Sensibilité de *Pasteurella multocida* et de *Staphylococcus aureus* isolés sur des lapins de chair (*Oryctolagus cuniculus*) à des solutions phyto-aromathérapiques à l'aide de la technique du Phytogramme®

S. BOUCHER[1], T. MAUVISSEAU[2]

[1]LABOVET CONSEIL (Réseau Cristal), BP 539 85505 Les Herbiers cedex

[2] LABOVET CONSEIL (Réseau Cristal), 40 rue Arsène Mignen, 85140 Les Essarts

Résumé – En reprenant 83 souches de *Pasteurella multocida* et de *Staphylococcus aureus* isolées et conservées à -80°C ces trois dernières années sur des lapins de chair provenant des Pays de Loire, de Normandie, du Nord et d'Auvergne, les auteurs ont testé leur sensibilité à différents mélanges non antibiotiques de différentes concentrations d'huiles essentielles réputées pour leurs propriétés médicinales bactéricides, associées éventuellement à des extraits de plantes. Ils ont pour cela utilisé une technique de diffusion des principes actifs en gélose : le Phytogramme®, technique qui est décrite dans le texte. Les résultats montrent que cette technique est suffisamment discriminante pour permettre de classer les mélanges selon leur efficacité *In vitro* par la mesure du diamètre d'inhibition. Le Phytogramme® est donc un nouvel outil utile pour la prescription de produits phytothérapeutiques.

Abstract – Sensitivity of *Pasteurella multocida* and *Staphylococcus aureus* isolated in rabbits (Oryctolagus cuniculus) in phyto-aromatherapy solutions using the Phytogramme®

Returning 83 strains of Pasteurella multocida and Staphylococcus aureus isolated and stored at -80 ° C in the last three years in rabbits from the Pays de Loire, Normandy, North and Auvergne, the authors tested their sensitivities to different non-antibiotic mixtures of different concentrations of essential oils known for their antibacterial medicinal properties, possibly associated with plant extracts. For this, they used a technique of diffusion of the active principles in agar : the Phytogramme®, technique which is described in the text. The results show that this technique is sufficiently discriminating to allow to classify the mixtures according to their efficacy in vitro by measuring the inhibition diameter. The Phytogramme® is therefore a useful new tool for the prescription of herbal medicines.

.

Introduction

Le plan Ecoantibio 2017 contraint les vétérinaires à réduire les prescriptions d'antibiotiques de 25 % dans toutes les filières. L'arrêt de l'antibioprévention est une des mesures de ce plan mais n'est pas suffisant. Plusieurs pratiques comme le recours à des autovaccins ou à une meilleure gestion zootechnique de l'élevage, peuvent limiter l'apparition des troubles bactériens. Néanmoins, lorsque l'affection se déclare, il existe des solutions alternatives ayant une activité antibactérienne. Sans être pour autant un substitutif nécessaire à l'antibiothérapie encore très utile, elles méritent d'être redécouvertes car elles ont permis pendant plusieurs siècles de contenir certaines affections, tant en médecine humaine que dans le monde vétérinaire.

Si pendant longtemps ces solutions ont été utilisées de façon assez empirique, leur utilisation peut désormais être encadrée par des examens de laboratoires permettant de faire le bon choix de solutions à base d'huiles essentielles, comme on le fait avec un antibiogramme pour aider au choix d'un antibiotique.

La technique d'aromatogramme décrite par Belaiche en 1979 (Belaiche, 1979) permet de choisir les huiles essentielles ayant le plus grand diamètre d'inhibition pour une bactérie donnée.

Le Phytogramme® est une technique dérivée utilisant des mélanges d'huiles essentielles et d'extraits de plantes. Il permet de tester la sensibilité des bactéries à un produit complexe.

L'étude a été conduite sur plusieurs semaines dans un laboratoire d'analyses vétérinaires du Réseau Cristal sur des souches de *Staphylococcus aureus* et de *Pasteurella multocida* isolées en élevage de lapin de chair après un épisode pathologique déclaré.

