

**ETUDE DE L'ACTIVITE MODULATRICE D'HUILES ESSENTIELLES SUR LA
COLONISATION DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* CHEZ LE POUSSIN.
ANALYSE COMPAREE DU DENOMBREMENT BACTERIEN ET DE LA
COMPOSITION DU MICROBIOTE CAECAL PAR METAGENOMIQUE 16S**

Girard Claire¹, Chabrilat Thibaut¹, Kerros Sylvain¹

¹PHYTOSYNTHESE -57 avenue Jean Jaures- 63200 MOZAC,
Claire.girard@phytosynthese.com

RÉSUMÉ

Campylobacter jejuni (*C. jejuni*) est une bactérie du microbiote caecal des volailles de chair, responsable d'une des premières causes d'infection d'origine alimentaire chez l'Homme. Le contrôle du développement de ce pathogène est essentiel, et la limitation de la population de *C. jejuni* en élevage constitue une mesure de prévention supplémentaire. Le but de cette étude est d'évaluer l'activité anti-bactérienne d'un additif à base d'huiles essentielles (additif phyto) contre *C. jejuni* ainsi que ses propriétés modulatrices du microbiote caecal chez le poulet de chair. Dès l'éclosion, 60 poussins Ross sont nourris *ad libitum* avec de l'aliment sans antibiotique selon le schéma expérimental : un groupe de 30 poussins supplémentés de J0 à J17 avec 500g/t de l'additif HE dans l'aliment (Groupe EXP) et un groupe de 30 poussins non supplémentés (Groupe Témoin). A J14, les poussins sont inoculés avec *C. jejuni* (10⁴ UFC/oiseau). Trois jours post inoculation (J17), 15 oiseaux de chaque groupe sont euthanasiés et le contenu caecal est prélevé. Un dénombrement de *C. jejuni* est réalisé et les échantillons de chaque groupe sont classés en « fortement colonisé » (> 5log UFC/g) ou « faiblement colonisé » (<5log CFU/g). L'analyse statistique est réalisée avec le test exact de Fisher. Une analyse métagénomique des gènes codant l'ARNr 16S est menée en parallèle par séquençage haut débit avec la plateforme Illumina (MiSeq). L'abondance relative (en OTU) des taxons bactériens est analysée selon DESeq2. Cette étude montre que la supplémentation avec l'additif phyto tend à réduire post challenge (p=0.056) le nombre d'oiseaux fortement colonisés par *C. jejuni* (5 oiseaux sur 15 pour Groupe EXP sont faiblement colonisés par *C. jejuni* contre 11 sur 15 pour Groupe Témoin). De plus, l'analyse métagénomique montre que *C. jejuni* est un genre bactérien discriminant entre les groupes EXP et Témoin. En effet, l'abondance relative du genre *Campylobacter* est plus importante chez les oiseaux du groupe Témoin (p=0.009). Cette étude, combinant dénombrements bactériens et analyse métagénomique, montre que la supplémentation avec l'additif phyto tend à réduire la colonisation des oiseaux par *C. jejuni* en période d'exposition.

ABSTRACT

Study of essential oil balance effect against *Campylobacter jejuni* colonisation in chicks

Campylobacter jejuni (*C. jejuni*), a bacteria from poultry caecal microbiota, is responsible of one of the first causes of human food born disease. The control of its growth in farm is a keypoint for campylobacteriosis prevention. The aim of this study is to evaluate the antibacterial effect of an essential oil blend additive (EO additive) and to observe the caecal bacterial microbiota evolution in poultry. Since hatching, 60 Ross chicks are fed *ad libitum* without antibiotic feed additives: 30 chicks are fed with 500g/t of EO additive in feed from day 0 to day17 (EXP Group) and 30 chicks have no supplementation in feed (Control group). At day 14, all birds are inoculated with 10⁴ CFU/mL per bird of *C. jejuni*. 3 days post challenge (D17), 15 birds from each group are sacrificed and caecal contents are sampled. *C. jejuni* counting is performed and each sample from each group is rated as either "highly colonized" (> 5 log CFU/g) or "slightly colonized" (< 5 log CFU/g). Statistical analysis is performed with Fisher exact test. 16 S bacterial DNA from caecal contents is analysed by high throughput sequencing using Miseq Illumina technology. Relative abundance (OTU) of each taxonomic level is analysed with DESeq2. This study shows EO additive supplementation aim to minimize the number of birds "heavily colonized" by *C. jejuni* post challenge (5 birds on 15 for Group EXP are slightly colonized whereas 11 birds on 15 for Control group, p=0.056). Moreover, metagenomic analysis shows that *C. jejuni* is a selective bacterial genus between EXP Group and Control group. *C. jejuni* relative abundance from Control group birds are higher than the one of EXP Group (p=0.009). The combination of bacterial counting and metagenomics analysis in this study shows that EO additive supplementation contributes to reduce *C. jejuni* colonisation in challenge period.

