

LES ADDITIFS ALIMENTAIRES PEUVENT-ILS AUGMENTER L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES ANTIBIOTIQUES A LARGE SPECTRE CONTRE *E. COLI* ?

Benedetta Tugnoli¹, Giulia Giovagnoni², Andrea Toschi², Andrea Piva^{1,2}, Ester Grilli^{1,2}

¹ VETAGRO S.p.A., via Porro 2 - 42124 REGGIO EMILIA (ITALIE)

² UNIVERSITE DE BOLOGNE, DIMEVET, via Tolara di Sopra 50 - 40064 OZZANO
EMILIA, BO (ITALIE)

benedetta.tugnoli@vetagro.com

RÉSUMÉ

Le but de cette étude était de vérifier si des additifs alimentaires non antibiotiques, à savoir des acides organiques et des composés de nature identique, pouvaient améliorer l'activité antimicrobienne des antibiotiques à large spectre contre *E. coli*. À cette fin, l'activité antimicrobienne de l'amoxicilline, de la colistine et de la néomycine a été testée contre huit souches d'*E. coli* isolées du foie de poulet de chair, seules ou en combinaison avec de l'acide sorbique (SOR) et du thymol (THY). La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été trouvée avec la méthode de micro-dilution testant: antibiotiques (128-0,5 mg / L), SOR (100-0,78 mM) et THY (6,25-0,05 mM) et la combinaison de SOR + THY (dans un rapport 2:1, de 6,25 mM + 3,12 mM à 0,10 mM + 0,05 mM). Après 24h à 37 ° C, l'inhibition de la croissance a été évaluée par une mesure d'absorbance (630 nm) et les données ont été analysées avec une analyse de variance à un facteur (one way-ANOVA, p <0,05). Toutes les souches étaient résistantes à l'amoxicilline jusqu'à 128 mg / L et sensibles à la colistine jusqu'à 0,5 mg / L. Pour la néomycine, deux souches étaient inhibées à 64 mg / L et quatre souches à 32 mg, les souches restantes étaient résistantes. Les valeurs de CMI pour THY et SOR seuls étaient respectivement de 3,12 et 50 mM, mais lorsque combinées, la CMI était réduite respectivement de 2 et 16 fois (1,56 et 6,25 mM). SOR + THY (1,56 mM + 0,78 mM) a augmenté l'activité antimicrobienne de la NEO de 2 et 3 fois (six souches) et de 10 fois (une souche) et a amélioré l'activité antimicrobienne de l'AMOX jusqu'à 70% dans une souche.

En conclusion, l'acide sorbique et le thymol ont inhibé la croissance d'*E. coli*, montrant un fort effet synergique et leur combinaison a pu améliorer l'activité antimicrobienne des antibiotiques couramment utilisés pour le traitement de la colibacillose chez les volailles.

ABSTRACT

Can feed additives increase the antimicrobial activity of wide-spectrum antibiotics against *E. coli*?

Aim of this study was to test whether non-antibiotic feed additives, i.e. organic acids and nature identical compounds, can improve the antimicrobial activity of broad-spectrum antibiotics against *E. coli*. For this purpose, the antimicrobial activity of amoxicillin, colistin and neomycin was tested against eight strains of *E. coli*, isolated from broiler liver, alone or in combination with sorbic acid (SOR) and thymol (THY). The minimal inhibitory concentration (MIC) was found with micro-dilution method testing: antibiotics (128-0.5 mg/L), SOR (100-0.78 mM), and THY (6.25-0.05 mM) and the combination of SOR+THY (in a 2:1 ratio, from 6.25mM+3.12mM to 0.10mM+0.05mM). After 24h at 37°C, growth inhibition was evaluated by absorbance measurement (630 nm) and data were analyzed with ANOVA (P<0.05). All the strains were resistant to amoxicillin up to 128 mg/L and sensitive to colistin until 0.5 mg/L. For neomycin, two strains were inhibited at 64 mg/L and four strains at 32 mg/L, the remaining strains were resistant. MIC values for THY and SOR alone were 3.12 and 50 mM, respectively, but when in combination the MIC was reduced by 2 and 16-fold respectively (1.56 and 6.25 mM). SOR+THY (1.56mM+0.78mM) increased NEO activity by 2 and 3-fold (six strains) and by 10-fold (one strain) and improved AMOX activity up to 70% in one strain.

