

## EFFET DE DEUX PREPARATIONS D'HUILES ESSENTIELLES SUR LA CROISSANCE DES BACTERIES *IN VITRO* ET LES PERFORMANCES DU POULET DE CHAIR\*

**Mathlouthi Nejib<sup>1,3</sup>, Bouzaïenne Taroub<sup>2</sup>, Oueslati Imen<sup>3</sup>, Recoquillay François<sup>4</sup>, Hamdi Mokhtar<sup>2</sup>, Bergaoui Ridha<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Ecole Supérieure d'Agriculture du Kef, Route Dahmani, 7119 LE KEF, Tunisie*

<sup>2</sup>*Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie de Tunis, Tunisie*

<sup>3</sup>*Institut National Agronomique de Tunisie, Laboratoire de Recherche en "Economie Agroalimentaire", 43 Avenue Charles Nicolle, Cité Mahrajène, 1082 TUNIS, Tunisie*

<sup>4</sup>*Phytosynthèse, 57 Avenue Jean Jaurès Z.A. Mozac Volvic BP 50100, 63203 RIOM Cedex France*

*\*Etude réalisée dans le cadre d'un projet de coopération Tunisie-Egypte financée par le ministère tunisien de l'enseignement supérieur, de la recherche scientifique et de technologie*

### RÉSUMÉ

L'objectif de l'étude est d'évaluer l'efficacité de deux préparations d'huiles essentielles sur les performances du poulet de chair, l'une renferme uniquement de l'huile essentielle (HE) de romarin, l'autre est une association d'huiles essentielles (AHE). Notre étude est composée de deux parties : essai *in vitro* et essai *in vivo*. La composition des huiles essentielles et leurs pouvoirs antibactériens (*in vitro*) sont déterminés. L'essai, *in vivo*, porte sur 500 poussins mâles élevés au sol et répartis en 4 lots (5 répétitions par lot) : lot T : témoin négatif ; lot AB : T + Antibiotiques (Avilamycine) ; lot R : T + HE de romarin et lot MHE : T + AHE. Les composés majoritaires de l'HE de romarin sont le cinéole (50 %), le camphre (12 %) et l' $\alpha$ -pinène (10 %). L'AHE renferme essentiellement des aldéhydes, des phénols et des terpènes. Les HE de romarin présentent une activité antibactérienne *in vitro* contre *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* et *Staphylococcus*. Cependant elles n'inhibent pas la croissance des *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Bacillus*. Par contre, l'AHE, présente un pouvoir antibactérien contre toutes les bactéries à l'exception de *Lactobacillus rhamnosus*. L'indice de consommation (IC) le plus élevé ( $P < 0,05$ ) est enregistré chez les poulets du lot T (1,90). Les IC des lots AB (1,79), R (1,82) et MHE (1,82) sont similaires ( $P > 0,05$ ). En plus, le lot T présente le taux de mortalité le plus élevé (9,6 %) par rapport aux lot AB (0,8 %), R (4,0 %) et MHE (3,2 %). Ainsi, les deux préparations d'huiles essentielles présentent la même efficacité zootechnique chez le poulet alors qu'elles n'ont pas le même pouvoir antibactérien *in vitro*.

### ABSTRACT

The aim of this work is to test the *in vitro* antimicrobial activity of essential oils of rosemary and a preparation of essential oils association (EOA) and their effects on growth performances of broilers. The disc diffusion method was applied for the determination of antimicrobial activities of essential oils contained in rosemary and EOA. The GC-MS was used to determine the essential oils composition. *In vivo*, a total of 500, 1-day-old male broilers (Arbor Acres) were assigned to 4 treatments (5 replicates per treatment): basal diet (T) and basal diet supplemented with either antibiotics (AB), rosemary (R) or EOA (MHE). Essential oils of rosemary contained cineole (50 %), camphor (12 %) and  $\alpha$ -pinene (10 %). EOA contained phenols. *In vitro*, essential oils of rosemary had antimicrobial effects on *E. Coli*, *Salmonella*, *Listeria* and *Staphylococcus*. However they had no antimicrobial activities on *Enterococcus*, *Bacillus* and *Lactobacillus*. The essential oils of EOA had antimicrobial effects on all bacteria tested excepted for *Lactobacillus rhamnosus*. *In vivo*, throughout the trial, the feed:gain ratios of AB (1.79), R (1.82) and MHE (1.82) were similar but higher ( $P < 0,05$ ) than T (1.90). Besides the highest mortality rate was recorded in birds fed T diet (9.6 %) compared to those fed R (4.0 %), AB (0.8 %) and MHE (3.2 %) diets. Finally, the two essential oils preparations had the same efficiency in broiler though they had not *in vitro* the same antimicrobial activities.

