



**Formation Doctorale : Molécules bioactives, Santé et Biotechnologie**

**Discipline : Biologie**

**Spécialité : Biochimie et Biotechnologie**

**Laboratoire : Laboratoire de Biotechnologie, Environnement, Agro-Alimentaire et Santé (LBEAS)**

## **THESE DE DOCTORAT**

Présentée par

**HRIOUECH Soukayna**

**Mise au point d'alternatives naturelles innovantes pour la lutte contre la sélection de bactéries résistantes suite à un traitement antibiotique**

Soutenue le 10 /10 / 2020 devant le jury composé de :

<b>Pr. MY Abderrahmane AFIFI</b>	<b>Faculté de médecine et de pharmacie -Fès</b>	<b>Président</b>
<b>Pr. Bouchra OUMOKHTAR</b>	<b>Faculté de médecine et de pharmacie -Fès</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Khalid ZEROUALI</b>	<b>Faculté de médecine et de pharmacie -Casablanca</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Anas TAZI</b>	<b>Centre Hospitalier Universitaire Ibn Sina - Rabat</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Najat CHAMI</b>	<b>Faculté des Sciences Dhar El Mahraz -Fès</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Pr. Soumya ELABED</b>	<b>Faculté des Sciences et Techniques-Fès</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Dr. Laila BENJELLOUN</b>	<b>Société R2S</b>	<b>Membre Invité</b>
<b>Pr. Khalid BOUZOUBAA</b>	<b>Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II - Rabat</b>	<b>Membre Invité</b>
<b>Pr. Adnane Remmal</b>	<b>Faculté des Sciences Dhar El Mahraz -Fès</b>	<b>Directeur de thèse</b>

## Remerciements

Je tiens avant tout à exprimer ma sincère gratitude au **Pr. Adnane REMMAL**, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire, il y a de nombreuses années. Il m'a permis de me former à la recherche en débutant par le stage de Master en 2015, puis en me donnant l'opportunité de continuer par une thèse au sein de son équipe ainsi que de m'avoir aidée à financer ma thèse. Je le remercie pour sa compétence scientifique, sa disponibilité, et ses conseils. Je le remercie de la confiance qu'il m'a accordée et d'être tout simplement un modèle pour moi.

Je remercie **Pr. Najat CHAMI** pour tous les efforts et l'aide que vous avez fournis lors de la correction de ce manuscrit. Sans vous, il n'aurait eu la forme présente. Voyez en ces mots l'expression de ma haute considération.

Mes plus vifs remerciements vont au **Pr. MY Abderrahmane AFIFI**, pour l'honneur qu'il a fait en acceptant de présider ce jury de thèse. Qu'il me soit permis de lui témoigner ma très haute considération.

Hommages respectueux et sincères aux rapporteurs de cette thèse les professeurs **Bouchra OUMOKHTAR**, **Khalid ZEROUALI** et **Anas TAZI**, pour l'honneur qu'ils ont fait en acceptant de juger le présent travail. Veuillez trouver ici, l'expression de ma respectueuse admiration.

J'adresse aussi mes remerciements aux professeurs **Najat CHAMI** et **Soumya ELABED**, d'avoir bien voulu examiner ce manuscrit et juger ce travail. Merci pour votre disponibilité et pour le temps que vous avez accordé à la critique de ce travail.

Je suis très honorée par la présence de **Dr. Laila BENJELLOUN** et du **Pr. Khalid BOUZOUBAA**, d'avoir accepté d'être parmi les membres de jury de ce travail. Voyez en ces mots l'expression de mes sincères remerciements.

J'adresse des remerciements particuliers à tous les membres **du laboratoire de microbiologie de la faculté de médecine et de pharmacie de Fès**, plus particulièrement **Pr. Bouchra OUMOKHTAR** pour sa collaboration et son aide. Qu'elle trouve ici l'expression de mes vifs remerciements surtout pour sa gentillesse et pour son soutien.

Enfin, je voudrais remercier tous les membres du laboratoire de biotechnologie des plantes aromatiques. Je cite spécialement Mesdemoiselles **Aouatef Mzabi**, **Hanane Chefchaou** **Mariam Tanghort** et **Hakima Moussa**, qui ont contribué par leur bonne humeur à créer un cadre de travail agréable. Merci de faire partie de ma vie, je vous dédie également cette thèse.

Enfin j'exprime ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail.

## **Dédicaces**

Avec un grand amour et beaucoup de respect, je dédie ce modeste travail :

### **À mes très chers parents**

En témoignage de mon amour, mon affection et ma grande reconnaissance pour tous les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et mon bien être afin que je puisse me consacrer pleinement à mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner.

Je prie le bon Dieu de vous bénir, de veiller sur vous, en espérant que vous serez toujours fiers de moi.

### **À mes chères sœurs **Fatima, Hayat, Milouda, Zakiya** et **Soumiya** et à mes chers frères **Anouar et Taoufik****

Pour votre amour, votre soutien, les moments de joies que nous avons partagés ensemble et pour tout ce que vous avez fait pour moi. Je vous souhaite une vie comblée et beaucoup de réussite.

### **À mes chères nièces **Ibtissam** et **Aya** et mes adorables neveux **Mohammed-Yassine, Adam** et **Ilyass****

Je vous exprime à travers ce travail ma grande affection, mon grand amour et mon profond attachement. Je vous souhaite une vie heureuse pleine de joie, de bonheur et de succès.

### **À ma chère amie **Khaoula****

Ton amour, ta gentillesse, et ta bonne écoute m'ont permis de surmonter les moments difficiles. Merci pour ton soutien et tes intarissables encouragements.

### **À tous les membres de ma famille, petits et grands**

#### **À ceux :**

Qui considèrent l'ambition, la volonté et la persévérance, des instruments pour aboutir à la cible désirée.

#### **À ceux qui auront l'occasion d'avoir ce travail entre les mains.**

## Résumé

La sélection des germes résistants ou multi-résistants à la suite des traitements aux antibiotiques aussi bien chez l'homme que chez l'animal constitue un problème majeur de santé publique. La première partie de travail a consisté en la comparaison, *in vitro* et *in vivo*, l'effet de trois antibiotiques ; l'amoxicilline, la tylosine et la colistine à celui d'un produit innovant le NP<sup>®</sup> sur le développement de l'anti-biorésistance de la flore intestinale des poussins de chair. Le NP<sup>®</sup> est un produit innovant contenant le thymol comme principe actif, développé et breveté par notre laboratoire. Les résultats ont montré que l'usage des antibiotiques comme facteurs de croissance dans l'aviculture contribue à l'émergence des bactéries résistantes aux antibiotiques utilisés. Cette résistance s'avère être aussi une résistance croisée avec d'autres antibiotiques. L'incorporation du NP<sup>®</sup> dans l'eau de boisson de poulets de chair n'induit ni la sélection des bactéries résistantes au NP<sup>®</sup> ni la résistance croisée aux antibiotiques. Le NP<sup>®</sup> a aussi contribué à une amélioration de performances zootechniques des animaux.

L'évaluation *in vivo* de l'action de ce même produit NP<sup>®</sup> associé à l'un ou à l'autre de trois antibiotiques ; l'amoxicilline, l'enrofloxacin et l'oxytétracycline sur la flore intestinale des dindonneaux d'élevage, a confirmé que l'usage du NP<sup>®</sup> seul ou associé à l'un ou à l'autre des trois antibiotiques dans l'aviculture n'induit pas le phénomène de résistance. Cette association contribue aussi à l'amélioration des performances de la croissance des dindonneaux d'élevage. Les résultats ont montré aussi un effet synergique entre le NP<sup>®</sup> et les antibiotiques lorsqu'ils sont associés.

Une étude comparative de la charge bactériologique de la moelle osseuse prélevée au niveau de fémurs de poulets d'un élevage ayant utilisé les antibiotiques comme facteurs de croissance et celle de poulets appartenant à un élevage ayant reçu le NP<sup>®</sup> comme additif alimentaire a été réalisée. L'évaluation de la fréquence de résistance aux antibiotiques des souches isolées a révélé un taux de résistance élevé chez les bactéries isolées à partir des échantillons provenant de l'élevage utilisant les antibiotiques par rapport à celui trouvé chez les bactéries provenant de l'élevage utilisant le NP<sup>®</sup> comme additif alimentaire. Ceci fait du NP<sup>®</sup> une bonne alternative aux antibiotiques facteurs de croissance. Ce produit permet aux éleveurs d'obtenir de bonnes performances de croissance sans nuire à la santé du consommateur ni à l'environnement.

Le test *in vitro* de l'effet de l'association de l'un ou l'autre des composés majoritaires des huiles essentielles (HE): (le thymol, le carvacrol, l'eugénol ou le 1,8-cinéol) à l'un des deux antibiotiques (l'amoxicilline/acide clavulanique (AMC) ou la gentamicine) sur des souches d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* a montré un effet synergique entre les composés majoritaires et les antibiotiques. L'évaluation *in vivo* de l'effet de l'AMC et de la gentamicine séparément ou en association avec le 1,8-cinéol sur un modèle expérimentale d'ostéomyélite aiguë chez le lapin a démontré que le 1,8-cinéol a montré un effet synergique en association avec l'AMC et la gentamicine, qui offrent des possibilités de réduire l'utilisation d'antibiotiques. De plus, l'AMC associée au 1,8-cinéol pourrait être utilisée pour traiter l'ostéomyélite à *S. aureus* résistante à la méthicilline.

**Mots clés:** Antibiotiques, composés majoritaires des huiles essentielles, anti-biorésistance, synergie d'action, alternative naturelle, volaille, ostéomyélite.

## Abstract

The selection of resistant or multi-resistant germs following antibiotic treatments in both humans and animals is a major public health problem. The first part of this study examines the use of antibiotics as growth factors in poultry farming and its contribution to the emergence of resistant bacteria. Through a comparison, *in vitro* and *in vivo*, of the effect of three antibiotics; amoxicillin, tylosin, and colistin, and an innovative product (NP<sup>®</sup>) containing thymol as active principle, developed and patented by our laboratory, on antibioresistance development found in the intestinal flora of broiler chicks. This study establishes that the use of antibiotics as growth factors contributes to the emergence of resistant bacteria to the antibiotic used. These resistant bacteria also turned out to be cross-resistant to other antibiotics. The incorporation of NP<sup>®</sup> into broiler chickens' drinking water didn't induce the selection of bacteria resistant to NP<sup>®</sup> or cross-resistance to antibiotics. The NP<sup>®</sup> has also contributed to an improvement in zootechnical performance of animals.

The *in vivo* evaluation of the action of the NP<sup>®</sup> combined with either one of the following antibiotics; amoxicillin, enrofloxacin, and oxytetracycline on the intestinal flora of farmed turkeys confirmed that the use of NP<sup>®</sup> either alone or combined with one of those three antibiotics in poultry farming does not induce resistance phenomenon. This association also contributed significantly to the growth performance of poultry. The results also showed a synergistic effect between NP<sup>®</sup> and antibiotics when combined.

A comparative study of the bacteriological load in bone marrow isolated from femurs of chickens of a farm that was using antibiotics as growth promoters and that of chickens belonging to another farm using NP<sup>®</sup> as a feed additive was carried out. The frequency evaluation of the antibiotic resistance of the isolated strains revealed a high resistance rate in the bacteria found in samples belonging to the farm using antibiotics compared to that found in bacteria belonging to the farm using NP<sup>®</sup> as a food additive. This ultimately makes NP<sup>®</sup> a good alternative to antibiotics used for maximizing feed efficiency in poultry. This product could help breeders obtain high growth performance without harming consumers' health.

The *in vitro* test of the effect of the association of one of the major compounds of the essential oils (EO): (thymol, carvacrol, eugenol or 1,8-cineole) with one of the two antibiotics (amoxicillin/clavulanic acid (AC) or gentamycin) on strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* has shown a synergistic effect between the major compounds and the antibiotic. The *in vivo* evaluation of the effect of AMC and gentamicin either separately or in combination with 1,8-cineole on an experimental model of acute osteomyelitis on rabbits demonstrated that 1,8-cineole showed a synergistic effect in combination with both AMC and gentamicin, which offer possibilities for reducing antibiotic usage. Moreover, the AMC associated with 1,8-cineole could be used to treat methicillin resistant *S. aureus* osteomyelitis.

**Keywords:** Antibiotics, major compounds of essential oils, anti-bioresistance, synergy, natural alternative, poultry, osteomyelitis.

