

ETUDE DE LA SENSIBILITE DES ENTEROCOQUES ET DES COLIBACILLES EN VOLAILLE SUR 5 HUILES ESSENTIELLES AVEC L'AROMATOGRAMME.

Mauvisseau Thierry ¹, Martineau Martine ¹, Sourisseau Louis¹

¹RESEAU CRISTAL-LABOVET CONSEIL-28 rue des Sables, 85140 LES ESSARTS, France
t.mauvisseau@reseaucristal.fr

RÉSUMÉ

Le recours aux huiles essentielles (HE) est une alternative aux antibiotiques en élevages. Cette thérapeutique répond aux attentes du Plan Eco antibio 2012 et a été soutenue avec la demande de recherche dans ce domaine avec le plan Eco Antibio II. La production de volaille sans antibiotique se développe fortement et le recours aux HE est de plus en plus fréquent dans un but thérapeutique. Malheureusement, peu d'études existent sur la réelle pertinence des plantes utilisées. L'objet de notre travail a été de retenir 5 HE (cannelle de Ceylan, girofle, niaouli, origan compact, thym à feuille de sarriette et thym à thymol), réputées actives sur les bactéries, que nous avons testées par la méthode de l'aromatogramme en milieu gélosé. Nous avons sélectionné 20 souches de colibacilles et 14 souches d'entérocoques, isolées sur animaux malades en élevages. Nous avons comparé les diamètres d'inhibition, ce qui a permis de quantifier le pouvoir antibactérien de ces 5 HE, avec une bonne sensibilité pour la cannelle, l'origan et le thym à thymol, avec une sensibilité plus importante pour les colibacilles que pour les entérocoques, avec cependant des différences significatives entre les différentes souches. Le niaouli n'a pas d'activité antibactérienne et le girofle et le thym à sarriette une activité assez faible. La différence de sensibilité constatée sur certaines souches peut expliquer les moins bonnes réponses thérapeutiques parfois observées.

ABSTRACT

Study of the sensitivity of enterococci and colibacilli in poultry on 5 essential oils with the aromatogram.

The use of essential oils (EOs) is an alternative to antibiotics in farms. This therapy meets the expectations of the Eco Antibio Plan 2012 and has been supported by the demand for research in this area with the Eco Antibio II plan. The production of poultry without antibiotics is developing strongly and the use of EO is more and more frequent for therapeutic purposes. Unfortunately, few studies exist on the real relevance of the plants used. The object of our work was to retain 5 EOs (Ceylon cinnamon, Cloves, Niaouli, Compact oregano, Savory leaf thyme and Thymol thyme), deemed to be active on bacteria, which we tested by the method of aromatogram in agar medium. We have selected 20 strains of colibacilli and 14 strains of enterococci, isolated from sick animals in farms. We compared the diameters of inhibition which made it possible to quantify the antibacterial power of these 5 EOs, with good sensitivity for cinnamon, oregano and thymol thyme with greater sensitivity for colibacilli than for enterococci, however with significant differences between the different strains. Niaouli has no antibacterial activity and Clove and Savory thyme a fairly low activity. The difference in sensitivity observed on certain strains may explain the poorer therapeutic responses sometimes observed.

