

EVALUATION IN VITRO DE LA CAPACITE D'INHIBITION D'UN PROBIOTIQUE TRIPLE SOUCHE DE BACILLUS SUR DES ISOLATS CLINIQUES D'ENTEROCOCCUS CECORUM

Sandvang Dorthé ¹, Capern Lena Catrine ¹, Meuter Antoine ¹, Betz Sarah ²

¹ Animal and Plant Health & Nutrition, Chr. Hansen, A/S, Hørsholm, Danemark

² Elanco France, Crisco Uno, 3-5 Avenue de la Cristallerie, 92317 Sèvres, France

sarah.betz@elancoah.com

RÉSUMÉ

Enterococcus cecorum (EC) est considéré comme une bactérie commensale du tube digestif des poulets de chair. Toutefois, lors d'une dysbactériose, ce pathogène opportuniste peut proliférer et passer dans la circulation sanguine par translocation bactérienne. EC diffuse alors vers certains tissus (ex. articulations) ou organes (ex. foie, rate) où il va induire des lésions, comme des ostéomyélites, associé parfois à de la mortalité, générant un impact économique notable. Dans ce contexte, 22 isolats différents d'EC collectés sur des poulets de chair présentant des signes cliniques, 12 en provenance d'élevages d'Europe occidentale et 10 d'élevages américains, ont été testés pour évaluer *in vitro* la capacité d'inhibition d'un probiotique triple souche de *Bacillus* (GALLIPRO® FIT, Chr. Hansen), composé de deux souches spécifiques de *Bacillus subtilis* (DSM 32325, DSM 32324) et une souche de *Bacillus amyloliquefaciens* (DSM 25840). L'essai a été réalisé en utilisant le test d'inhibition en surnageant. À la suite d'une mise en culture du probiotique, le surnageant est prélevé puis mis en contact avec l'isolat d'EC. L'effet inhibiteur de la croissance bactérienne est évalué en mesurant la densité optique (DO 600 nm) de la solution et en la comparant à celle d'un témoin sans surnageant.

Les résultats montrent que le surnageant, produit à partir d'un probiotique triple souche de *Bacillus*, présente une capacité d'inhibition très élevée contre des isolats cliniques d'EC, allant de 80% à 96% d'inhibition de croissance pour les 22 isolats. Cet effet d'inhibition directe évalué *in vitro* peut s'expliquer par la capacité des souches de *Bacillus* du probiotique à libérer des lipopeptides biosurfactants inhibiteurs spécifiques tels que les surfactines et les fengycines, capables d'inhiber la croissance de bactéries pathogènes. Cet essai montre l'intérêt et le potentiel du probiotique triple souche de *Bacillus* dans la lutte contre le pathogène émergent *Enterococcus cecorum*, avec une efficacité *in vitro* qu'il conviendra de valider avec des tests en élevage ainsi que des essais expérimentaux *in vivo* challengés.

ABSTRACT

Effect of a triple-strain *Bacillus*-based probiotic on *in vitro* inhibition of clinical *Enterococcus cecorum* strains isolated from commercial broilers.

Enterococcus cecorum (EC) is usually recognized as a harmless commensal of the gut of broiler chickens. However, dysbacteriosis conditions can allow this opportunistic pathogen to overgrow and benefit from loosening of tight junctions to translocate from a leaky gut to the bloodstream. EC can then be transported to specific tissues (e.g.: joints) or organs (e.g.: heart, liver) where it can induce significant damage. The clinical picture of pathogenic EC infection in a flock is high mortality due to septicemia early in the growing period followed weeks later by lameness due to osteomyelitis of the femoral head. In this context, 22 different EC isolates were collected from broiler chickens, 12 isolates from West European farms and 10 isolates from US farms, to assess the *in vitro* inhibitory capability of a triple-strain *Bacillus*-based probiotic (GALLIPRO® FIT, Chr. Hansen), consisting of two specific strains of *Bacillus subtilis* (DSM 32325, DSM 32324) and one strain of *Bacillus amyloliquefaciens* (DSM 25840). A pathogen inhibition assay was conducted to determine the ability of the probiotic supernatant to inhibit the growth of the different EC isolates. The inhibitory effect of the supernatant against bacterial growth was evaluated using optical density (OD 600 nm) by accessing the turbidity. All the experiments were conducted in triplicates. Results revealed that the supernatant produced by this triple-strain probiotic had a very high magnitude of inhibition against EC, ranking from 80% and 96% for the 12 West European and 10 US isolates. This strong *in vitro* capability for direct inhibition of clinical EC isolates can be explained by the ability of the probiotic to release specific inhibitory lipopeptides such as surfactins and fengycins able to inhibit the growth of pathogenic bacteria. This study demonstrates the potential of the triple-strain *Bacillus*-based probiotic to contribute to prevention programs aimed at addressing EC challenge in broilers with an *in vitro* efficacy which needs to be confirmed through trials in commercial conditions as well as *in vivo* challenge trial model.

