

ETUDE IN VITRO SUR L'EFFET DE PHYTOACTIFS NON VOLATILS CONTRE *HISTOMONAS MELEAGRIDIS*

Carlu Claire¹, Girard Claire¹, Chabrilat Thibaut¹, Schuler David², Liebhart Dieter², Kerros Sylvain¹.

¹Phytosynthese 63200 MOZAC

²Clinic for Poultry and Fish Medicine, Department for Farm Animals and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine Vienna, Austria.

claire.carlu@phytosynthese.fr

RÉSUMÉ

Histomonas meleagridis est le protozoaire responsable de l'histomonose. Cette maladie se traduit par des lésions d'inflammations des caecums et des foies chez les volailles. Depuis le retrait des spécialités telles que le dimétridazole en 2002 et le nifursol en 2003, les plantes font l'objet de recherche pour limiter son développement.

La présente étude vise à mesurer l'efficacité de 7 extraits végétaux (EV) riches en actifs non volatils sur *H. meleagridis* en comparaison à un noyau d'huiles essentielles (HE) actuellement sur le marché (ProtoPhyt).

Les EV ont été présélectionnés suite à une expérimentation *in vitro* sur le protozoaire *Trypanosoma brucei gambiense*. Les EV et HE ont d'abord été testés à 0,2 %, puis à 0,1% ; 0,05% ; 0,025% ou à 1,6% ; 0,8% ; 0,4% (10^5 *H. meleagridis*, incubation : 40°C) en comparaison du témoin négatif (eau distillée +1,5% lécithine de soja) et témoin positif (dimétridazole). Les cellules viables ont été comptées pour chaque échantillon à 24, 48 et 72h et la concentration minimale létale (CML) a été définie comme la concentration où aucune cellule vivante n'est observée après 24h. Un EV riche en sapogénine a présenté une CML plus faible que HE (0,025%). Une CML égale à celle de l'HE a été obtenue chez 2 EV (saponines ; lignanes). A la plus haute concentration testée (1,6%), 2 EV (limonoïdes ; tanins) n'ont pas montré de létalité mais une réduction significative supérieure à 90%. En complément, une substance (flavonoïdes) a permis 100% de létalité à une dilution inférieure à la CML entre 24 et 72h. Tous les actifs testés montrent une activité anti-*Histomonas* *in vitro* dans l'intervalle de concentration testé. Ces résultats doivent être adaptés à la concentration des plantes en phytoactifs.

Mots clés : histomonose, dindes, phytoactifs, huile essentielle

ABSTRACT

In Vitro study on the effect of non-volatile phytoactives against *Histomonas meleagridis*

Histomonas meleagridis is the protozoan responsible for histomonosis. This disease results in inflammatory lesions of the ceca and livers in poultry. Since the withdrawal of specialties such as dimetridazole in 2002 and nifursol in 2003, plants have been the subject of research to limit its development. The study aims to measure the efficiency of 7 plants extracts rich in non-volatile active ingredients (VE) on *H. meleagridis* in comparison with essential oils (EO), product currently on the market (ProtoPhyt).

VE were preselected following an *in vitro* experiment on the protozoan *Trypanosoma brucei gambiense*. VE and EO were tested at 0,2%, then at 0.1%; 0.05%; 0.025% or at 1.6%; 0.8%; 0.4% (10^5 *H. meleagridis*, incubation : 40°C) in comparison with negative control (distilled water+1,5% soy lecithin) and positive control (dimetridazole). Viable cells were counted for each sample at 24, 48 and 72h and the minimum lethal concentration (MLC) was defined as the concentration where no living cells are observed after 24h. One VE rich in sapogenine have lower (MLC) than EO (0.025%). An MLC similar to EO was obtained with 2 VE (saponins, lignans). At the highest concentration tested (1.6%), 2 VE (limonoids, tannins) did not show lethality but a significant reduction greater than 90%. In addition, one substance (flavonoids) allowed 100% lethality at a dilution lower than the MLC between 24 and 72h. All of the substances have anti-*Histomonas* activity *in vitro* in the concentration range tested. These results must be adapted to the concentration of the plants in phytoactives.

