

**ETUDE DE LA CAPACITE D'INHIBITION DE LA CROISSANCE D'*E. COLI*
EXPOSEE A UN MELANGE D'HUILES ESSENTIELLES, PUIS DE LA CAPACITE
DE RECUPERATION D'*E. COLI*, EN COMPARAISON DE LA COLISTINE.**

**Girard Claire¹, Chabrilat Thibaut¹, Araujo Coralie¹, Leguay Clara¹, Johansen Bianca²,
Sergere Jean-Christophe², Kerros Sylvain¹**

¹ PHYTOSYNTHESE, 57 avenue Jean-Jaurès, 63200 MOZAC

² SETUBIO S.A., Parc Naturopôle Nutrition Santé, 03800 SAINT BONNET DE ROCHEFORT

claire.girard@phytosynthese.com

RESUME

Les additifs phytogéniques constituent des solutions alternatives aux antibiotiques en nutrition animale. Le but de cette étude est de comparer la capacité d'inhibition de croissance d'*E. coli* exposée à un mélange commercial d'huiles essentielles (mélange HE) puis à la colistine. La capacité de récupération de la bactérie est également comparée après exposition à ces deux substances antibactériennes. Premièrement, un suivi de croissance d'une souche *E. coli* a été réalisé par dénombrement à 0H, 1H, 2H, 4H et 6H en présence du mélange HE ou de la colistine à concentrations CMI, CMI/2 et CMI/4. Puis, le même suivi de croissance a été mesuré mais cette fois après 90 min de contact, les deux agents antibactériens ont été éliminés du milieu par centrifugation. En effet, il s'agit de mesurer la capacité de récupération bactérienne. C'est l'écart de population bactérienne mesuré à partir du temps initial correspondant à l'élimination des substances antibactériennes, jusqu'à 24H. Le mélange HE montre une capacité d'inhibition de la croissance bactérienne à doses inférieures sub-CMI (à CMI/2 à t=4H, réduction d'1 log₁₀ par rapport au contrôle). Cette activité bactériostatique est dépendante de la concentration, tout comme pour la colistine. L'antibiotique présente une activité plutôt bactéricide (à CMI/2 à t=4H, réduction de 4,5 log₁₀ par rapport au contrôle). La capacité de récupération d'*E. coli* est nulle après exposition à une dose CMI de colistine et identique au contrôle après exposition au mélange HE. Après exposition à une dose sub-CMI d'antibiotique, la capacité de récupération bactérienne est cette fois 1,83 fois supérieure à celle du contrôle alors qu'elle reste identique au contrôle après exposition au mélange HE. Ceci pourrait s'expliquer par une adaptation métabolique de la part de la bactérie. Cette étude doit être complétée par des travaux sur le mode d'action comparé des huiles essentielles et de l'antibiotique, dont les modes d'acquisition de résistance.

ABSTRACT

Study of the growth inhibition capacity et the recovery capacity of *E. coli*, exposed to an essential oils blend in comparison with colistin antibiotic.

Phytogenic additives are new alternatives identified to reduce the use of antibiotics in feed. The aim of this study is to investigate the growth inhibition capacity et the recovery capacity *E. coli* exposed at inhibitory et sub-inhibitory concentrations (MIC et sub-MIC) to an essential oil mixture (EO mix). Bacteria growths are compared with a positive antibiotic control: colistin. First, an *E. coli* growth monitoring (log₁₀) is performed from 0 to 6 hours in the presence of both antibacterial substances at different concentrations (MIC, MIC/2 et MIC/4). Then, a second *E. coli* growth monitoring is performed after elimination by centrifugation of antimicrobial agents previously in contact with the bacteria during 90 minutes. The recovery capacity is the difference of *E. coli* population (log₁₀) between initial time corresponding to the elimination, et 24 hours. Both antibacterial substances demonstrate a concentration-dependent growth inhibition capacity at sub-MIC concentrations. Unlike the EO mix which have a bacteriostatic action (at CMI/2 at t=4H, reduction of 1 log₁₀ compared to the control), colistin has a bactericidal trend (at CMI/2 at t=4H, reduction of 4.5 log₁₀ compared to the control); the *E. coli* recovery capacity is non-existing after exposure to colistin at MIC et equal to the negative control when using EO mix at MIC. An exposure to colistin at MIC/4 results in a 1,83 times higher population compared to an exposure to EO mix at MIC/4 et negative control. A hypothesis is the modification of the bacteria metabolism due to an adaptation. This study should be completed by further investigations on mode of action, including resistance patterns.

INTRODUCTION

L'augmentation de l'antibio-résistance nécessite une utilisation raisonnée des antibiotiques. Après l'interdiction de l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance dans l'alimentation animale, et à défaut de trouver de nouvelles molécules, dont la difficulté principale est de pouvoir pénétrer la paroi bactérienne (Payne et al., 2007), des alternatives telles que les huiles essentielles (HE) et extraits de plantes sont utilisées en prévention dans l'alimentation des volailles.