INTRODUCTION

Enterococcus cecorum (EC) est une bactérie commensale que l'on retrouve en grande proportion dans le microbiote digestif de nombreuses volailles. Or, depuis environ 15 ans, cette bactérie est à l'origine d'une pathologie émergente du poulet de chair, au point d'être considérée aujourd'hui au niveau mondial comme une priorité sanitaire (Jung et al., 2018).

D'un point de vue de sa pathogénicité, cette bactérie de type coque à Gram positif est un micro-organisme pathogène opportuniste qui peut être amenée à proliférer lors d'une dysbactériose et passer dans la circulation sanguine par translocation bactérienne, à la faveur d'un relâchement des jonctions serrées intestinales. EC diffuse alors vers certains tissus (ex. articulations) ou organes (ex. foie, rate).

Le tableau clinique classique de l'infection à EC se caractérise par des boiteries vers 3 semaines dues à une ostéomyélite de la tête fémorale. A l'autopsie, les oiseaux peuvent également présenter une spondylolisthèse de la vertèbre thoracique libre (6°) ou une péricardite et/ou hépatite témoignant de la septicémie, et ce parfois très précocement. Cette infection peut générer entre 5 et 15% de mortalité (Jung et al., 2017). L'impact économique de cette maladie est donc extrêmement important du fait de performances dégradées, d'un taux de saisie supérieur à la normale et du recours souvent nécessaire à des traitements antibiotiques coûteux. Dans cette étude, l'objectif est d'évaluer *in vitro* la capacité d'inhibition d'un probiotique triple souche de *Bacillus* sur 22 isolats cliniques d'EC. Un essai est réalisé en utilisant le test d'inhibition en surnageant

1. MATERIELS ET METHODES

À la suite d'une mise en culture du probiotique, le surnageant est prélevé après centrifugation et filtration de la solution ; il est alors mis en contact avec l'isolat d'EC. L'effet inhibiteur de la croissance bactérienne est évalué pour le surnageant en mesurant la densité optique (DO 600 nm) de la solution, et en la comparant à celle d'un témoin sans surnageant. Les expériences sont répétées trois fois pour chaque isolat.

1.1. Isolats d'*E. cecorum* utilisés

Vingt-deux isolats différents d'EC furent collectés sur des poulets de chair. 12 isolats provenaient d'élevages d'Europe occidentale et 10 isolats d'élevages américains ont été fournis par l'Université d'Arkansas à partir de prélèvements sur des élevages conventionnels intégrés. Ces élevages ont un historique d'infection à EC récurrente. Les souches furent isolées à partir de l'analyse du cœur, foie, des articulations ou des écouvillons cloacaux.

1.2. Test d'inhibition

Un essai d'inhibition du pathogène est réalisé en utilisant le test d'inhibition en surnageant (Figure 1) visant à évaluer la capacité du surnageant, obtenu à partir d'une culture du probiotique, à inhiber la croissance des différents isolats pathogènes d'EC collectés dans ces élevages.

Le probiotique testé (GALLIPRO® FIT, Chr. Hansen) est composé de deux souches spécifiques de *Bacillus subtilis* (DSM 32325, DSM 32324) et une souche de *Bacillus amyloliquefaciens* (DSM 25840).