Key words: histomonosis, turkey, phytoactives, essentials oils

INTRODUCTION

Depuis l'arrêt du Nifursol en mars 2003, les traitements contre l'histomonose sont inexistants. A ce jour, la filière ne dispose plus de moyen de lutte officiel contre la maladie ; pourtant les conséquences économiques en élevage sont importantes. En effet cette maladie engendre des lésions des caecums et des foies chez les animaux avec des taux de mortalité élevés en particulier chez la dinde selon Hafez *et al.* (2006). Des conseils de conduite zootechnique ont alors été promulgués, et de nombreux programmes alimentaires proposent des additifs dont le but est de limiter la pression d'infestation de ce parasite. A cela, la nécessité d'une meilleure gestion du risque se présente afin de limiter l'impact de la maladie : des conditions d'hygiène strictes, une eau de qualité, une immunité renforcée sont nécessaires pour garder un environnement sain selon Callait-Cardinal *et al.* (2009). Aucune solution ne présente à ce jour de résultats significatifs lors de cas d'histomonose avéré avec mortalité. Quelques propositions commerciales ont vu le jour, notamment des solutions à base d'huiles essentielles, s'intégrant dans une stratégie de prévention. Des précédentes études ont pu révéler des effets des actifs végétaux sur d'autres protozoaires, c'est pourquoi nous continuons d'explorer leurs effets sur *H. meleagridis*. En considérant que si un extrait se révélait avoir une action même faible sur ce protozoaire, alors celui-ci serait un candidat intéressant à intégrer dans une démarche de prévention pour limiter les risques de développement. Les extraits végétaux (EV), riches en actifs non volatiles testés dans cette étude ont été présélectionnés suite à une expérimentation *in vitro* sur le protozoaire *Trypanosoma brucei gambiense*. Ces 7 EV ont été comparés à un noyau d'huiles essentielles actuellement présent sur le marché (ProtoPhyt).

L'objectif du projet était d'évaluer l'efficacité d'EV *in vitro* sur la croissance de *H. meleagridis*. Les EV ont été sélectionnés et fournis par Phytosynthese (Mozac). L'expérimentation a été menée à l'Université vétérinaire de Vienne.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Etudes préliminaires

Au préalable, une étude *in vitro* sur *Trypanosoma brucei gambiense* a été réalisée pour déterminer l'activité antiprotozoaire. Celle-ci a été réalisée en triplicat. Le paramètre étudié était la concentration exprimée en µg/ml permettant d'inhiber la croissance de 50% des parasites (IC50). La méthode d'évaluation de l'activité trypanocide a été développée par l'Université française Paris-Sud selon la méthode de Loiseau *et al.* (2000). Des extraits de plantes et huiles essentielles ont été testés dans cette étude

préliminaire. Nous avons retenu les EV les plus efficaces (IC50 < 100 µg/ml) dont l'utilisation et le sourcing sont possibles pour l'alimentation animale en Europe.

1.2. Substances testées

Le tableau 1 énumère les 7 EV et le mélange d'huiles essentielles qui ont été mis en contact avec les cellules d'*Histomonas*. Pour le déroulement de l'étude les EV devaient être en solution aqueuse. L'ensemble des solutions mères a été préparé par Phytosynthese.

L'ensemble des extraits ont été dilués à 1/4 dans une solution d'eau distillé. Le mélange HE a été dilué dans une solution d'eau distillé et de lécithine de soja (1,5%). La lécithine de soja n'a pas entraîné de toxicité comme le montre le témoin négatif.

Toutes les substances ont été diluées et ajustées aux concentrations finales.