INTRODUCTION

Les souches de *Campylobacter* sont des bactéries à Gram négatif du microbiote caecal des volailles, responsable d'une des premières causes d'infection d'origine alimentaire chez l'Homme. *C. jejuni* est une espèce pathogène pour l'Homme et aurait été détectée sur 65 % des viandes de poulet en France dans une étude de 2009 (Guyard-Nicodème et al., 2015). Le contrôle de son développement en élevage constitue une mesure de prévention importante pour limiter les toxi-infections, en complément des mesures de biosécurité. Des stratégies non antibiotiques sont à l'étude, telles des bactériophages ou des additifs alimentaires. Cette étude a pour but d'étudier la capacité d'un additif formulé à base d'huiles essentielles (additif HE) à réduire en situation de challenge, la colonisation intestinale de *C. jejuni* chez le poulet de chair, ainsi que son impact sur la composition du microbiote caecal. Avec le développement de nouvelles techniques de séquençage à haut débit, l'étude de la composition du microbiote intestinal a été rendue possible. Ces techniques permettent désormais d'étudier le matériel génétique et d'identifier des espèces jusque-là inconnues car non cultivables *in vitro* (Medinger et al., 2010). Cette technique peut aider à comprendre le mode d'action de l'additif sur la modification du microbiote et ainsi aider à réduire la prolifération de *C. jejuni*.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Conditions expérimentales

60 poussins Ross de 1 jour, vaccinés contre la maladie de Marek et contre la bronchite infectieuse ont été mis en place en station expérimentale.

Ils ont été répartis dans un même bâtiment, en 2 salles côte à côte de 1.95m² selon le schéma expérimental suivant : un groupe de 30 poussins supplémentés de J0 à J17 avec 500g/t de l'additif HE (Phyto CSC, Phytosynthese) dans l'aliment (Groupe EXP) et un groupe de 30 poussins non supplémentés (Groupe Témoin). Ils étaient nourris *ad libitum*. A J14, tous les poussins ont été inoculés avec *C. jejuni* A2008a (10⁴ UFC/oiseau). 3 jours post inoculation (J17), 15 oiseaux de chaque groupe ont été euthanasiés par une saignée précédée d'une éthernarcose et le contenu caecal a été prélevé.

1.2. Dénombrement bactérien

A J17, les contenus caecaux individuels ont été dilués au 1:9 (poids/volume) dans de l'eau peptonnée tamponnée (Hutchinson and Bolton, 1984). Après homogénéisation, 100µL d'une dilution préalable au 1/10^e ont été prélevés et ensemencés sur une gélose sélective mCCDA (Fisher Scientific). Après 48h d'incubation à 42°C en conditions microaérobies, les colonies de *C. jejuni* ont été dénombrées selon l'intervalle 10³ à 10⁸ UFC/g (Thibodeau et al., 2011). Les échantillons des groupes EXP et témoin ont été classés en « fortement colonisé » (> 5log UFC/g) ou « faiblement colonisé » (<5log UFC/g). L'analyse statistique a été réalisée avec le test exact de Fisher.

Une recherche de *C. jejuni* a été menée sur un échantillon composite de fientes fraîches (méconium et duvet à J0) sur l'ensemble des poussins avant de débiter l'essai. Cette démarche a suivi le même protocole que celui réalisé pour les dénombrements bactériens. Les colonies suspectes ont été testées par PCR-*Campylobacter* spécifique.