INTRODUCTION

L'application du plan Eco Antibio I en 2012-2016 a permis de réduire de plus de 25 % le recours aux antibiotiques en production animale. La finalité était de limiter l'apparition de bactéries multirésistantes qui pouvait diminuer l'efficacité des antibiotiques en médecine humaine (ANSES, 2014). Dans le domaine de la volaille, les antibiotiques sont majoritairement utilisés sur la colibacillose avec des formes respiratoires rapidement septicémiques, et sur des pathologies articulaires générées par des entérocoques. Diverses solutions alternatives aux antibiotiques ont été étudiées telles que les huiles essentielles (HE). Ces substances issues des plantes aromatiques par distillation, renferment des molécules à fort pouvoir antibactérien pour certaines, pouvant être utilisées en remplacement des antibiotiques en élevage. Ces solutions sont de plus en plus administrées devant le développement croissant de productions animales élevées avec des cahiers des charges sans antibiotiques. En médecine humaine, le nombre de publications relatives à l'utilisation des HE est croissant (Melo et al., 2015) et divers germes bactériens ont pu être testés permettant d'établir un panel d'HE potentiellement utilisables dans un but thérapeutique. Ces études ont permis à des médecins aromathérapeutes formés de traiter des affections bactériennes au quotidien sans antibiotiques, et parfois des affections multirésistantes. (Franchomme et al., 2001). En médecine vétérinaire, le nombre de publications est assez peu conséquent. Le Plan Eco Antibio II (2017) incite à développer la recherche sur l'aromathérapie vétérinaire. L'objectif de cette étude a été d'étudier 5 HE souvent utilisées en élevage pour leurs propriétés reconnues comme antibactériennes (cannelle de Chine, clou de girofle, niaouli, origan, thym à sarriette et thym à thymol) (Dahigaonkar et al., 2018) (Fournomiti et al., 2015) (Oussalah et al., 2006). Ces HE ont été testées sur 20 colibacilles et 14 entérocoques. Nous avons travaillé avec des HE chémotypées, dont le profil chimique est bien connu et avons privilégié celles à base de composants antibactériens majeurs, tels que les phénols et des aldéhydes aromatiques. Afin de pouvoir valider cette efficacité antibactérienne, nous avons eu recours à une technique de laboratoire : l'aromatogramme en milieu gélosé, qui permet de mesurer le diamètre d'inhibition généré par l'huile essentielle sur la souche bactérienne retenue. Nous avons voulu comparer 2 familles de bactéries : les colibacilles et les entérocoques, afin de vérifier si les diamètres d'inhibition diffèrent d'une bactérie à l'autre. Ensuite, nous avons comparé les résultats des 20 colibacilles entre eux afin de vérifier s'il y avait des différences de sensibilités suivant les souches de colibacilles isolés. Le même travail a été réalisé sur les 14 entérocoques.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Les souches

Nous avons sélectionné des colibacilles isolés sur affection clinique avec mortalité en élevage de volaille (poulet, poule et dinde). Ces souches sont conservées en gélose longue conservation à température ambiante. Nous avons retenu 5 colibacilles O78K80 et 3 *E. coli* O2K1, sérotypes réputés pathogènes pour la volaille et 12 colibacilles dits non sérotypés n'appartenant pas aux sérotypes O78K80, O2K1 et O1K1. (Mansouri et al., 2018). Ces colibacilles étaient responsables de mortalité anormale en élevage, nécessitant un traitement avec un antibiotique ou avec des mélanges d'huiles essentielles. Nous avons également retenu des entérocoques qui sont responsables de troubles locomoteurs surtout en poulet à forte croissance, nécessitant un traitement à l'amoxicilline, antibiotique à spectre gram positif. Les isollements ont été réalisés sur des lésions articulaires (arthrite, spondylolisthésis ou ostéomyélite) ou au niveau de la moelle osseuse. 9 *E. cecorum* et 5 *E. hirae* ont été retenus dans notre étude à partir de notre souchothèque.

1.2. Les HE

Nous avons sélectionné des HE chémotypées dont le composant aromatique majeur ou différentiant vis-à-vis de la même plante était connu (Faucon, 2015). Pour ce faire nous avons eu recours à des HE de qualité pharmaceutique (Matière Première à Usage Pharmaceutique : MPUP). Une HE est composée de plusieurs substances aromatiques qu'il est possible de déterminer et de quantifier à l'aide d'une chromatographie en phase gazeuse. Toutes ces substances n'ont pas des propriétés antibactériennes (Ex des esters, les coumarines), nous avons donc ciblé principalement des HE réputées contenir des substances agissant sur les bactéries. Les phénols avec le thymol (HE de thym, chémotypée thymol : K), le carvacrol (origan compact : H et thym à feuille de sarriette : J) et l'eugénol (HE de clou de girofle : D). Les aldéhydes aromatiques avec le cinnamaldéhyde (cannelle de Ceylan : B) et enfin des oxydes moins antibactériens mais de très bons antiviraux et expectorants avec le 1-8 cinéol retrouvé dans l'HE de niaouli.

1.3. La méthode

Nous avons utilisé la technique de l'aromatogramme en milieu gélosé. (Calvo et al., 2006) pour identifier d'éventuels diamètres d'inhibition générés par l'HE. Un inoculum a été préparé à partir de chaque bactérie dans une solution d'eau physiologique, permettant d'obtenir une suspension à 0,5 Mac Farland. La