1.3. Culture

Des cellules monoxéniques d'*H. meleagridis*, ont été cultivées selon la méthode décrite par Grabensteiner *et al.* (2007). Elles ont été dénombrées et ajustées à une concentration de 10⁶ cellules par ml. La suspension précédente a été disposée dans plusieurs microtubes (100 µl) à une concentration de 10⁵ avec 800 µl de milieu de culture et 100 µl des différentes substances à tester.

Dans un premier temps, les 8 substances ont été testées à une concentration de 0,2% considérée comme dilution de référence. Dans un second temps, selon l'activité anti-*Histomonas* obtenue à cette concentration, 2 gammes de dilutions ont été utilisées : soit des dilutions plus basses (0,1% ; 0,05% ; 0,025%), soit des dilutions plus hautes (0,4% ; 0,8% ; 1,6%). Afin de démontrer l'effet sur *H. meleagridis*, le dimetridazole a été utilisé en tant que contrôle positif à 400 µg/ml, et l'eau distillée+1,5% de lécithine de soja en témoin négatif.

1.4. Comptage de cellules

Chaque échantillon a été coloré au bleu de trypan permettant de colorer les cellules mortes et ainsi d'identifier les cellules viables. La chambre de comptage de cellules Neubauer a permis de compter les cellules d'*H. meleagridis* viables après 24h.

La concentration minimale létale (CML) a été définie comme la plus petite concentration où aucune cellule vivante ou motile n'est observée après 24h d'incubation.

Un décompte des cellules d'*H. meleagridis* a été poursuivi à 48h et 72h. Les tests de sensibilité ont été effectués dans 3 expériences indépendantes et en triplicat.

1.5. Analyse statistique

Le test de Mann-Whitney U a été utilisé pour analyser les différences entre les groupes.

La p-value < 0,001 est considérée comme significative.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

La figure 1 représente les résultats préalablement obtenus sur un screening sur *Trypanosoma brucei gambiense*. Le mélange d'huiles essentielles nécessitait 1,8 µg/ml pour obtenir l'IC 50 et les 7 EV sélectionnés ont obtenu une IC 50 comprise entre 7 et 91 µg/ml.

Le tableau 2 ci-dessous présente les CML de chacune des substances testées. HE avait une CML de 0,4%, elle était supérieure à EV6 qui a permis de tuer les cellules de *H. meleagridis* à la concentration 0,025%. En effet, sa CML était de 0,025%. Les EV 2 et 7 avaient une CML équivalente à celle de HE. Les substances 3 et 5 n'avaient pas montré de létalité à la plus haute concentration testée (1,6%) après 24h mais ont permises une réduction significative des cellules viables.

Le tableau 3 présente la viabilité des cellules de *H. meleagridis* à 24, 48 et 72h après leur mise en contact avec les substances. Les résultats de létalité des cellules observées à 24h ont été confirmés à 48h et 72h pour HE, EV 2, EV 6 et EV 7. L'EV 3 n'obtenait aucune cellule viable à 1,6 % après 48h d'incubation, sans que cela ne se poursuive à 72h. On peut suggérer une anomalie lors de la manipulation à 48h ou éventuellement un développement des quelques cellules restantes. L'EV 4 provoquait la létalité des cellules à 0,8 % et 1,6 % à 48h et 72h d'incubation. A 24h, des cellules viables restaient présentes à 1,6 % mais pas à 0,8 %. Des études complémentaires doivent être menées pour connaître la concentration létale exacte de ces deux extraits végétaux sur les cellules du protozoaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Callait-Cardinal M.P., Gilot-Fromont E., Chossat L., Gonthier A., Chauve C., Zenner L. Epidemiol. Infect. (2009) ; 138 : 353–363
- Hafez M., Hauck R. Archives of Animal Nutrition. 2006 ; 60 :5, 436-442,
- E. Grabensteiner, N. Arshad & M. Hess, Parasitol Res. 2007; 101 :193–199.
- Loiseau PM, LubertP., Wolf JG. Antimicrob. Agents Chemother. 2000 Nov ; 44(11) :2954-61.