1.3. Analyse métagénomique

Une analyse métagénomique des gènes codant l'ARNr 16S a été menée en parallèle sur chaque contenu caecal des 2 groupes. Les extractions d'ADN ont été réalisées d'après Thibodeau et al (2017). Le séquençage haut débit a été effectué avec la plateforme Illumina (MiSeq) en 2x250 pb. L'analyse des données brutes a été exécutée avec DaDa2 (v 1.6.0) sous R studio (version de R 3.4.4) avec les packages suivants : phyloseq, ggplot2, vegan, dplyr, scales, grid, reshape2, igraph, ape, gplots, lme4, phangorn, plotly, tidyr, data.table, RColorBrewer, randomcoloR, DESeq2. La base de données Silva v132 a été utilisée pour l'assignation taxonomique des séquences. L'abondance relative (en OTU) des taxons bactériens dans les échantillons caecaux a été analysée avec le package DESeq2. Les différences entre les groupes ont été analysées statistiquement avec le test Permanova-adonis.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les dénombrements de *C. jejuni* dans les échantillons composites de fientes fraîches à J0 n'ont révélé aucune présence de *C. jejuni* chez les oiseaux.

La Figure 1 présente les résultats du dénombrement de *C. jejuni* à J17 dans les 2 groupes (EXP et Témoin) et selon l'intensité de la colonisation de *C. jejuni*.

Le groupe EXP présentait 1/3 d'oiseaux « fortement colonisés » alors que le groupe Témoin présentait 11

oiseaux sur 15 « fortement colonisés » ($p=0.056$). 3 jours post inoculation de *C. jejuni*, une tendance à une moindre proportion d'oiseaux fortement excréteurs lorsque supplémentés en additif HE a donc été mise en évidence. Ces résultats sont en accord avec ceux de Arsi et al. (2014), qui montrait l'intérêt potentiel d'une supplémentation en thymol et en carvacrol sur la réduction de la colonisation de *C. jejuni* chez le poulet de chair.

L'abondance relative des OTUs pour chaque groupe est représentée par un graphique Multi dimensional scaling non métrique (NMDs) (Figure 2). Ce graphique permet de visualiser la structure des microbiotes. Chaque point représente un échantillon analysé : plus les points ou les groupes de points sont rapprochés, plus les structures des microbiotes des groupes sont semblables. A J17, l'analyse graphique montre que le microbiote des oiseaux du Groupe EXP possédait une structure différente de celui des oiseaux du Groupe Témoin : le centroïde associé au nuage de points des oiseaux non traités était différent de celui des animaux traités ($p < 0.001$, indice de Bray Curtis). La dispersion des animaux au sein des 2 nuages de points était la même (beta dispersion $p=0.57$, indice de Bray-Curtis), indiquant que à J17 la variance de la structure du microbiote au sein des 2 groupes était la même. L'ensemble des poussins ayant été élevés dans les mêmes conditions, la supplémentation de cet additif HE a donc pu avoir un impact sur la structure du microbiote des oiseaux, le différenciant de celui des animaux non supplémentés.

L'abondance relative des OTUs regroupés par genre bactérien a montré des différences significatives selon le traitement (Tableau 1). Ainsi, pour le groupe témoin, l'abondance relative du genre *Campylobacter* était 4,6 fois plus importante que dans le Groupe EXP (Facteur « fold change » = 4,6 exprimé en $\log_2$, $p=0.009$). L'analyse métagénomique montre que le genre *Campylobacter* est le plus différenciant pour le groupe témoin. L'analyse des genres bactériens qui regroupent de nombreuses espèces doit être corrélée au dénombrement de l'espèce pathogène. Ainsi les 2

méthodes d'analyse différentes (métagénomique et dénombrement bactérien) tendent à montrer une aptitude pour l'additif HE à limiter le développement de *Campylobacter* dans le caecum.

Certaines huiles essentielles ont démontré un mode d'action d'inhibition directe de la croissance de plusieurs pathogènes, y compris *C. jejuni* (Fisher and Phillips, 2006; Kotzekidou et al., 2008; Rota et al., 2004). Cette inhibition directe peut être ici une explication au plus grand nombre d'individus faiblement excréteurs de *C. jejuni* lorsqu'ils sont supplémentés en additif HE. Dans notre étude, l'additif HE a également un effet sur la structure du microbiote caecal (Figure 2). Une autre hypothèse pour expliquer la tendance à la moindre colonisation de *C. jejuni* est que cette influence permette une exclusion compétitive de *C. jejuni* par d'autres bactéries. En effet, l'exclusion compétitive désigne la réduction de la colonisation d'un pathogène en raison de l'occupation par une autre espèce, d'une niche écologique ou d'une compétition vis-à-vis d'une ressource (Nurmi and Rantala, 1973).