In conclusion, sorbic acid and thymol inhibited the growth of *E. coli*, showing a strong synergistic effect and their combination was able to improve the antimicrobial activity of antibiotics commonly used for the treatment of colibacillosis in poultry.

INTRODUCTION

L'E. coli est une bactérie à Gram négatif en forme de bâtonnet appartenant à la famille des Enterobactériales, résistante à l'environnement et normalement présente dans le tractus intestinal des animaux, y compris les volailles. C'est l'un des agents pathogènes les plus fréquents dans cette catégorie, provoquant une colibacillose et une colisepticémie. Les pertes économiques peuvent commencer au premier jour de la vie du poulet et durer toute la vie car l'infection à *E. coli* est présente dans tous les groupes d'âge et types de poulets, avec une prévalence particulièrement élevée chez les poules pondeuses (Kabir, 2010; McMullin, 2004; Singer et Hofacre, 2004). La prévention est le meilleur moyen de lutter contre l'infection par *E. coli*, en particulier par le biais de mesures environnementales ou de vaccination. Le traitement de la colibacillose repose principalement sur des antibiotiques, tels que les sulfamides potentialisés, les aminopénicillines, les tétracyclines, la colistine et les aminosides (Agunos et al., 2012), bien que la résistance aux antibiotiques soit répandue dans le monde entier et représente un problème mondial.

Dans un contexte mondial de réduction de l'utilisation d'antibiotiques et de l'augmentation actuelle de la résistance aux antimicrobiens bactériens, les additifs alimentaires aux propriétés antimicrobiennes constituent une stratégie utile. Dans cette optique, les acides organiques (OA) et les composés de nature identique (NIC) peuvent constituer un nouveau moyen de contrôler les infections bactériennes, améliorant ainsi la santé et les performances de croissance des animaux. Leur activité antimicrobienne est bien connue du fait de l'altération du pH bactérien et de la formation de pores dans les membranes bactériennes (Grilli et Piva, 2012).

Sur la base des propriétés antimicrobiennes d'OA et de NIC, le but de cette étude était d'évaluer si la combinaison d'OA et de NIC avec des antibiotiques classiques pour la volaille pourrait augmenter l'activité antimicrobienne des antibiotiques contre les souches de *E. coli* in vitro.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Mise en place de l'expérience

Huit souches d'*E. coli* ont été isolées de cas cliniques (foies de poulets) et ont été cultivées dans un bouillon d'infusion de cœur et cerveau (BHI; Oxoid) au cours de deux incubations ultérieures de 24 h avant le dénombrement sur gélose BHI à 37 ° C dans des conditions aérophiles. Les antibiotiques de cette étude étaient l'amoxicilline (AMOX), la colistine (COL) et la néomycine (NEO) d'Alpha Aesar (Thermo Fisher (Kandel) GmbH), tandis que l'acide sorbique (SOR) et le thymol (THY) ont été achetés à Sigma -Aldrich Merck (Sigma-Aldrich Srl, Italie). Des solutions mères

de chaque substance ont été préparées dans du BHI, ajustées à pH 6,5 et stérilisées par filtration avec une taille de pores de la membrane de 0,22 µm. L'activité antimicrobienne de chaque substance a été déterminée à l'aide d'une méthode de dilution en bouillon dans des plaques de microtitration à 96 puits avec 10⁵ UFC / mL de chaque souche. Après 24 h à 37 ° C, l'inhibition de la croissance a été évaluée par une mesure d'absorbance à 630 nm (Varioskan Lux, Thermo Fisher, Italie). Pour chaque substance la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été définie comme la concentration la plus faible de chaque composé capable de donner une absorbance = 0.