## Sommaire

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Présentation du travail</b> .....	<b>2</b>
<b>Revue bibliographique</b> .....	<b>4</b>
<b>I- Antibiotiques, résistance et multi-résistance</b> .....	<b>4</b>
1- Qu'est qu'un antibiotique .....	4
2- Histoire du développement des antibiotiques.....	5
3- Antibiotiques naturels, semi-synthétiques et synthétiques .....	6
4- Mode d'action des antibiotiques .....	7
4.1- la paroi bactérienne .....	7
4.2- La membrane cellulaire.....	8
4.3- L'ADN .....	8
4.4- La synthèse protéique.....	8
4.5- Blocage des voies métaboliques clés .....	9
5- Résistance bactérienne .....	9
5.1- Définition .....	9
5.2- Génétique de la résistance .....	10
5.3- Modes d'émergence de la résistance bactérienne .....	11
5.3.1- Résistance naturelle.....	11
5.3.2- Résistance acquise.....	11
5.4- Mécanisme génétique de la résistance acquise .....	11
5.4.1- Résistance chromosomique/transmission verticale .....	12
5.4.2- Résistance transférable/transmission horizontale .....	12
5.4.3- Plasmides.....	13
5.4.4- Transposons.....	13
5.4.5- Intégrons et cassettes de gènes .....	13
6- Mécanismes de transfert de résistance entre les bactéries .....	14
6.1- Transformation .....	14
6.2- La transduction .....	14
6.3- La conjugaison .....	14
7- Mécanismes biochimiques de la résistance acquise .....	15
7.1- Inactivation des antibiotiques.....	15
7.1.1- Inactivation de l'antibiotique par hydrolyse .....	15
7.1.2- Inactivation des antibiotiques par transfert de groupe.....	16
7.1.3- Inactivation des antibiotiques par procédé réduction-oxydation .....	16

7.2-	Modification de la cible.....	16
7.3-	Perméabilité des pompes à efflux et de la membrane externe.....	17
7.3.1-	Pompes à efflux.....	17
7.3.2-	Modification de la perméabilité de la membrane externe.....	17
8-	Multi-résistance.....	18
<b>II-</b>	<b>Antibiotiques en aviculture.....</b>	<b>18</b>
1-	Production et consommation de la viande de volaille dans le monde et au Maroc.....	18
2-	Utilisation des antibiotiques en élevage.....	20
3-	Types d'utilisations des antibiotiques en aviculture.....	21
3.1-	Usage thérapeutique.....	21
3.2-	Usage zootechnique.....	21
4-	Anti-biorésistance chez les bactéries des volailles.....	21
5-	Transmission de bactéries et des gènes de résistance de l'animal à l'homme.....	22
6-	Les couts économiques de la résistance aux antibiotiques.....	24
<b>III-</b>	<b>Utilisation des huiles essentielles dans le secteur avicole.....</b>	<b>24</b>
1-	Définition des HE.....	25
2-	Composition chimique des HE.....	25
3-	Toxicité des HE.....	26
4-	Effets biologiques des huiles essentielles.....	26
4.1-	Activité antibactérienne.....	26
4.3-	Activité antioxydante.....	27
4.4-	Activité anti-inflammatoire.....	27
4.5-	Pouvoir aromatisant des huiles essentielles.....	28
4.6-	Effets sur la digestion.....	28
4.7-	Autres effets.....	28
5-	Effet sur les performances de croissance chez la volaille.....	29
<b>IV-</b>	<b>L'ostéomyélite.....</b>	<b>29</b>
1-	Définition.....	29
2-	Agents infectieux.....	29
3-	Modèles expérimentaux d'ostéomyélite.....	31
4-	Traitement des ostéomyélites.....	32
4.1-	Antibiothérapie.....	32
5-	Les huiles essentielles comme outil de lutte contre <i>S. aureus</i> .....	33

# **Partie I : Comparaison de l'effet du thymol à ceux de l'amoxicilline, de la colistine, et de la tylosine sur le développement de la résistance dans la flore intestinale de poulet de chair 35**

<b>I-</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>36</b>
<b>II-</b>	<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>37</b>
	<b>Test <i>in vitro</i> .....</b>	<b>37</b>
1.	Milieux de culture .....	37
2.	Agents utilisés .....	37
3.	Souche bactérienne .....	37
4.	Préparation du milieu de repiquage .....	37
5.	Préparation de l'inoculum .....	38
6.	Détermination des CMI des antibiotiques et du thymol .....	38
	<b>Test <i>in vivo</i> .....</b>	<b>39</b>
1.	Animaux et conditions d'élevage .....	39
1.1	Préparation du local .....	39
1.2-	Animaux d'expérience .....	39
2.	Traitement utilisé dans l'eau de boisson .....	39
2.1	Le NP <sup>®</sup> .....	39
2.2	Les antibiotiques .....	39
3.	Lots d'animaux .....	40
4.	Prélèvement de fèces .....	41
5.	Milieux de culture .....	41
6.	Évaluation <i>in vivo</i> de l'anti-biorésistance chez <i>E. coli</i> .....	42
6.1	Détermination des CMI .....	42
6.2	Détermination des pourcentages d'inhibition des concentrations infra-inhibitrices .....	42
7.	Évaluation de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale <i>in vivo</i> .....	42
7.1	Préparation des différents gradients de concentration des antibiotiques et du thymol sur milieu solide .....	42
7.2	Dénombrement .....	43
8.	Mesures des paramètres zootechniques .....	44
8.1	Poids vif moyen .....	44
8.2	Gain de poids vif .....	44
8.3	Consommation alimentaire individuelle (Ci) .....	44
8.4	Indice de consommation (IC) .....	45
9.	Analyse statistique .....	45



<b>III- Résultats .....</b>	<b>46</b>
1. Effet de l'amoxicilline sur le développement de l'anti-biorésistance chez <i>E. coli</i> .....	46
2. Effet du thymol sur le développement de l'anti-biorésistance chez <i>E. coli</i> .....	46
3. Évolution <i>in vivo</i> de l'anti-biorésistance d' <i>E. coli</i> isolée de la flore intestinale des poussins de chair47	
4. Effet de l'association des antibiotiques avec le NP <sup>®</sup> sur l'anti-biorésistance <i>in vivo</i> d' <i>E. coli</i> .	48
5. Évaluation du pourcentage d'inhibition des différents antibiotiques ou du thymol pour les souches d' <i>E. coli</i> isolées.....	50
5.1 Pourcentage d'inhibition d' <i>E. coli</i> des différents lots par l'amoxicilline.....	50
5.2 Pourcentage d'inhibition de croissance d' <i>E. coli</i> des différents lots par la tylosine .....	51
5.3 Pourcentage d'inhibition de croissance d' <i>E. coli</i> des différents lots par la colistine .....	54
5.4 Pourcentage d'inhibition de croissance d' <i>E. coli</i> des différents lots par le thymol.....	55
6. Évaluation de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale par la technique du gradient de concentration .....	56
6.1 Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale des lots traités aux antibiotiques...	56
6.2 Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale du lot témoin.....	57
6.3 Évolution de l'anti-biorésistance aux antibiotiques de la FMAT du lot traité au NP <sup>®</sup> .....	58
6.4 Évaluation de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale au thymol .....	58
7. Effet des antibiotiques sur les performances zootechniques .....	59
7.1 Évolution du poids vif moyen .....	59
7.2 Évolution du gain de poids vif moyen (GM).....	60
7.3 Évolution de la consommation alimentaire et de l'indice de consommation .....	60
<b>IV. Discussion .....</b>	<b>62</b>
<b>Partie II : Effet de l'association des antibiotiques au NP<sup>®</sup> sur le développement de la résistance au niveau de la flore intestinale de la dinde .....</b>	<b>70</b>
<b>I- Introduction .....</b>	<b>71</b>
<b>II- Matériel et méthodes .....</b>	<b>72</b>
1- Animaux d'expérience .....	72
2- Traitement des animaux .....	72
3- Lots d'animaux.....	72
4- Dénombrement de la FMAT .....	73
5- Évaluation de l'anti-biorésistance <i>in vivo</i> de la FMAT intestinale.....	74
5.1- Procédure de dispersion des antibiotiques et du thymol.....	74
5.2- Dénombrement sur gradient de concentration.....	74

6-	Évaluation <i>in vivo</i> de l'anti-biorésistance chez <i>E. coli</i> .....	75
6.1-	Isolement et préparation de l'inoculum.....	75
6.2-	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	75
7-	Détermination des paramètres zootechniques .....	76
8-	Étude statistique .....	77
<b>III-</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>78</b>
1-	Évaluation de la charge de la flore mésophile aérobie totale (FMAT).....	78
2.	Évolution de l'anti-biorésistance d' <i>E. coli</i> isolée de la flore intestinale des dindonneaux .....	78
2.1-	Évolution <i>in vivo</i> de l'anti-biorésistance à l'amoxicilline .....	78
2.2-	Évolution de l'anti-biorésistance à l'oxytétracycline .....	79
2.3-	Évolution de l'anti-biorésistance à l'enrofloxacin.....	80
2.4-	Évolution de l'anti-biorésistance au thymol.....	80
3.	Évaluation <i>in vivo</i> de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale par la technique du gradient de concentration .....	81
3.1-	Évaluation de l'anti-biorésistance de la FMAT à l'amoxicilline.....	81
3.2-	Évaluation de l'anti-biorésistance de la FMAT à l'oxytétracycline.....	83
3.3-	Évaluation de l'anti-biorésistance de la FMAT à l'enrofloxacin.....	85
3.4-	Effet du NP <sup>®</sup> sur l'évolution de l'ant-biorésistance de la FMAT au thymol et à d'autres antibiotiques .....	87
3.5-	Évaluation de l'anti-biorésistance da la FMAT chez le lot témoin .....	88
4.	Évolution des paramètres zootechniques.....	89
4.1-	Évolution du poids vif moyen .....	89
4.2-	Évolution du gain de poids moyen .....	90
4.3-	Évolution de la consommation alimentaire et de l'indice de consommation .....	91
<b>IV.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>92</b>
<b>Partie III : Évaluation de l'action du NP<sup>®</sup> sur la charge bactériologique au niveau de la moelle osseuse du poulet de chair .....</b>		<b>96</b>
<b>I-</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>97</b>
<b>II-</b>	<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>98</b>
1-	Échantillonnage.....	98
2-	Préparation des milieux de culture .....	98
3-	Prélèvement et mise en culture de la moelle osseuse .....	98
4-	Culture sur gélose au sang.....	98
5-	Purification des isolats.....	99
6-	Identification biochimique .....	99

6-1- Coloration de Gram .....	99
6-2- Test oxydase .....	100
6-3- Test catalase.....	100
6-4- Test de fermentation de sucres (glucose, lactose).....	101
7- Test d'agglutination au latex pour les streptocoques .....	101
8- Test coagulase .....	102
9- Identification par Api 20 E.....	103
10- Test de sensibilité aux antibiotiques par antibiogramme .....	104
<b>III- Résultats .....</b>	<b>106</b>
1- Fréquence de prélèvements positifs.....	106
2- Isolats identifiés.....	106
2.1- À partir de l'élevage utilisant les antibiotiques comme facteurs de croissance .....	106
2.1- Isolats identifiés à partir de l'élevage utilisant le NP <sup>®</sup> comme additif alimentaire.....	107
3- Caractéristiques des souches identifiées.....	108
4- Taux de résistance aux antibiotiques des souches isolées partir de l'élevage utilisant les antibiotiques comme facteurs de croissance.....	110
4.1- Profil de résistance des souches isolées.....	110
4.2- Résistance aux différents antibiotiques.....	113
4.3-Multi-résistance des souches isolées .....	114
5- Profil de résistance aux différents antibiotiques des souches isolées à partir de l'élevage utilisant le NP <sup>®</sup> comme additif alimentaire.....	115
5.1- Taux de résistance des souches isolées .....	115
5.2 - La multi-résistance des souches isolées .....	117
<b>VI. Discussion.....</b>	<b>118</b>
<b>Partie IV : Mise au point d'un traitement alternatif pour la lutte contre l'ostéomyélite à SARM utilisant l'amoxicilline/acide clavulanique, la gentamicine ou quatre composés majoritaires d'HE <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....</b>	<b>123</b>
<b>I- Introduction .....</b>	<b>124</b>
<b>II- Matériel et méthodes.....</b>	<b>125</b>
<b>Test <i>in vitro</i>.....</b>	<b>125</b>
1. Composés majoritaires .....	125
1.1- Procédure de dispersion des composés majoritaires des huiles essentielles.....	125
1.2- Préparation de la suspension mère de thymol .....	125
2. Antibiotiques .....	125
3. Souches bactériennes.....	126

4.	Préparation de l'inoculum bactérien.....	127
5.	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	127
6.	Test d'association des composés majoritaire avec les antibiotiques .....	128
6.1-	Souches utilisées .....	128
6.2-	Étude de la combinaison des composés majoritaires avec les antibiotiques .....	128
<b>Test <i>in vivo</i>.....</b>		<b>131</b>
1.	Agents antibactériens .....	131
2.	Animaux d'expérience .....	131
3.	Préparation de l'inoculum .....	132
4.	Induction de l'ostéomyélite chez le lapin.....	132
5.	Quantification de l'infection .....	133
6.	Lots d'animaux.....	133
7.	Traitement .....	134
8.	Évaluation de la charge bactérienne.....	134
9.	Sacrifice des animaux et dénombrement bactérien .....	134
10.	Prise de la température corporelle .....	135
11.	Poids vif moyen.....	135
12.	Gain du poids vif.....	135
13.	Taux de mortalité : .....	135
14.	Analyse statistique :.....	135
<b>III. Résultats .....</b>		<b>136</b>
1.	Concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	136
2.	Effet de l'association des antibiotiques aux composés majoritaires (CM).....	137
3.	Évolution de la température corporelle .....	140
4.	Taux de mortalité.....	141
5.	Poids vif moyen.....	141
6.	Gain de poids vif moyen .....	143
7.	Évaluation de la charge bactérienne de la moelle osseuse .....	144
<b>VI. Discussion.....</b>		<b>146</b>
<b>Conclusions et perspectives .....</b>		<b>153</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>		<b>155</b>

### **Articles publiés**

-**Hriouech, S.**, Akhmouch, A. A., Tanghort, M., Chefchaou, H., Mzabi, A., Chami, N., & Remmal, A. (2020). *In Vitro* and *In Vivo* Comparison of Changes in Antibiotics Susceptibility of *E. coli* and Chicken's Intestinal Flora after Exposure to Amoxicillin or Thymol. *Veterinary Medicine International*, 2020.

- **Hriouech, S.**, Akhmouch, A. A., Mzabi, A., Chefchaou, H., Tanghort, M., Oumokhtar, B., & Remmal, A. (2020). The Antistaphylococcal Activity of Amoxicillin/Clavulanic Acid, Gentamicin, and 1, 8-Cineole Alone or in Combination and Their Efficacy through a Rabbit Model of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020.

-Moussa. H., **Hriouech. S.**, Tanghort. M., Chefchaou. H., Mzabi Aouatef, Chami. N., & Remmal. A. (2020). A Comparative Study of the Antifungal Activity of a Natural Product Based on Essential Oils with Imazalil and Thiabendazole on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*.

### **Articles soumis**

-**Hriouech. S.**, Chami. N., & Remmal. A. Evolution of Resistance in the Intestinal Flora of Poultry during Thylosin, Colistin and Thymol Exposure.

-**Hriouech. S.**, Moussa H., Chami. N., & Remmal. A. Synergistic action of amoxicillin/clavulanic acid and gentamicin combined with thymol, carvacrol, eugenol and 1,8-cineole on bone infection-bacteria.

### **Communication affichée**

HRIOUECH S., OUMOKHTAR B., REMMAL A., Oct 2019. The anti-staphylococcal activity of amoxicillin/clavulanic acid, gentamicin, and 1,8-cineol alone or in combination, and their efficacy in a rabbit model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. 5th International Congress, Microbial Biotechnologies and opportunities for Socio-Economic Development. BIOMIODS-2019. Al akhawayn university, Ifrane.