La première étape consiste à mettre en culture le probiotique triple souche dans un bouillon non-sélectif BHI (cœur-cerveille) à 37°C pendant 12h en conditions aérobies. Ce dernier est alors centrifugé (9000rpm/10 mins) pour obtenir une sédimentation des bactéries. Le surnageant qui correspond à la partie supérieure de la solution est alors séparé de la fraction solide puis filtré à l'aide d'une seringue de 12mL pourvu d'un filtre de 0,22 µm. Dépourvu de toutes cellules bactériennes, ce surnageant ne contient donc plus de souches probiotiques mais renferme les différents métabolites, notamment des lipopeptides, que ces dernières ont pu sécréter lors de la mise en culture et la phase d'incubation. Ce surnageant est alors dilué à 50% dans un bouillon non sélectif BHI. Un même bouillon de culture BHI ne contenant pas le surnageant est utilisé comme témoin et est dilué à 50% avec de l'eau Milli-Q. En parallèle, de manière individuelle, les isolats d'EC sont également mis en culture sur gélose au sang à 37°C pendant 12h. Chaque culture d'isolat d'EC est ensuite mise en contact soit avec le bouillon probiotique (contenant le surnageant probiotique) soit avec le bouillon témoin (sans ce surnageant). Pour ce faire, pour chacun des 22 isolats, 10 µl de solution contenant le pathogène après incubation est mélangé avec 200 µl de bouillon BHI Témoin alors que 10 µl de cette même solution contenant la souche spécifique de EC est mélangée avec 200 µl de bouillon BHI contenant le surnageant du probiotique. Après incubation, l'effet inhibiteur de la croissance bactérienne du surnageant est évalué en mesurant la densité optique (DO 600 nm) de la solution et en la comparant à celle du Témoin pour un même isolat. Le test est réalisé en triplicata pour chacun des isolats. Cette méthode repose sur la quantification de la croissance bactérienne en lien avec la turbidité de l'inoculum : le nombre de bactéries dans une suspension étant directement proportionnel à sa turbidité.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

A titre d'exemple, le graphique de la figure 2 montre les résultats obtenus pour l'un des isolats de EC (souche provenant d'un poulet souffrant d'arthrite) et compare la croissance dans le temps (mesures effectuées toutes les vingt minutes sur une durée totale de huit heures) de cet isolat en présence du

surageant du probiotique avec celle de cette même souche d'EC évoluant dans un même milieu de culture dépourvu, quant à lui, du surageant du probiotique. Comparés aux témoins, le taux de croissance s'avère très faible pour les vingt-deux isolats testés en présence du surageant (voir figure 3), démontrant un très fort pouvoir d'inhibition du probiotique quelle que soit la souche pathogène d'EC testée. L'histogramme de la figure 4 présente l'ensemble des résultats pour les vingt-deux isolats d'EC sous la forme de pourcentage moyen d'inhibition du probiotique par rapport au témoin. Les résultats montrent que le surageant, produit à partir d'un probiotique triple souche de *Bacillus*, dispose d'une capacité d'inhibition *in vitro* très élevée sur des isolats cliniques d'EC, avec des résultats allant de 80% à 96% d'inhibition pour les 12 isolats européens et les 10 isolats américains (Figure 4).

Cet effet d'inhibition directe évalué *in vitro* peut s'expliquer par la capacité du probiotique à libérer des métabolites ayant une activité antibactérienne. Il s'agit de lipopeptides biosurfactants inhibiteurs spécifiques, tels que les surfactines et les fengycines, capables d'inhiber la croissance de certaines bactéries par la formation de pores au niveau de leur membrane cellulaire (Sumi et al., 2015). L'un des critères majeurs de sélection des souches de *Bacillus* du probiotique développé par Chr Hansen est en effet leur faculté à sécréter ces lipopeptides.

CONCLUSION

Ces données d'essais *in vitro* d'inhibition de croissance d'EC démontrent l'intérêt et le potentiel du probiotique composé de trois souches spécifiques de *Bacillus* dans la lutte contre ce pathogène émergent en production de volaille qu'est *Enterococcus cecorum*. Or, ce test *in vitro*, n'évalue qu'un mode d'action spécifique du probiotique qui est sa faculté à inhiber directement le développement de bactéries potentiellement pathogènes. Il convient désormais de conduire des essais *in vivo* afin d'évaluer l'impact de l'ensemble des modes d'actions inhérents au probiotique chez le poulet de chair à travers un modèle expérimental d'infection à EC et également en conditions réelles au sein d'élevages soumis à des problèmes récurrents d'entérocoques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Jung et al., 2018. Avian Dis Sep, 62(3) : 261-271
Jung et al, 2017. BMC Microb. 17:106
Sumi et al., 2015. J. Microb. 61 : 93-103

