

**MESURE DE LA SENSIBILITE D'ESCHERICHIA COLI ISOLES SUR DES  
VOLAILLES VIS-A-VIS D'UN MELANGE D'HUILES ESSENTIELLES REPUTEES  
ANTIBACTERIENNES ET D'EXTRAITS DE PLANTES A L'AIDE DE LA  
TECHNIQUE DU PHYTOGRAMME®.**

**Mauvisseau Thierry**

*LABOVET CONSEIL (Réseau Cristal), 40 rue Arsène Mignen, Les Essarts, 85140 ESSARTS  
EN BOCAGE*

[t.mauvisseau@reseaucristal.fr](mailto:t.mauvisseau@reseaucristal.fr)

**RESUME :**

La réduction de l'antibiothérapie est désormais une obligation en médecine vétérinaire, le maintien des performances et la santé des animaux en est une autre également. Le recours aux solutions alternatives telles que l'aromathérapie est une des voies permettant d'assurer la santé des animaux.

A partir du Phytogramme®, développé par RESALAB, technique de diffusion d'une solution à base d'huiles essentielles sur une géloseensemencée avec une souche bactérienne, nous avons réalisé une étude sur 67 souches d'*Escherichia coli* isolés sur volailles malades. Cela a permis d'établir que chacun des mélanges d'huiles essentielles ne génère pas toujours les mêmes diamètres d'inhibition et même que certaines souches ne semblent pas sensibles au mélange comportant des huiles essentielles réputées antibactériennes. Le Phytogramme® est donc un examen permettant d'appréhender avec moins d'empirisme le recours aux huiles essentielles dans le traitement des pathologies bactériennes à partir d'un résultat in vitro.

**ABSTRACT :**

**Measurement of the susceptibility of *Escherichia coli* isolated from poultry to a mixture of essential oils known as antibacterial and plant extracts using the Phytogramme® technique**

The reduction of antibiotic therapy is now a requirement in veterinary medicine, maintaining performance and animal health is another. The use of alternative solutions such as aromatherapy is one way of ensuring animal health.

From the Phytogramme®, developed by RESALAB, a technique for diffusing a solution based on essential oils on an agar seeded with a bacterial strain, we carried out a study on 67 strains of *Escherichia coli* isolated from diseased poultry. This made it possible to establish that each of mixture of essentials oils does not always generate the same inhibition diameters and even that some strains do not appear to be sensitive to the mixture comprising essential oils that are known to be antibacterial. The Phytogramme® is therefore a test allowing to apprehend with less empiricism the use of essential oils in the treatment of the bacterial pathologies based on an in vitro result.

## INTRODUCTION :

La diminution de l'utilisation des antibiotiques en médecine aviaire et plus particulièrement de certains antibiotiques critiques dont les Fluoroquinolones a contribué à rechercher des solutions alternatives pour maîtriser avec succès les mortalités en élevage de grande taille.

L'aromathérapie ou le recours aux huiles essentielles a fait ses preuves de façon empirique depuis de nombreuses années en médecine humaine mais elle peut être utilisée également en médecine vétérinaire avec succès (May, 7).

Certaines plantes, comportant des huiles essentielles, possèdent des propriétés antibactériennes reconnues (Cannelle, Girofle, Thym, Arbre à thé..) qui peuvent être mesurées à l'aide d'un examen de laboratoire le Phytogramme®. Il permet de mesurer un diamètre d'inhibition d'un mélange d'huiles essentielles vis-à-vis d'une souche bactérienne donnée, technique dérivée de l'aromatogramme de Belaiche (Belaiche, 1979). Cet examen est un outil précieux dans le choix de la spécialité qui possède le plus grand diamètre d'inhibition mesuré in vitro. (CIVAM, 2014)

En se fondant sur les travaux réalisés en 1948 par le Dr Girault, qui traitait avec succès des patients avec plusieurs huiles essentielles associées, mais testées individuellement auparavant par un aromatogramme, à partir de bactéries isolées sur le patient, nous avons sélectionné 67 souches de colibacilles isolés sur des volailles à la suite d'un examen bactériologique et les avons testées avec différents mélanges d'huiles essentielles et mesuré les différents diamètres d'inhibition.