## INTRODUCTION

Les antibiotiques en tant que facteurs de croissance (AFC) sont utilisés en alimentation animale depuis les années 50. Leur efficacité zootechnique et économique est à l'origine de leur utilisation systématique (Donoghue, 2003 ; Motl et al., 2005 ; Devie et al., 2006). Cependant, depuis plusieurs années, une augmentation de l'antibiorésistance est observée aussi bien en médecine humaine que vétérinaire. Ainsi chez l'homme, des bactéries pathogènes apparaissent résistantes et réduisent l'efficacité de certains antibiotiques, telles que la pénicilline et la tétracycline. L'utilisation très importante des antibiotiques en médecine est en grande partie responsable, mais leur utilisation en élevage, dans un but thérapeutique ou comme facteur de croissance, pourrait aussi y contribuer. Pour cette raison, par mesure de précaution, l'Union Européenne (UE) a interdit depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2006, l'utilisation de tous les AFC dans les aliments pour animaux. Cette suppression a provoqué une détérioration de l'état sanitaire des animaux, une augmentation du taux de mortalité, une baisse des poids corporels, un accroissement des indices de consommation et par conséquent une diminution de la rentabilité économique des élevages avicoles (Dibner et Richards., 2005). De nombreuses alternatives aux AFC sont donc proposées.

Parmi ces alternatives, les extraits de plantes dont les huiles essentielles (HE) ont un fort potentiel pour remplacer les AFC chez le poulet de chair. En effet, elles ont de nombreux effets biologiques : antibactérien sans développement de phénomène de résistance, antioxydant activateur du système immunitaire, stimulateur des processus de digestion. L'activité antimicrobienne d'huiles essentielles a été montrée *in vitro* par de nombreuses études, principalement contre des bactéries pathogènes telles que *C. perfringens*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* et *Yersinia enterocolitica* (Dorman et Deans, 2000 ; Fabio et al., 2003). L'étude de l'effet de ces HE sur des bactéries bénéfiques est relativement rare (Lee et al, 1998). Il semble que les HE soient plus efficaces sur les bactéries à Gram positif, que sur les bactéries à Gram négatif. Ceci est dû probablement à la présence des lipopolysaccharides dans la structure de la membrane des bactéries à Gram négatif qui gênent la pénétration des HE (Lee et al., 2003). Or, la flore du tube digestif des volailles est composée principalement de bactéries à Gram positif (Gabriel et al, 2005), bien qu'elle contienne aussi des bactéries à Gram négatif dont certaines peuvent avoir un effet négatif sur la santé du tube digestif comme *Escherichia coli* ou *Salmonella*. L'activité antibactérienne de ces HE est due à la présence de ces substances telles que le thymol, le carvacrol, l'eugénol, le cinnamaldehyde. Le thymol, le carvacrol

et l'eugénol qui sont les trois principaux composants du thym et de l'origan, ont montré, *in vitro*, une importante activité antimicrobienne contre différentes bactéries néfastes *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et *Clostridium sporogenes* (Paster et al., 1990 ; Dorman et Deans, 2000). Ainsi, il est intéressant de combiner plusieurs HE pour bénéficier des phénomènes de synergie entre les composés et maximiser par conséquence leur potentiel antibactérien.

L'objectif de la présente étude est d'évaluer, *in vitro*, le pouvoir antibactérien de deux préparations d'huiles essentielles (HE de romarin et un mélange d'huiles essentielles) non seulement sur les bactéries néfastes, mais aussi sur les bactéries bénéfiques du tube digestif du poulet de chair. La deuxième partie de notre étude consiste à étudier *in vivo* l'efficacité de ces deux préparations d'huiles essentielles.

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Sources des huiles essentielles

L'HE de Romarin (*Rosmarinus officinalis*) est fournie par l'entreprise Carthago (Sousse, Tunisie) et est extraite par hydro-distillation. La préparation d'HE Enterocox est produite par Phytosynthèse (France).

