

EVALUATION DE L'EFFET DE PHYTOMOLECULES SUR LA CROISSANCE D'*HISTOMONAS MELEAGRIDIS* EN CONDITIONS *IN VITRO*

E. N'guetta, K. Vermeulen, R. Neto, V. Van Hamme, A. Wealleans

KEMIN EUROPA NV - Toekomstlaan 42 - 2200 HERENTALS BELGIQUE

eric.nguetta@kemin.com

RÉSUMÉ

L'histomonose est une maladie infectieuse réémergente au sein de l'Union Européenne depuis l'interdiction progressive des molécules permettant de la prévenir ou de la traiter de manière efficace telles que le dimetridazole. L'histomonose peut toucher plusieurs espèces aviaires mais les dindes y sont particulièrement sensibles. En élevage de dindes, l'histomonose se manifeste en premier lieu par la présence de lésions hépatiques et caecales qui peuvent être associées à une forte mortalité, ce qui en fait un enjeu économique majeur. L'agent pathogène de l'histomonose est *Histomonas meleagridis*, un protozoaire parasite obligatoire des oiseaux galliformes. L'objectif de cette étude était de comparer, en conditions *in vitro*, l'effet d'un mélange de phytomolécules (cinnamaldéhyde, terpènes d'orange, thymol, eugénol, carvacrol, oléorésine de capsicum) utilisé seul ou avec un ajout d'acides organiques à celui de l'huile d'origan sur la croissance d'*H. meleagridis*. Des prélèvements de 10^5 cellules d'*H. meleagridis* issus d'une culture monoxénique réalisée en présence d'*E. coli* ont été incubés dans des microtubes à 40°C pendant l'étude. Le contrôle positif a été réalisé en présence de dimetridazole (DZ) à une concentration finale de 400 µg/ml tandis que le contrôle négatif (CN) contenait uniquement le milieu de culture. Le mélange de phytomolécules ajouté seul (PM) ou en combinaison avec des acides organiques (PM+AO), ainsi que l'huile d'origan (HO) ont été ajoutés à une concentration finale de 0,2%. Pour chaque condition expérimentale, des comptages cellulaires ont été réalisés après 24h, 48h et 72h d'incubation. Les différences significatives ont été analysées avec le test de Kruskal Wallis (seuil $P=0,05$). Les meilleurs résultats ont été obtenus en présence du dimetridazole et en présence des mélanges d'actifs PM et PM+AO. Ces traitements ont permis d'inhiber la croissance d'*H. meleagridis* ($P<0,05$). L'huile d'origan n'a pas eu d'effet inhibiteur et a uniquement permis une réduction numérique de la croissance du protozoaire. Ces résultats suggèrent que les phytomolécules pourraient contribuer aux stratégies de lutte contre l'histomonose. Des études complémentaires sont nécessaires afin d'évaluer l'effet *in vivo* de ces ingrédients.

ABSTRACT

Evaluation of the effect of phytochemicals on the *in vitro* growth of *Histomonas meleagridis*

Histomonosis has re-emerged in the EU since the drugs previously used to prevent or treat it effectively such as dimetridazole were phased out. Several domestic avian species can be affected by histomonosis but turkeys are particularly susceptible. The economic consequences of this disease can be significant in turkey production due to the high mortality levels it can potentially cause. The etiological agent of histomonosis is *Histomonas meleagridis*, an obligate protozoan parasite that causes hepatic and caecal lesions in infected galliform birds. The aim of this study was to compare the effect of mixtures of phytochemicals (cinnamaldehyde, orange terpenes, thymol, eugenol, carvacrol, capsicum oleoresin) used alone or in combination with organic acids to that of oregano oil on the *in vitro* growth of *H. meleagridis*. 10^5 cells of *H. meleagridis* were sampled from a monoxenic culture supplemented with *E. coli* and incubated in microtubes at 40°C. Dimetridazole was added at 400 µg/ml for the positive control (DZ) and the negative control (CN) contained only growth medium. The mixture of phytochemicals tested alone (PM) or in combination with organic acids (PM+AO) and oregano oil (HO) were added at a concentration of 0.2%. Cell counts were performed after 24h, 48h and 72h of incubation. A Kruskal Wallis test was used for the statistical analysis (alpha level=0.05). The mixtures of phytochemicals PM, PM+AO and dimetridazole inhibited the growth of *H. meleagridis* ($P<0.05$). Oregano oil did not have a similar inhibitory effect but numerically reduced the growth of the parasite. Further studies are needed to evaluate the *in vivo* effect of these ingredients.