L'objectif de cette étude est de vérifier si tous les mélanges d'huiles essentielles et d'extraits ont des actions antibactériennes identiques sur les pasteurelles et les staphylocoques choisis et de voir si toutes les souches d'un taxon sont identiquement inhibées par différentes spécialités.

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel

Les principaux mélanges utilisés ont été sélectionnés à partir d'huiles essentielles ayant une activité antibactérienne. Ces mélanges, notamment parce qu'ils contiennent aussi des extraits de plantes, peuvent avoir des propriétés thérapeutiques autres telles que les actions détoxifiante, drainante, mucolytique ou encore stimulante de l'immunité qui ajoutent à leur pouvoir curatif.

A la différence des antibiotiques, les huiles essentielles ne sont pas composées d'une seule molécule mais de plusieurs dizaines à des concentrations variables. Chaque composant est appelé chémotype.

La composition d'une huile essentielle varie suivant les modes de culture, de récolte, d'extraction, du terroir de culture de la plante, du climat etc. Une chromatographie en phase liquide de chaque huile essentielle a été demandée au fabricant avant de réaliser le mélange afin de connaître les différents constituants et garantir ainsi une répétabilité dans la constitution de la spécialité. La richesse de certains chémotypes influe directement sur l'effet antibactérien et les propriétés annexes.

L'essai a été conduit directement sur le mélange d'huiles essentielles – tel qu'il se présente dans les spécialités finales commercialisées - car l'association de plusieurs huiles essentielles peut modifier les chémotypes de base, certains composants d'une huile essentielle pouvant réagir avec d'autres composants d'une autre huile essentielle pour former des molécules ayant des actions synergiques ou antagonistes, comme pour les antibiotiques (Lequeux et Boutin, 2013 ; Civam Adage, 2014).

Cinq produits ont été testés (4 produits utilisés en solution dans l'eau de boisson sont notés de A à D et un, appelé E, contenant uniquement des huiles essentielles, prescrit en pulvérisation atmosphérique).

38 souches de pasteurelles (8 dites d'environnement Ornithine décarboxylase négative notée ODC- et 30 réputées pathogènes ODC+) et 45 souches de staphylocoques (4 hautement virulentes et 41 moyennement virulentes) ont été testées. Elles ont toutes été isolées sur une période de 3 ans et ont été sélectionnées pour leur grande résistance à différents antibiotiques classiquement utilisés en cuniculture.

1.2. Méthode

La méthode du Phytogramme® a été mise au point par RESALAB en 2014. C'est une méthode de diffusion en milieu gélosé à partir d'un puits de 6mm contenant 50 µl de la solution à tester.

Le phytogramme® est réalisé à partir d'une souche bactérienne identifiée par un examen bactériologique classique.

Chaque souche est mise en suspension dans 3 ml d'eau. La gélose, au préalable creusée du nombre de puits recevant les différentes spécialités, est ensuite ensemencée par écouvillonnage croisé à partir de cet inoculum.

Chaque puits reçoit ensuite 50 µl de la solution à tester. Les géloses imprégnées et ensemencées sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures +/- 4h.

Le type de gélose peut varier en fonction des différentes bactéries testées.

Chaque solution est testée pure et diluée à 50 % afin d'apprécier l'effet de la diminution de la concentration du produit sur la bactérie.

La diffusion de l'huile essentielle à partir du puits dans la gélose peut inhiber la pousse de la bactérie en faisant apparaître un halo de diamètre plus ou moins grand. La mesure de ce diamètre est réalisée au moyen d'un pied à coulisse.

Le puits faisant 6 mm de diamètre, le halo mesure plus de 6mm. Lorsqu'il n'y a pas de halo, la pousse de la bactérie n'est pas inhibée et donc le diamètre d'inhibition est de 6mm.

Plus le diamètre est important plus l'action inhibitrice du mélange sur la bactérie est élevée.

1.3. Analyses statistiques

Pour chaque souche, il a été noté le diamètre d'inhibition. Une analyse statistique mesurant la moyenne des diamètres, l'écart type, le minimum et le maximum a été établi afin de mieux visualiser les résultats et de déterminer les différences d'une souche à l'autre

2. Résultats et discussion

Les résultats sont présentés dans les tableaux 1 (pasteurelles) et 2 (staphylocoques).