Figure 1. Test d'inhibition en « surnageant » (Méthodologie)

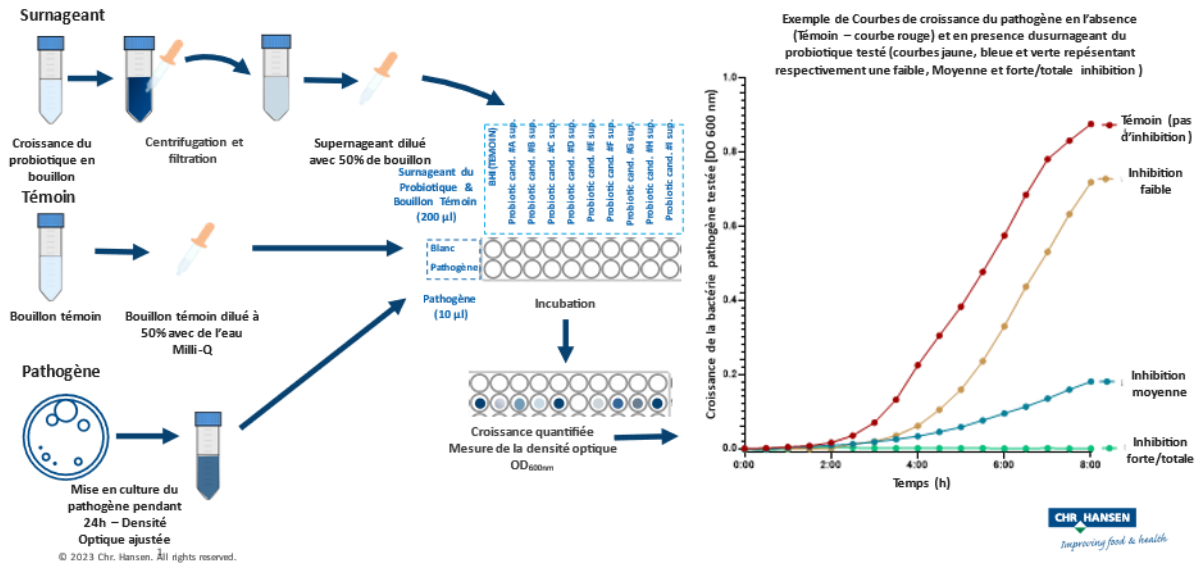


Figure 2. Taux de croissance *in vitro* d'un isolat de EC (souche pathogène prélevée sur un poulet souffrant d'arthrite et provenant d'un élevage standard français) en présence ou non du surnageant du probiotique triple souche (mesurée par densité optique)