suspension est diluée pour obtenir une concentration souhaitée à 10^7 UFC/ml pour les colibacilles et 10^8 pour les entérocoques. L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage à partir de l'inoculum attendu sur une gélose de Mueller Hinton. L'HE est déposée sur un buvard en papier Wattman de 6 mm de diamètre selon 2 volumes : 3 et 5 μ l et un buvard avec de l'eau déminéralisée faisant office de témoin négatif. Les boîtes sont ensuite mises à l'incubation à 37°C pendant 24 heures. L'activité antibactérienne se manifeste par un halo plus ou moins large autour du buvard qui a été mesuré à l'aide de pied à coulisse. Chaque essai est réalisé en duplicate, la moyenne des 2 mesures est calculée. Dans la mesure où les lectures n'ont pas été réalisées à l'aide d'un lecteur optique, de légers écarts de l'ordre du millimètre peuvent être observés avec le pied à coulisse. Entre 6 et 10 mm de diamètre, la sensibilité est qualifiée de « assez faible » ; de 10- 20 mm de diamètre, la sensibilité est dite « significative » et au-delà de 20 mm de diamètre la sensibilité est dite « élevée ». Dans la mesure où le diamètre du buvard est de 6 mm, il ne peut y avoir de diamètre inférieur. Tout diamètre égal à 6 mm indique qu'il n'y a pas de halo autour du disque et donc, par conséquent, que l'HE n'a pas généré d'inhibition de la souche bactérienne. Il y a donc résistance.

1.4. Analyse statistique

Les diamètres d'inhibition moyens sont ensuite comparés pour chaque germe et pour chaque HE, à l'aide du test statistique non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney et le logiciel BioStaTGV en ligne, afin de déterminer si les diamètres sont statistiquement différents entre les colibacilles et les entérocoques.

Une représentation graphique avec des boîtes à moustache permet de déterminer la répartition des mesures pour chaque genre bactérien et ainsi de répondre à la question de savoir si certaines souches sont plus sensibles que d'autres vis-à-vis d'une HE, comme cela a été depuis longtemps constaté avec les antibiotiques.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Résultat

Les diamètres d'inhibition mesurés sur les colibacilles sont plus élevés à 3 et 5 μ l que ceux des entérocoques. (Tableaux 1). Les mesures s'étalent de 6 à 40 mm. Trois HE semblent particulières actives sur les 2 bactéries à savoir les HE B, H et K. avec des diamètres d'inhibition supérieurs à 20 mm. Les diamètres observés sont toujours plus faibles à 3 μ l qu'à 5 μ l.

Pour un même genre bactérien, les diamètres à 3 et 5 μ l ne sont pas tous homogènes, et certains présentent des valeurs très élevées par rapport aux médianes des diamètres : pour d'autres la dispersion est beaucoup plus restreinte (Figures 1-4).

Pour les colibacilles, l'huile G ne génère pas de diamètres d'inhibition à 3 μ l et un très léger diamètre à 5 μ l pour la souche 1966 de *E. coli* NS. L'activité antibactérienne de l'huile G est donc très faible.

Les HE D et J génèrent un faible diamètre pour les souches de *E. coli* à 3 μ l et à 5 μ l, avec une faible amplitude (<10 mm) avec des résultats légèrement plus élevés pour l'HE D.

Pour les HE B, H et K les diamètres d'inhibition sont plus élevés mais avec des amplitudes beaucoup plus larges (15 à 20 mm) La souche 2611 de *E. coli* NS présente un diamètre très élevé à 34,5 mm à 5 μ l pour l'HE K. et 33 mm pour 3 μ l. Les diamètres pour l'HE K semblent plus variables par rapport aux HE B et H.

Les mêmes remarques peuvent être faites pour les entérocoques avec la souche de *E. cecorum* (19-0190) présentant des diamètres beaucoup plus élevés > 30 mm que la moyenne pour les HE H et K à 3 μ l et à 5 μ l. A l'inverse la souche d'*E. hirae* 21-2236 génère des diamètres < 20 mm.

L'analyse statistique par le test de Wilcoxon Mann Whitney (Tableau 2) des diamètres à 3 μ l et à 5 μ l pour chaque HE entre les entérocoques et les colibacilles, nous indique une différence significative pour 4 HE B, D, H et J à 3 et 5 μ l ($p < 0,05$) et une différence significative pour l'HE K uniquement à 5 μ l. Il n'y a de différence pour l'HE G aux 2 dosages ($P > 0,05$).

2.2 Discussion

Les HE B, H et K, respectivement la cannelle, l'origan et le thym à thymol, sont les 3 HE majeures générant les plus grands diamètres d'inhibition pour les colibacilles comme pour les entérocoques. Cependant au sein d'une même famille, les diamètres observés sont très variables et certaines souches sont moyennement sensibles alors que d'autres le sont beaucoup plus. Ce qui pourrait expliquer des efficacités différentes suivant les souches identifiées.