Tableau 1: Diamètre d'inhibition (en mm) de la croissance des pasteurelles par la technique du Phytogramme®

		Moyenne	Ecart type	Min	Max
PRODUIT A	pur	20,65	6,80	11,65	35,53
PRODUIT A	dilué 1/2	14,73	6,81	6,00	34,88
PRODUIT B	pur	27,10	3,18	21,17	35,86
PRODUIT B	dilué 1/2	20,79	3,97	12,96	29,88
PRODUIT C	pur	7,05	2,25	6,00	13,07
PRODUIT C	dilué 1/2	6,00	0,00	6,00	6,00
PRODUIT D	pur	22,93	3,13	17,93	31,35
PRODUIT D	dilué 1/2	16,41	3,14	11,25	28,44
PRODUIT E	pur	35,59	4,77	27,50	46,78
PRODUIT E	dilué 1/2	32,61	3,92	25,59	43,52

L'analyse du tableau 1 montre une moyenne du diamètre d'inhibition toujours plus élevée pour le produit non dilué. Plus la concentration en huiles essentielles est élevée, plus le diamètre d'inhibition est important.

Plus le diamètre est petit (proche de 6 mm), plus l'écart type est petit, ce q ui indique que certains mélanges ne semblent pas du tout inhiber la croissance de la pasteurelle (cas du PRODUIT C).

Certains produits comme le PRODUIT E, le PRODUIT B ou le PRODUIT D ont toujours un diamètre >20 mm en pur et > à 15 mm en dilution au demi, le maximum d'inhibition étant atteint par le PRODUIT E.

La croissance de certaines souches de pasteurelles est bien inhibée par le PRODUIT A (diamètre > 30 mm), alors que d'autres ne le sont pas (diamètre mini de 6 mm), ce qui se traduit par un écart type plus élevé.

Tableau 2 : Diamètre d'inhibition (en mm) de la croissance des staphylocoques par la technique du Phytogramme®

		Moyenne	Ecart type	Min	Max
PRODUIT A	pur	14,58	8,71	6,00	36,09
PRODUIT A	dilué 1/2	10,56	6,92	6,00	30,59
PRODUIT B	pur	20,26	6,01	6,00	33,57
PRODUIT B	dilué 1/2	15,08	6,60	6,00	28,79
PRODUIT C	pur	6,11	0,75	6,00	11,08
PRODUIT C	dilué 1/2	6,00	0,00	6,00	6,00
PRODUIT D	pur	16,93	5,24	6,00	26,94
PRODUIT D	dilué 1/2	13,17	6,03	6,00	25,22
PRODUIT E	pur	23,59	5,32	12,24	35,75
PRODUIT E	dilué 1/2	21,03	5,61	6,00	33,43

Dans le tableau 2, tous les diamètres moyens quel que soit le produit sont inférieurs à ceux des pasteurelles.

En dehors du PRODUIT E utilisé en pur, toutes les autres spécialités n'inhibent pas systématiquement la pousse de la bactérie, avec des diamètres minimum de 6 mm pour tous les produits.

Comme pour l'inhibition de la croissance des pasteurelles, l'écart type le plus important est noté pour le PRODUIT A, avec des souches présentant un diamètre important supérieur à 35 mm, et d'autres de 6 mm. .

Le PRODUIT C n'inhibe pratiquement pas la pousse des staphylocoques.

Le PRODUIT E est celui qui a généré le plus grand diamètre d'inhibition, vient ensuite le PRODUIT B et le PRODUIT D, avec des écarts types assez réduits.

L'analyse de ces résultats permet d'apprécier les variations des diamètres d'inhibition des bactéries vis-à-vis des différentes spécialités.

Il est important de noter qu'au sein d'une même espèce, les diverses souches ne se comportent pas de la même façon avec les différents mélanges

Il n'est donc pas possible de systématiser un diamètre en fonction d'un type de bactérie au même titre que pour un a ntibiotique donné, seul un antibiogramme peut permettre de connaître ces diamètres.