Les HE sont des liquides volatiles issus du métabolisme secondaire des plantes aromatiques. Elles sont constituées d'une multitude de composés terpènes, aldéhydes et phénols (Padalia et al., 2015). Elles possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales connues depuis l'antiquité et largement étudiées *in vitro* sur de nombreuses bactéries Gram – et Gram + (Dorman et Deans, 2000; Liu et al., 2013; Mickiene et al., 2011).

Cependant, si l'action antibactérienne combinée de deux HE ou de leurs principaux composants a été étudiée (de Azeredo et al., 2011; Bassolé et Juliani, 2012), l'action bactériostatique d'un mélange complexe d'HE sur une souche bactérienne n'a été que peu exploré.

Le but de ce travail est de comparer l'action d'un mélange commercial complexe d'HE (mélange HE) à celle d'un antibiotique, la colistine, sur une souche d'*Escherichia coli* (*E. coli*), en déterminant la capacité d'inhibition et la capacité de récupération de la bactérie après exposition aux actifs.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Détermination de la composition du mélange HE

L'analyse du mélange HE (fourni par Phytosynthese) est effectuée en utilisant un chromatographe en phase gazeuse (ThermoFisher Trace GC) couplé à un spectromètre de masse (ThermoFisher DSQ I). La colonne chromatographique est de type TG-5MS (longueur : 30m ; diamètre interne : 0,25mm ; épaisseur du film : 0,25 µm) et le passeur automatique est Triplus. Le gaz vecteur est l'hélium et le débit est de 0,7ml/min. La température de la colonne est initialement réglée à 60°C et augmente

progressivement de 5°C/min jusqu'à 300°C. Les échantillons sont dilués (1/10) puis 0,5 µl est injecté. Les composants sont identifiés grâce à la banque de données NIST 5. Ces analyses ont été réalisées en triplicatas dans le laboratoire de Phytosynthese.

1.2. Préparation des échantillons des actifs testés

Le sulfate de colistine (Sigma-Aldrich, 1264-72-8) est préparé en solution aqueuse à 1 mg/ml dans de l'eau stérile et conservé à -80°C et décongelé deux fois maximum. La solution de travail est préparée à 50µg/ml. Le mélange HE est préparé à 50% dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), puis dilué dans de l'eau stérile aux concentrations à tester. La solution de travail du mélange HE est de 4%. La préparation des échantillons des actifs et les tests microbiologiques ont été réalisés dans le laboratoire de Setubio.

1.3. Exposition des bactéries au mélange HE et à la colistine

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus petite concentration d'actif inhibant toute croissance bactérienne visible à l'œil nu à 37°C pendant 18H. La CMI est déterminée pour la colistine et le mélange HE sur une souche *E. coli* (CIP 53.126) selon la méthode de micro dilution en bouillon décrite dans la norme ISO 20776-1 :2006. Une série de dilutions de raison 2 est réalisée à partir de concentrations maximales testées de 12,5 µg/ml de colistine et 1% de mélange HE. Un témoin solvant est utilisé en parallèle aux mêmes concentrations que le mélange d'HE.

Le suivi de croissance bactérienne est réalisé en milieu liquide (bouillon Mueller Hinton) par la méthode du time-kill, adaptée des protocoles décrits par May J *et al* [2000] et Peterson PJ *et al* [2007]. Un dénombrement sur gélose riche est effectué à T0 (avant la mise en contact des bactéries avec l'échantillon), à T1H, T2H, T4H, T6H, et T24H. Les concentrations testées sont CMI, CMI/2 et CMI/4 pour le mélange HE et la colistine avec une concentration de colonies testées calibrée à 5.10^5 - 10^6 UFC/ml. Un témoin solvant est réalisé aux mêmes concentrations que le mélange HE. Les expériences sont répétées en double et de manière indépendante. Les résultats sont représentés en nombre de microorganismes (\log_{10} UFC/mL) en fonction du temps. Enfin, un second suivi de croissance après

mise en contact avec les agents antibactériens est réalisé selon les protocoles de Lee SI et Choe SJ [2004] et Pankuch GA *et al* [2003]. Il est adapté de la méthode du time-kill. Mais cette fois après 90 min de contact, les deux agents antibactériens sont éliminés du milieu par centrifugation à 2 100 g, 10 minutes, et le culot bactérien est repris dans du milieu frais. En effet, il s'agit de mesurer la capacité de récupération bactérienne. Elle est définie comme l'écart de population de microorganismes mesuré à partir du temps initial correspondant à l'élimination des substances antibactériennes, jusqu'à 24H. Les résultats sont représentés graphiquement par le nombre de microorganismes (Log_{10} UFC/mL) en fonction du temps.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le mélange HE est un mélange complexe de 16 molécules identifiées (phénols, aldéhydes et terpènes) dont les composés principaux sont le cinnamaldéhyde (42,73 %), suivi du thymol (15,00%) et enfin du carvacrol.