Illustré en vert dans le tableau 2, on remarque qu'après 48h et 72h, les EV 1 et 7 ont éliminé l'ensemble des cellules à une dilution inférieure à leur CML (respectivement 0,8 % et 0,4 %) illustrant un effet temps de mise en contact de ces substances sur le protozoaire.

L'effet dose a été remarqué pour l'ensemble des actifs et mis en évidence sur la figure 1 ci-dessous. On observait une diminution des cellules viables lors de l'augmentation de la concentration en actifs pour chacune des substances. De même, on observe une augmentation des cellules viables de 24h à 72h, on peut supposer un effet limité dans le temps de ces extraits.

Les 7 substances présélectionnées sur *Trypanosoma brucei gambiense* ont toutes montré une activité anti-*Histomonas* à une concentration inférieure à 1,6% et 5 ont obtenu une CML entre 0.25 et 0,8 %. Cependant EV 6 semble plus efficace que HE sur *H. meleagridis* alors que *Trypanosoma brucei gambiense* était moins sensible à ces dernières.

CONCLUSION

Dans un contexte où il est difficile de maîtriser cette maladie, l'application de solutions à base d'actifs végétaux pourrait être un moyen de limiter son apparition. Dans cette étude, tous les actifs testés ont un impact direct sur la viabilité des cellules d'*H. meleagridis* ce qui pourrait confirmer une analogie d'actions de ces actifs sur les deux protozoaires trypanosome et *Histomonas*. Des études complémentaires seraient nécessaires pour mesurer le potentiel de ces actifs sur des volailles sous pression d'histomonose.

Tableau 1. Liste des substances testées sur les cellules d'*Histomonas*

Nature	N°	Substances testées	
Huile essentielle (HE)		HE	ProtoPhyt™*, Phytosynthese
Extraits végétaux (EV)	1	Flavonoïdes	Extrait Propolis EPP-AF™, Apis Flora
	2	Lignanes	Extrait Laurier du Nordeste (<i>Ocotea</i> sp.)
	3	Tanins	Extrait Grenade (<i>Punica granatum</i>)
	4	Lactones	Extrait Chirette verte (<i>Andrographis paniculata</i>)
	5	Limonoïdes	Extrait Neem (<i>Azadirachta indica</i>)
	6	Sapogénine	Extrait PhytoGenine™, Phytosynthese
	7	Saponine	Extrait Petit houx, Phytosynthese

*TM : Trade mark

Figure 1. Pré screening des extraits testés préalablement sur *Trypanosoma brucei gambiense* exprimé en IC50 (µg/ml) (retenus les actifs dont IC50 <100 µg/ml)

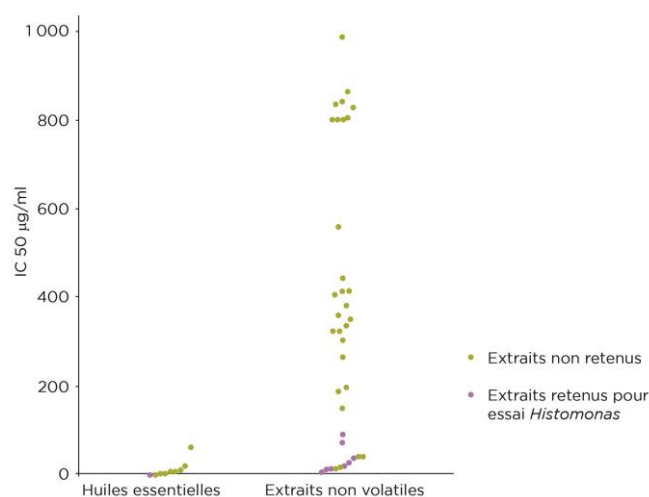


Figure 2 : Viabilité des cellules selon la concentration de chaque substance
Nombre de cellules viables selon les substances et les concentrations testées à 24h