L'objectif est d'apprécier si un même mélange génère des diamètres sensiblement identiques vis à vis d'un taxon et s'il peut être utilisé systématiquement sur une problématique colibacillaire identifiée en élevage ou si les souches d'un même taxon peuvent présenter des diamètres d'inhibition très variables, comme c'est le cas pour les antibiotiques et nécessitant de ce fait le recours à cet examen en routine, pour le choix de la thérapeutique.

## 1. MATERIEL ET METHODE.

### 1.1 Matériel

Le produit utilisé est constitué d'une part d'un mélange de plusieurs huiles essentielles dont : la cannelle de Ceylan, le Niaouli et le Thym et d'autre part d'extraits de plantes à propriétés immunostimulantes et drainantes.

Certaines HE (Huiles essentielles) ont des propriétés antibactériennes, mais également antivirales, antiparasitaires, expectorantes, anti-diarrhéiques, immunostimulantes suivant les différents composants chimiques contenus dans l'HE.

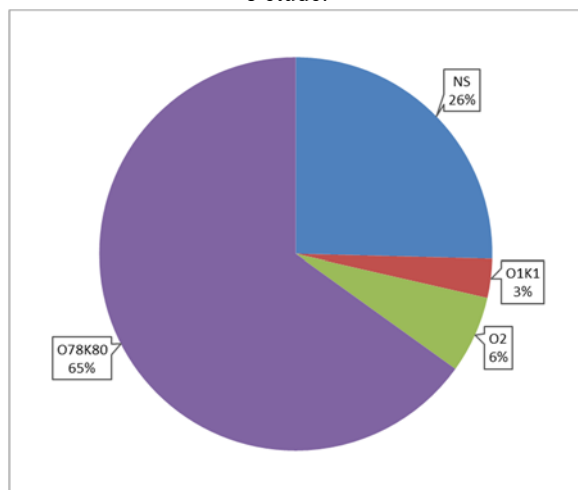
Une chromatographie en phase gazeuse a permis de mesurer les différents composants de chaque huile essentielle et d'identifier le chémotype (constituant singularisant l'HE retenue). En effet, la richesse en chémotype majeur a un impact sur l'activité antibactérienne. Certains constituants tels que le cinnamaldéhyde (Cannelle), le 1-8 cinéol (Niaouli) et le thymol (Thym), ont de réelles activités antibactériennes. En fonction de la richesse en constituants chimiques, l'activité peut être différente. Par exemple un thym riche en paracymène aura plus une activité antalgique ou anti inflammatoire qu'un thym riche en thymol. La composition en chémotype varie selon les conditions climatiques, le terroir, la saison ou l'organe récolté. Un thym cultivé en Tunisie ou en Italie, ou récolté à différentes période de l'année peut contenir des chémotypes complètement différents et avoir des activités totalement différentes. (Franchomme, 4)

Il est donc très important de connaître précisément le chémotype de chaque plante pour avoir une idée précise de l'effet attendu. Un certificat d'analyse avec la constitution des différents chémotypes a été demandé au fabricant de façon à avoir une répétabilité des effets antibactériens.

Les HE sont issues du métabolisme secondaire de la plante à partir d'un noyau isopentényl pyrophosphate (Franchomme, 4) La différenciation de chaque composant des HE se fait ensuite par différentes réactions de carboxylation et/ou d'oxygénation. Des recombinaisons de constituants issus de l'association de plusieurs HE dans un mélange, peuvent donner naissance à un nouveau constituant chimique ou augmenter la quantité d'un constituant présent dans une HE à très faible quantité (Franchomme, 4). Dans la pratique, les spécialités utilisées sont constituées de plusieurs HE de façon à optimiser les effets bénéfiques au travers des différentes actions de chaque HE. Par exemple, dans le cas d'une infection respiratoire d'origine bactérienne qui génère une production importante de mucus et de pus, l'association d'une HE antibactérienne avec une autre HE à propriété