INTRODUCTION

L'histomonose (ou maladie de la tête noire) est une maladie parasitaire des volailles dont l'agent étiologique est le protozoaire *H. meleagridis* (McDougald, 2005). Il s'agit d'une maladie entérique qui affecte en particulier les dindes. Elle peut provoquer des niveaux de mortalités variables chez ces dernières et entraîner des pertes allant de 10% à 100 % des troupeaux (Callait-Cardinal et al., 2007). L'histomonose peut aussi se manifester chez d'autres espèces aviaires telles que les poules pondeuses ou les poules reproductrices en entraînant des chutes de ponte (Liebhart et al., 2013, Dolka et al., 2015). Bien que moins souvent affectées en comparaison aux dindes, ces espèces peuvent jouer un rôle important de réservoir du fait d'un portage asymptomatique, mais aussi par le biais d'une excrétion élevée d'œufs du ver *Heterakis gallinarum* (Liebhart et Hess, 2020), un hôte intermédiaire dans la transmission du parasite (Springer et al., 1969). De plus, l'histomonose peut être aggravée par la coccidiose caecale (due à *Eimeria tenella*) ou par les infections colibacillaires (McDougald et Hu 2001, Popp et al., 2011). D'un point de vue clinique, c'est une maladie qui se traduit le plus souvent, chez les animaux affectés, par la présence d'une diarrhée jaune soufre associée à des lésions caecales et qui peut conduire à une apathie. Chez les dindes, des lésions hépatiques sont fréquemment présentes en cas de migration vers le foie (Liebhart et Hess, 2020).

Historiquement, les approches thérapeutiques utilisées pour prévenir et traiter l'histomonose ont essentiellement reposé sur l'utilisation du dimetridazole, une molécule de nos jours interdite à cause de sa potentielle cancérogénicité (Ré et al., 1997). D'autres solutions telles que la nitarsone, un composé arsenical, ou le nifursol ont également été retirées du marché dans les différentes régions où elles étaient auparavant disponibles (Clark et Kimminau, 2017). Dans certains pays tels que la France, l'interdiction ou le retrait de ces molécules s'est suivie d'une réémergence des cas d'histomonose (Callait-Cardinal et al., 2007). A ce jour, il n'existe plus de traitement curatif contre *H. meleagridis* au sein de l'Union Européenne et la prophylaxie repose principalement sur l'utilisation de vermifuges en vue de limiter la transmission d'*H. gallinarum* (vecteur du parasite), ainsi que sur l'ensemble des mesures de séparation des espèces.

Dans l'optique d'une recherche de solutions alternatives, plusieurs approches reposant sur l'utilisation d'actifs d'origine végétale ont donné des résultats prometteurs (Liebhart et al., 2017), mais leur potentiel reste à définir. Nous avons par conséquent investigué, *in vitro*, l'effet d'un mélange de phytomolécules avec ou sans ajout d'acides organiques ainsi que celui de l'huile d'origan sur la

croissance d'*H. meleagridis*, afin de déterminer si cette stratégie pouvait présenter un intérêt dans la lutte contre l'histomonose.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Culture d'*H. meleagridis*