### 1.2. Détermination de la composition des huiles essentielles

L'analyse des huiles essentielles est effectuée en utilisant un chromatographe en phase gazeuse (Agilent 6890N) connecté à un spectromètre de masse (Agilent 5973N). La colonne chromatographique est de type HP5-MS 5% Phenyl Methyl Siloxane (longueur : 30 m ; diamètre interne : 0,25 mm ; épaisseur du film : 0,25 µm) et le passeur automatique est Agilent 7683B. Le gaz vecteur est de l'hélium à un flux de 1ml/min. La température de la colonne est initialement réglée à 5°C (durant 1 min) puis augmente progressivement à un taux de 2°C/min pour atteindre, au bout de 130 min, les 300°C. Les échantillons sont dilués (1/10) puis 1 µl est injecté. Les composants sont identifiés en comparant leurs temps de rétentions relatifs et leurs masses avec les bases de données standards, NIST05a et Wiley7 (Bampidis et al., 2005). Ces Analyses sont effectuées l'INRAP de Sidi Thabet (Tunisie).

### 1.3. Etude *in vitro*

L'effet antibactérien des HE est étudié sur 13 souches bactériennes représentatives du tube digestif du poulet et fournies par l'Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie (INSAT, Tunisie) : *Lactobacillus* (4 souches) : *Lactobacillus rhamnosus* TB1 (LMINSAT), *Lactobacillus reuteri* LRT1 (LMINSAT), *Lactobacillus plantarum*

(LMINSAT) et *Lactobacillus salivarius* LST1 (LMENITA) ; *Enterococcus* (3 souches) : *Enterococcus faecalis* EIST1 (LMINSAT), *Enterococcus faecium* EUMT3 (LMINSAT) et *Enterococcus faecium* EUMT10 (LMINSAT) ; *Escherichia coli* (2 souches) : *Escherichia coli* 0111 (LMENITA) et *Escherichia coli* (LMINSAT) ; *Staphylococcus aureus* 20256 (CIP) ; *Salmonelle indiana* (CIP), *Listeria innocua* 8011T (CIP) et *Bacillus subtilis*.

Le pouvoir antibactérien des huiles essentielles est évalué par la méthode de diffusion des disques avec différentes dilutions et 3 répétitions par dilution.

#### 1.4. Etude *in vivo*

Le régime de base a été formulé à l'aide du logiciel PORFAL, ITP-INRA version 2.0. Il est à base de maïs (69,8 %) et de tourteau de soja (33,2 %). Les recommandations nutritionnelles du poulet de chair sont celles indiquées dans Nutrition et Alimentation des Volailles (Larbier et Leclercq, 1992). Cet aliment apporte 2910 kcal d'EM/kg, 20,5 % de protéines et 1,154 % de lysine. L'aliment est en farine et il est distribué à volonté après avoir été ou non additionné d'un antibiotique (Avilamycine) ou de l'une des deux préparations d'huiles essentielles : 100 g / tonne d'aliment pour le romarin (R) et 1000 g / tonne d'aliment pour l'Enterocox (MHE).

Cinq cent poussins mâles (Arbor-Acres) sont élevés au sol (10 poulets par m<sup>2</sup>) et répartis en 4 lots (5 répétitions par lot et 25 poulets par répétition) : T (aliment de base), AB (aliment de base + Avilamycine), R (aliment de base + HE de romarin) et MHE (aliment de base + mélange d'huiles essentielles). Les poussins sont pesés à jeun et individuellement le premier jour, le 21<sup>ème</sup> jour et le 42<sup>ème</sup> jour d'âge. Les quantités d'aliment ingérées par groupe de 25 poulets ont été enregistrées chaque semaine. Les animaux morts au cours de l'expérience sont enregistrés et pesés.

#### 1.5. Analyses statistiques

Les données sont analysées statistiquement moyennant la procédure ANOVA du logiciel Statview pour Windows 4.5 (1996). La différence entre les moyennes est déterminée par le test Fisher. Le seuil de signification statistique est fixé à  $P < 0,05$ .

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

Le composé majoritaire (Tableau 1) de l'huile essentielle du romarin (*Rosmarinus officinalis*) est le cinéole (50 %) suivi du camphre (12 %), de l' $\alpha$ -pinène (10 %) et du bicyclo-3.1.1-heptane (6,5%). En ce qui concerne la préparation de plusieurs huiles essentielles, elle est constituée par des aldéhydes, des phénols et des terpènes.

L'HE de romarin (Tableau 2) présente une activité antimicrobienne contre *E.coli*, *Salmonella*, *Listeria*,

et *Staphylococcus*. Cependant elles n'inhibent pas la croissance des *Bacillus*, des *Enterococcus* et des *Lactobacillus*.