La baisse des diamètres d'inhibition entre 3 μ l et 5 μ l indique bien que la quantité de composant aromatique est liée à la taille du halo est donc à la sensibilité. De ce fait pour qu'un produit revendique une vraie activité antibactérienne, il est important d'avoir une bonne quantité de principe actif antibactérien. Des produits sous dosés bien que contenant des actifs antibactériens peuvent ne pas avoir d'activité antibactérienne et s'avérer inefficaces.

L'HE G (le niaouli) ne présente pratiquement pas de diamètre d'inhibition tant à 5 μ l qu'à 3 μ l, cette HE n'a donc pas d'activité antibactérienne. Le 1-8 cinéol

est plus réputé pour son activité mucolytique et son activité antivirale que pour son activité antibactérienne.

L'HE D (le clou de Girofle) semble avoir une activité antibactérienne plus élevée sur les colibacilles avec un diamètre supérieur à 10 mm aux 2 dosages et moins bonne pour les entérocoques.

L'HE J (thym à feuille de sarriette) bien que comportant du carvacrol comme pour l'origan (Huile H) semble moyennement actif sur les colibacilles et sur une souche d'entérocoque.

Les colibacilles sont plus sensibles à l'origan que les entérocoques aux 2 dosages ; pour les autres HE, la différence n'est significative qu'à 5 µl pour le thym à Thymol et à feuille de Sarriette.

La différence d'efficacité pourrait s'expliquer par la différence de structure de la paroi des bactéries plus épaisse sur les bactéries à Gram positif. L'activité antibactérienne des HE est conférée par sa lipophilie qui lui permet de traverser les membranes phospholipidiques et de créer des trous générant des fuites d'ions potassium néfastes pour la survie de la bactérie (Swamy et al., 2016), les HE traversant plus rapidement, probablement, les bactéries à Gram négatif où la paroi est plus fine.

CONCLUSION

Les HE de cannelle, de thym à Thymol et d'origan permettent d'inhiber la croissance in vitro des entérocoques et des colibacilles avec une activité plus importante sur les colibacilles à dose équivalente.

Cette étude a permis de bien identifier plusieurs HE avec des actions potentielles qui pourraient être décuplées avec une association de ces HE. Une étude plus poussée du potentiel synergique pourrait être menée (Mauviseau, 2016).

La variabilité de sensibilité suivant les souches, démontrée par cette étude explique parfois des échecs aux traitements à base d'HE qui pourraient être limités en prenant soin de réaliser un aromatogramme comme cela est désormais vivement recommandé pour le recours aux antibiotiques avec l'antibiogramme. Le recours aux HE en médecine vétérinaire est donc une vraie thérapeutique alternative aux antibiotiques qui mérite un encadrement médical.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) 2014. Évaluation des risques d'émergence d'antibiorésistances liées aux modes d'utilisation des antibiotiques dans le domaine de la santé animale. Saisine n° 2011-SA-0071.
- Calvo, M. A., Arosemena, E. L., Shiva, C., & Adelantado, C., 2011, Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, 1179-1185.
- Dahigaonkar, K., Deshmukh, K., Kulkarni, S., & Mondal, R., 2018, World Journal of Pharmaceutical research (7) 372-382
- ECOANTIBIO II 2017-2021: Réduire l'utilisation des antibiotiques vétérinaires. <https://agriculture.gouv.fr/eoantibio>
- Faucon M, 2015 Traité d'aromathérapie scientifique et médicale. Ed Sang de la Terre.
- Fournomiti, M., Kimbaris, A., Mantzourani, I., Plessas, S., Theodoridou, I., Papaemmanouil, V., & Alexopoulos, A., 2015, Microbial ecology in health and disease, 26(1), 23289.
- Franchomme P., et al., 2001. L'aromathérapie exactement. Ed Jollos.
- Mansouri, N., Aoun, L., Dalichaouche, N., & Hadri, D., 2018, Veterinary world, 11(11), 1539.
- Mauviseau T., 2016. Le Point vétérinaire, (47), 76-83
- Melo, A. D. B., Amaral, A. F., Schaefer, G., Luciano, F. B., de Andrade, C., Costa, L. B., & Rostagno, M. H., 2015, Canadian journal of veterinary research, 79(4), 285-289.
- Oussalah, M., Caillet, S., & Lacroix, M., 2006, Journal of food protection, 69(5), 1046-1055.
- Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R., 2016, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016.