Une culture monoxénique d'*H. meleagridis* (*H. meleagridis*/ Turkey/ Austria/ 2922/ C6) enrichie avec une souche d'*E. coli* afin d'assurer la viabilité du parasite a été utilisée pour la réalisation de l'étude. Les tests ont été faits dans des microtubes contenant 800 µl de milieu de culture frais composé de 85% de milieu 199 (M199; Gibco™, Invitrogen, Lofer, Autriche), de 2 mg/ml d'amidon de riz (Sigma-Aldrich) et de 15% de sérum de veau fœtal (Gibco™, Invitrogen). Les cultures d'*H. meleagridis* ont ensuite été ajustées pour avoir une concentration de 10⁶ cellules par ml par des dilutions successives. Un prélèvement de 100 µl contenant 10⁵ parasites a été ajouté à chaque microtube contenant 800 µl de milieu frais, ainsi que 100 µl de préparation de phytomolécules à tester. Les cultures ont été incubées à 40°C. Pour chaque condition expérimentale, les tests ont été faits en trois répétitions indépendantes, chacune d'entre elle ayant été réalisée en triplicat.

1.2. Préparation des phytomolécules et inoculation des cultures

Trois produits ont été évalués dans cette étude. Un premier mélange de phytomolécules (PM) a été préparé à partir des ingrédients du RepaXOL™ (Kemin Industries), qui est une préparation doublement microencapsulée contenant 22% de phytomolécules (cinnamaldéhyde, de terpènes d'orange, de thymol, d'eugénol, de carvacrol et d'oléorésine de capsicum). Un second mélange (PM+AO) a été préparé en réduisant de moitié la quantité des ingrédients de la préparation PM et en ajoutant de l'acide citrique et de formate de calcium à la préparation. Les phytomolécules des préparations PM et PM+AO ont été dissoutes dans du Tween 80. Un troisième produit constitué d'huile d'origan contenant 12% de phytomolécules a été utilisé (Dosto Oregano, Dovital). Les produits expérimentaux ci-dessus ont été évalués à une concentration finale de 0.2%.

Le dimetridazole (Sigma Aldrich, Vienne, Autriche) a été utilisé comme contrôle positif à une concentration finale de 400 µg/ml.

1.2. Comptages des cellules d'*H. meleagridis* et analyse statistique

Le comptage des cellules d'*H. meleagridis* a été effectué après 24, 48 et 72h d'incubation. Pour ce

faire, chaque échantillon a été marqué avec une coloration au bleu de trypan (0,4%) (Gibco™, Invitrogen, Lofar, Autriche). La numération a été faite avec une cellule de Neubauer (hématimètre Bright-Line™; Hausser Scientific, Horsham, Pennsylvanie, USA, fourni par Sigma-Aldrich, Vienne, Autriche). Le cas échéant, la confirmation de l'élimination totale du parasite a été effectuée en inoculant les suspensions cellulaires dans un milieu de culture frais ne contenant aucun produit expérimental. L'analyse statistique des résultats a été faite à l'aide du test de Kruskal Wallis. En cas de différence significative ($P < 0,05$), le test post hoc de Conover-Iman a été réalisé.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Dans cette étude, les préparations de phytomolécules ont montré un effet inhibiteur sur la croissance de la souche d'*H. meleagridis* évaluée en conditions *in vitro* (Figure 1).

Le mélange de phytomolécules PM a inhibé la croissance d'*H. meleagridis* dès 24 heures d'incubation en comparaison au groupe contrôle ($P < 0,0001$). L'inhibition du parasite s'est confirmée après 48 heures et 72 heures d'incubation. Des résultats similaires ont été obtenus avec le mélange PM+AO, auquel a été ajouté de l'acide citrique et du formate de calcium ($P < 0,0001$). Pour ce dernier, une très faible croissance a été observée après 72h d'incubation. Celle-ci pourrait être expliquée par le manque de stabilité dans le temps des phytomolécules après leur mise en solution. Une observation notable a été que l'ensemble des résultats obtenus avec les préparations PM et PM+AO ont été comparables au dimetridazole, qui a de la même manière entièrement inhibé la croissance du parasite après 24, 48 et 72 heures d'incubation ($P < 0,0001$). Après l'ajout de ces différentes préparations, aucune reprise de croissance n'a pu être observée en réinoculant les suspensions cellulaires dans des milieux de culture frais. L'huile d'origan n'a pas eu d'effet inhibiteur significatif sur le parasite. L'absence d'effet du Tween 80, utilisé pour la préparation des mélanges de phytomolécules, a été vérifiée. Les différentes préparations n'ont pas eu d'effet significatif sur la croissance d'*E. coli* (données non présentées), ce qui suggère un effet direct contre *H. meleagridis*.

