

EFFICACITE D'UNE NOUVELLE FORMULATION DU CARVACROL CONTRE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* EN ESSAI *IN VIVO* ET IMPACT SUR LE MICROBIOTE CAECAL.

Allaoua Marion¹, Combes Sylvie², Noirot Virginie¹, Etienne Pierre¹, Gabarrou Jean-François¹, Bouchez Olivier³, Treilhou Michel⁴, Bonnafé Elsa⁴

¹Phodé, 10 Avenue de la Martelle, 81150 Terssac, ²INRA GenPhySE, Université de Toulouse, INPT, ENVT, 31326 Castanet-Tolosan, ³GeT-PlaGe, Genotoul, INRA Auzerville, 31326 Castanet-Tolosan, ⁴INUC, équipe BTSB, Place de Verdun, 81000 Albi

mallaoua@phode.fr

RESUME

Campylobacter est la première cause bactérienne de maladie gastro-intestinale alimentaire. La principale source d'infection est la viande de volaille, majoritairement contaminée lors de l'éviscération à l'abattoir. L'administration orale de carvacrol peut être une méthode prometteuse pour réduire *Campylobacter* dans le tractus digestif mais ce composé est absorbé de façon proximale dans le système sanguin, et n'atteint ainsi pas les caeca où se multiplie la bactérie. Une nouvelle formulation galénique solide (Phodé, France) a été créée pour vectoriser le carvacrol. Dans cette étude, son efficacité (2,5 kg.T⁻¹ d'aliment) à diminuer la charge caecale en *C. jejuni* chez les poulets de chair artificiellement inoculés (10⁸ UFC/poulet) à 21 jours d'âge est évaluée. Le séquençage de l'ADNr 16S permet d'étudier l'impact de l'inoculation artificielle et de l'addition de la formulation sur le microbiote caecal. Cette étude est menée sur 3 groupes de poulets, un non inoculé et non traité, un inoculé non traité et un inoculé et traité. La formulation réduit la charge en *C. jejuni* de 1,4 log en comparaison avec le groupe inoculé non-traité (P<0,05). L'inoculation artificielle impacte la richesse observée du microbiote, sa diversité et l'abondance relative des genres majeurs. La formulation augmente (P<0,05) la diversité et modifie la structure du microbiote en comparaison avec le groupe contrôle inoculé mais non traité. Ainsi, cette formulation du carvacrol modifie le microbiote caecal et limite la croissance de *C. jejuni* en condition d'inoculation artificielle.

ABSTRACT

Efficacy of a new carvacrol-based product on *Campylobacter jejuni* in challenge test *in vivo* and impact on the whole caecal microbiota

Campylobacter is the leading cause of foodborne diarrheal disease. The main source of infection is the meat from poultry origin mostly contaminated during evisceration at slaughterhouse. Oral administration of carvacrol could be a promising method to reduce *Campylobacter* in the digestive tract but this compound is absorbed proximally in the blood system, so it does not get to the sites of *Campylobacter* growth which are the caeca. A new solid galenic formulation (Phodé, France) has been created to control the release of the carvacrol. In the present study, the efficacy of this formulation (2.5 kg.T⁻¹ feed) in decreasing the *C. jejuni* caecal load in broiler chickens artificially inoculated (10⁸ CFU/chicken) at 21 days is evaluated. The 16S rDNA sequencing allows us to study the impact of both artificial inoculation and addition of the formulation to the feed on the whole caecal microbiota. This study is conducted on 3 groups of chickens, one not inoculated and untreated, one inoculated and untreated and one inoculated and treated. The formulation decreases the *C. jejuni* load by 1.4 log in comparison with the inoculated and non-treated control (P<0.05). The artificial inoculation impacts the microbiota richness and the relative abundance of major genera. The formulation increases (P<0.05) the diversity and modifies the structure of the microbiota in comparison with the control samples (chickens inoculated but non-treated). The results show that this formulation of carvacrol modifies the caecal microbiota and limits the growth of *C. jejuni* under artificial inoculation conditions.