La CMI du mélange HE est 186 fois supérieure à celle de la colistine (tableau 2), ce qui suggère une plus grande susceptibilité d'*E. coli* à l'antibiotique.

L'étude de la cinétique de croissance d'*E. coli* (figure 1) prouve une activité inhibitrice même à concentrations sub-CMI de mélange HE, comme précédemment décrit (Liu et al., 2013). Cette action est dépendante de la concentration, comme pour l'antibiotique. Le témoin solvant ne présente aucune activité antibactérienne (données non présentées). La colistine, quant à elle, présente une activité bactéricide. En effet, après 2H à la dose CMI, la diminution de la charge bactérienne par rapport au contrôle est de 0.5 Log_{10} avec le mélange HE contre 4,5 Log_{10} avec la colistine. Ce résultat est en accord avec des études précédentes rapportant l'activité à la fois bactéricide et dépendante de la concentration de la colistine (Bergen et al., 2012; Owen et al., 2007). L'activité inhibitrice du mélange HE peut s'expliquer par la présence de composés phénols et aldéhydes dont l'activité antibactérienne est connue pour être

plus efficace que celle des composés terpéniques (Bajpai et al., 2012; Bassolé et Juliani, 2012).

La capacité de récupération d'*E. coli* est définie comme la différence (en Log_{10} UFC/mL) entre le dénombrement bactérien à T24H et le dénombrement après élimination des substances antibactériennes. Elle est nulle après exposition pendant 90 minutes à une dose CMI de colistine (figure 2), comme précédemment rapporté (Michalopoulos et Falagas, 2011). Elle est identique au contrôle après exposition au mélange HE. Cependant, après exposition à une dose sub-CMI d'antibiotique, la capacité de récupération bactérienne est cette fois 1,83 fois supérieure à celle du contrôle alors qu'elle reste identique au contrôle après exposition au mélange HE. Une recroissance plus rapide de souches de bactéries à Gram négatif (*Acinetobacter baumannii*) après exposition à des concentrations sub-CMI de colistine (CMI/2) a déjà été constatée (Owen et al., 2007). Ce phénomène a lui aussi pu être observé sur *E. coli* après exposition au méropénème (Hanberger et al., 1995). Le mécanisme sous-jacent est aujourd'hui inconnu (Bergen et al., 2012) mais il est possible que des doses sub-CMI d'antibiotique puissent modifier le métabolisme bactérien, contrairement au mélange HE. D'autres changements métaboliques ont déjà pu être observés notamment, dans le cas de la persistance bactérienne (Keren et al., 2004; Levin et Rozen, 2006; Martínez et Rojo, 2011).

CONCLUSION

Les résultats de cette étude montrent que le mélange HE peut inhiber la croissance bactérienne même à des doses sub-CMI et possède une action, bactériostatique. Cette action est dépendante de la concentration, comme pour l'antibiotique. Il est également prouvé ici que le mélange HE n'augmente pas la capacité de récupération d'*E. coli*, contrairement à la colistine. Il serait intéressant de poursuivre cette étude par des investigations sur le mode d'action comparé du mélange HE et de l'antibiotique, en incluant les modes d'acquisition de résistance.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- de Azeredo G.A., Stamford T.L.M., Nunes P.C., Gomes Neto N.J., de Oliveira M.E.G., de Souza E.L., 2011. Food Res. Int., (44), 1541–1548.
- Bajpai V.K., Baek K.-H., Kang, S.C., 2012. Food Res. Int., (45), 722–734.
- Bassolé I.H.N., Juliani H.R., 2012. Molecules, (17), 3989–4006.
- Bergen P.J., Landersdorfer C.B., Zhang J., Zhao M., Lee H.J., Nation R.L., Li J., 2012. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., (74), 213–223.
- Dorman H.J.D., Deans S.G., 2000. J. Appl. Microbiol., (88), 308–316.
- Hanberger H., Svensson E., Nilsson L.E., Nilsson M., 1995. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., (14), 383–390.
- Keren I., Shah D., Spoering A., Kaldalu N., Lewis K., 2004. J. Bacteriol., (186), 8172–8180.
- Lee S.Y., Choe S.-J., 2004. Int. J. Antimicrob. Agents, (23), 457–461.
- Levin B.R., Rozen D.E., 2006. Nat. Rev. Microbiol., (4), 556–562.
- Liu Y., Zhang X., Wang Y., Chen F., Yu Z., Wang L., Chen S., Guo M., 2013. World J. Microbiol. Biotechnol., (29), 1161–1167.
- Martínez J.L., Rojo F., 2011. FEMS Microbiol. Rev., (35), 768–789.
- May J., Chan C.H., King A., Williams L., French G.L., 2000. J. Antimicrob. Chemother., (45), 639–643.
- Michalopoulos A.S., Falagas M.E., 2011. Ann. Intensive Care, (1), 1.
- Mickiene R., Bakutis B., Baliukoniene V., 2011. Ann. Agric. Environ. Med., (18).
- Owen R.J., Li J., Nation R.L., Spelman D., 2007. J. Antimicrob. Chemother., (59), 473–477.
- Padalia H., Moteriya P., Baravalia Y., Chanda S., 2015. Battle Microb. Pathog. Basic Sci. Technol. Adv. Educ. Programs, (1), 34–45.
- Pankuch G.A., Jacobs M.R., Appelbaum P.C., 2003. Antimicrob. Agents Chemother., (47), 3012–3014.
- Payne D.J., Gwynn M.N., Holmes D.J., Pompliano D.L., 2007. Nat. Rev. Drug Discov., (6), 29–40.
- Petersen P.J., Jones C.H., Bradford P.A., 2007. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., (59), 347–349.

