamaldéhyde) et de PS (Substance

Perméabilisante) (Biotronic® Top3, Biomin Holding GmbH, Autriche) sur l'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes ont été testés *in vitro* via des essais sur micro-plaques. Les pathogènes suivants ont été testés : *Salmonella enteritidis* (DSM 9898), *Salmonella typhimurium* (DSM 554), *E. coli* O55:K59(B5):H (DSM 4779) et *E. coli* O128:H2 (DSM 8703). Un premier essai portant sur le MA et le CA a été mis en oeuvre afin de vérifier que l'addition du CA au MA peut améliorer l'effet inhibiteur de croissance des acides organiques sur des bactéries sélectionnées. Le milieu Trypticase Soy Broth (TSB, Oxoid) a été préparé en respectant les instructions du fabricant. Ensuite, le milieu a été stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Dans les deux essais, chaque souche a été cultivée à partir d'une culture cryo composée de 100 µl de suspension bactérienne décongelée et 10 ml de milieu, incubés toute la nuit à 37°C. Le lendemain, la culture principale a été préparée à partir de 100 µl de la culture incubée la nuit et de 10 ml de milieu. La culture principale a été incubée une nouvelle fois pendant 4 heures sans gazage pour s'assurer de la viabilité des souches. La densité optique (OD) des cultures principales a été mesurée à 690 nm à l'aide d'un photomètre à lampe tungstène. Lorsqu'aucune coloration n'est apparue, le milieu a été utilisé. Pour l'essai en micro-plaques, les cultures principales ont été diluées jusqu'à obtenir une OD de $0,1 \pm 0,015$, et, ensuite appliquées sur les micro-plaques. Les deux cultures de *Salmonella* ont été diluées au 1/10 et les deux souches d'*E. coli* au 1/15. Tous les puits de la micro-plaque ont été remplis avec des solutions et des suspensions bactériennes en adéquation avec le format des plaques. Les solutions tests ont été ajoutées, diluant le MA à une concentration finale de 0,135% et le CA à 0,0125%. Un second essai a été mis place afin de tester si l'ajout de PS pouvait améliorer significativement l'effet inhibiteur de croissance du mélange MA et CA. Les puits de la micro-plaque ont été remplis avec les suspensions bactériennes et les solutions de MA, CA et PS à des concentrations respectives de 0,15%, 0,0009% et 0,034%. Dans les deux essais, les micro-plaques ont été incubées à 37°C sans gazage. La densité optique des microplaques a été mesurée pour les deux essais avant et après 24h d'incubation à une longueur d'onde de 620 nm à l'aide d'un lecteur de plaque. Le changement de densité optique dans les puits test a été comparé aux changements dans les puits contenant le témoin de croissance. L'ampicilline a été utilisée comme témoin positif pour toutes les souches. Chaque essai micro-plaque a été réalisé trois fois avec 4 puits pour chaque substance testée, totalisant 12 sources de données par souche et par substance test. Les chiffres donnés dans la partie Résultats sont les valeurs moyennes de ces 12 sources de données pour chacune des souches, accompagnées des écarts-types.

1.2. Essai in vivo

450 poussins de chair (Ross 308) âgés d'un jour, de même origine, ont été répartis de façon aléatoire dans 3 groupes de traitement avec 6 répétitions (parquet) par traitement, et, 25 oiseaux par parquet. Le groupe témoin a reçu un régime standard ne contenant pas de facteur de croissance naturel ou antibiotique. Le groupe I a reçu un régime supplémenté avec un facteur de croissance naturel (NGP) composé d'un MA, de CA et de PS à un taux d'inclusion de 1 kg par tonne d'aliment. Le groupe II a reçu un régime supplémenté avec un facteur de croissance antibiotique (AGP) bacitracine de zinc et un NGP composé d'un mélange d'acides organiques à un taux d'inclusion de 150 ppm et 0,5 kg par tonne d'aliment respectivement. L'essai a été conduit sur une durée de 42 jours. Les régimes sont à base de maïs et de farine de soja et sont fournis *ad libitum*. Tous les oiseaux ont été pesés à chaque changement alimentaire et le gain moyen quotidien (GMQ) a été ensuite calculé. L'ingestion alimentaire a été enregistrée pour chaque période de croissance et l'indice de consommation calculé. Une analyse statistique a été réalisée par ANOVA grâce au logiciel SPSS.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