INTRODUCTION

Depuis 2005, la campylobactériose est la maladie zoonotique bactérienne d'origine alimentaire la plus fréquemment déclarée en Europe (Laroche et Magras, 2013; European Food Safety Authority, 2006). Le lait cru, l'eau ou encore la viande de bovins peuvent être incriminés dans les contaminations humaines, mais la principale source d'infection alimentaire est la viande de volaille ou les contaminations croisées avec celle-ci. *Campylobacter*, et plus particulièrement les espèces thermotolérantes *C. jejuni* et *C. coli*, sont principalement responsables de cette maladie. La volaille est souvent porteuse asymptomatique de cette bactérie et l'on estime qu'en Europe 71,2 % des poulets sont contaminés (European Food Safety Authority, 2010). Les bactéries du genre *Campylobacter* se développent principalement dans les caeca des poulets, et en plus faible proportion dans le gros intestin et le cloaque (Dhillon et al, 2006).

Les composés d'huiles essentielles et en particulier les monoterpènes phénoliques possèdent des propriétés antibactériennes intéressantes *in vitro* (Ultee et al, 2002; Di Pasqua et al, 2006). Toutefois, les propriétés hydrophobes des monoterpènes phénoliques, comme le carvacrol, mènent à une absorption proximale de ces composés dans le système sanguin. N'atteignant pas les caeca, ils perdent leur intérêt antibactérien (Kohlert et al, 2000; Rubió et al, 2012). Ainsi, l'administration orale d'une nouvelle formulation galénique du carvacrol, à libération contrôlée dans les caeca et le gros intestin, pourrait être une bonne solution pour réduire *Campylobacter* dans le tractus digestif des poulets. Cette formulation a notamment permis de retrouver 2h après administration, 52 % de l'actif au niveau caecal (Allaoua et al, 2018).

L'objectif de cette étude était d'évaluer *in vivo* l'efficacité d'une forme vectorisée et protégée du carvacrol ajoutée à l'aliment. Pour cela nous avons inoculé artificiellement les poulets, mesuré la croissance de *C. jejuni* dans les caeca et étudié la communauté bactérienne caecale par séquençage de l'ADNr 16S.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Expérimentation animale

Cet essai a été mené selon les standards éthiques et avec l'accord du comité d'éthique d'expérimentation animale du Centre Val de Loire, à la plateforme d'infection expérimentale (PFIE) de Tours-Nouzilly (02110.02).

Quatre-vingt-dix poussins mâles ROSS 308 d'un jour ont été séparés en 3 groupes (N=30), un non inoculé et non traité (nInT), un inoculé et non traité (InT), et un inoculé et traité pendant toute la durée de l'élevage (IT).

Les poulets ont été inoculés à 21 jours avec 10^8 CFU de *C. jejuni* par poulet. Le produit Phodé, dont le principe actif principal est le carvacrol, a été ajouté chez le groupe traité à 2,5 kg par tonne d'aliment tout au long du test.

Les euthanasies ont été réalisées à l'aide de CO₂ ou par dislocation cervicale en fonction de l'âge des animaux. Elles ont été réalisées sur 7 poulets de chaque groupe à 25, 31 et 35 jours (soit 4, 10 et 14 jours post-inoculation). Lors des autopsies, les deux caeca de chaque poulet ont été récupérés, congelés dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C.

1.2. Evaluation de la charge de *C. jejuni* dans les caeca

L'ADN des échantillons a été extrait à partir de 200 mg de contenu caecal, en utilisant le QiAmp Fast DNA Stool Mini Kit et en accord avec les instructions du fournisseur et le protocole de Josefsen *et al.* (Josefsen et al, 2015).

Le gène *hipO* de *C. jejuni* a été amplifié selon le protocole d'Allaoua *et al.* (Allaoua et al, 2018).

Les données ont été analysées avec le logiciel R (version 3.3.3, The R foundation for statistical computing, Vienne, Autriche). Les résultats suivant une distribution normale, un modèle linéaire à deux paramètres incluant l'âge des animaux et les traitements a été utilisé pour prédire le log d'expression. Les différences entre les traitements ont été ensuite analysées à l'aide d'un test post hoc de Tukey avec une correction de Bonferroni.