CONCLUSION

Cette étude qui combine dénombrement de *C. jejuni* et analyse métagénomique, permet de montrer la potentielle tendance inhibitrice de la colonisation de *C. jejuni* par un additif à base d'huiles essentielles sélectionnées. Les résultats obtenus montrent la pluralité des mécanismes d'action possibles de cet additif à la fois sur la bactérie en elle-même mais également sur l'équilibre du microbiote caecal du poulet de chair. Cet additif pourrait ainsi contribuer au contrôle des infections alimentaire dues à ce pathogène chez l'Homme. D'autres études à plus grandes échelles seront nécessaires pour valider la réduction de la prévalence de *Campylobacter* sur les carcasses de poulet.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arsi, K., Donoghue, A. M., Venkitanarayanan, K., Kollanoor-Johny, A., Fanatico, A. C., Blore, P. J. and Donoghue, D. J., 2014. J. Food Saf., 34(4), 321–325
 Fisher, K. and Phillips, C. A., 2006. J. Appl. Microbiol., 101(6)
 Guyard-Nicodème, M., Rivoal, K., Houard, E., Rose, V., Quesne, S., Mourand, G., Rouxel, S., Kempf, I., Guillier, L., Gauchard, F. and Chemaly, M., 2015. Int. J. Food Microbiol., 203, 8–14
 Hutchinson, D. N. and Bolton, F. J., 1984. J. Clin. Pathol., 37(8), 956–957
 Kotzekidou, P., Giannakidis, P. and Boulamatsis, A., 2008. LWT - Food Sci. Technol., 41(1), 119–127
 Medinger, R., Nolte, V., Pandey, R. V., Jost, S., Ottenwälder, B., Schlöter, C. and Boenigk, J., 2010. Mol. Ecol., 19, 32–40
 Nurmi, E. and Rantala, M., 1973. Nature, 241(5386), 210–211
 Rota, C., Carramiñana, J. J., Burillo, J. and Herrera, A., 2004. J. Food Prot., 67(6), 1252–1256

Thibodeau, A., Fravallo, P., Laurent-Lewandowski, S., Guévremont, E., Quessy, S. and Letellier, A., 2011. Can. J. Vet. Res. Rev. Can. Rech. Veterinaire, 75(4), 298–307
Thibodeau, A., Letellier, A., Yergeau, É., Larrivière-Gauthier, G. and Fravallo, P., 2017. Front. Microbiol., 8,

Figure 1: Nombre d'oiseaux fortement ou faiblement colonisés par *C. jejuni* à 17 jours d'âge (Test exact de Fisher $p=0.056$)

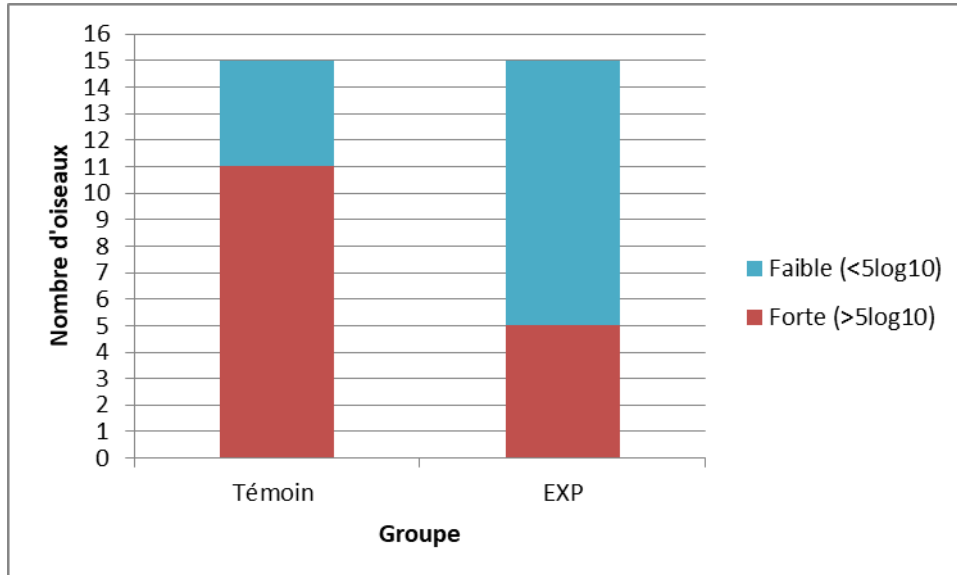


Figure 2 : Comparaison de la structure du microbiote 3 jours post challenge (J17) (indice de Bray-Curtis)