1.1. Résultats

1.1.1 Essai in vitro

Les résultats de l'essai *in vitro* (cf. Figures 1 et 2) ont montré que le MA seul inhibe la croissance de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O55:K59 (B5):H et *E. coli* O128:H2 de 53,5, 59,3, 55,2 et 33,3%, respectivement. Le CA seul inhibe de 23,4, 28,1, 30,7 et 18,4% respectivement la croissance de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* et celle des deux souches d'*E. coli*. La combinaison MA et CA a résulté en une inhibition de 99,0% de *Salmonella enteritidis*, 99,8% de *Salmonella typhimurium* et 100,0% des deux souches d'*E. coli*. Dans le second essai, le mélange MA et CA combiné à des niveaux plus bas par comparaison avec les essais précédents a inhibé la croissance de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O55:K59 (B5):H et *E. coli* O128:H2 de 6,9, 3,9, 29,5 et 2,3%, respectivement. L'addition de PS au mélange d'acides organiques et CA a résulté en une inhibition de la croissance de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O55:K59 (B5):H et *E. coli* O128:H2 de 86,2, 100,0, 70,5 et 100,0%, respectivement.

1.1.2 Essai in vivo

Les résultats de l'essai *in vivo* sont présentés dans le Tableau 1. Ils montrent que la supplémentation en NGP composé du mélange MA, CA et PS (Essai I+NGP) ainsi que la supplémentation en AGP+NGP composé d'acides organiques (Essai II+AGP/NGP) a

significativement amélioré le poids vif (PV) et le GMQ de 5% ($P < 0,05$) ainsi que l'efficacité alimentaire de 3% ($P > 0,05$) par comparaison avec le groupe témoin. Dans l'Essai I+NGP, l'indice de consommation et l'EPEF (Facteur Européen d'Efficacité de Production) ont été améliorés par comparaison avec les deux autres groupes.

1.2. Discussion

Il a déjà été démontré que l'utilisation de mélanges d'acides au lieu d'un seul acide avait une efficacité plus grande du fait d'un spectre d'action plus large (Namkung *et al.*, 2003). Cependant, il a été suggéré que la combinaison d'acides organiques / huiles essentielles aurait des actions bénéfiques dans différentes parties du tractus gastro-intestinal. Les acides organiques exerceraient leur activité dans l'aliment et la partie supérieure du tractus gastro-intestinal, les huiles essentielles dans la partie distale de l'intestin (Langhout, 2000). Les effets bénéfiques sur les bactéries devraient être donc visibles sur une grande partie du tractus gastro-intestinal. Les substances phytochimiques comme le CA sont des substances chimiques définies au même titre que les huiles essentielles (de Souza *et al.*, 2005). On peut donc s'attendre à observer des effets similaires quand on combine acides organiques et CA. L'effet synergique de la combinaison acides organiques et CA a été confirmé par les résultats des présentes études. On sait que la PS fragilise la membrane externe des bactéries Gram-négatif (Alakomi, 2001). On peut donc supposer que l'effet antimicrobien du mélange acides organiques et CA sur des bactéries Gram-négatif sera potentialisé en présence de PS. C'est ce que montre le deuxième essai : la synergie observée dans cet essai indique clairement que l'addition de PS améliore les effets des acides organiques et du CA grâce à une augmentation de la perméabilité de la membrane externe. L'essai *in vivo* met en évidence une amélioration des performances de croissance chez des poulets de chair supplémentés avec un mélange d'acides organiques, de CA et PS. Les essais en poulet ainsi qu'en porc ont montré qu'il est possible d'améliorer les performances animales avec un mélange alimentaire à base d'acides organiques en réduisant les infections gastro-intestinales d'origine bactérienne (Ricke, 2003; Garrido *et al.*, 2004). L'inhibition plus importante des bactéries Gram-négatif pourrait s'expliquer par les dommages causés à leur membrane externe. La membrane devenue perméable laisse entrer dans la cellule des substances externes comme les acides organiques ou le CA qui ont des effets antimicrobiens. (Alakomi, 2000). Dans le cadre de cet essai, on peut donc faire l'hypothèse selon laquelle l'amélioration des performances de croissance est possible grâce à la réduction de la charge bactérienne dans l'intestin par un mélange antimicrobien acides organiques, CA et PS. Les bactéries pathogènes étant inhibées, elles

n'entrent plus en compétition avec l'hôte pour l'utilisation des nutriments.