Tableau 1. Moyenne des diamètres d'inhibition pour les Entérocoques et les colibacilles à 3 et 5 µl pour les 5 HE

Enterocoque	Concentration (3 µL)			Concentration (5 µL)		
	Moyenne de Diamètre	Max. de Diamètre	Min. de Diamètre	Moyenne de Diamètre	Max. de Diamètre	Min. de Diamètre
B	19,39	25,50	14,50	21,00	27,50	15,50
D	9,46	11,50	7,00	10,79	13,50	9,00
G	6,07	6,50	6,00	6,14	7,00	6,00
H	20,00	30,50	16,00	22,61	34,00	18,50
J	8,29	10,00	6,00	11,46	17,50	9,50
K	19,82	29,50	15,00	22,25	33,50	15,00

Colibacille	Concentration (3 µL)			Concentration (5 µL)		
	Moyenne de Diamètre	Max. de Diamètre	Min. de Diamètre	Moyenne de Diamètre	Max. de Diamètre	Min. de Diamètre
B	25,95	30,00	21,00	29,05	33,50	25,00
D	13,13	17,50	11,50	15,15	20,00	12,00
G	6,00	6,00	6,00	6,28	10,50	6,00
H	23,95	30,50	17,50	29,98	40,00	21,00
J	9,90	11,00	8,50	12,88	17,50	8,00
K	21,00	33,00	14,50	27,90	37,00	20,50

Tableau 2. P value de la comparaison des diamètres entres colibacilles et entérocoques en fonction des HE (Test Wilcoxon-Mann-Whitney)

HE	Dosage	p value	Dosage	p value
B	3 µl	5,18E-05	5 µl	3,77E-05
D		1,54E-05		2,74E-04
G		0,1		0,51
H		0,032		0,0017
J		0,00046		0,044
K		0,98		0,012

Figure 1. Répartition des diamètres d'inhibition des Entérocoques à 5 µl

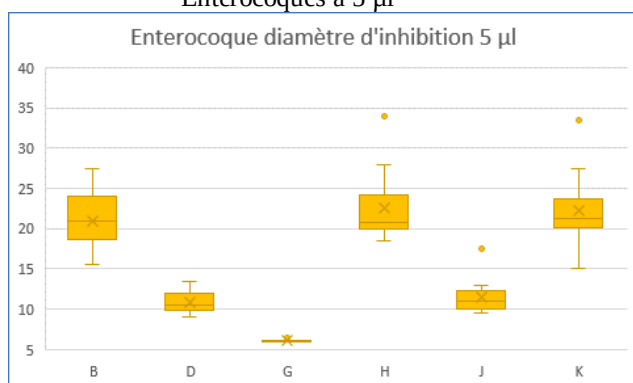


Figure 3. Répartition des diamètres d'inhibition des Colibacilles à 5 µl

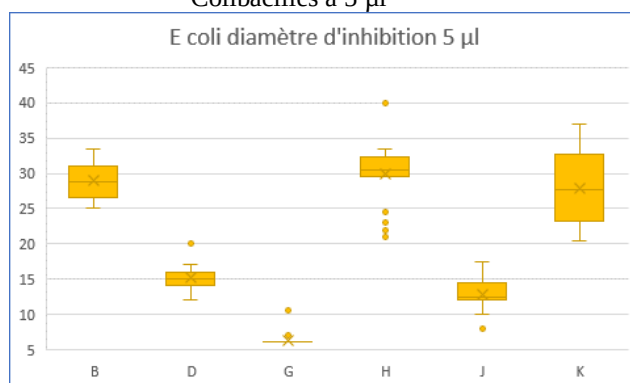


Figure 2. Répartition des diamètres d'inhibition des Entérocoques à 3 µl

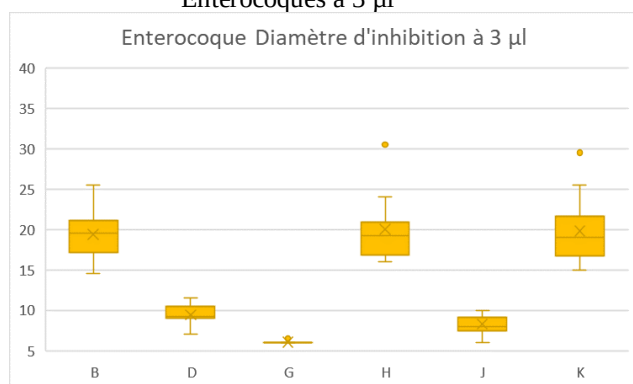


Figure 4. Répartition des diamètres d'inhibition des Colibacilles à 3 µl