### **Communication orale**

**Hriouech S.** and Remmal A., Dec 2018, Alternative to antibiotics to fight against the resistance in the intestinal flora of chicks. 4<sup>th</sup> edition of the doctoral student's forum. Faculty of Sciences and Techniques- Sidi Mohamed Ben Abdellah's University, Fez, Morocco.

### **Compétition**

February 1st to April 25th, 2018: Communication and popularization training of the international competition "My thesis in 180 seconds".

## Liste des figures

Figure 1 : Les différents modes d'action des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006) .....	7
Figure 2: Schéma explicatif du mécanisme de transduction .....	14
Figure 3: Schéma explicatif du mécanisme de conjugaison.....	15
Figure 4: Action des HE et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Burt, 2004).....	27
Figure 5: Souche de SARM, en microscopie électronique (a : ×4780 ; b : ×2000) .....	30
Figure 6 : Expression temporelle des facteurs de virulence chez <i>S. aureus</i> (Lays, 2012).....	30
Figure 7: Diagramme schématique de l'expérience réalisée .....	41
Figure 8: Étapes de préparation du gradient de concentrations.....	43
Figure 9: Méthode du dénombrement de la FMAT sur les gradients de concentrations d'antibiotiques .....	44
Figure 10: Évolution de la CMI des antibiotiques et du thymol en fonction du temps.....	47
Figure 11: Effet de l'association de l'ATB avec NP <sup>®</sup> sur l'évolution de la CMI .....	49
Figure 12: Évolution du pourcentage d'inhibition de croissance d' <i>E. coli</i> en fonction de la concentration d'amoxicilline (en µg /ml) en comparant pour chaque lot le pourcentage d'inhibition de chaque concentration d'amoxicilline le jour 21 au jour 28 .....	50
Figure 13: Évolution du pourcentage d'inhibition de croissance d' <i>E. coli</i> en fonction de la concentration de tylosine (en µg /ml) en comparant pour chaque lot le pourcentage d'inhibition de chaque concentration de tylosine le jour 21 au jour 28 (** p<0.01 ; ***p <0.001 ; ****p <0.0001)..	52
Figure 14: Évolution du pourcentage d'inhibition de croissance d' <i>E. coli</i> en fonction de la concentration de colistine (en µg /ml) en comparant pour chaque lot le pourcentage d'inhibition de chaque concentration de colistine le jour J21 au jour J28 (** p<0.01 ; ***p <0.001 ; ****p <0.0001)	54
Figure 15: Évolution du pourcentage d'inhibition de croissance d' <i>E. coli</i> en fonction de la concentration du thymol (en mg /ml) en comparant pour chaque lot le pourcentage d'inhibition de chaque concentration de NP <sup>®</sup> le jour 21 au jour 28 (** p<0.01 ; ***p <0.001 ; ****p <0.0001).....	55
Figure 16: Effet des antibiotiques et du NP <sup>®</sup> sur le poids vif moyen des poussins de chair. Les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à p<0,05.....	59
Figure 17: Effet des antibiotiques et du NP <sup>®</sup> sur le gain de poids moyen des poussins de chair. Les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à p<0,05 .....	60
Figure 18: Diagramme schématique de l'expérience réalisée .....	74
Figure 19: La réduction de TTC de couleur blanche en formazan de couleur rouge .....	76
Figure 20: Résultat de l'étalement sur gradient de concentration de l'amoxicilline à 12 µg/ml le jour J21 .....	82
Figure 21: Résultat de l'étalement sur gradient de concentration de l'oxytétracycline à 2 µg/ml le jour J21. ....	84
Figure 22: Résultat de l'étalement sur gradient de concentration de l'enrofloxacin à 0, 25 µg/ml aux jours J21 et J35.....	86
Figure 23: Le test oxydase.....	100
Figure 24: Le test catalase .....	101
Figure 25: Les étapes du test d'agglutination au Latex .....	102
Figure 26: Les étapes du test coagulase .....	103
Figure 27: Procédure d'identification par la galerie Api 20E. ....	104

Figure 28: Résultats de l'identification d' <i>E. coli</i> 5144572 par Api20E .....	109
Figure 29: Résultats de l'identification de <i>Raoutella terrigena</i> 5205773 par Api20E.....	109
Figure 30: Identification de <i>Proteus mirabilis</i> 0737000 par Api20E.....	109
Figure 31: Identification d' <i>Enterobacter aerogenes</i> 5105773 par Api20E.....	110
Figure 32: Résultat positif du test d'agglutination au latex.....	110
Figure 33: Taux de résistance des souches à Gram positif aux antibiotiques .....	113
Figure 34: Taux de résistance des souches à Gram négatif aux antibiotiques.....	113
Figure 35: Pourcentage de multi-résistance chez les souches isolées à partir de l'élevage utilisant les antibiotiques comme facteurs de croissance.....	114
Figure 36: Pourcentage de résistance des souches isolées aux antibiotiques .....	117
Figure 37: Illustration de multi-résistance chez les souches isolées de la moelle osseuse de fémurs de poulets provenant de l'élevage utilisant la NP <sup>®</sup> .....	117
Figure 38: Lapins en cages.....	131
Figure 39 : Réalisation d'une trépanation au niveau du tibia à l'aide d'une aiguille de Jamshidi 8 Gauges.....	132
Figure 40: Prélèvement de la moelle osseuse à l'aide d'une seringue 8 Ga au niveau du tibia. ....	133
Figure 41: Digramme schématique du modèle d'ostéomyélite expérimentale aigue à <i>S. aureus</i> chez le lapin.....	134
Figure 42: Évolution de la température corporelle des lapins.....	140
Figure 43: Évolution du gain de poids moyen.....	143
Figure 44: Évolution de la charge bactérienne dans la moelle osseuse en log <sub>10</sub> UFC durant les 14 jours de l'expérience. ....	144

## Liste des tableaux

Tableau 1: Découverte des antibiotiques et développement de la résistance (Davies, 1994; von Eiff <i>et coll.</i> , 1997; Kliebe <i>et coll.</i> , 1985; O'Brien, 1997; Ronald <i>et coll.</i> , 1966; Soussy <i>et coll.</i> , 1994) .....	11
Tableau 2: Antibiotiques utilisés chez la volaille dans le monde (Gaskins <i>et coll.</i> , 2002; Castanon, 2007; Landoni et Albarellos, 2015).....	20
Tableau 3: Traitement par les antibiotiques de l'ostéomyélite chez l'adulte .....	32
Tableau 4: Données relatives aux produits utilisés avec la posologie.....	40
Tableau 5: Les différents lots avec les doses et les durées de traitement durant l'expérience .....	41
Tableau 6: Effet de l'amoxicilline sur le développement de l'anti-biorésistance chez <i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>in vitro</i> .....	46
Tableau 7: Effet du thymol sur le développement de l'anti-biorésistance chez <i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>in vitro</i> .....	46
Tableau 8: Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale du lot traité à l'amoxicilline. ....	56
Tableau 9: Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale du lot traité à la colistine .....	56
Tableau 10: Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale du lot traité à la tylosine .....	56
Tableau 11: Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale du lot témoin.....	57
Tableau 12: Évolution de l'anti-biorésistance aux antibiotiques et au NP <sup>®</sup> de la FMAT du lot traité au NP <sup>®</sup> .....	58
Tableau 13 : Évaluation de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale au thymol .....	59
Tableau 14: Effet des antibiotiques sur la consommation alimentaire et l'IC.....	61
Tableau 15: Données relatives aux produits utilisés .....	72
Tableau 16: Évolution de la charge intestinale en FMAT des différents lots d'animaux (*p<0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0.001 comparées avec le lot témoin).....	78
Tableau 17: Évolution des CMI de l'amoxicilline vis-à-vis des isolats d' <i>E. coli</i> durant l'expérience .	79
Tableau 18: Évolution de la CMI de l'oxytétracycline vis-à-vis des isolats d' <i>E. coli</i> en fonction du temps .....	79
Tableau 19: Évolution de la CMI de l'enrofloxacin vis-à-vis des isolats d' <i>E. coli</i> en fonction du temps .....	80
Tableau 20: Évolution de la CMI du thymol vis-à-vis des isolats d' <i>E. coli</i> en fonction du temps .....	81
Tableau 21: Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT du lot traité à l'amoxicilline et du lot traité à l'amoxicilline associée au NP <sup>®</sup> .....	82
Tableau 22: Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT du lot traité à l'oxytétracycline et du lot traité à l'oxytétracycline associée au NP <sup>®</sup> .....	84
Tableau 23: Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT du lot traité à l'enrofloxacin et de celui traité à l'enrofloxacin associée au NP <sup>®</sup> .....	86
Tableau 24: Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale du lot traité au NP <sup>®</sup> .....	87
Tableau 25: Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale du lot témoin.....	88
Tableau 26: Évolution du poids vif moyen des différents lots d'animaux (*p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001 comparé au lot témoin) .....	89
Tableau 27: Évolution du gain de poids moyen (*p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001 comparé avec le lot témoin) .....	90
Tableau 28: Évolution de la consommation alimentaire et de l'indice de consommation .....	91
Tableau 29: les antibiotiques utilisés pour le test de sensibilité par antibiogramme .....	105



Tableau 30 : Les souches bactériennes isolées à partir des fémurs de poulets de l'élevage utilisant les antibiotiques comme facteurs de croissance.....	107
Tableau 31: Les souches bactériennes isolées à partir de la moelle osseuse de fémurs de poulets provenant de l'élevage utilisant le NP <sup>®</sup> comme additif dans l'aliment.....	108
Tableau 32: Profil de résistance des 3 souches de <i>Streptococcus sp</i> .....	111
Tableau 33: Profil de résistance des 2 <i>Enterococcus sp</i> .....	111
Tableau 34: Profil de résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	111
Tableau 35: Profils de résistance des isolats à Gram négatif.....	112
Tableau 36: Profil de résistance des bactéries à Gram négatif provenant de la moelle osseuse de fémurs de poulet provenant de l'élevage utilisant le NP <sup>®</sup> comme additif alimentaire.....	116
Tableau 37: les souches bactériennes utilisées avec leur profil de résistance.....	126
Tableau 38 : Les concentrations obtenues dans l'ensemble des puits de la microplaque pour l'association de l'AMC avec le thymol.....	130
Tableau 39: Valeurs des CMI obtenues par la méthode de micro-dilution.....	136
Tableau 40 : Effet de l'association de l'AMC avec la gentamicine.....	137
Tableau 41 : Effet de l'association de l'AMC avec le thymol.....	138
Tableau 42: Effet de l'association de l'AMC avec le carvacrol.....	138
Tableau 43: Effet de l'association de l'AMC avec l'eugénol.....	138
Tableau 44: Effet d'association de l'AMC avec le 1,8-cinéol.....	138
Tableau 45 : Effet de l'association de la gentamycine avec le thymol.....	139
Tableau 46: Effet de l'association de la gentamycine avec le carvacrol.....	139
Tableau 47: Effet de l'association de la gentamycine avec l'eugénol.....	140
Tableau 48: Effet de l'association de la gentamicine avec le 1,8-cinéol.....	140
Tableau 49: Évolution du poids vif moyen en grammes. Les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes par rapport aux valeurs du lot témoin positif à $p < 0,05$ .....	142
Tableau 50: Différence de la charge bactérienne au niveau de la moelle osseuse entre le jour J7 et J3 et entre le jour J14 et J3 en $\log_{10}$ UFC/g. Les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à $p < 0,05$ .....	144

## Liste des abréviations

**AMC** : Amoxicilline/acide clavulanique

**ATB** : Antibiotiques

**BHI**: Brain Heart Infusion

**BLSE** :  $\beta$ -lactamases à spectre étendu

**CA** : Consommation alimentaire

**CASFM/EUCAST** : Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie

**CFI** : Concentration fractionnaire inhibitrice

**CMI**: Concentration minimal inhibitrice

**DL<sub>50</sub>** : Dose létale

**DO<sub>600</sub>** : Densité optique à 600 nm

**EDS** : Eau distillée stérile

**EMB** : Eosine bleu de méthylène

**FAO** : Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

**FMAT** : Flore mésophile aérobie totale

**GEN** : Gentamicine

**GM** : Gain de poids moyen

**HE** : Huile essentielle

**IC** : Indice de consommation

**SARM**: *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

**ME** : Membrane externe

**MHA**: Mueller-Hinton Agar

**MHB**: Mueller-Hinton Broth

**CLSI**: Clinical and laboratory Standards Institute

**NP**: Natural product

**PBS**: Tampon phosphate saline

**PCA**: Plate Count Agar

**PLP**: Protéine liant les Pénicillines

**LIAV**: Laboratoire Industriel d'alternatives vétérinaires

**LPS**: Lipopolysaccharides

**TIAC** : Toxi-infections alimentaires collectives

**TSA** : Gélose tryptone caséine soja

**TSB**: Bouillon tryptone caséine soja

**TTC**: Triphenyl-tetrazolium chloride

**UFC** : Unité formant colonie

**UI** : Unité international

## Introduction

La résistance bactérienne aux antibiotiques est un problème qui a émergé dès le début de la commercialisation des antibiotiques (Zaman *et coll.*, 2017). En effet, les bactéries possèdent une capacité d'acquérir des mécanismes de résistance sous l'influence de la pression de sélection exercée par les antibiotiques (Munita et Arias, 2016). Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), la résistance bactérienne est devenue un phénomène mondial et croissant, avec des bactéries de plus en plus résistantes, voire résistantes à tous les antibiotiques. Cette résistance associée à l'amenuisement de l'arsenal thérapeutique, fait de cette problématique une véritable menace pour la santé publique.

En médecine vétérinaire, il est actuellement reconnu que l'usage des antibiotiques, surtout dans les pays en voie de développement, est associé à une augmentation de la résistance à ces antibiotiques au niveau de la flore pathogène du site infectieux et de la flore commensale du tube digestif des animaux d'élevage (Torumkuney *et coll.*, 2016; Suresh *et coll.*, 2018). Le contrôle de l'anti-biorésistance pour ces deux flores constitue un double enjeu pour la santé animale et la santé publique. En effet, les bactéries commensales du tube digestif des animaux pouvant jouer un rôle de réservoir de bactéries résistantes transmissibles à l'Homme via la chaîne alimentaire ou via l'environnement (Hu *et coll.*, 2016; Muloï *et coll.*, 2018).