La préparation de plusieurs huiles essentielles (Tableau 3) présente un pouvoir antimicrobien contre toutes les bactéries à l'exception de *Lactobacillus rhamnosus*. Ainsi, le mélange d'HE inhibe à la fois les bactéries gram positif et gram négatif alors que l'HE de romarin présente un effet antibactérien que sur les bactéries gram négatif. Cet effet sélectif des huiles essentielles a été très étudié dans la littérature. L'activité antibactérienne des huiles essentielles est due à la présence des alcools à longues chaînes et des composés phénols qui inhibent la croissance des bactéries (Skocibusic et al., 2006, Sharififar et al., 2007).

Le poids au 42<sup>ème</sup> jour des poulets de chair (Tableau 4) des lots AB, R et MHE sont supérieurs à celui du lot témoin ( $p < 0,05$ ). Par ailleurs, il n'y a pas de différences significatives ( $p > 0,05$ ) entre les différents lots ayant reçu les deux préparations d'huiles essentielles. La quantité d'aliment ingérée la plus faible ( $p < 0,05$ ) a été enregistrée chez les poulets du lot AB. Les animaux des lots témoin et R ont ingéré la même quantité d'aliment. L'indice de consommation le plus élevé ( $p < 0,05$ ) a été obtenu avec le lot témoin (1,90). Les poulets des lots AB (1,79), R (1,82) et MHE (1,82) ont des indices de consommation similaires mais meilleurs ( $p < 0,05$ ) que celui du lot témoin. La suppression des AFC du régime alimentaire (Tableau 4) du poulet de chair entraîne une augmentation du taux de mortalité. L'addition des deux préparations d'huiles essentielles permet de réduire le taux de mortalité mais il reste supérieur à celui du lot recevant les AFC.

Les résultats de la présente étude montre que les deux préparations d'huiles essentielles permettent d'améliorer les performances du poulet de chair par rapport au lot témoin. En effet, Hernandez et al. (2004), pensent que les huiles essentielles de romarin pourraient améliorer la digestibilité de l'aliment dans tout le tractus digestif. En plus les composés contenus dans l'HE de romarin (cinéole,  $\alpha$ -pinène) limitent le développement des bactéries pathogènes dans l'intestin de poulet (Dorman et Deans, 2000). Cependant, Jang et al. (2007) trouvent que le poids vif, le gain moyen quotidien, la quantité d'aliments ingérés, et l'indice de consommation n'ont pas été significativement améliorés suite à l'addition d'extraits de plantes.

## CONCLUSION

Les résultats de la présente étude montrent que les deux préparations d'huiles essentielles peuvent être utilisées comme alternative aux AFC. Elles présentent la même efficacité zootechnique chez le poulet de chair bien qu'elles n'aient pas le même pouvoir antibactérien *in vitro*.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bampidis, V. A., Christodoulou, V., Florou-Paneri, P., Christaki, E., Spais, A. B., Chatzopoulou, P. S., 2005. Anim. Feed Sci. Technol., (121), 285-295.
- Devie, P., Divol, A., Gilbert, G., Laurent, Sandra., Le Goaziou, A., Olivon, M., Petit, J., 2006. www.univ-best.fr/esmisab/site/prod-animal/antibio-pdf
- Dibner, J.J., Richards, J.D., 2005. Poult. Sci., (84), 634-643.
- Donoghue, Dan J., 2003. Poult. Sci., (82), 618-621.
- Dorman, H-J, Deans, S-G., 2000. J. Appl. Microbiol., (88), 308-316.
- Fabio, A., Corona, A., Forte, E., Quaglio, P., 2003. New Microbiol., (26), 115-120.
- Gabriel, I., Mallet, S., Sibille, P., 2005. INRA Prod. Anim., (18), 309-322.
- Hernandez, F., Madrid, J., Garcia, V., Orenge, J., Megias, M.D., 2004. Poult. Sci., (83), 169-174.
- Jang, I.S., Ko, Y.H., Kang, S.Y., Lee, C.Y., 2007. Anim. Feed Sci. Technol., (134), 304-315.
- Larbier, M., Leclercq, B., 1992. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Paris.
- Lee, H., Ahn, Y., 1998. J. Agric. Food Chem., (46), 8-12.
- Lu, J., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J., Lee, M.D., 2003. Appl. Environ. Microbiol., (69), 6816-6824.
- Motl.M.A, Fritts, C.A., Waldroup, P.W., 2005. J. Appl. Poult. Res., (14), 167-173.
- Paster, N., Juven, B. J., Shaaya, E., Menashero, M., Nitzan, R., Weisslowitz, H., Ravid, U., 1990. Let. Appl. Microbiol., (11), 33-37.
- Sharififar, F., Mosha, M.H., Mansouri, S. H., Khodashenas, M., Khoshnoodi, M., 2007. Food Control, (18), 800-805.
- Skocibusic, M., Bezic, N., Dunkic, V., 2006. Food Chem., (96), 20-28.