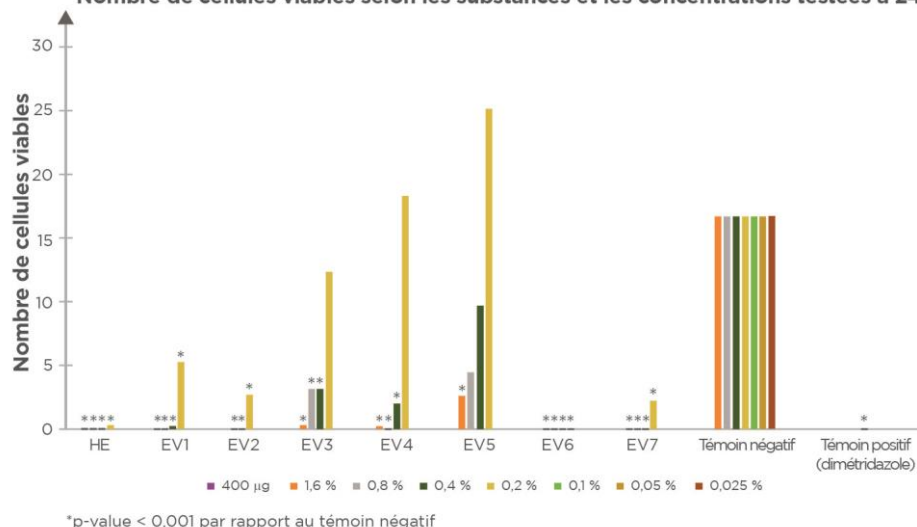


Tableau 2 : Nombre de cellules viables *H. meleagridis* à 24h selon les concentrations de chaque substance

	1,6%	0,8%	0,4%	0,2%	0,1%	0,05%	0,025%
HE	0	0	0	0,222			
EV1	0	0	0,111	5,222			
EV2		0	0	2,667			
EV3	0,222	3,111	3,111	12,333			
EV4	0,167	0	1,944	18,222			
EV5	2,556	4,389	9,611	25,111			
EV6				0	0	0	0
EV7	0	0	0	2,222			

 CML

Tableau 3 : Nombre de cellules de *H.meleagridis* viables selon les substances testées et les différentes concentrations testées à 24h, 48h et 72h

Substances testées	Concentration	24h	48h	72h
HE	1,6 %	0	0	0
	0,8 %	0	0	0
	0,4 %	0	0	0
	0,2 %	0,222	0,111	0,056
EV1	1,6 %	0	0	0
	0,8 %	0	0	0
	0,4 %	0,111	0	0
	0,2 %	5,222	11,611	16,944
EV2	0,8 %	0	0	0
	0,4 %	0	0	0
	0,2 %	2,667	3,778	0,833
EV3	1,6 %	0,222	0	0,278
	0,8 %	3,111	2,389	3,056
	0,4 %	3,111	1,389	3,611
	0,2 %	12,333	18,833	25,778
EV4	1,6 %	0,167	0	0
	0,8 %	0	0	0
	0,4 %	1,944	3,111	7,111
	0,2 %	18,222	28,778	33,056
EV5	1,6 %	2,556	1,944	2,444
	0,8 %	4,389	11,389	48,667
	0,4 %	9,611	24,944	54,722
	0,2 %	25,111	39,389	54,278
EV6	0,2 %	0	0	0
	0,1 %	0	0	0
	0,05 %	0	0	0
	0,025 %	0	0	0
EV7	1,6 %	0	0	0
	0,8 %	0	0	0
	0,4 %	0	0	0
	0,2 %	2,222	0	0
Témoin négatif		16,667	21,806	31,222
Témoin positif (diméridazole)	400 µg/ml	0	0	0

 Létalité des cellules au cours du temps