Durant les dernières décennies, de plus en plus de pays riches adoptent des réglementations interdisant l'usage des antibiotiques dans l'alimentation animale en tant que facteurs de croissance (Suresh *et coll.*, 2018). Ces interdictions ont conduit à une diminution des performances zootechniques des animaux et à l'émergence de troubles digestifs comme les entérites non spécifiques, qui constituent aujourd'hui un réel problème économique pour l'élevage de volailles (Diarra *et coll.*, 2014).

En médecine humaine, lors du traitement des infections dues aux bactéries résistantes, le problème de la résistance est toujours posé. L'OMS déclare que les bactéries multi-résistantes tuent jusqu'à 700 000 personnes chaque année. L'ostéomyélite à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline (SARM) est un exemple d'infections rebelles en médecine humaine. Cette infection est responsable chaque année de mortalité et de morbidité dans le monde et les coûts de traitement sont élevés (Gaudin *et coll.*, 2011). Dans les pays développés, l'ostéomyélite aiguë touche environ un enfant sur 800 000 par an (Crone *et coll.*, 2020), mais elle est considérablement plus fréquente dans les pays à revenu faible ou intermédiaire (Peltola et Paakkonen, 2014). Au Maroc, l'ostéomyélite est plus fréquente chez l'enfant (El hamdi, 2016).

À ce jour, il n'y a pas d'alternatives efficaces pour remplacer les antibiotiques en médecine humaine afin de lutter contre l'anti-biorésistance.

L'objectif principal de notre travail est d'une part, d'essayer de trouver des substances naturelles comme alternatives aux antibiotiques promoteurs de croissance, utilisés dans l'alimentation de la volaille. D'autre part, de tester l'effet de l'association des composés majoritaires des huiles essentielles (HE) des plantes aromatiques connues pour leur effet antimicrobien avec des antibiotiques à faibles doses à la recherche d'une éventuelle synergie d'action. Ces synergies d'action offrent des possibilités de réduire les doses d'antibiotiques utilisées en améliorant leur efficacité sur les bactéries résistantes en médecine humaine.

## Présentation du travail

Le présent travail s'inscrit dans la suite des travaux effectués au sein de notre laboratoire, qui s'intéressent à l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et de leurs composés majoritaires (Remmal *et coll.*, 1993a; Bennis *et coll.*, 2004; Rhayour *et coll.*, 2003, Chami *et coll.*, 2005, 2004; Sennouni *et coll.*, 2018; Mzabi *et coll.*, 2019). Ces substances naturelles pourraient être utilisées en médecine humaine en association avec les antibiotiques à des doses plus faibles afin d'améliorer leur effet sur les bactéries résistantes. Les HE et leurs composés majoritaires pourraient être aussi utilisées comme alternatifs aux antibiotiques utilisés dans le domaine avicole.

Dans la première partie de ce travail, nous avons évalué, *in vitro*, l'effet du thymol, composé majoritaire des HE du thym et d'origan, en comparaison avec un antibiotique, l'amoxicilline sur le développement du phénomène de l'anti-biorésistance chez une souche bactérienne d'*E. coli*. Nous avons ensuite testé *in vivo* l'action du NP<sup>®</sup>, un produit naturel mis au point et breveté par notre laboratoire, et de trois antibiotiques ; l'amoxicilline, la tylosine et la colistine sur le développement du phénomène de l'anti-biorésistance dans la flore mésophile aérobie totale (FMAT) et des souches d'*E. coli* isolées de la flore intestinale de poussins de chair. L'effet du NP<sup>®</sup> a été également évalué sur les paramètres zootechniques (le poids vif, le gain de poids, la consommation alimentaire et l'indice de consommation) de ces poussins pendant 21 jours.

La deuxième partie de ce travail a été consacrée à évaluer l'action de ce même produit NP<sup>®</sup> associé avec l'un des trois antibiotiques (l'amoxicilline, l'oxytétracycline ou l'enrofloxacin) sur le contrôle de la charge intestinale des dindonneaux (FMAT). Nous avons aussi évalué l'effet de cette association sur l'anti-biorésistance de la FMAT et d'*E. coli* intestinaux et sur les paramètres zootechniques chez les dindonneaux.

Dans la troisième partie, nous avons déterminé la charge bactérienne de la moelle osseuse prélevée à partir des de fémurs de poulets qui ont reçu le NP<sup>®</sup> comme additif alimentaire en comparaison avec celle des poulets ayant reçu les antibiotiques comme facteurs de croissance, et nous avons déterminé le profil de résistance des germes isolés.

Enfin, la quatrième partie a consisté à étudier *in vitro* l'effet de l'association des composés majoritaires d'HE (le thymol, le carvacrol, l'eugénol et le 1,8-cinéol) avec deux antibiotiques (l'amoxicilline/acide clavulanique et la gentamicine) à la recherche d'une éventuelle synergie d'action. Nous avons ensuite testé l'effet *in vivo* de l'amoxicilline et de la gentamicine utilisées soit séparément soit en combinaison avec le 1,8-cinéol sur un modèle expérimental d'ostéomyélite aiguë à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline (SARM) chez le lapin.

## **Revue bibliographique**

### **I- Antibiotiques, résistance et multi-résistance**

Les antibiotiques ont été considérés comme la «solution miracle» qui a permis de mettre fin aux maladies infectieuses depuis les années trente du siècle dernier. Bien qu'ils aient amélioré la santé d'innombrables humains et animaux, de nombreux antibiotiques ont également perdu leur efficacité depuis le début de l'ère des antibiotiques (Grohs, 2017). En dépit du développement de nouveaux antibiotiques, les bactéries ont développées leurs défenses contre ces antibiotiques et continuent à développer de nouvelles résistances (Davies et Davies, 2010). Par conséquent, de nombreuses maladies sont devenues difficiles à traiter, un phénomène fréquemment attribué à l'utilisation abusive et inappropriée des antibiotiques en médecine humaine.

L'utilisation des antibiotiques dans l'élevage d'animaux destinés à la consommation a également contribué de manière significative à la prolifération d'organismes résistants aux antibiotiques dans le monde. De plus, actuellement les bactéries résistantes aux antibiotiques sont rencontrées dans presque tous les écosystèmes de la planète (Andremont, 2016). L'utilisation des antibiotiques exerce une pression de sélection qui se traduit par des bactéries résistantes aux antibiotiques et l'apparition de gènes de résistance (Allen *et coll.*, 2010). Certaines bactéries résistantes sont présentes naturellement dans l'environnement (Kummerer, 2004). Des agents pathogènes et non pathogènes sont libérés dans l'environnement de plusieurs manières, contribuant à créer un réseau de résistance incluant l'homme, les animaux et l'environnement (Allen *et coll.*, 2010).

#### **1- Qu'est qu'un antibiotique**

Le troisième dictionnaire international de Webster (1981) définit un antibiotique comme étant une substance produite par un microorganisme (bactérie ou champignon) et en solution diluée à la capacité d'inhiber la croissance ou de tuer un autre microorganisme (comme un germe pathogène). Le manuel de microbiologie bien connu de Brock définit un antibiotique comme «un agent chimique produit par un organisme nocif pour d'autres organismes» (Madigan *et coll.*, 1997). En d'autres termes, un antibiotique est une substance antibactérienne naturelle d'origine microbienne et qui peut être synthétisée chimiquement, capable d'inhiber spécifiquement la croissance d'autres micro-organismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux du germe.

## 2- Histoire du développement des antibiotiques

L'intérêt pour la chimiothérapie antimicrobienne a été suscité dès la découverte des micro-organismes comme agents responsables de maladies infectieuses. Bien que la pénicilline ait été le premier antibiotique naturel découvert, l'idée d'utiliser des micro-organismes à des fins thérapeutiques n'était pas nouvelle. Les champignons étaient utilisés dans les cataplasmes depuis de nombreuses années et, en 1899, un produit appelé pyocyanase, extrait de *Pseudomonas aeruginosa*, était utilisé dans le traitement des plaies (Garrod *et coll.*, 1973). La pénicilline a été isolée en 1928 par Alexander Fleming (Fleming, 1929), mais ce dernier était incapable d'isoler et de purifier suffisamment d'antibiotiques pour les utiliser. En 1940, Chain et ses collaborateurs avaient montré la valeur thérapeutique de la pénicilline, mais ces derniers étaient également incapables de produire suffisamment de pénicilline pour un usage commercial. En 1943, une collaboration entre Andrew Moyer et Robert Coghill a permis d'obtenir des rendements de production de pénicilline bien supérieurs. Après une recherche mondiale de souches de *Penicillium* susceptibles de produire plus de pénicilline, Raper et Fennell (1946) ont découvert une souche de *Penicillium chrysogenum* capable de produire des rendements encore plus élevés en pénicilline.

Après l'utilisation de la pénicilline, une série de différents antibiotiques ont été rapidement découverts. En 1940, Selman Waksman avait commencé à rechercher des composés antimicrobiens produits par les microorganismes du sol. En 1943, l'un des étudiants de Waksman découvrit la streptomycine (Schatz *et coll.*, 1944). À la même époque René Dubos a découvert la gramicidine (Hotchkiss et dubos, 1941), le premier antibiotique actif contre les bactéries à Gram positif. Peu de temps après, la chlortétracycline, le chloramphénicol et d'autres antibiotiques ont été découverts (Garrod *et coll.*, 1973). De nombreuses découvertes à la même époque concernaient des médicaments trop toxiques pour la consommation humaine. Néanmoins, ces travaux ont débouché sur de nombreux médicaments et, durant 10 ans seulement, des médicaments contenant les principales classes d'antibiotiques ont été découverts.

En 1962, l'une des dernières découvertes était un antibiotique de synthèse, l'acide nalidixique. La première des quinolones a été décrite et, bien qu'elle n'ait pas d'importance thérapeutique, la modification de l'acide nalidixique a conduit à la production de fluoroquinolones. Les membres de cette classe, tels que la ciprofloxacine, la norfloxacine, l'enrofloxacine et l'ofloxacine, sont devenus très importants dans le traitement des maladies infectieuses tant chez l'homme que chez l'animal (Mitsubishi, 1993). Depuis les années

soixante, peu d'antibiotiques ont été découverts. Les antibiotiques mis au point ont essentiellement consisté à des modifications chimiques des molécules existantes. Ces modifications ont été très utiles dans le traitement des maladies infectieuses, conduisant à une destruction accrue des agents pathogènes à un plus large spectre d'action, avec une toxicité réduite et une réduction des effets secondaires.

Cependant, depuis les années 1970, une seule nouvelle classe d'antibiotiques a été introduite (Lipsitch *et coll.*, 2002) et une tendance récente de l'antibiothérapie est apparue, celle-ci consiste à l'utilisation d'associations d'ATB dotés de mécanismes d'action différents, afin d'accroître leur efficacité et de résoudre le problème de la résistance aux antibiotiques.

### 3- Antibiotiques naturels, semi-synthétiques et synthétiques

Les antibiotiques sont généralement classés en trois catégories : les antibiotiques naturels, synthétisés par des microorganismes, les antibiotiques semi-synthétiques qui sont des dérivés d'antibiotiques naturels et les antibiotiques synthétiques, tels que les sulfamides et les quinolones.

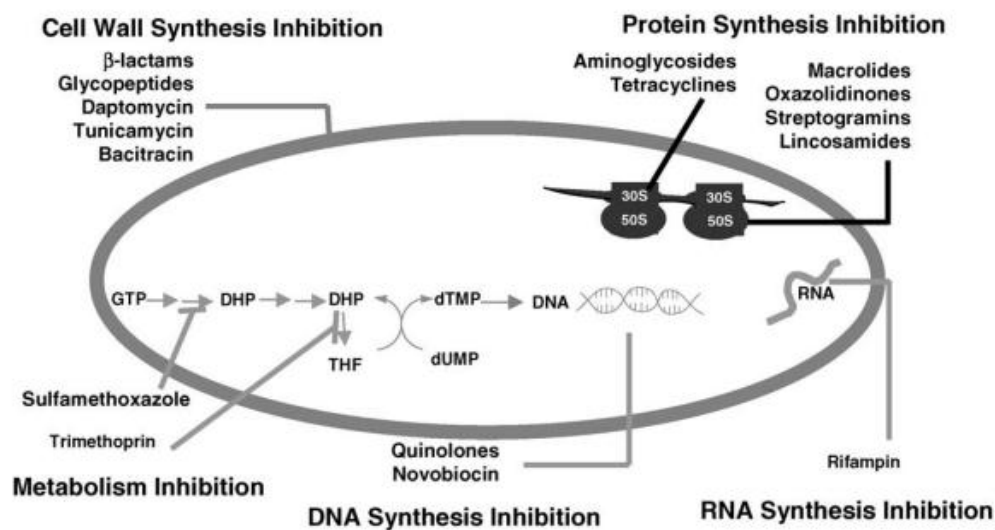
- **Les antibiotiques naturels** sont fabriqués par des microorganismes (champignons ou bactéries) et leur permettent d'éliminer les bactéries concurrentes avec lesquelles ils sont en compétition dans leur milieu. Le premier antibiotique naturel, la pénicilline, a été découvert en 1928 par Alexander Fleming chez le champignon *Penicillium notatum*.
- **Les antibiotiques semi-synthétiques** sont obtenus par de petites modifications de la structure des antibiotiques naturels. Par exemple, l'introduction de la benzylpénicilline, une petite variation du milieu de croissance du *Penicillium* a altéré une chaîne latérale de la structure de la pénicilline par un seul atome d'oxygène, ce qui a entraîné la phénoxyéthylpénicilline. Ce dérivé est stable aux acides et convient à l'administration orale.  
Après l'identification chimique des antibiotiques naturels, de nombreux dérivés ont été ou sont toujours produits et testés pour leur activité antibactérienne. D'autres exemples d'antibiotiques semi-synthétiques sont les pénicillines semi-synthétiques résistantes à la pénicillinase telles que la nafcilline, la cloxacilline et la flucloxacilline (Mevius *et coll.*, 1999).
- **Les antibiotiques synthétiques** anciennement appelés chimio-thérapeutiques sont synthétisés chimiquement. Le premier composé à activité chimio-thérapeutique utilisé en médecine était le Prontosil, un colorant azoïque apparenté structurellement aux sulfanilamides. Peu de temps après, les sulfamides ont été mis au point et jouent toujours un rôle important dans le



traitement des maladies infectieuses. Des exemples plus récents d'antibiotiques synthétiques sont les nitrofuranes et les quinolones.