Cette étude confirme les résultats préalablement obtenus avec le RepaXOL™ contre *H. meleagridis*. Dans leur étude, Hauck et Hafez (2007) ont observé un effet léthal avec cet ingrédient en conditions *in vitro* au bout de 24 heures d'incubation, à une dilution de 1,25 µl/ml (0,125%). Si de nombreuses études décrivent les propriétés antibactériennes et antioxydantes des phytomolécules telles que le cinnamaldéhyde, les terpènes d'oranges, le thymol,

l'eugénol, le carvacrol et d'oléorésine de capsicum (Doyle et al., 2019, Calo et al., 2015, Miguel 2010), il est intéressant de noter que certaines d'entre elles possèdent aussi une activité antiparasitaire (Anthony et al., 2005). Ainsi, l'activité histomonocide d'huiles essentielles principalement composées de cinnamaldéhyde et de limonène, un hydrocarbure terpénique des agrumes, a été observée *in vitro* sur *Tetratrichomonas gallinarum* et *H. meleagridis* (Zenner et al., 2003). Dans la présente étude, l'effet histomonocide a été plus important avec les préparations PM et PM+AO en comparaison à l'huile d'origan, dont les constituants majoritaires sont le carvacrol et de thymol (Lu et al. 2018). Il aurait toutefois été intéressant d'évaluer l'effet de d'origan utilisée dans cette étude à une dilution plus élevée, du fait de sa plus faible concentration en phytomolécules que celle des autres préparations. Le mode d'action de ces ingrédients pourrait être lié à des perturbations membranaires et à des modifications de la régulation osmotique du parasite (Anthony, 2008).

Cependant, la validation *in vivo* de ces résultats pourrait être un défi, notamment du fait de la localisation préférentielle du parasite au niveau des caeca. Cette particularité évoque la question de la stabilité des phytomolécules considérées le long du tractus digestif suite à leur administration orale, de manière à ce qu'ils puissent atteindre *H. meleagridis* où il réside préférentiellement. A cet égard, l'encapsulation dans une matrice protectrice permettant une libération contrôlée pourrait améliorer les chances de réussite *in vivo*.

En conditions *in vivo*, les co-infections par *E. coli* et *H. meleagridis* ne sont pas rares. Dans leur étude menée sur des poules pondeuses, Abdelhamid et ses collaborateurs (2020) ont montré que celles-ci peuvent accentuer la baisse de gain de poids et la sévérité des lésions caecales. Une autre conséquence des co-infections a été la diminution de l'abondance et de la diversité de la flore bactérienne caecale au profit des colibacilles pathogènes. Ces observations suggèrent que les stratégies de gestion de la flore caecale peuvent avoir un rôle dans la lutte contre le parasite.

Par ailleurs, *H. meleagridis* pourrait bénéficier de ses interactions avec *E. coli* pour la régulation de son environnement, sa protection contre le stress oxydant, ou encore son approvisionnement en nutriments (Bilic et Hess, 2020). Il a aussi été démontré qu'*E. coli* supporte fortement la croissance du parasite en conditions *in vitro* (Ganas et al., 2012). A ce titre, les solutions de lutte contre l'histomonose favorisant la gestion simultanée de ces deux pathogènes pourraient avoir un intérêt particulier. Il est probable que l'effet histomonocide observé avec PM+AO provienne principalement de l'action des phytomolécules, mais leur association avec des solutions pouvant avoir un