**Tableau 1.** Composition de l'huile essentielle de romarin déterminée par CPG-MS\*

N°d'ordre**	Composés	Teneur (%)
1	$\alpha$ -Pinène	10,0
2	Camphène	3,7
3	Bicyclo(3.1.1)heptane	6,5
4	$\beta$ -Myrcène	1,1
5	Cymol	1,6
6	$\alpha$ -Terpinène	0,4
7	Cinéole	50,0
8	Camphre	12,0
9	Linalool	0,8
10	Bornéol	3,4
11	1-Terpinène-4-ol	0,9
12	Caryophyllène	3,9
13	$\alpha$ -Humulène	0,4
14	p-menth-1-ène-8-ol	2,2

\* CPG-MS : chromatographe en phase gazeuse connecté à un spectromètre de masse.

\*\*ordre d'apparition des chromatogrammes en se basant sur leurs temps de rétention

**Tableau 4.** Effet des huiles essentielles sur les performances des poulets de chair

Lots	Aliment ingéré 1 - 42 j (g/poulet)	Indice de consommation 1 - 42 j	Poids 42 j (g)	Mortalité (%)
T	3833 $\pm$ 125 <sup>a</sup>	1,90 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	2066 $\pm$ 204 <sup>a</sup>	9,6 <sup>a</sup>
AB	3709 $\pm$ 55 <sup>b</sup>	1,79 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>	2140 $\pm$ 225 <sup>b</sup>	0,8 <sup>b</sup>
R	3827 $\pm$ 54 <sup>a</sup>	1,82 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	2167 $\pm$ 242 <sup>b</sup>	4,0 <sup>c</sup>
MHE	3803 $\pm$ 122 <sup>c</sup>	1,82 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>	2143 $\pm$ 223 <sup>b</sup>	3,2 <sup>c</sup>
Probabilité	HS	HS	S	S
	< 0,0001	0,0065	0,0149	0,0283

a, b, c : Les moyennes ayant des lettres différentes sont significativement différentes

T (aliment de base), AB (aliment de base + Avilamycine), R (aliment de base + HE de romarin) et MHE (aliment de base + mélange d'huiles essentielles)

**Tableau 2.** Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de romarin (zones d'inhibitions en mm selon différentes concentrations)

Bactéries	Dilutions de l'HE** de romarin (ml HE / ml du solvant)			
	Pure*	0.33	0.2	0.14
<i>Escherichia coli</i> 0111	15	17	17	0
<i>Escherichia coli</i>	13	15	16	0
<i>Salmonelle indiana</i>	15	15	0	0
<i>Listeria innocua</i> 8011T	12	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> 20256	9	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> 168	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> EIST1	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecium</i> EUMT3	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecium</i> EUMT10	0	0	0	0
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> TB1	0	0	0	0
<i>Lactobacillus reuteri</i> LRT1	0	0	0	0
<i>Lactobacillus plantarium</i>	0	0	0	0
<i>Lactobacillus salivarius</i> LST1	0	0	0	0

\* : L'huile essentielle à l'état pure sans dilution

\*\* : Huiles essentielles

**Tableau 3.** Activité antimicrobienne de la préparation de plusieurs huiles essentielles (zones d'inhibitions en mm selon différentes concentrations)

Bactéries	Dilutions de la préparation de plusieurs HE** (ml HE / ml du solvant)					
	Pure *	0.33	0.2	0.14	0.11	0.09
<i>Escherichia coli</i> 0111	16	21	18	14	10	0
<i>Escherichia coli</i>	21	15	13	10	8	7
<i>Salmonelle indiana</i>	15	18	0	0	0	0
<i>Listeria innocua</i> 8011T	23	12	11	7	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> 20256	26	18	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> 168	19	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> EIST1	15	14	11	0	0	0
<i>Enterococcus faecium</i> EUMT3	13	12	12	0	0	0
<i>Enterococcus faecium</i> EUMT10	12	12	0	0	0	0
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> TB1	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus reuteri</i> LRT1	14	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus plantarium</i>	13	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus salivarius</i> LST1	14	0	0	0	0	0

\* : L'huile essentielle à l'état pure sans dilution

\*\* : Huiles essentielles