#### 4- Mode d'action des antibiotiques

À la différence des antiseptiques et des agents désinfectants, les antibiotiques agissent en général de façon très spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne. Cette grande spécificité d'action explique pourquoi les antibiotiques sont actifs à très faible concentration (Fajardo et Martínez, 2008). Cette action s'exerce selon les molécules sur des sites variés (Figure 1).



**Figure 1** : Les différents modes d'action des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006)

Les antibiotiques peuvent agir sur différentes structures bactériennes parmi lesquelles :

##### 4.1- la paroi bactérienne

La plupart des cellules bactériennes sont entourées d'une couche rigide de peptidoglycane (PG), cette couche les protège face à la pression osmotique dominante, compatible avec l'environnement et les conditions dans lesquels elles se trouvent. Le peptidoglycane possède un certain nombre de liaisons peptidiques de réticulation appelées  $\beta$ -(1-4) -N-acétylhexosamine (Bugg et Walsh, 1992; Höltje, 1998). Pour survivre, les bactéries doivent nécessairement synthétiser du peptidoglycane; ils le font par l'activité des protéines de liaison à la pénicilline (penicillin binding proteins PBPs) qui sont des transglycosylases et des transpeptidases. Ces deux enzymes jouent un rôle très important en ajoutant des pentapeptides disaccharidiques pour étendre les brins glycanes de la molécule de peptidoglycane existante, ainsi que des liaisons croisées d'unités de peptidoglycanes immatures (Park et Uehara, 2008). Des antibiotiques tels que les pénicillines, les carbapénèmes et les céphalosporines sont capables de bloquer la réticulation des unités peptidoglycanes en inhibant la formation de

liaisons peptidiques catalysée par les PBP (Josephine *et coll.*, 2004). La plupart des antibiotiques appartenant à la classe des glycopeptides (par exemple, la vancomycine) sont capables d'inhiber la croissance bactérienne en inhibant la synthèse de PG. Cette inhibition se fait en se liant à des unités de PG, ainsi qu'en bloquant l'activité de la transglycosylase et de la transpeptidase (Kahne *et coll.*, 2005).

#### **4.2- La membrane cellulaire**

Certaines antibiotiques agissent sur la membrane cellulaire, en désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit de graves troubles d'échanges électrolytiques avec le milieu extérieur (Chopra, 1998). Ces antibiotiques sont spécifiques à chaque groupe microbien en fonction de différents types de lipides contenus dans leurs membranes cellulaires. Par exemple, la Daptomycine dépoliarise la membrane dépendante du calcium, ce qui entraîne l'arrêt de la synthèse macromoléculaire et la perturbation de la membrane cellulaire chez les bactéries (Alborn *et coll.*, 1991). Les polymyxines provoquent la désintégration de la membrane cellulaire bactérienne en se liant efficacement au fragment lipidique du lipopolysaccharide dans la cellule bactérienne (Falagas *et coll.*, 2010)

#### **4.3- L'ADN**

Les voies métaboliques qui conduisent à la synthèse des acides nucléiques sont très essentielles. La perturbation de la synthèse des acides nucléiques est nuisible à la survie des cellules bactériennes. Les antibiotiques interfèrent avec la synthèse de l'acide nucléique en bloquant la réplication ou en arrêtant la transcription. La réplication de l'ADN implique la dissociation de la structure à double hélice, un processus facilité par les enzymes hélicase (Jankowsky, 2011). Le groupe d'antibiotiques quinolones, par exemple, interfère avec la fonctionnalité de l'enzyme hélicase, empêchant ainsi l'enzyme de jouer son rôle de déroulement de l'ADN. Cette action antibactérienne des quinolones tronque finalement le processus de réplication et de réparation de l'ADN (Chen *et coll.*, 1996). Les antibiotiques dont le mode d'action est l'inhibition de la synthèse d'acides nucléiques ciblent également la topoisomérase II et la topoisomérase IV de la bactérie. La perturbation des activités de ces enzymes chez les bactéries affecte négativement l'ARN polymérase, ce qui empêche la synthèse de l'ARN (Ebimieowei et Ibemologi, 2016).

#### **4.4- La synthèse protéique**

Les antibiotiques qui inhibent la synthèse des protéines font partie des classes d'antibiotiques les plus larges et peuvent être divisés en deux sous-classes: les inhibiteurs de 50S et les inhibiteurs de 30S qui sont les deux sous-unités de l'ARN ribosomal. Des antibiotiques tels

que l'érythromycine, la clindamycine, la lincomycine, le chloramphénicol et le linézolide font partie des inhibiteurs du ribosome 50S (Douthwaite, 1992; Katz et Ashley, 2005). Les antibiotiques qui inhibent le ribosome 50S le font en bloquant physiquement soit la phase d'initiation de la traduction protéique, soit la phase d'élongation de la synthèse protéique, où l'acide aminé entrant est lié à la chaîne peptidique naissante en croissance contribuant la perturbation du processus de synthèse protéique de la bactérie, ce qui induit en fin de compte son inhibition ou sa mort (Patel et Bonomo, 2011)

Les inhibiteurs du ribosome 30S agissent principalement en bloquant l'accès des aminoacyl-ARNt au ribosome. Les exemples d'antibiotiques qui fonctionnent de cette manière comprennent la tétracycline, la streptomycine, la spectinomycine (Chopra et Roberts, 2001; Hong *et coll.*, 2014)

#### **4.5- Blocage des voies métaboliques clés**

Il a été démontré que certains antibiotiques, tels que les sulfamides et le triméthoprime, miment un substrat nécessaire au métabolisme cellulaire des bactéries. Par conséquent, les enzymes bactériennes s'attachent à l'antibiotique plutôt qu'au substrat normal. En particulier, les sulfamides agissent comme le tétrahydrofolate nécessaire à la synthèse de l'acide folique dans les cellules bactériennes (Rees *et coll.*, 2017). L'acide folique est essentiel dans le métabolisme des acides nucléiques et des acides aminés; pour cette raison, les sulfonamides perturbent finalement la production d'acides nucléiques (ADN et ARN) et d'acides aminés, car ils imitent les substrats nécessaires au métabolisme de l'acide folique (Rees *et coll.*, 2017).

### **5- Résistance bactérienne**

#### **5.1- Définition**

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la résistance aux antibiotiques constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé humaine et la sécurité alimentaire

Il existe différentes définitions de la résistance bactérienne dans la littérature. En effet, selon la discipline considérée, l'approche de la résistance et son expression ne sont pas tout à fait les mêmes (AFSSA, 2006) :

- Pour le **clinicien**, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si le traitement n'est pas efficace.
- Pour le **pharmacologue**, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si les concentrations atteintes au site d'action, sont inférieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI).

- Pour le **microbiologiste**, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si elle dispose d'un mécanisme de résistance augmentant la valeur de la CMI.

La diversité de ces définitions est importante à prendre en compte car elle influence les motivations de lutte contre l'anti-biorésistance (AFSSA, 2006).

## **5.2- Génétique de la résistance**

En examinant l'historique des agents antimicrobiens (Tableau 1), le développement de la résistance bactérienne était un phénomène attendu (Huovinen, 1997).

Les bactéries isolées chez des patients il y a 60 ans n'avaient pratiquement aucun gène de résistance (Hughes et Datta, 1983). De même, des souches résistantes aux nouveaux antibiotiques n'ont pas été observées chez plusieurs espèces de bactéries avant que ces agents n'aient été utilisés pendant des années, voire des décennies.

Les informations les plus fiables sur les caractéristiques des bactéries de l'ère pré-antibiotique proviennent d'études sur les "pathogènes microbiens Murray-collection" collectés entre 1914 et 1950. Ces organismes sont totalement sensibles aux antibiotiques courants. Même si les sulfamides ont été introduits dans la pratique clinique au milieu des années 1930, la "collection de Murray" est sensible à cette classe de médicaments. Cependant, beaucoup de "souches Murray" portent des plasmides et sont capables de promouvoir le transfert conjugatif (Davies, 1994).

Lorsque les antibiotiques ont été introduits pour la première fois dans le traitement d'infections bactériennes courantes, on ne s'attendait pas à un développement de résistance aux antibiotiques au cours du traitement, car on pensait que la fréquence de mutations en résistance à des bactéries était trop faible. À cette époque, on ignorait que même dans la nature, les bactéries peuvent collecter et échanger des informations génétiques avec une facilité extraordinaire et sans spécificité vis-à-vis des espèces (Davies, 1994).

**Tableau 1:** Découverte des antibiotiques et développement de la résistance (Davies, 1994; von Eiff *et coll.*, 1997; Kliebe *et coll.*, 1985; O'Brien, 1997; Ronald *et coll.*, 1966; Soussy *et coll.*, 1994)

Antibiotique	Découverte	Introduction dans l'utilisation clinique	Identification de la résistance
Penicilline	1940	1943	1940 (Methicillin 1961/5)
Streptomycine	1944	1947	1947, 1956
Tétracycline	1948	1952	1956
Erythromycine	1952	1955	1956
Vancomycine	1956	1972	1987
Acide Nalidixique	1960	1962	1966
Gentamicine	1963	1967	1970
Fluoroquinolones	1978	1982	1985

### 5.3- Modes d'émergence de la résistance bactérienne

La résistance aux antibiotiques apparaît selon deux modalités : l'une naturelle, l'autre acquise.

#### 5.3.1- Résistance naturelle

Les bactéries peuvent présenter une résistance naturelle à certaines familles d'antibiotiques. Ces mécanismes de résistance sont spontanés et assez constants. Ainsi, ils peuvent être dus à l'absence de la cible ou à l'absence de pénétration de l'antibiotique. Cette résistance concerne l'ensemble des souches d'une même famille (Fauchère, 2002).

#### 5.3.2- Résistance acquise

Les bactéries, préalablement sensibles à un antibiotique, peuvent développer une résistance à cet antibiotique, ce qui implique des changements génétiques chromosomiques ou extra-chromosomiques.

Elles ne concernent que quelques souches, d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique donné (Fauchère, 2002). La résistance acquise possède généralement un faible risque de transmission horizontale lorsque la résistance apparaît à la suite d'une mutation chromosomique. En revanche, la résistance acquise est considérée comme ayant un potentiel plus élevé pour la diffusion horizontale de résistance aux antibiotiques, lorsque les gènes de résistance sont présents sur des éléments génétiques mobiles (Lerminiaux et Cameron, 2019).

### 5.4- Mécanisme génétique de la résistance acquise

Toute résistance possède une base génétique, qui peut soit être une partie fixe du génome bactérien, soit être transférable entre bactéries.

#### **5.4.1- Résistance chromosomique/transmission verticale**

Ce type de résistance se développe à partir de mutations dans les séquences nucléotidiques du chromosome bactérien, ce qui entraîne la synthèse de protéines ou d'autres macromolécules qui diffèrent suffisamment des entités chimiques d'origine pour interférer avec l'activité de l'antibiotique. Les mutations peuvent se produire de manière continue et indépendamment de la présence d'antibiotiques, mais sont généralement réparées par des mécanismes cellulaires. Le transfert de mutations a lieu pendant la multiplication ou ce qu'on appelle transmission verticale. La fréquence de mutation est faible, généralement comprise entre  $10^{-6}$  et  $10^{-10}$  par génération (Yamashita *et coll.*, 2000).

Les mutations présentant une résistance accrue aux antibiotiques ne sont avantageuses pour la bactérie qu'en présence d'antibiotiques. Seules les sous-populations bactériennes sensibles seront éliminées à des concentrations supérieures à la concentration minimale inhibitrice (la CMI). Le développement de résistances résultant de mutations est généralement spécifique à l'antibiotique sélectionné ou à des antibiotiques étroitement apparentés.

La résistance chromosomique est héréditaire par clonage. Le développement d'une résistance chromosomique au sein d'une population exposée à un antibiotique est généralement un processus graduel, effectué par plusieurs mutations successives, mais pour certains antibiotiques, une seule mutation peut produire une résistance entraînant une augmentation spectaculaire de la CMI.

#### **5.4.2- Résistance transférable/transmission horizontale**

Les bactéries possèdent des systèmes de transfert génétique extrêmement efficaces capables d'échanger et d'accumuler des gènes de résistance. Certains gènes bactériens, y compris les gènes codant pour la résistance, peuvent se déplacer entre des éléments d'ADN chromosomiques et extra-chromosomiques d'une bactérie. Ils peuvent se déplacer entre des bactéries appartenant à une espèce identique ou différente ou à des bactéries de genres différents. Ce type de transfert est appelé transmission horizontale. Les gènes de résistance aux antibiotiques présents sur les plasmides et les transposons circulent vers et à partir des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, ainsi qu'entre les bactéries qui habitent des niches écologiques très différentes (Levy, 1997). Le transfert inter-espèces implique qu'une fois les gènes de résistance transférables développés, les bactéries portant ces gènes resteront des donneurs potentiels de gènes pour d'autres bactéries.

### **5.4.3- Plasmides**

Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaires pouvant contenir des gènes de résistance. Ils se répliquent indépendamment de l'ADN chromosomique bactérien. Les plasmides jouent un rôle important dans l'évolution bactérienne, car ils affectent la réplication, le métabolisme, la fertilité bactérienne ainsi que la résistance aux toxines bactériennes (bactériocines), aux antibiotiques et aux bactériophages. Ils ont la capacité d'être transférés d'une bactérie à une autre, entraînant ainsi une large diffusion des caractéristiques codées par les plasmides dans un écosystème bactérien notamment la résistance aux antibiotiques. Les gènes codés par les plasmides sont intrinsèquement plus mobiles que les gènes chromosomiques, car les plasmides peuvent être transférés au sein d'une même espèce et entre différentes espèces. Les plasmides R sont des plasmides contenant des gènes de résistance. L'acquisition de nouveaux déterminants de la résistance peut se produire beaucoup plus facilement par les plasmides R que par la mutation génétique. Un seul plasmide R peut coder pour la résistance à 10 antibiotiques différents simultanément. La diffusion des plasmides peut s'effectuer par distribution clonale et par transfert intra-espèce et inter-espèce, ce qui entraîne une augmentation progressive de la proportion de micro-organismes portant un ou plusieurs plasmides R.