effet contre *E. coli* pourrait être pertinente dans la gestion conjointe des deux pathogènes. En conditions *in vivo*, Paul et al. (2010) ont montré qu'ajoutés à 3 kg/t d'aliment, les sels d'acide formique peuvent significativement réduire la quantité de colibacilles dans le contenu intestinal et améliorer l'indice de consommation. Des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer dans quelle mesure la limitation des interactions parasite-bactérie, notamment avec *E. coli*, pourraient contribuer aux stratégies de lutte contre l'histomonose.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude indiquent que les mélanges de phytomolécules évalués (RepaXOL™) ont un effet inhibiteur sur la croissance de *H. meleagridis* en conditions *in vitro* dès 24h d'incubation. Ces ingrédients pourraient constituer des solutions alternatives d'intérêt pour une meilleure gestion de l'histomonose. Des études complémentaires sont cependant nécessaires pour la validation de ces résultats chez la dinde. En outre, l'association des phytomolécules avec d'autres ingrédients d'intérêt pourrait être une stratégie d'avenir pour la gestion des co-infections colibacillaires et de leurs conséquences sur la flore microbienne.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelhamid, M. K., Quijada, N. M., Dzieciol, M., Hatfaludi, T., Bilic, I., Selberherr, E., ... & Paudel, S., 2020. *Frontiers in microbiology*, 11.
- Anthony, J. P., Fyfe, L., & Smith, H., 2005. *Trends in parasitology*, 21(10), 462-468.
- Anthony, J. P., 2008. Thèse de doctorat, Queen Margaret University.
- Bilic, I., & Hess, M., 2020. *Trends in parasitology*, 36(3), 232-235.
- Callait-Cardinal, M. P., Leroux, S., Venereau, E., Chauve, C. M., Le Pottier, G., & Zenner, L., 2007. *Veterinary Record*, 161(17), 581-585.
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C., 2015. *Food control*, 54, 111-119.
- Clark, S., & Kimminau, E., 2017. *Avian Diseases*, 61(3), 281-288.
- Dolka, B., Żbikowski, A., Dolka, I., & Szeleszczuk, P., 2015. *Veterinary Research Communications*, 39(3), 189-195.
- Doyle, A. A., & Stephens, J. C., 2019. *Fitoterapia*, 139, 104405.
- Ganas, P., Liebhart, D., Glösmann, M., Hess, C., & Hess, M., 2012. *International journal for parasitology*, 42(10), 893-901.
- Hauck, R., & Hafez, H. M., 2007. *Avian diseases*, 51(4), 880-883.
- Hauck, R. & Hafez, H.M., 2013. *Parasitology Research*, 112, 19-34
- Liebhart, D., Ganas, P., Sulejmanovic, T., & Hess, M., 2017. *Avian Pathology*, 46(1), 1-18.
- Liebhart, D., & Hess, M., 2020. *Avian Pathology*, 49(1), 1-4.
- Liebhart, D., Sulejmanovic, T., Grafl, B., Tichy, A. & Hess, M., 2013. *Avian Pathology*, 42, 79-84.
- Lu, M., Dai, T., Murray, C. K., & Wu, M. X., 2018. *Frontiers in microbiology*, 9, 2329.
- McDougald, L. R., 2005. *Avian diseases*, 49(4), 462-476.
- McDougald, L. R., & Hu, J., 2001. *Avian Diseases*, 307-312.
- Miguel, M. G., 2010. *Molecules*, 15(12), 9252-9287.
- Paul, S. K., Halder, G., Mondal, M. K., & Samanta, G., 2007. *The Journal of Poultry Science*, 44(4), 389-395.
- Popp, C., Hauck, R., Balczulat, S., & Hafez, H. M., 2011. *Avian diseases*, 55(2), 328-330.
- Ré, J. L., De Méo, M. P., Laget, M., Guiraud, H., Castegnaro, M., Vanelle, P., & Duménil, G., 1997. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 375(2), 147-155.
- Springer, W. T., Johnson, J., & Reid, W. M., 1969. *Parasitology*, 59(2), 401-405.
- Zenner, L., Callait, M. P., Granier, C., & Chauve, C., 2003. *Parasite*, 10(2), 153-157.

Figure 1. Effet du dimetridazole (DZ), du mélange de phytomolécules ajouté seul (PM) ou en combinaison avec des acides organiques (PM+AO) et de l'huile d'origan (HO) sur la croissance d'*H. meleagridis* au bout de 24h, 48h et 72h d'incubation en comparaison au contrôle (CN). Les lettres (a, b) différentes indiquent des différences significatives à $P < 0,05$.