CONCLUSION

En conclusion, les résultats des essais *in vitro* indiquent que l'effet des acides organiques sur l'inhibition des bactéries peut être amélioré de façon synergique par l'inclusion de CA et de PS. L'essai *in vivo* confirme l'hypothèse selon laquelle une

supplémentation de l'aliment avec un mélange d'acides organiques, de CA et de PS augmente les performances de croissance chez le poulet de chair. L'amélioration des performances de croissance résulterait d'une réduction de la charge bactérienne dans le tractus gastro-intestinal. Cela reste une hypothèse qui nécessite des études supplémentaires pour être confirmée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALAKOMI, H.L. (2001). *Ph.D. Thesis*, University of Helsinki.
- BARNES, E.M. (1958). *British Veterinary Journal* 114: 333-344.
- CÁNOVAS, M., TORROGLOSA, T. and IBORRA, J.L. (2005). *Enzyme and Microbial Technology* 37: 300-308.
- DE SOUZA, E.L., DE OLIVEIRA, L.E., DE FREIRE, L.K.R. and DE SOUSA, P.C. (2005). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 245-250.
- DIBNER, J.J. and RICHARDS, J.D. (2005). *Poultry Science* 84: 634-643.
- DOMADIA, P., SWARUP, S., BHUNIA, A., SIVARAMAN, J. and DASGUPTA, D. (2007). *Biochemical Pharmacology* 74: 831-840.
- GARRIDO, M.N., SKJERVHEIM, M., OPPEGAARD, H. and SØRUM, H. (2004). *Applied and Environment Microbiology* 70: 5208-5213.
- HANSEN, C.F., RIIS, A.L., BRESSON, S., HOJBJERG, O. and JENSEN, B.B. (2007). *Livestock Science* 108: 206-209.
- LANGHOUT, P. (2000). *Feed Mix Special: Alternatives to antibiotics*, 24-27.
- NAMKUNG, H., LI, M., YU, H., COTTRILL, M., GONG, J. e DE LANGE, C.F.M. (2003). *Proceedings of the 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*, Alberta, Canada. pp. 93-95.
- RICKE, S.C. (2003). *Poultry Science* 82: 632-639.
- STARR, M.P. and REYNOLDS, D.M. (1951). *Proceedings of the 51st General Meeting of the Society of American Bacteriology*, Chicago, USA. pp. 15-34.

Tableau 1. Performances, Facteur Européen d'Efficacité de Production (EPEF) et mortalité des poulets de chair nourris avec un régime témoin ou un régime test supplémenté soit en antibiotique soit en facteur de croissance naturel (moyennes, écarts-types).

	Témoin AGP/NGP	Essai I+NGP	Essai II+AGP/NGP	Ecart-Type
Nombre d'animaux (n)	150	150	150	
Poids vif final (g/oiseau)	2630.0 ^a	2757.7 ^b	2679.7 ^{ab}	45.37
Ingestion alimentaire (g/oiseau)	4453.3	4585.0	4532.0	4.76
GMQ (g/oiseau)	62.6 ^a	65.7 ^b	63.8 ^{ab}	45.37
Indice de consommation	1.69	1.66	1.69	0.22
EPEF	331	353	345	
Mortalité, %	5.3	6.0	8.7	

AGP = facteur de croissance antibiotique, NGP = facteur de croissance naturel, EPEF = Facteur Européen d'Efficacité de Production: (viabilité [%] x poids vif final [kg]/âge [jours]/efficacité alimentaire) x 100; ^{a,b} différence significative (P<0,05).