### **5.4.4- Transposons**

Les transposons (gènes sauteurs) sont de courtes séquences d'ADN pouvant se déplacer entre des plasmides, entre un plasmide et le chromosome bactérien ou entre un plasmide et un bactériophage (virus bactérien). Contrairement aux plasmides, les transposons ne sont pas capables de se répliquer indépendamment et doivent être conservés dans un réplicon fonctionnel (par exemple, un plasmide ou un chromosome).

Les transposons, y compris ceux portant des gènes de résistance, sont facilement acquis par les plasmides, puis incorporés dans l'ADN bactérien. Plusieurs transposons sont souvent regroupés sur le même plasmide, ce qui entraîne le transfert de plusieurs déterminants de la résistance avec une seule conjugaison (Burns, 1995).

Le transfert intracellulaire de transposons entre plasmides, entre chromosomes bactériens et plasmides, ainsi qu'un transfert inter-bactérien de plasmides et de transposons conjuguatifs peuvent entraîner un développement rapide de la résistance au sein de plusieurs populations bactériennes.

### **5.4.5- Intégrons et cassettes de gènes**

Les intégrons sont des éléments d'expression génique naturels. Ils sont composés de deux régions conservées et d'une région variable interposée, qui contient des cassettes de gènes

pour la résistance aux antibiotiques. Les cassettes de gènes sont des éléments qui incluent un seul gène et un site de recombinaison. Plus de 40 cassettes ont été identifiées et sauf cinq qui contiennent des gènes de résistance (Hall, 2007). Les intégrons sont mobiles, ils peuvent être situés dans l'ADN chromosomique, mais sont plus souvent situés dans des plasmides ou des transposons.

## 6- Mécanismes de transfert de résistance entre les bactéries

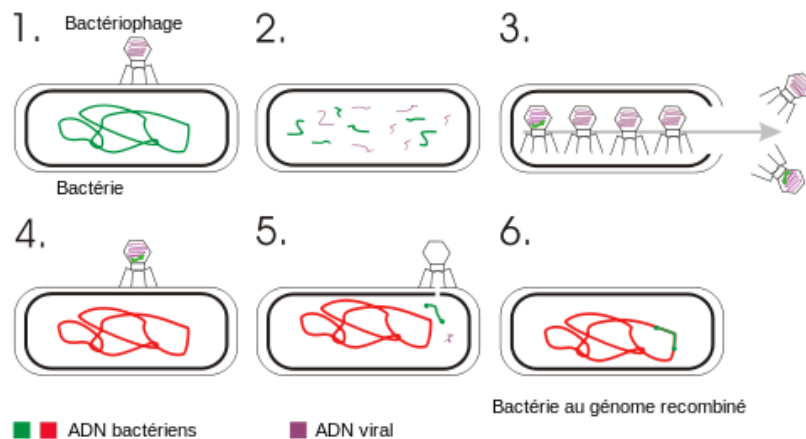
Les gènes ou les groupes de gènes de résistance peuvent s'acquérir par transformation, par transduction ou par conjugaison.

### 6.1- Transformation

La transformation est un processus actif qui permet le transfert et l'échange de gènes. Ce phénomène naturel est contrôlé par des gènes chromosomiques qui permettent l'absorption de l'ADN exogène libéré par une cellule compétente. C'est un mécanisme d'échange de gènes très répandu, mais pas universel entre les souches bactériennes (Wolfgang *et coll.*, 1999).

### 6.2- La transduction

La transduction est un mécanisme de transfert de l'ADN d'une bactérie à une autre, dont le vecteur est un virus bactérien appelé bactériophage. Ce mécanisme se produit généralement lorsqu'un virus porte accidentellement de l'ADN d'une cellule bactérienne et l'injecte dans une autre essentiellement de la même espèce. Deux types de transduction sont rencontrés : la transduction généralisée et la transduction spécialisée (Davison *et coll.*, 2000).

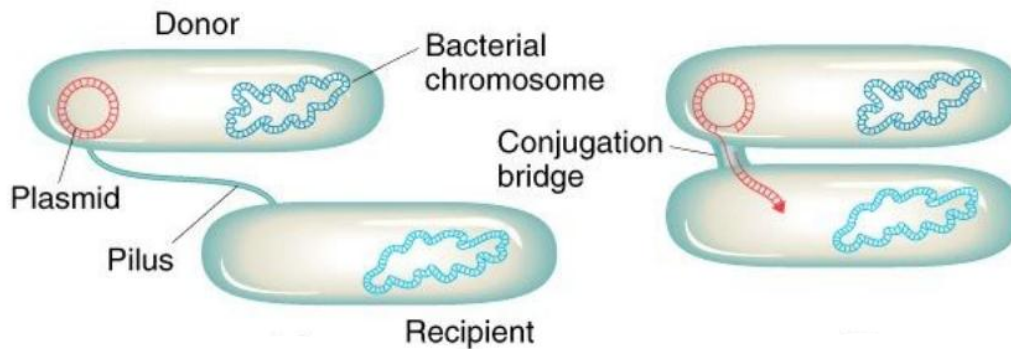


**Figure 2:** Schéma explicatif du mécanisme de transduction

### 6.3- La conjugaison

Les plasmides sont souvent transférés par conjugaison. La conjugaison est un processus au cours duquel l'ADN est transféré d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice par un mécanisme complexe nécessitant un étroit contact cellulaire et responsable en grande partie de l'émergence d'une résistance chez les bactéries pathogènes (Yamashita *et coll.*, 2000).





**Figure 3:** Schéma explicatif du mécanisme de conjugaison

## 7- Mécanismes biochimiques de la résistance acquise

Les mécanismes de la résistance acquise peuvent être regroupés en trois grands types de mécanismes : diminution de la perméabilité et efflux actif, modification de la cible des antibiotiques et production d'enzymes inactivant les antibiotiques. Ce dernier mécanisme est le plus fréquent.

### 7.1- Inactivation des antibiotiques

Les mécanismes de défense par l'inactivation des antibiotiques comprennent la production d'enzymes qui dégradent ou modifient l'antibiotique lui-même. Les stratégies biochimiques sont l'hydrolyse, le transfert de groupe et les mécanismes redox.

#### 7.1.1- Inactivation de l'antibiotique par hydrolyse

De nombreux antibiotiques possèdent des liaisons chimiques sensibles à l'hydrolyse (par exemple des esters et des amides). On sait que plusieurs enzymes détruisent l'activité des antibiotiques en ciblant et en clivant ces liens. Ces enzymes peuvent souvent être excrétées par les bactéries, ce qui inactive les antibiotiques avant qu'elles n'atteignent leur cible dans la bactérie. Les amidases hydrolytiques classiques sont les  $\beta$ -lactamases qui clivent le noyau  $\beta$ -lactame des antibiotiques pénicillines et céphalosporines. De nombreuses bactéries à Gram négatif et à Gram positif produisent de telles enzymes et plus de 200  $\beta$ -lactamases différentes ont été identifiées (Bonnet, 2004; Kotra et Mobashery, 1999). Les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) induisent une résistance à toutes les pénicillines, les céphalosporines de troisième génération (par exemple, la ceftazidime, le céfotaxime, la ceftriaxone) et l'aztréonam, mais pas les céphamycines (céfoxitine et céfotétan) et les carbapénèmes. Les BLSE sont très diverses: plus de 180 BLSE différentes ont été identifiées. Ils sont le plus souvent détectés dans *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis*, mais ont également été trouvés dans d'autres *Enterobacteriaceae* (Bradford, 2001; Shah et coll., 2004).

### **7.1.2- Inactivation des antibiotiques par transfert de groupe**

Les enzymes inactivant les antibiotiques par transfert de groupe est la famille des transférases. Ces enzymes inactivent les antibiotiques (aminoglycosides, chloramphénicol, streptogramine, macrolides ou rifampicine) par substitution chimique (des groupes adénylyle, phosphoryle ou acétyle sont ajoutés à la périphérie de la molécule d'antibiotique). Les antibiotiques modifiés sont affectés dans leur liaison à une cible. Les stratégies chimiques comprennent l'o-acétylation et la N-acétylation (Allignet et el Solh, 1995; Vetting *et coll.*, 2004) l'O-phosphorylation (Matsuoka et Sasaki, 2004; Yazawa *et coll.*, 1994), l'O-nucléotidylation (Brisson-Noël *et coll.*, 1988; Pedersen *et coll.*, 1995), l'O-ribosylation (Houang *et coll.*, 2003), l'O-glycosylation et le transfert de thiol. Ces stratégies de modification covalente nécessitent toutes un co-substrat pour leur activité (ATP, acétyl-CoA, NAD<sup>+</sup>, UDP-glucose ou glutathion) et, par conséquent, ces processus sont limités au cytoplasme.

### **7.1.3- Inactivation des antibiotiques par procédé réduction-oxydation**

L'oxydation ou la réduction des antibiotiques a rarement été exploitée par des bactéries pathogènes. Cependant, il existe quelques exemples de cette stratégie : l'un d'eux est l'oxydation des antibiotiques tétracyclines par l'enzyme TetX. En outre, *Streptomyces virginiae*, producteur de la virginiamycine M1, un antibiotique de la famille des streptogramines de type A, se protège de son propre antibiotique en réduisant un groupe cétonique critique en alcool en position 16 (Andersen *et coll.*, 1997; Yang *et coll.*, 2004).

## **7.2- Modification de la cible**

Le deuxième mécanisme majeur de résistance est la modification du site cible de l'antibiotique, de sorte que l'antibiotique est incapable de se lier correctement. Cependant, il est possible que des changements mutationnels se produisent dans la cible, réduisant ainsi la sensibilité à l'inhibition tout en conservant la fonction cellulaire (Spratt, 1994).

Dans certains cas, la modification de la structure de la cible pour produire une résistance nécessite d'autres modifications dans la cellule afin de compenser les caractéristiques modifiées de cette cible. Dans le cas de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthiciline (SARM), l'acquisition et l'intégration dans le chromosome d'un gène (*mecA*), d'origine mal connue, induit la synthèse d'une nouvelle Protéine liant les Pénicillines PLP (PLP 2a). La PLP 2a est capable d'assurer à elle seule l'assemblage du peptidoglycane et elle confère une résistance à toutes les bêta-lactamines (Enright, 2003; Happi *et coll.*, 2005; Leski et Tomasz, 2005).

### **7.3- Perméabilité des pompes à efflux et de la membrane externe**

Les pompes à efflux sont des protéines membranaires qui exportent les antibiotiques hors de la cellule et maintiennent leurs concentrations intracellulaires à faibles niveaux. La perméabilité réduite de la membrane externe (ME) entraîne une réduction de l'absorption d'antibiotiques. L'absorption réduite et l'efflux actif induisent une faible résistance chez de nombreuses bactéries d'importance clinique (Eliopoulos, 2004).

#### **7.3.1- Pompes à efflux**

Les pompes à efflux affectent toutes les classes d'antibiotiques, en particulier les macrolides, les tétracyclines et les fluoroquinolones, car elles inhibent différents aspects de la biosynthèse des protéines et de l'ADN et doivent donc être intracellulaires pour exercer leur effet. Les pompes à efflux varient par leur spécificité et leur mécanisme (Webber et Piddock, 2003). Bien que certains systèmes d'efflux soient spécifiques à un médicament, de nombreux sont des transporteurs multidrogues capables d'expulser un large spectre de médicaments de structure différente, contribuant ainsi de manière significative à la multi-résistance bactérienne (van Veen et Konings, 1997). Les pompes d'efflux multidrogues inductibles sont responsables de la résistance intrinsèque de nombreux organismes aux antibiotiques. Ainsi, une mutation des éléments régulateurs qui contrôlent la production des pompes à efflux peut entraîner une augmentation de la résistance aux antibiotiques. Les bactéries à Gram positif et à Gram négatif peuvent posséder des pompes à efflux à médicament unique et / ou à médicament multiple (Langton *et coll.*, 2005; Putman *et coll.*, 2000).

#### **7.3.2- Modification de la perméabilité de la membrane externe**

Les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe constituée d'une couche interne contenant des phospholipides et d'une couche externe contenant les lipopolysaccharides (LPS). Cette composition de la membrane externe (ME) qui ralentit la pénétration de l'antibiotique et son transport à travers la ME est obtenu grâce aux protéines les porines qui forment des canaux remplis d'eau. Les molécules de médicament peuvent pénétrer dans la ME en utilisant l'un des modes suivants: par diffusion à travers les porines ou par diffusion à travers la bicouche ou bien encore par absorption auto-promue. Les antibiotiques tels que les  $\beta$ -lactames, le chloramphénicol et les fluoroquinolones pénètrent dans la membrane externe à Gram négatif par les porines. De ce fait, des modifications du nombre, de la taille ou de la sélectivité des copies des porines modifieront le taux de diffusion de ces antibiotiques (Hancock et Brinkman, 2002; Nikaido, 2003).

## **8- Multi-résistance**

Au cours des dernières années, plusieurs organismes divergents sont apparus comme des causes importantes de morbidité et de mortalité en médecine humaine, notamment des infections causées par des bactéries réfractaires au traitement en raison de la résistance à de nombreux antibiotiques (Colomb-Cotinat *et coll.*, 2016). Des exemples sont *Salmonella Typhi*, les pneumocoques résistants à la pénicilline, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et les mycobactéries multi-résistantes. La résistance simultanée d'une bactérie à trois classes d'antibiotiques ou plus par divers mécanismes de résistance généralement codés par différents gènes est définie comme une multi-résistance.

La multi-résistance chez les bactéries est généralement attribuée à l'acquisition de transposons, d'intégrons et/ou de plasmides portant des déterminants génétiques pour différents mécanismes de résistance.

En raison de l'utilisation intensive d'antibiotiques dans les hôpitaux et dans la production animale, les souches hospitalières de bactéries et les bactéries chez les animaux d'élevage ont tendance à "collecter" des gènes de résistance suite à une pression de sélection exercée par les antibiotiques (Torumkuney *et coll.*, 2016; Suresh *et coll.*, 2018; Turner *et coll.*, 2019). En conséquence, dans ces environnements en général, un plus grand nombre de bactéries multi-résistantes peut être détecté en comparant avec des environnements avec une pression de sélection moindre (moins d'utilisation d'antibiotiques).