1.3. Exploration du microbiote caecal

Le gène de l'ADNr 16S microbien a été amplifié avec des amorces universelles liées à des adaptateurs et index (343F: 5'CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACG GRAGGCAG-CAG and 784R: 5'GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAC CAGGGTATCTAAT-CCT) ciblant la région V3-V4. Les amplicons des gènes d'ADNr 16S ont été générés via 30 cycles à 65°C sur un MiSeq Illumina à la plateforme GeT PLAGE (Toulouse, France). L'affiliation taxonomique des OTU (Operational taxonomic Unit) a été réalisée par BLAST en utilisant la base de données Silva 132. Pour chaque échantillon, la richesse (nombre d'OTU observé) et l' α -diversité (Shannon, InvSimpson) ont été estimées sur la base de 20675 séquences par échantillon. Pour comparer la structure de la communauté bactérienne dans l'ensemble des échantillons, une analyse de matrice de distance non-métrique (nMDS, non-Metric Distance Scaling) a été menée avec l'index de dissimilarité de Bray-Curtis.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Effet de la formulation sur la charge caecale en *Campylobacter jejuni*

Les poulets du groupe non inoculé et non traité sont exempts de *C. jejuni* tout au long du test. Les résultats des deux autres groupes sont présentés sur la figure 1. Le modèle linéaire utilisé pour les statistiques montre qu'il n'y a pas d'effet significatif de l'âge de prélèvement, mais qu'il y a un impact significatif du traitement et une interaction significative entre le jour et le traitement ($P < 0,05$). En effet, la comparaison entre le groupe traité et le contrôle inoculé mais non traité révèle une diminution significative d'1,4 log ($P < 0,05$) de la charge caecale en *C. jejuni* après 35 jours de traitement. Aucune différence n'a été observée entre les groupes à 25 jours (Figure 1).

2.2. Impact de l'inoculation artificielle et de l'ajout de la formulation à l'aliment, sur le microbiote caecal du poulet

L'âge, l'inoculation et le traitement structurent la communauté bactérienne caecale des poulets (figures 2). Dans ce jeu de données, 8 phyla, 63 familles et 186 genres ont été identifiés. Parmi les 186 genres, 58 % ont été affiliés avec un BLAST de plus de 97 %.

Sur la figure 2A, le nombre d'espèces observées (OTU) et les indices de diversité de Shannon et InvSimpson sont présentés. Comparativement au groupe contrôle non inoculé et non traité, l'inoculation artificielle avec *C. jejuni* (avec ou sans traitement) augmente significativement la richesse de la population à 31 et 35 jours, et sa diversité à 35 jours selon les deux indices. L'ajout de la formulation dans l'aliment des animaux inoculés augmente la richesse de la population à 31 et 35 jours par rapport au groupe contrôle non inoculé (nInT) mais pas par rapport au groupe contrôle inoculé et non traité (InT). La formulation augmente la diversité à 25 et 31 jours en comparaison avec les deux autres groupes, et à 35 jours en comparaison avec le groupe contrôle non inoculé. Chez les animaux inoculés, l'ajout de la formulation dans l'aliment semble stabiliser la diversité à des niveaux élevés.

La structure des communautés diffère fortement entre les trois lots comme en témoigne la séparation nette des trois groupes de points sur la figure 2B. Cette séparation est effective dès 25 jours d'âge. L'ajout de la formulation chez les animaux inoculés exerce la plus grande modification de la structure de la communauté comparativement aux lots contrôle.

Une évolution de la structure de la communauté avec le temps est observée dans les trois lots. Toutefois, l'inoculation et l'inoculation couplée à l'ajout de la formulation conduisent à une plus grande ressemblance des individus entre eux (moindre dispersion des points au sein d'un même lot) témoignant d'une action de contrainte sur la communauté comparativement au lot contrôle (figure 2B).

La figure 3 présente l'abondance des phyla dans le contenu caecal des poulets dans les trois groupes expérimentaux. Le phylum des *Firmicutes* est le plus abondant dans le contenu caecal des poulets, quel que soit l'âge ou le traitement ($\approx 70-95\%$). Chez le groupe nInT, on observe une augmentation significative de cette abondance entre 25 et 31 jours, puis une stabilisation entre J31 et J35. Dans les deux autres groupes on observe des abondances stables au cours du temps.

À 25 jours, l'abondance de *Firmicutes* est significativement plus élevée chez le groupe inoculé traité que chez le groupe contrôle non inoculé. De même, à 35 jours, cette abondance est significativement plus élevée dans ce groupe que dans les deux groupes contrôle n'ayant pas reçu le traitement.

Le phylum des *Proteobacteria* est le deuxième phyla le plus abondant ($\approx 5-29\%$) dans le contenu caecal des poulets. Chez le groupe InT, la proportion de *Proteobacteria* n'évolue pas en fonction de l'âge. Chez le groupe contrôle nInT, il n'y a pas d'évolution significative entre 25 et 31 jours, mais une diminution significative est visible entre 31 et 35 jours. Concernant le groupe inoculé et traité, aucune évolution n'est notée entre 25 et 31 jours ou entre 31 et 35 jours, mais une diminution significative est observée entre 25 et 35 jours.