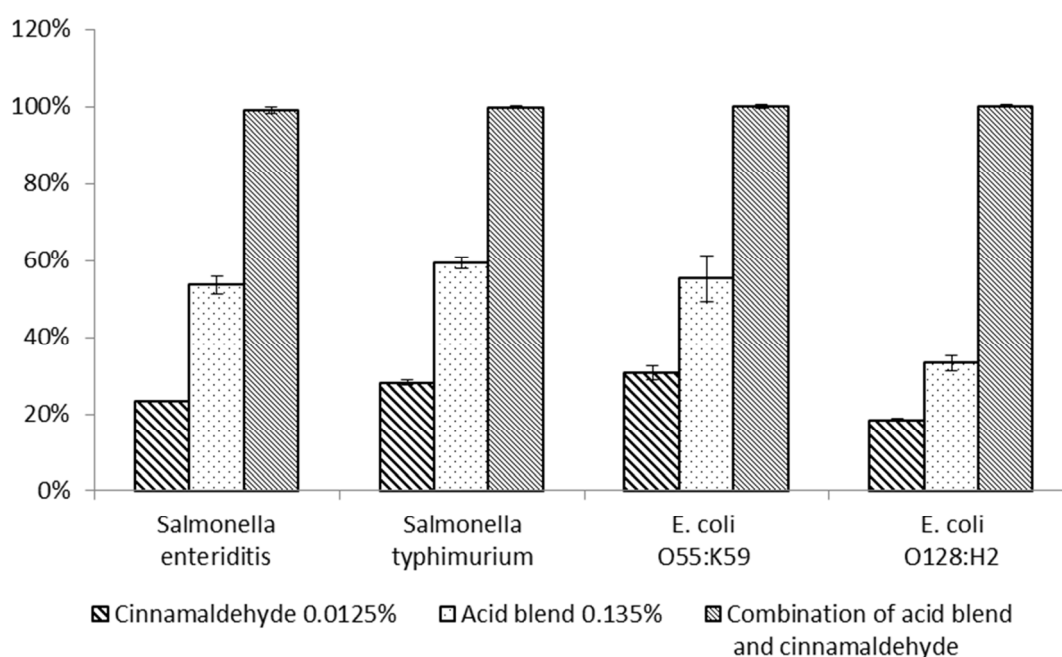


Figure 1. Inhibition de la croissance de *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* O55:K59 (B5):H et *E. coli* O128:H2 par du cinnamaldéhyde, un mélange d'acides organiques (formique, propionique et acétique) et un mélange d'acides organiques combiné à du cinnamaldéhyde (mélange antimicrobien)

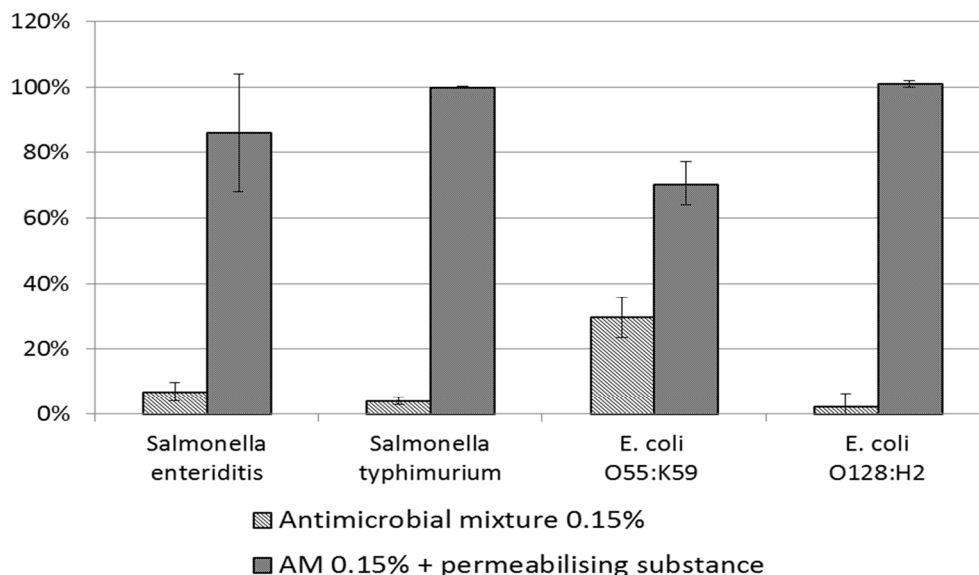


Figure 2. Inhibition de la croissance de *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* O55:K59 (B5):H et *E. coli* O128:H2 par un mélange d'acides formique, propionique et acétique combiné à du cinnamaldéhyde (mélange antimicrobien utilisé à de faibles concentrations par comparaison avec l'essai décrit en Figure 1), ce mélange antimicrobien étant combiné également à une substance perméabilisante