Les tests antimicrobiens ont été réalisés en trois étapes :

1) Composés individuels

Les souches de *E. coli* ont été testées avec une gamme de concentrations (dilutions de 2 fois) d'AMOX, de COL et de NEO (à 128-0,5 mg / L), de SOR (à 100-0,78 mM) et de THY (à 6,25-0,05 mM).

2) Combinaison d'acide sorbique et de thymol

Les souches d'*E. coli* ont été testées avec une combinaison de SOR + THY (dans un rapport de 2:1, choisi sur la base d'études préliminaires) à partir de 6,25 mM + 3,12 mM à 0,10 mM + 0,05 mM.

3) Combinaison antibiotique + acide sorbique + thymol

Les souches d'*E. coli* ont été testées avec la combinaison de SOR + THY (dans un rapport de 2:1, de 6,25 mM + 3,12 mM à 0,10 mM + 0,5 mM) ajoutées à AMOX (128, 64, 32 mg / L) ou NEO (64, 32, 16 mg / L).

1.2. Analyse statistique

Chaque plaque a été analysée en double et les données ont été analysées avec une analyse de variance à un facteur (one way-ANOVA) et des différences considérées comme significatives à p <0,05.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les souches d'*E. coli* ont d'abord été testées avec des antibiotiques, de l'acide sorbique ou du thymol individuellement.

En ce qui concerne les antibiotiques, les huit souches ont montré une sensibilité variable. Comme le montre le tableau 1, toutes les souches étaient résistantes à l'AMOX jusqu'à 128 mg / L. Concernant la NEO, deux souches étaient inhibées à 64 mg / L et quatre souches à 32 mg / L, tandis que les autres étaient résistantes. Au contraire, toutes les souches étaient sensibles à la COL avec une valeur de CMI autour de 0,5-1 mg / L.

Comparativement aux antibiotiques, les souches d'*E. coli* ont présenté une réponse plus homogène à l'acide sorbique et au thymol. Pour les huit souches d'*E. coli*, les valeurs de CMI pour le SOR et le THY seuls étaient respectivement de 50 et 3,12 mM (Figure 1), mais lorsque SOR et THY étaient combinés, la CMI était réduite respectivement de 16 et 2 fois (3,12 mM et 1,56 mM). Par conséquent, la combinaison de SOR et de

THY a eu un effet additif permettant de réduire la CMI des deux composés lorsqu'ils ont été testés ensemble. En effet, l'activité antimicrobienne de l'OA et des plantes peut être améliorée en les combinant. Dans une série de travaux, notre groupe de recherche a montré une efficacité marquée de l'OA et des plantes, lorsqu'ils sont utilisés ensemble, *in vitro* contre *Salmonella* et *Campylobacter*: des expériences menées pour tester l'activité antimicrobienne de l'OA et NIC par la méthode de la concentration inhibitrice minimale ont révélé que lorsque les OA sont combinés à des composés identique nature, tels que les monoterpènes, ils sont plus efficaces contre *Salmonella typhimurium* ou *Campylobacter jejuni* que lorsqu'ils sont testés seuls, supportant fortement une action synergique de l'OA et des plantes (Grilli et Piva, 2012; Grilli et al., 2013). Le mécanisme d'action proposé à la base de la synergie entre l'OA et les NIC implique l'effet perméabilisant de ces derniers qui, en modifiant la membrane bactérienne, faciliteraient à terme l'entrée de l'OA et donc l'action antimicrobienne (Grilli et Piva, 2012).

La troisième étape de l'étude comprenait l'addition de la combinaison acide sorbique + thymol à des antibiotiques tels que l'amoxicilline et la néomycine, ce qui n'était pas efficace seul contre les souches de *E. coli*, dans le but d'améliorer leur efficacité.