La famille des *Enterobacteriaceae* est la plus représentée dans le phylum des *Proteobacteria*. En comparaison avec le groupe nInT, l'abondance de cette famille est diminuée significativement à 25 jours par l'inoculation artificielle avec *Campylobacter* (InT); et à 35 jours sous l'effet de la formulation chez les animaux inoculés (figure 4). À 35 jours l'abondance de *Campylobacteraceae* est significativement inférieure chez le groupe inoculé et traité en comparaison avec le groupe contrôle inoculé non traité.

Parmi les *Firmicutes*, les familles *Ruminococcaceae* et *Lachnospiraceae* sont retrouvées majoritairement chez les groupes inoculés. L'inoculation artificielle et le traitement avec la formulation n'ont pas d'effet sur l'abondance de la famille *Ruminococcaceae*. À 35 jours, l'abondance en *Lachnospiraceae* a été augmentée par l'inoculation artificielle; et à 25 jours elle est augmentée par le traitement avec la formulation chez les animaux inoculés comparativement aux deux autres groupes. Au sein du groupe contrôle inoculé et non traité, l'abondance en *Lachnospiraceae* augmente entre 25 et 35 jours.

3. CONCLUSION

En conclusion, le traitement avec le produit à base de carvacrol a diminué de 1,4 log de la charge caecale en *Campylobacter* après 35 jours de traitement.

Par ailleurs, cette étude confirme que l'inoculation avec *Campylobacter jejuni* a une influence sur la structure et la composition du microbiote. En effet,

suite à l'inoculation, il a été observé une augmentation de la diversité du microbiote, ainsi qu'une modification de l'abondance des phyla et des familles.

Des études ont déjà montré une modification du microbiote en présence de *Campylobacter* (Sakaridis et al, 2018; Sofka et al, 2015). Ces modifications n'étant pas les mêmes en fonction de la lignée de poulets, de l'alimentation, du sexe ou encore de la charge en *Campylobacter*.

Dans notre étude, la réduction de la charge en *Campylobacter* par l'utilisation d'une forme galénique vectorisée du carvacrol dans l'aliment s'est accompagnée d'une modification des caractéristiques du microbiote : diversité, composition taxonomique et structure. Si ces modifications semblent bénéfiques au regard de la colonisation de *Campylobacter* et par conséquent pour la santé publique, il conviendrait de poursuivre les investigations sur leur impact sur les performances zootechniques des poulets sur de plus grands effectifs.

Figure 1 : Cinétique de portage de *C. jejuni* chez les poulets ROSS 308 après le traitement avec le produit à base de carvacrol *via* l'alimentation

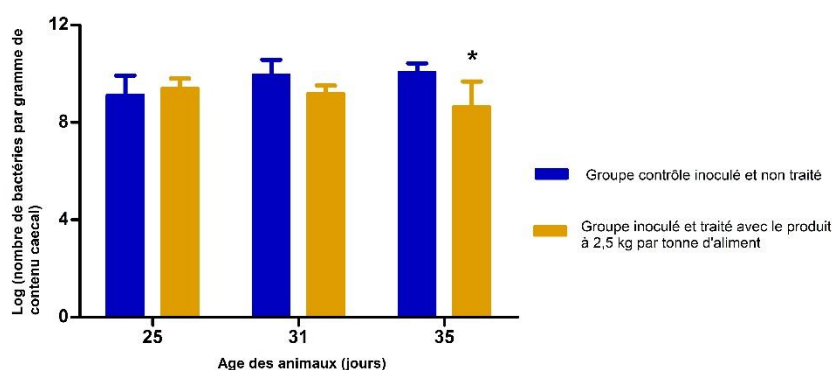


Figure 2 : Richesse et alpha-diversité (A) et bêta-diversité (B) du microbiote caecal du groupe inoculé et traité en comparaison des deux groupes contrôle.