anti- inflammatoire et expectorante sera plus bénéfique qu'une HE à activité antibactérienne uniquement. C'est l'une des grandes différences fondamentales entre un antibiotique qui n'a en général qu'une activité antibactérienne.(May,2014) L'essai a été conduit sur des souches de colibacilles isolées sur organes de volailles présentant des troubles cliniques avec mortalité (péricardite, péri-hépatite, pneumonie), pour lesquels un traitement antibiotique n'était pas toujours possible pour des questions de délai d'attente trop long par rapport à l'abattage ou bien pour des productions ne voulant pas avoir recours aux antibiotiques (production biologique ou volaille élevée sans antibiotiques). Les colibacilles testés appartenaient soit aux sérotypes classiques réputés pathogènes en volailles 65 % (*E. coli* O78K80, *E. coli* O2K1, *E. coli* O1K1) soit à des sérovars non identifiés (26%) mais responsables de lésions infectieuses avec mortalité associée.

**Figure 1.** Répartition des différents sérovars de 67 *Escherichia coli* isolés de volailles testés dans l'étude.



## 1.2 Méthode

La méthode du Phytogramme a été mise au point par RESALAB en 2014. (Mauvisseau, 2016) C'est une technique issue de l'aromatogramme réalisé sur une HE pure décrite par Belaiche en 1948 à partir de buvard imbibé d'HE. (Lequeux, 2013)

Elle repose, en revanche, sur une méthode de diffusion en milieu gélifié à partir d'un puits de 6mm de diamètre contenant 50 µl de la solution pure d'un mélange donné d'HE, de dispersant et de solvant et un autre puits contenant le même volume d'une solution diluée dans de l'eau physiologique à 50%.

La souche bactérienne isolée sur organe est ensuite mise en suspension afin de réaliser un bouillon titré à partir du système de Mac Farland.

Les gélifos sont ensemencées par écouvillonnage croisé à partir du bouillon bactérien.

Les gélifos sont mises en incubation à 37 °C pendant 24 heures pour la lecture des résultats.

Les diamètres d'inhibition de la solution pure et de la solution diluée à 50% sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse, permettant d'avoir des mesures au centième de millimètre

Plus le diamètre d'inhibition est important plus l'activité antibactérienne *in vitro*, est élevée.

Les HE sont déposées dans un puits de 6 mm de diamètre.

Une valeur donnée à 6 mm, correspond au diamètre du puits, donc une absence de diamètre d'inhibition. A partir d'une valeur (supérieure à 6 mm), nous pouvons conclure à une inhibition de la pousse de la bactérie et parler de diamètre d'inhibition. A partir d'un diamètre de 15mm l'activité inhibitrice *in vitro* peut être qualifiée d'assez élevée (3 mm pour Belaiche en HE pure) Afin de mesurer l'effet reproductible de cette technique, des essais interlaboratoires réalisés dans 10 laboratoires, ont permis de reproduire des valeurs similaires à partir de souches identifiées. (RESALAB)

## 1.2 Analyse statistique

Les 67 mesures ont été compilées dans un tableau avec le diamètre en solution pure et le diamètre en solution diluée.

Une analyse statistique sur les moyennes, l'écart type, les diamètres minimum, maximum et la répartition des mesures sous forme d'histogramme a été pratiquée afin d'apprécier une éventuelle homogénéité des résultats.

Chaque analyse a été pratiquée sur le diamètre en pur et sur le diamètre en dilué.