## **II- Antibiotiques en aviculture**

### **1- Production et consommation de la viande de volaille dans le monde et au Maroc**

La viande et les œufs sont des produits avicoles importants. Ils font partie des denrées alimentaires d'origine animale les plus largement consommées dans le monde entier, quelles que soient les cultures, les traditions et les religions. Ils sont riches en protéines de haute qualité et constituent la principale source mondiale de protéines animales. Ils contiennent également des acides gras essentiels et une faible teneur en matières grasses. Depuis le début des années 1960, la consommation mondiale d'œufs par habitant s'est multipliée par 2, tandis que la consommation de viande de volaille s'est multipliée par 5. Cette augmentation rapide de la consommation au cours des dernières décennies est due à la croissance de la population, à l'urbanisation et à l'augmentation des revenus dans les pays en cours de développement. Le domaine de la volaille continue à s'industrialiser et à se développer dans de nombreuses régions du monde. En 2008 la production mondiale de la volaille a progressé de 4% par

rapport à 2007, en réponse à une demande globalement en augmentation. La croissance a été particulièrement soutenue au Brésil, en Chine et, dans une moindre mesure, aux Etats-Unis (FAOSTAT, 2009).

Les États-Unis d'Amérique sont le plus grand producteur de viande de volaille dans le monde: ils produisent 18% de la production mondiale. Ils sont suivis par la Chine, le Brésil et la Fédération de Russie. La Chine est le premier producteur mondial d'œufs (40% de la production mondiale) et viennent ensuite les États-Unis d'Amérique (7%) et l'Inde (6%).

En 2008, 93 millions de tonnes de viande de volaille ont été produites à l'échelle de la planète, dont les deux tiers aux Etats-Unis, dans l'Union européenne, en Chine, et au Brésil (FAOSTAT, 2009).

D'après l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (la FAO), il y a une dominance de la consommation de poulets par rapport aux autres types de viandes. La production de poulet de chair représenterait environ 86 % de la production mondiale de la volaille. Cette dominance est particulièrement marquée au Brésil, où la quasi-totalité de la production de volaille est constituée de poulet (97 %). Aux Etats-Unis, il y a une production dominante de poulet (82%) avec une production de dinde de 17%.

Dans l'Union européenne, le poulet représente aux alentours de 72 % de la production, accompagné d'une production de dinde (16 %) et de canard (4 %). En Chine, la viande de poulet est également dominante (68 %) le reste étant composé de canard et d'oie avec une production de l'ordre de 30 % (FAOSTAT, 2009).

La FAO estime la production mondiale de volailles en 2016 à 115,8 Millions de tonnes, soit une hausse de 0,9 % par rapport à 2015, et une hausse de 21.2% par rapport à 2008. Les perspectives agricoles de la FAO à l'horizon de 2025 montrent que l'on peut s'attendre à une progression de la production de volailles de 14 % entre 2016 et 2025, tandis que la production toutes types de viandes confondues augmenterait de 12,5 %. Une production de volaille de 131 millions de tonnes est attendue en 2025.

Au Maroc, l'aviculture constitue un secteur très important avec une hausse moyenne durant les quatre dernières décennies d'environ 7.7% des productions de viandes de volailles et 3.5% des productions d'œufs de consommation. Le secteur avicole constitue l'une des activités agricoles les plus dynamiques. La production de la viande de la volaille en 2008 était de 490 milles tonnes et elle a atteint 550 milles tonnes en 2017. Concernant la production des œufs, 5,5 milliards d'œufs ont été produits en 2017. La production actuelle couvre **100%** des besoins en viandes de volailles représentant **52%** de la consommation totale de toutes viandes

confondues et **100%** des besoins en œufs de consommation. Selon la Fédération Interprofessionnelle du Secteur Avicole (FISA, 2016), la consommation de poulet par habitant au Maroc est de 17.4 kg.

## 2- Utilisation des antibiotiques en élevage

Bien que les statistiques d'utilisation des antibiotiques soient difficiles à obtenir pour l'industrie avicole, une étude réalisée par DuPont et Steele en 1987 a révélé que 80% des volailles élevées aux États-Unis avaient reçu les ATB dans l'aliment.

Au niveau mondial, les familles d'antibiotiques utilisées en élevage sont souvent les plus anciennes. Ce sont principalement, les macrolides, les  $\beta$ -lactamines, les fluoroquinolones et les céphalosporines (Tableau 2)

**Tableau 2:** Antibiotiques utilisés chez la volaille dans le monde (Gaskins *et coll.*, 2002; Castanon, 2007; Landoni et Albarellos, 2015).

<b>Famille</b>	<b>Antibiotique</b>	<b>Utilisation</b>
<i><b>Aminoglycosides</b></i>	Gentamicine	Préventive
	Néomycine	Curative
	Streptomycine	Curative
<i><b>B-lactarnines</b></i>	Pénicilline	Curative
	Amoxicilline	Curative
<i><b>Céphalosporines</b></i>	Ceftiofur	Curative
<i><b>Quinolones</b></i>	Enrofloxacin	Curative
	Fluméquine	Curative
	Sarafloxacin	Curative
<i><b>Streptogramine</b></i>	Virginiamycine	Préventive
<i><b>Tétracyclines</b></i>	Tétracycline	Curative
	Chlorotétracycline	Curative
	Oxytétracycline	Curative

Dans le monde, 90 % des antibiotiques produits sont destinés aux traitements des animaux et distribués dans l'aliment, tous usages confondus (facteurs de croissance, préventif, curatif) (BÂRKA, 2000).

Ils sont utilisés à 20% chez les volailles. On estime que la supplémentation des aliments avec un additif de croissance (antibiotique naturel ou chimique) concerne selon Barka (2000) : Les dindons (96 %) de façon quasiment systématique,

- ✚ Les poulets de chair (68 %) de façon largement majoritaire,
- ✚ Les poules pondeuses (20 %) de façon significative mais minoritaire.

### **3- Types d'utilisations des antibiotiques en aviculture**

L'utilisation des antibiotiques chez les animaux a permis le développement de l'élevage moderne, du point de vue, économique est sanitaire. Ainsi, en aviculture intensive, les antibiotiques ont deux types d'utilisations (Colin, 1991) :

#### **3.1- Usage thérapeutique**

En élevage de rente, les antibiotiques ont tout d'abord une utilisation thérapeutique dans le but de combattre une infection présente (antibiothérapie curative) ou de prévenir une infection possible (antibiothérapie préventive ou prophylactique). La voie d'administration la plus rapide pour traiter un grand nombre d'animaux est l'eau de boisson ou l'incorporation dans l'aliment (Coumba, 2006).

#### **3.2- Usage zootechnique**

À côté de l'utilisation thérapeutique, on trouve une utilisation propre à l'élevage de rente qui vise à améliorer la croissance des animaux par l'incorporation de faibles quantités d'antibiotiques dans l'alimentation.

Chez les animaux d'élevage, l'utilisation des antibiotiques en tant que facteurs de croissance a débuté dans les années 1940. L'effet promoteur de croissance de ces produits a été découvert chez les poulets peu après l'introduction des antibiotiques à usage thérapeutique. Les travaux de Moore et ses collaborateurs en 1946, ont permis de mettre en évidence l'effet promoteur de croissance chez les poulets où des antibiotiques ont été utilisés pour stériliser le tractus gastro-intestinal. Cette pratique conduit à l'accoutumance des germes et rend les antibiotiques inefficaces dans les cas où ils sont nécessaires. En agissant de la sorte, l'éleveur cherche à obtenir une croissance accélérée de l'animal, en particulier dans l'élevage du poulet.

où l'introduction des additifs permet d'améliorer l'indice de croissance de 3 à 12% ; l'animal croît plus vite en mangeant moins (Ramdane, 2015).

### **4- Anti-biorésistance chez les bactéries des volailles**

La flore intestinale des animaux peut constituer un réservoir de bactéries antibiorésistantes capables d'infecter ou de coloniser le corps humain par la chaîne alimentaire. Ces souches sont fréquemment présentes chez les animaux destinés à la consommation humaine, y compris chez les volailles. Les poulets peuvent être des réservoirs pour plusieurs agents pathogènes véhiculés par les aliments, dont *Campylobacter*, *Salmonella* et *E. coli* (Kazwala *et coll.*, 1990).

L'utilisation des antibiotiques chez les volailles a créé des organismes résistants chez les poulets eux-mêmes et dans tout l'environnement de production. De nombreuses souches résistantes, notamment *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* et *Aeromonas*, ont été isolées de la litière de poulets ayant reçu des antibiotiques (Kelley *et coll.*, 1998).

De nombreuses études de surveillance ont été réalisées pour mesurer la prévalence de la résistance chez les volailles. Les souches d'*E. coli* résistantes sont fréquemment isolées chez des poulets vivants et des souches présentant une résistance multiple à la tétracycline, à la streptomycine, aux sulfamides, à la gentamicine, aux fluoroquinolones et à pratiquement tous les autres antibiotiques ont été isolées (Baya *et coll.*, 1986; Blanco *et coll.*, 1997). Même après l'arrêt d'un antibiotique, la résistance persiste. Dans les années 1970, un groupe expérimental de poulets a reçu de l'oxytétracycline et a été comparé à un groupe témoin. En 12 semaines, 70% des isolats d'*E. coli* du groupe expérimental étaient résistants à plus de deux antibiotiques, dont la streptomycine et l'ampicilline (Levy, 2001).

Les souches *Campylobacter spp* sont également particulièrement préoccupantes puisque les taux de colonisation chez les poulets sont passés de 50% à 100%. Aux Pays-Bas, une étude de 1997 a révélé une résistance à la quinolone chez 29% des *Campylobacters* de volailles vivantes (Jacobs Reitsma, 1997). En 2003, Hein *et coll.* (2003) ont signalé une prévalence de 45% de *campylobacter* chez le poulet. Les fluoroquinolones sont le plus souvent utilisées pour traiter la campylobactériose et la résistance aux quinolones chez *Campylobacter spp* a considérablement augmenté au cours des 20 dernières années. En Autriche, 50% des isolats de *Campylobacter* provenant de volailles étaient résistants à la ciprofloxacine (Hein *et coll.*, 2003).

*Salmonella spp* est un autre agent pathogène important chez les poulets vivants et la résistance aux antibiotiques chez ces espèces est en augmentation. En 1996, en Espagne, 62% des isolats étaient résistants à au moins un antibiotique et, en 2000, 82% de *Salmonella spp* étaient résistants selon Usera *et coll.* (2002).

### **5- Transmission de bactéries et des gènes de résistance de l'animal à l'homme**

Des études menées au cours des dernières décennies ont montré que les souches intestinales bactériennes chez les animaux, y compris les souches portant des gènes de résistance aux antibiotiques, peuvent être transmises naturellement à l'homme (Evers *et coll.*, 2016; Levy, 1997; Marshall *et coll.*, 1990). Les bactéries intestinales adaptées aux animaux peuvent se propager dans l'environnement et coloniser, au moins de façon transitoire, le tractus intestinal d'autres espèces animales et de l'homme. Cela a été démontré chez les ouvriers agricoles et



chez les personnes vivant à proximité des fermes. De plus, la colonisation intestinale chez l'homme par des souches d'*Enterococcus faecium* résistantes à la vancomycine dérivées d'animaux de ferme (porcs et volailles) a été démontrée (Berchieri Jr, 1999). Selon Marshall *et coll.* (1990), lorsque des souches d'*E. coli* adaptées aux animaux sont marquées génétiquement et sont réintroduites chez d'autres animaux, elles peuvent être récupérées dans l'environnement de la ferme, dans l'intestin d'autres espèces animales et dans les matières fécales de humains.

Une ancienne étude réalisée par Smith (1969) a clairement montré que des bactéries intestinales d'origine animale, telles que *E. coli* contenant des facteurs R (plasmides transférables portant des gènes de résistance), sont capables de coloniser l'intestin humain et de transférer des gènes de résistance à la souche résidente d'*E. Coli*. Cependant, un faible nombre de receveurs résistants a été isolés des fèces et n'a persisté que peu de temps. Dans ces expériences, le volontaire humain ne recevait pas d'antibiotiques. Bien que ce type d'expérience n'ait pas été répété à plus grande échelle, principalement pour des raisons éthiques ( Smith, 1970; Nijsten *et coll.*, 1995). Des expériences similaires ont été réalisées sur des animaux recevant une bactérie résistante. Dans ces expériences, des bactéries résistantes adaptées à un certain hôte animal ont été administrées par voie orale à une espèce animale différente. Il a été démontré qu'une modification de la flore, chez les animaux traités aux antibiotiques ou chez les animaux nouveau-nés, pourrait augmenter la capacité de colonisation des souches exogènes et leur capacité à transférer les déterminants de la résistance ( Smith, 1970; Nijsten *et coll.*, 1995).

La transmission des bactéries se fait fréquemment via les denrées alimentaires. À l'abattoir par exemple, des bactéries pathogènes issues du tube digestif des animaux viennent contaminer la viande. La consommation de cette viande contaminée (transmission via l'alimentation) est notamment responsable de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). De nombreuses publications portent sur la contamination des viandes par *Campylobacter* et *Salmonella* et leur rôle dans les TIAC. Ces études démontrent que ces bactéries ingérées par les hommes via l'alimentation peuvent transmettre leurs résistances via l'échange de plasmides (Kazwala *et coll.*, 1990).

La contamination bactérienne des carcasses de poulet se produit généralement pendant l'abattage et la transformation, et ces micro-organismes peuvent survivre dans le produit vendu au consommateur (Moritz ; 2001).

Une étude de Bok et ses collaborateurs (1986) portant sur l'incidence des agents pathogènes alimentaires dans les poulets de chair vendus au détail en Afrique du Sud fait état de la mise

en évidence des souches d'*Aeromonas*, de *Shigella*, de *Campylobacter* et de *Yersinia*. Il est également apparu dans ce travail que plusieurs carcasses de poulet étaient contaminées par plus d'un agent pathogène à la fois. Le rapport du comité consultatif sur la sécurité microbiologique des aliments (ACMSF) en Europe mentionne que la chair de volaille est un réservoir important de *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli* (Moritz ; 2001). Plusieurs publications, dont certaines émanent du continent africain, font état d'anti-biorésistances observées chez des bactéries trouvées dans des poulets abattus et revendus au détail, ainsi que chez des poulets errants (Aarestrup *et coll.*, 2000; Beborra *et coll.*, 1994).