La combinaison SOR + THY à 1,56 + 0,78 mM a amélioré l'activité antimicrobienne de l'AMOX à la concentration la plus faible testée (32 mg / L) et amélioré l'activité jusqu'à 70% dans une souche et, comme le montre la figure 2-A, pour quatre souches sur huit cela a permis :

- la réduction moyenne de 57% de la croissance bactérienne par rapport à la même concentration d'AMOX seule
- la réduction moyenne de la croissance de 30% des bactéries par rapport à la même concentration de SOR + THY seuls (différence non statistiquement significative)

Encore une fois (Fig. 2-B), la même combinaison de SOR + THY (à 1,56 + 0,78 mM) ajoutée à la néomycine à 16 mg / L a été efficace dans toutes les souches, provoquant :

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agunos A., Léger D., Carson C., 2012. Can. Vet. J., (53), 1289–1300.
- Akond MA., Hassan S.M.R., Alam S., Shirin M., 2009. Am. J. Environ. Sci., (11), 47-52.
- Bearson S., Bearson B., Foster J.W. (1997). FEMS Microbiol. Lett., (147), 173-180.
- Grilli E., Piva A., 2012. In: On-Farm Strategies to Control Foodborne Pathogens. Editors: T.R. Callaway & T.S. Edrington, pp 183-210.
- Grilli E., Vitari F., Domeneghini C., Palmonari A., Tosi G., Fantinati P., Massi P., Piva A., 2013. J Appl Microbiol., (114), 308-317.
- Kabir S.M.L. 2010. Int. J. Environ. Res. Public Health, (7), 89-114.
- McMullin, 2004. A Pocket Guide to Poultry Health and Disease. 5M books Ed. ISBN: 095301505X;
- Shtylla T., Circella E., Madio A., Di Paola G., Çabeli P., Kumbe I., Kika A., Camarda A., 2009. Ital. J. Anim. Sci., (8), 771-774.
- Singer R.S., Hofacre C.L., 2006. Avian Dis. (50), 161-172.
- van den Bogaard E.A., London N., Driessen C., Stobberingh E.E., 2001. J. Antimicrob. Chemother., (47), 763-771.

- la réduction moyenne de 56% de la croissance bactérienne par rapport à la même concentration de NEO seule
- la réduction moyenne de la croissance de 47% des bactéries par rapport aux mêmes concentrations de SOR + THY seuls.

Ces résultats montrent que la combinaison d'acide sorbique et de thymol avec des antibiotiques à large spectre, tels que l'amoxicilline et la néomycine, peut augmenter l'efficacité de ces derniers. Le mode d'action de l'amoxicilline et de la néomycine implique l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne et de la synthèse des protéines, et plusieurs cas de résistance d'*E. coli* à ces antibiotiques ont été rapportés dans le monde entier (Akond et al., 2009; Shtylla et al., 2010; van den Bogaard et al., 2001). Nos résultats suggèrent que l'acide sorbique et le thymol peuvent fonctionner avec l'amoxicilline et la néomycine, peut-être grâce à l'action perméabilisante du thymol sur la paroi cellulaire bactérienne, qui peut favoriser l'entrée d'antibiotiques ou inhiber les pompes à efflux ou d'autres mécanismes de résistance. D'autre part, l'acide sorbique peut altérer le bilan énergétique car la bactérie consomme de l'ATP afin de pomper les protons et de rétablir le pH du cytosol en réponse à la dissociation de l'acide à l'intérieur de la cellule, tandis que l'anion peut être toxique, perturbant ainsi la synthèse de l'ADN et les fonctions métaboliques, et augmentant la pression cellulaire osmotique (Bearson et al., 1997).