Tableau 1 : Composition du mélange HE déterminée par chromatographie en phase gazeuse.

N° d'ordre	Composés	Moyenne (%)
1	Cinnamaldéhyde	42,73 ± 0,80
2	Thymol	15,00 ± 0,11
3	Carvacrol	8,95 ± 0,12
4	p-cymène	7,95 ± 0,63
5	α-terpinène	6,05 ± 0,26
6	Eugénol	5,90 ± 0,10
7	D-Limonène	3,44 ± 0,12
8	Néral	2,16 ± 0,11
9	β-pinène	1,00 ± 0,06
10	β-caryophyllène	1,01 ± 0,07
11	Géranial	0,54 ± 0,01
12	Disulfure de diallyle	0,41 ± 0,02
13	Linalol	0,35 ± 0,01
14	Citronellal	0,27 ± 0,01
15	Citronellol	0,26 ± 0,01
16	α-terpinéol	0,08 ± 0,01

Tableau 2 : Détermination des CMI de la colistine et du noyau d'huiles essentielles

	CMI colistine (µg/ml)	CMI noyau HE (µg/ml)
<i>E. coli</i>	1,56	291

Figure 1 : Courbes de croissance d'*E. coli* (\log_{10} UFC/ml) en fonction du temps (H), exposée à des CMI et sub-CMI de mélange HE (a) ou de colistine (b).

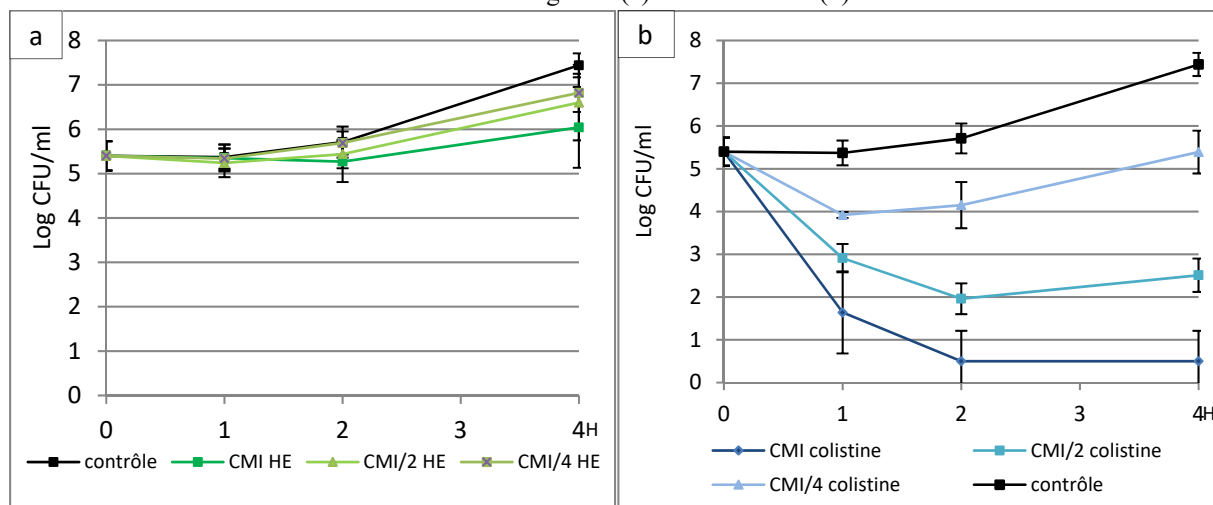


Figure 2 : Capacité de récupération d'*E. coli* (\log_{10} UFC/ml) après une exposition de 90 minutes au mélange HE ou à la colistine.