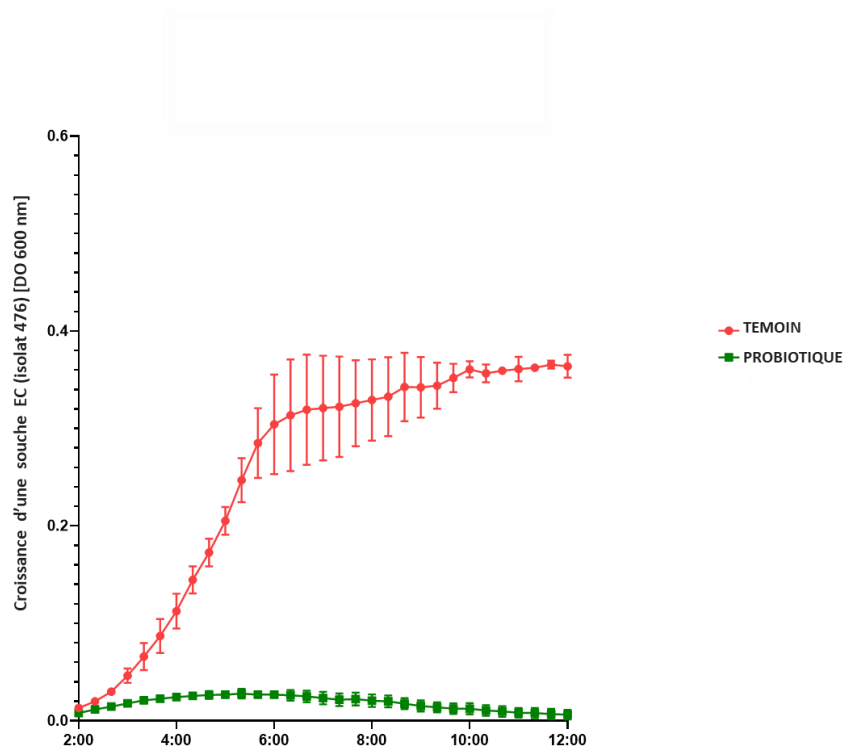


Figure 3. Pouvoir inhibiteur du probiotique triple souche sur les 22 isolats d'EC par rapport à un témoin (taux de croissance du pathogène dans le temps mesuré par densité optique ; tests réalisés en triplicat pour chaque isolat)

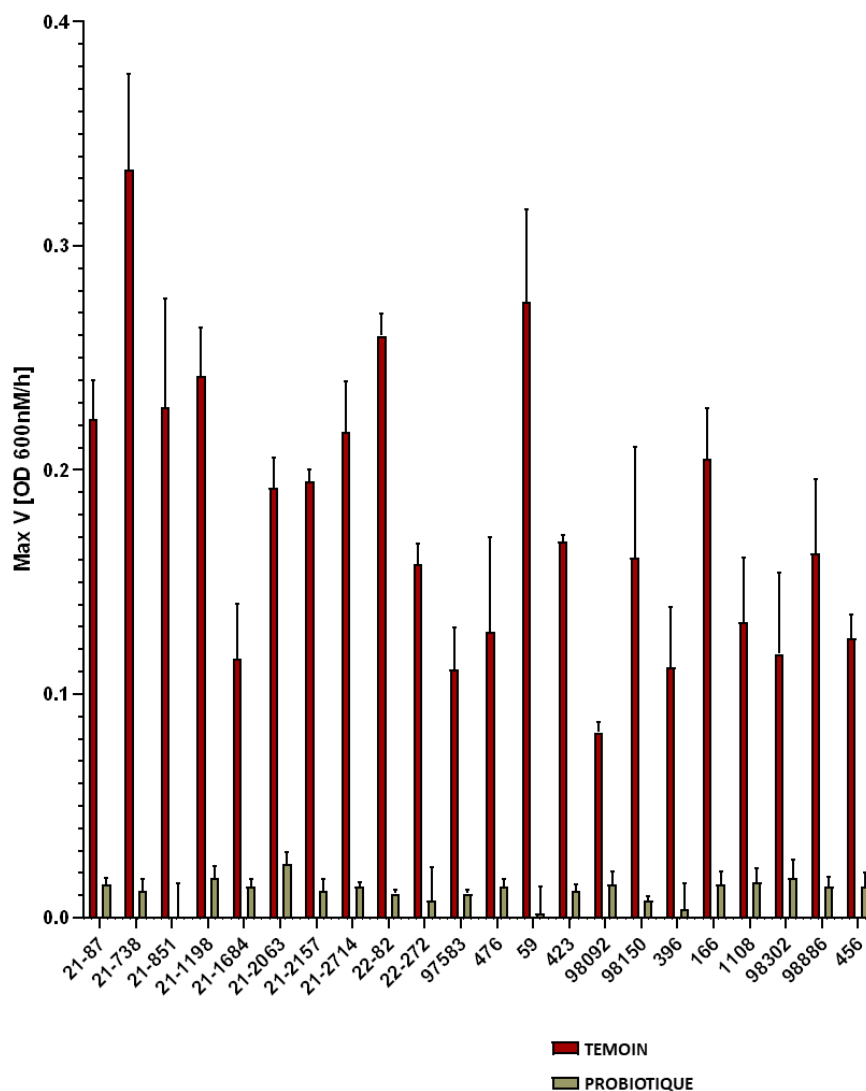


Figure 4. Pouvoir inhibiteur du probiotique triple souche sur les 22 isolats d'EC par rapport à un témoin (% d'inhibition moyen ; moyenne des 3 répétitions effectuées pour chaque isolat)