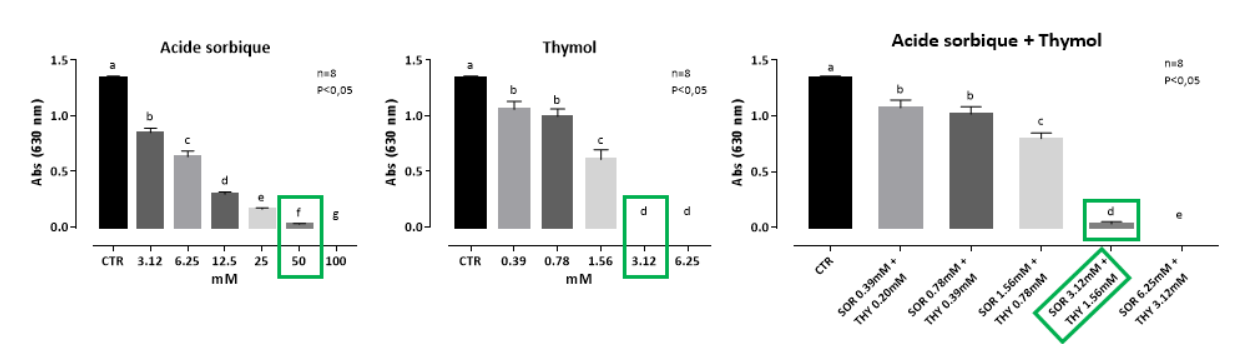
CONCLUSION

Dans cette étude, l'acide sorbique et le thymol inhibaient efficacement la croissance d'*E. coli*, montrant un fort effet synergique. De plus, la combinaison d'acide sorbique et de thymol a pu améliorer l'activité antimicrobienne des antibiotiques couramment utilisés pour le traitement de la colibacillose chez les volailles.

Tableau 1. Distribution des valeurs de CMI (mg / L) d'amoxicilline, de néomycine et de colistine contre 8 isolats *d'E. coli*

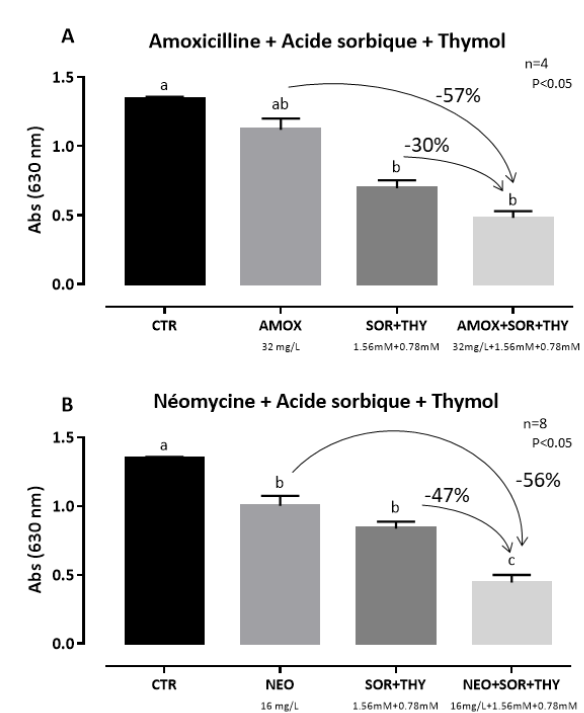
	mg / L									
	> 128	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5
AMOX	8									
NEO	2		2	4						
COL									2	6

Figure 1. Croissance d’*E. coli* après 24 h en présence d’acide sorbique, de thymol ou de la combinaison d’acide sorbique + thymol (dans un rapport de 2:1).



La croissance bactérienne est présentée en valeur d'absorbance (630 nm) et les valeurs sont moyennes ± SEM de 8 souches. Les valeurs CMI sont mises en surbrillance avec des cadres verts. Les données ont été analysées avec une analyse de variance à un facteur (one way-ANOVA) les colonnes avec des lettres différentes étaient significativement différentes (p <0,05).

Figure 2. Croissance d’*E. coli* après 24 h en présence de l'association acide sorbique + thymol avec de l'amoxicilline (A) et de la néomycine (B).



La croissance bactérienne est présentée en valeur d'absorbance (630 nm) et les valeurs sont les moyennes ± SEM de 4 souches (A) et de 8 souches (B). Les données ont été analysées avec une analyse de variance à un facteur (one way-ANOVA) et les colonnes avec des lettres différentes étaient significativement différentes (p <0,05).