Sur la figure B, plus les points sont éloignés et plus les microbiotes sont différents

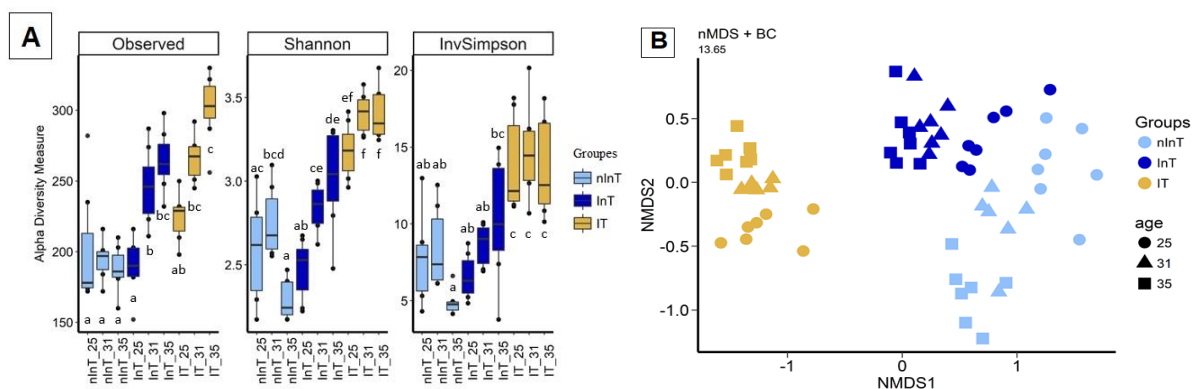
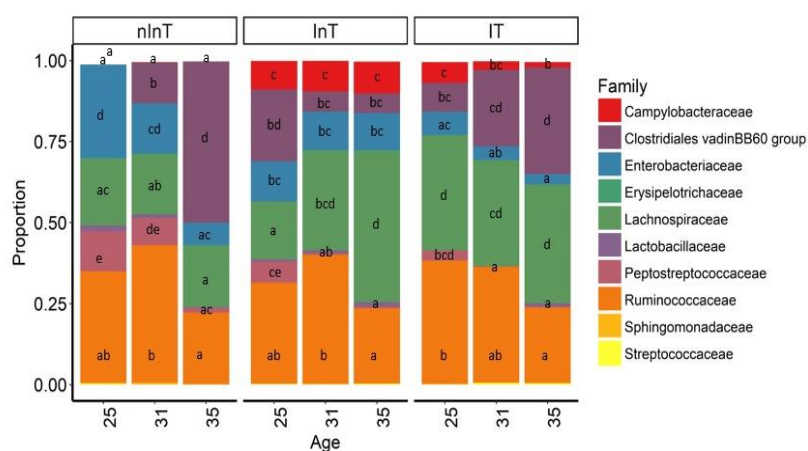


Figure 3 : Abondance relative des phyla dans le contenu caecal des poulets, pour chaque condition**Figure 4 :** Abondance relative des familles dans le contenu caecal des poulets, pour chaque condition

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allaoua M., Etienne P., Noiroit V., Carayon J.-L., Téné N., Bonnafé E., Treilhou M., 2018. *J. Appl. Microbiol.*, (125), 1162-1174.
- Dhillon A.S., Shivaprasad H.L., Schaberg D., Wier F., Weber S., Bandli D., 2006. *Avian Dis.*, (50), 55-58.
- Di Pasqua R., Hoskins N., Betts G., Mauriello G., 2006. *J. Agric. Food Chem.*, (54), 2745-2749.
- European Food Safety Authority, 2010. *Eur. Food Saf. Auth.*, (8).
- European Food Safety Authority, 2006. *EFSA J.*, (4).
- Josefsen M.H., Andersen S.C., Christensen J., Hoorfar J., 2015. *J. Microbiol. Methods*, (114), 30-34.
- Kohlert C., van Rensen I., März R., Schindler G., Graefe E.U., Veit M., 2000. *Planta Med.*, (66), 495-505.
- Laroche M., Magras C., 2013. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.*, (32), 685-699.
- Rubió L., Serra A., Macià A., Borràs X., Romero M.-P., Motilva M.-J., 2012. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, (905), 75-84.
- Sakaridis I., Ellis R.J., Cawthraw S.A., van Vliet A.H.M., Stekel D.J., Penell J., Chambers M., La Ragione R.M., Cook A.J., 2018. *Front. Microbiol.*, (9).
- Sofka D., Pfeifer A., Gleiss B., Paulsen P., Hilbert F., 2015. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, (128), 104-110.
- Ultee A., Bennik M.H.J., Moezelaar R., 2002. *Appl. Environ. Microbiol.*, (68), 1561-1568.