Il est également important de considérer que la quantité d'huiles essentielles et les plantes dans les différents mélanges ne sont pas les mêmes

L'activité antibactérienne est reconnue pour certains composants tels que le thymol ou le carvacrol, (Franchomme *et al*, 2001). Plusieurs plantes au sein d'un même mélange peuvent contenir du thymol (par exemple une huile essentielle de thym à thymol et une huile essentielle d'Origan) ce q ui augmentera en proportion la richesse du mélange. Il est donc important de mesurer l'activité antibactérienne du mélange et non d'une huile essentielle prise isolément (principe de l'aromatogramme).

Il faut également souligner que ces résultats ne laissent pas présager intégralement l'efficacité du mélange sur la maladie bactérienne incriminée.

En effet, comme pour un antibiogramme, le Phytogramme® ne permet de mesurer que l'effet antibactérien direct. Or, les huiles essentielles - à la différence des antibiotiques - possèdent d'autres propriétés importantes qui peuvent contribuer également à l a guérison de l'animal. Le 1,8-cinéole possède par exemple des propriétés anti-catarrhales (Franchomme *et al*, 2001), très intéressantes dans le cas de sinusite ou de trachéite mais peu ou pas de

propriété antibactérienne. La diffusion des huiles essentielles, lipophiles, dans l'organisme est en outre bonne. Mais il s erait intéressant de mesurer leur concentration dans les différents organes.

Les flavonoïdes contenus dans certains extraits de plantes ont de puissantes activités stimulantes sur le système immunitaire (May, 2014) qui peuvent aider l'animal à lutter contre l'affection bactérienne. Ces flavonoïdes en revanche, n'ont aucune action directe sur les bactéries.

Le recours au Phytogramme® est un moyen concret d'évaluer l'activité antibactérienne des préparations complexes phytothérapeutiques en se fondant sur des résultats quantifiés de laboratoire. Il peut aussi orienter le choix d'une spécialité dans un souci de réduction de l'emploi des antibiotiques.

Conclusion

Le Phytogramme® est un outil permettant d'apprécier l'activité antibactérienne d'un mélange d'huiles essentielles et d'extraits de plantes *in vitro*, par la mesure d'un diamètre d'inhibition.

Il permet d'orienter le choix d'une spécialité en fonction d'un germe isolé par un e xamen bactériologique.

L'analyse des résultats permet de valider l'activité d'un mélange d'huiles essentielles et de plantes sur les bactéries issues d'un même élevage. Elle montre aussi que les souches bactériennes peuvent présenter une sensibilité qui leur est propre. En ce s ens, la technique du Phytogramme® doit être mise en place dans l'arsenal des techniques aidant le vétérinaire à la prescription.

Une mesure de l'évolution de la sensibilité des souches vis-à-vis d'une même spécialité au cours de temps dans un même élevage pourrait être envisagée (comme on le fait pour les antibiotiques) afin de comprendre si des résistances aux huiles essentielles peuvent apparaître. Leur mécanisme d'action qui fait également appel à l a stimulation des défenses naturelles d'un organisme semble très différent de celui des antibiotiques.

Le choix du traitement doit cependant être fait en tenant compte aussi des propriétés annexes des huiles essentielles qui peuvent être également très importantes dans la guérison de l'animal.

Remerciements

Les auteurs remercient le service de recherche et développement de RESALAB, le personnel des laboratoires Labovet Analyses des Essarts, des Herbiers et de Beaupréau.

Références

FRANCHOMME. P, JOLLOIS. R, PENOEL.D » L'aromathérapie exactement » Ed Jollois 2001

MAY.P »Guide pratique de Phyto-Aromathérapie pour les animaux de compagnie » Ed Med'com 2014

LEQUEUX.G,BOUTIN.M »Aromatogramme : mise en place d'une méthodologie. Résultats préliminaires sur des souches de mammites bovines » Journées Nationales GTV Nantes 2013

BELAICHE P. « Traité de phytothérapie et d'aromathérapie » Paris Editions Masson 1979.

CIVAM ADAGE »Acte du colloque 24 mars 2014 Agrocampus Ouest-Rennes Retrour de 6 années d'expérimentation avec les huiles essentielles sur les bovins » 2014.