## 2. RESULTAT ET DISCUSSION :

L'analyse des moyennes (tableau 1) indique que les diamètres moyens pour le mélange donné d'HE sont assez proches en solution pure et en solution diluée à 50 %, avec seulement 4 mm d'écart. En diminuant la concentration en HE dans la spécialité de 50%, le diamètre d'inhibition diminue mais l'activité inhibitrice existe toujours. (Diamètre mesuré supérieur à 6 mm)

Le diamètre maximal est relativement important (12,23 mm en pur et 9,12 mm en dilué 50 %), en

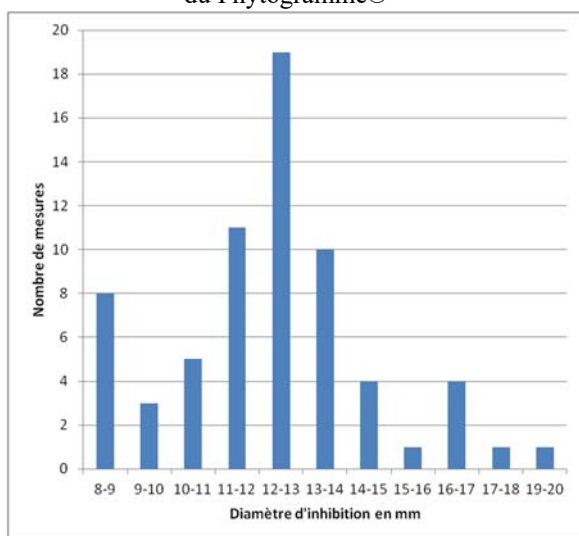
revanche pour le diamètre minimal, en dilution à 50 % la spécialité testée n'a pas généré de diamètre d'inhibition (6 mm) pour certaines souches, donc une absence d'activité antibactérienne directe sur le colibacille.

L'analyse des écarts-types indique une faible variation au sein des 67 souches testées. (2,03 et 2,32) à comparer avec les moyennes respectives de 9,12 et 12,23.

L'analyse de l'histogramme (figure 1) montre que tous les colibacilles sont inhibés par la spécialité utilisée en pur (diamètre d'inhibition supérieur à 6 mm pour les 67 souches). 8 souches de colibacilles présentent un très faible diamètre d'inhibition compris entre 8 et 9 mm et à l'inverse 2 souches présentent des diamètres très importants soit supérieurs à 17 mm.

En dehors des 8 souches faiblement sensibles, la répartition est homogène avec un diamètre médiant entre 11 et 14 mm, pour 60 % des souches.

**Figure 1.** Répartition des différents diamètres d'inhibition pour une solution pure pour les 67 souches de colibacilles isolés suivant la technique du Phytogramme®

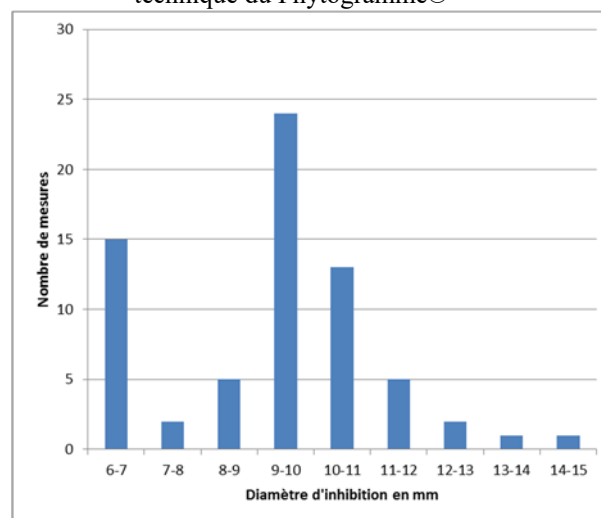


L'analyse de la répartition des diamètres d'inhibition avec une solution diluée à 50 % (figure 2) montre que 15 souches de colibacilles sur 67 ne sont pratiquement pas inhibées par la solution à base d'huiles essentielles. (diamètre de 6-7 mm)

50 % des colibacilles ont des diamètres compris en 9 et 11 mm et 2 souches présentent des diamètres importants.

**Figure 2.** Répartition des différents diamètres d'inhibition pour une solution diluée à 50 % pour

les 67 souches de colibacilles isolés suivant la technique du Phytogramme®



En dehors des souches non inhibées par le mélange d'HE, la répartition des diamètres est bien homogène.

Les diamètres mesurés au sein de la population de colibacilles testés sont moins importants que pour les mesures réalisées avec la solution pure.