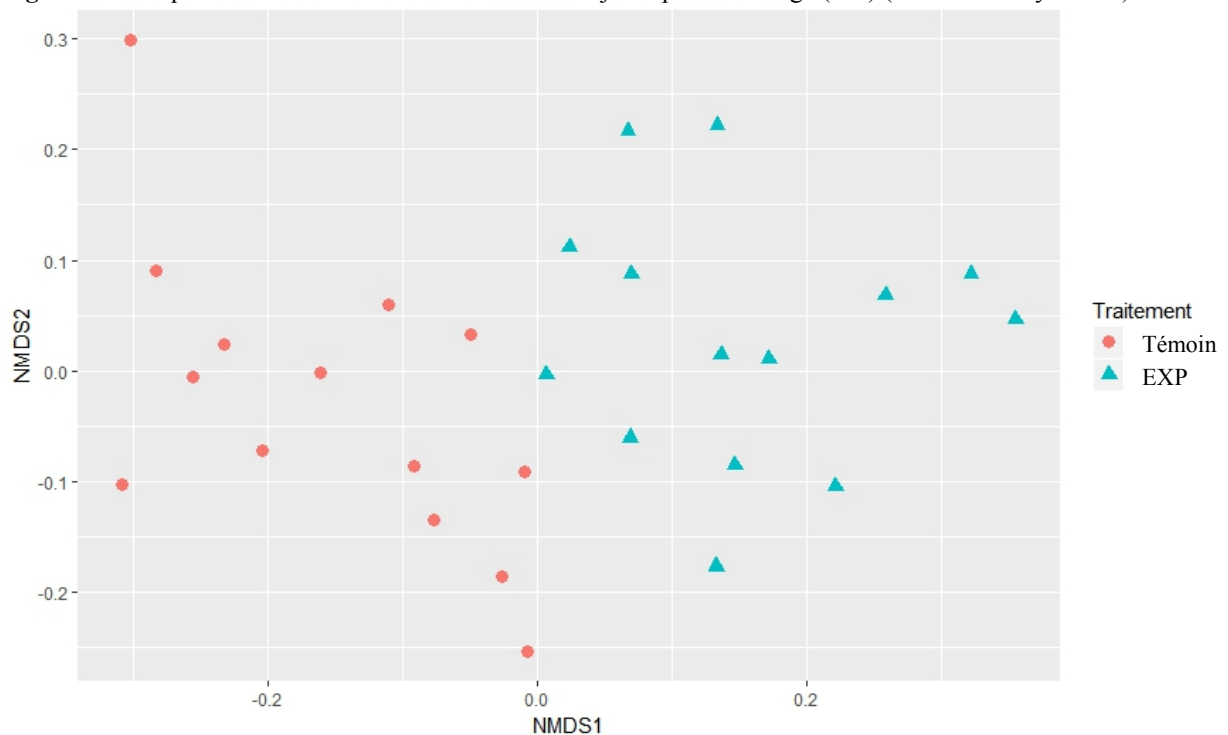


Tableau 1. Association de l'abondance relative des genres bactériens selon le traitement, après inoculation de *C. jejuni* A2008a

Traitement	Facteur	p	Assignation Taxonomique	
			Famille	Genre
Témoin	4,6	9 ^E -03	Campylobacteraceae	Campylobacter
	2,3	4 ^E -02	Lachnospiraceae	Blautia
	2,2	6 ^E -07	Ruminococcaceae	Intestinimonas
	1,5	2 ^E -03	Peptostreptococcaceae	Romboutsia
	1,5	4 ^E -05	Lachnospiraceae	ASF356
	1,0	8 ^E -05	Lactobacillaceae	Lactobacillus
	0,9	4 ^E -02	Erysipelotrichaceae	Erysipelatoclostridium
EXP	26,0	8 ^E -29	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae_UCG-005
	10,9	1 ^E -15	Ruminococcaceae	Subdoligranulum
	6,2	7 ^E -07	Enterobacteriaceae	Salmonella
	2,4	4 ^E -02	Staphylococcaceae	Jeotgaliococcus
	1,9	2 ^E -04	Leuconostocaceae	Weissella
	0,9	2 ^E -02	Clostridiales_vadinBB60_group	Clostridiales_vadinBB60_group_NA
	0,6	4 ^E -02	Ruminococcaceae	Ruminiclostridium_5