La répartition des différentes classes présente le même profil que pour la solution pure, en revanche, l'inhibition est plus marquée avec une concentration en HE plus importante, quelque soit le sérotype identifié des colibacilles testés.

## CONCLUSION :

Les mesures des diamètres d'inhibition pour les 67 souches testées ne sont donc pas homogènes, certaines souches sont bien inhibées par le mélange d'HE testées et d'autres très peu.

Plus la concentration en HE est importante dans la spécialité, plus l'activité antibactérienne est importante.

La sensibilité est variable en fonction de la souche d'*Escherichia coli* isolée. Le Phytogramme® est donc une technique qui permet de bien valider la sensibilité bactérienne *in vitro* vis-à-vis d'un mélange donné d'HE qui ont, au départ, potentiellement une activité antibactérienne reconnue. (Boucher et Mauvisseau, 2015)

Les spécialités à base d'HE ne peuvent donc se prévaloir d'une activité antibactérienne, quel que soit le germe isolé, au même titre qu'un antibiotique n'a pas toujours une activité antibactérienne vis-à-vis d'un taxon de bactéries. Seul un examen de laboratoire peut permettre d'appréhender son activité antibactérienne : antibiogramme pour l'antibiothérapie ou Phytogramme® pour l'aromathérapie.

Toutefois, les autres activités des HE: Immunostimulante, expectorante, antispasmodique, ou anti-diarrhéique, ne doivent pas être écartées et peuvent contribuer par ailleurs à la guérison clinique de l'animal, même pour des activités antibactériennes *in vitro* assez faibles se traduisant par des diamètres d'inhibition peu importants, ce qui est également un gros avantage par rapport aux antibiotiques.

L'étude pourrait être plus affinée en comparant des *Escherichia coli* ayant un profil de résistance aux

antibiotiques marqué et le diamètre d'inhibition vis-à-vis du mélange d'huiles essentielles grâce au Phytogramme®. Ces solutions alternatives peuvent représenter une médecine reconnue pour le traitement de germes très résistants en médecine vétérinaire comme cela est déjà pratiqué avec succès pour certaines affections en médecine humaine.

Le Phytogramme® est un examen de laboratoire permettant d'aborder le choix d'une thérapie alternative avec moins d'empirisme.

**Tableau 1.** Diamètres d'inhibition en millimètres des moyennes, diamètre maximal et minimal et écart type pour 67 souches d'*E.coli* isolés sur des volailles par la technique du Phytogramme®

Valeurs	1/2	pur
Moyenne de SPECIALITE	9,12	12,23
Max de SPECIALITE	14,22	19,98
Min de SPECIALITE	6	8,17
Écart type de SPECIALITE	2,03	2,32

## BIBLIOGRAPHIE

1. Belaiche P.,1979. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie .Paris. Editions Masson. 1979
2. Boucher S.,Mauvisseau T.,2015. Sensibilité de *Pasteurella multocida* et de *Staphylococcus aureus* isolés sur des lapins de chair (*Oryctolagus cuniculus*) à des solutions phytoaromathérapiques à l'aide de la technique du Phytogramme®. Journée de la recherche Cunicole 2015. ITAVI
3. CIVAM ADAGE,2014. Acte du colloque 24 mars 2014 Agrocampus Ouest-Rennes Retour de 6 années d'expérimentation avec les huiles essentielles sur les bovins. 2014.
4. Franchomme P.,et al.,2001. L'aromathérapie exactement. Ed Jolloy. 2001
5. Lequeux G.,Boutin M., 2013. Aromatogramme : mise en place d'une méthodologie. Résultats préliminaires sur des souches de mammites bovines. Journées Nationales GTV. Nantes 2013
6. Mauvisseau T.,2016. Le Phytogramme® : un nouvel outil utilisable en élevage. : Soigner autrement : trouver l'équilibre pour produire mieux. Ed Le Point vétérinaire. 2016
7. May P.,2014. Guide pratique de Phyto-Aromathérapie pour les animaux de compagnie. Ed Med'com. 2014