#### **6- Les couts économiques de la résistance aux antibiotiques**

Bien que la résistance aux ATB ait été associée à des effets néfastes sur la santé, les études existantes quantifiant la charge de morbidité ont des limites méthodologiques (Gandra *et coll.*, 2014). Le fardeau économique brut de la résistance aux antibiotiques est estimé à au moins 1,5 milliard de dollars en 2007 en Europe et à 55 milliards de dollars en 2000 aux États-Unis, y compris les frais des patients et les frais hospitaliers (ECDC, 2009). Selon Golkar (2014), près de deux millions d'Américains développent, chaque année, des infections associées aux soins, entraînant 99 000 décès, la plupart dus à des agents pathogènes résistants aux antibiotiques. En 2006, deux infections communes (la septicémie et la pneumonie) étaient à l'origine du 50 000 de décès aux USA ont coûté plus de 8 milliards de dollars au système de santé Américain (Golkar *et coll.*, 2014).

### **III- Utilisation des huiles essentielles dans le secteur avicole**

L'ajout d'antibiotiques à titre prophylactique dans l'aliment de la volaille pour améliorer sa croissance, et pour réduire la mortalité due aux maladies bactériennes est bien connu (Ricke *et coll.*, 2012, Van Boeckel *et coll.*, 2015, Suresh *et coll.*, 2018). Cependant, la préoccupation croissante suscitée par la transmission et la prolifération des bactéries résistantes via la chaîne alimentaire a conduit à l'interdiction de l'utilisation d'antibiotiques comme facteurs de croissance par l'Union Européenne en 2006 ( Dibner et Richards, 2005; Castanon, 2007). Cette interdiction a conduit à rechercher des alternatives à ces molécules. Différentes stratégies ont été adoptées, en particulier l'utilisation des extraits végétaux. En effet, de nombreuses recherches ont été menées pour explorer l'utilisation des plantes, des extraits de plantes et des huiles essentielles des plantes aromatiques comme substituts efficaces ( Lee *et coll.*, 2003; Barreto *et coll.*, 2008). Ces produits présentent plusieurs avantages par rapport aux antibiotiques commerciaux couramment utilisés car ils sont exempts de résidus et sont généralement reconnus comme des produits sûrs et couramment utilisés dans l'industrie alimentaire (Varel, 2002). Au cours de la dernière décennie, ces plantes ont reçu une attention

accrue en tant qu'améliorateurs possibles de performance de croissance des animaux. Le marché des améliorateurs de performance basé sur les plantes a augmenté depuis les années 90. Par exemple, les ventes des HE dans l'Union européenne étaient 90 de tonnes en 1996, et ils ont atteint 600 tonnes en 2006 (Greathead, 2003).

### **1- Définition des HE**

Selon la Pharmacopée Européenne (2011), une huile essentielle (HE) est un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale odorante botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. En pratique, il est possible d'obtenir une HE à partir de la plante entière ou bien seulement à partir de certaines parties de la plante telles les fleurs, les bourgeons, les graines, les feuilles, le bois, l'écorce, les fruits, les racines, les tiges et les brindilles (Brenes et Roura, 2010). Ces différents extraits ne sont pas forcément d'aspect huileux. Ce sont des mélanges de molécules variées, comprenant en particulier des terpènes et des composés oxygénés. Aujourd'hui, il existe plus de 3 000 HE, dont 300 sont commercialisées à des fins très diverses en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique. Les HE sont utilisées aussi comme produits phytosanitaires, comme produits aromatisants et enfin dans l'alimentation humaine et animale (Brenes et Roura, 2010). Outre leur utilisation traditionnelle, de nombreux effets bénéfiques de ces HE ont été signalés par des études expérimentales au cours des trois dernières décennies. Parmi ceux-ci figurent leur influence bénéfique sur le métabolisme des lipides, leur capacité à stimuler la digestion, leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes et leur potentiel anti-inflammatoire (Acamovic et Brooker, 2005).

### **2- Composition chimique des HE**

L'analyse détaillée de la composition des HE est effectuée par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (Daferera *et coll.*, 2000; Juliano *et coll.*, 2000). Les HE, du point de vue chimique, sont des mélanges assez complexes pouvant contenir de 20 à 60 composants à des concentrations très différentes (Blanco *et coll.*, 1997). Cette complexité rend souvent difficile l'explication de leurs activités (Senatore, 1996). Ce sont des mélanges variables principalement de terpénoïdes (linalol, géraniol, thujanol, bornéol, menthol, citronnillol,  $\beta$ -terpinéol) et une variété d'hydrocarbures aliphatiques de faible poids moléculaire (par exemple, les phénols tels que le thymol, le carvacrol, l'eugénol, le gäïacol et les aldéhydes aromatiques tels que la cinnamaldéhyde, le cuminal et le phellandral) (Dorman

et Deans, 2000). Les HE se caractérisent par deux ou trois composants majoritaires à des concentrations assez élevées (20 à 70%) par rapport aux autres composants présents à l'état de traces. Par exemple, le carvacrol (30%) et le thymol (27%) sont les principaux composants de l'huile essentielle d'*Origanum compactum*. Le linalol peut représenter 68% de l'huile essentielle de *Coriandrum sativum*, l' $\alpha$ - et  $\beta$ -thuyone (57%) et le camphre (24%) de l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* (Brenes et Roura, 2010). En règle générale, les composants majoritaires reflètent les caractéristiques biophysiques et biologiques des HE dont ils ont été isolés. Les composants phénoliques sont principalement responsables des propriétés antibactériennes des HE (Cosentino *et coll.*, 1999).

### **3- Toxicité des HE**

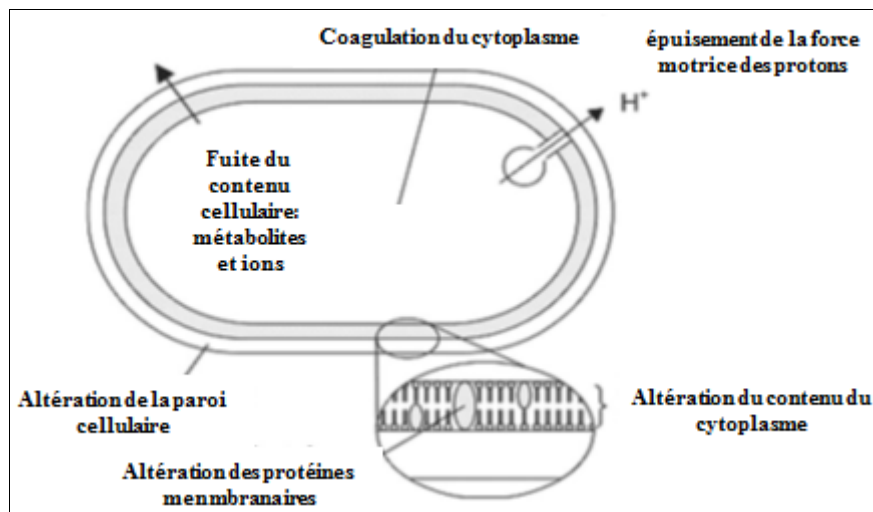
En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë faible ou très faible par voie orale: une dose létale médiane (DL50) comprise entre 2 et 5 g/kg pour la majorité des huiles couramment utilisées (anis, eucalyptus, girofle, etc.) ou le plus fréquemment supérieure à 5 g/kg pour la camomille, la citronnelle, la lavande, la marjolaine, le vétiver, etc (Couderc, 2001). D'autres HE ont une DL50 inférieure à 1g/kg comme l'essence de moutarde (0,34 g/kg) et les essences d'origan et de sarriette (1,37 g/kg). Les huiles essentielles du basilic, de l'estragon et de l'hysope ont une toxicité aiguë de 1,5 ml/kg.

### **4- Effets biologiques des huiles essentielles**

#### **4.1- Activité antibactérienne**

Les huiles essentielles sont reconnues depuis longtemps par leur activité antimicrobienne (Pellecuer, 1976; Remmal *et coll.*, 1993a, 1993b). L'effet antimicrobien des huiles essentielles est proprement lié à leur propriété lipophile (Frag *et coll.*, 1989). Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes peuvent pénétrer dans la membrane bactérienne, atteindre la partie interne de la membrane bactérienne et atteindre la partie interne de la cellule en raison de leur lipophilie ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire. Ces modifications entraînent une fuite d'ions et de composés intracellulaires (Cox *et coll.*, 1998). La perte du matériel cytoplasmique entraîne l'éclatement cellulaire. Mais il a également été proposé que des propriétés telles que la présence de groupes fonctionnels et l'aromaticité sont responsables de l'activité antibactérienne (Frag *et coll.*, 1989). En effet, le spectre d'action des HE est très étendu. Elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba et Kunicka, 2003). Les HE agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positive

que sur les bactéries à Gram négative. Toutefois, les bactéries à Gram négative paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Burt, 2004).



**Figure 4:** Action des HE et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Burt, 2004)

#### 4.2- Activité antifongique

Les phénols sont des agents chimiques antimicrobiens puissants, suivis des alcools, des cétones et des éthers. Ainsi, l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*, riche en carvacrol et en thymol, possède un effet antifongique puissant contre les souches *Aspergillus niger* (Carmo *et coll.*, 2008). Vale-Silva *et coll.* (2012) ont montré que le carvacrol inhibe la croissance et la production de toxines d'*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. Des travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré une activité fongicide de l'eugénol et du thymol *in vitro* sur *Saccharomyces cerevisiae* (Bennis *et coll.*, 2004a ; 2004b). De même les études réalisées dans notre laboratoire par Chami *et coll.* (2004a, 2004b, 2005), ont montré l'activité fongicide de l'eugénol et du carvacrol sur *Candida albicans* *in vitro* et *in vivo* sur des modèles expérimentaux de candidose orale et vaginale.

#### 4.3- Activité antioxydante

En général, le thymol et le carvacrol sont des composés actifs des HE. Leur activité est due à la présence de groupes OH phénoliques qui agissent comme donneurs d'hydrogène aux radicaux peroxy produits au cours de la première étape de l'oxydation lipidique, ce qui retarde la formation d'hydroxy peroxyde. Le thymol et le carvacrol peuvent agir comme antioxydants dans les œufs et la viande de poulet au moment de leur introduction dans l'alimentation de la volaille (Lee, 2002).

#### 4.4- Activité anti-inflammatoire

Les huiles essentielles contiennent des composés phénoliques connus par leurs propriétés anti-inflammatoires. Les terpénoïdes et les flavonoïdes sont les principales substances

présentant un pouvoir anti-inflammatoire (Krishan et Narang, 2014). Ces substances inhibent le métabolisme des prostaglandines inflammatoires. La camomille, le souci, la réglisse et l'anis sont des exemples de plantes dont les HE sont un potentiel anti-inflammatoire.

#### **4.5- Pouvoir aromatisant des huiles essentielles**

Les huiles essentielles et leurs composants purs sont également utilisés comme arômes dans l'alimentation humaine. Le carvacrol peut être utilisé pour aromatiser les boissons non alcoolisées jusqu'à 26 ppm et les aliments cuits jusqu'à 120 ppm (Burdock et Fenaroli, 2010). Le cinnamaldéhyde peut être utilisé à des concentrations aussi faibles que 8 ppm dans les produits de crème glacée et jusqu'à 4900 ppm dans les chewing-gums (Burdock et Fenaroli, 2010). Le thymol et la bêta-ionone sont également utilisés comme agents aromatisants dans les aliments (Lee, 2002).

#### **4.6- Effets sur la digestion**

les huiles essentielles affectent favorablement les fonctions de l'intestin en stimulant les sécrétions digestives, tels que la bile et le mucus et en favorisant une activité enzymatique accrue chez les animaux (Platel et Srinivasan, 2000). Chez les poulets de chair, les HE améliorent la sécrétion du trypsine, d'amylase et de chyme jéjunal (Jang *et coll.*, 2007) et réduisent l'adhérence d'agents pathogènes comme *E. coli* et *Clostridium perfringens* à la paroi intestinale (Jamroz *et coll.*, 2006; Ezzat Abd El-Hack *et coll.*, 2016). Craig a rapporté que les plantes aromatiques et leurs HE jouent un rôle dans l'activité visant à réduire le cholestérol (Craig, 1999). L'effet hypocholestérolémiant de l'huile de citronnelle est dû à l'inhibition de l'activité de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase, qui agit comme enzyme régulatrice essentielle dans le processus de synthèse du cholestérol. (Elson *et coll.*, 1989)

#### **4.7- Autres effets**

Certaines huiles essentielles agissent contre les parasites. Santoro *et coll.*, (2007) ont montré que les HE d'origan et du thym inhibent la croissance de *Trypanosoma cruzi*. Des travaux menés dans notre laboratoire par Remmal *et coll.*, (2011) ont montré une action antiparasitaire *in vitro* des HE de girofle et de thym sur les ookystes d'*Eimeria*. Dans une étude récente, Tanghort *et coll.* (2019) ont montré l'action antiparasitaire des HE de thym, d'origan et de girofle, ainsi que de leurs composés majoritaires; thymol, carvacrol et eugenol sur deux espèces de *Cryptosporidium*: *C. baileyi* et *C. galli*, avec une concentration létale médiane (CL50) faible (CL50 < 0,4 mg/mL).

## **5- Effet sur les performances de croissance chez la volaille**

Dans le domaine avicole, les HE sont principalement utilisés pour améliorer les performances zootechniques (vitesse de croissance, Indice de Consommation (IC), digestibilité des aliments, statut sanitaire des animaux).

Comme les huiles essentielles sont aussi des produits aromatiques, elles devraient stimuler l'appétit. Les huiles essentielles rajoutées aux aliments peuvent agir non seulement sur la microflore intestinale, mais également sur l'utilisation des nutriments (Suresh *et coll.*, 2018). De plus, il semble que les HE peuvent agir sur les performances de croissance en améliorent ces derniers car elles stimulent la sécrétion d'enzymes digestives, ce qui améliore la digestion des nutriments et la consommation alimentaire (Jamroz *et coll.*, 2006). Aussi, l'impact bénéfique des huiles essentielles sur la modulation du microbiote intestinal est étroitement lié à la santé et à l'immunité, ce qui affectera les performances de croissance et le bien-être.

Notre laboratoire a mis au point une composition innovante brevetée à base de thymol, le composé majoritaire de l'huile essentiel de thym et de l'origan (Remmal *et coll.*, 2019). Cette composition est un additif alimentaire qui a montré en plus de son effet antibactérien un effet qui améliore les performances de croissance de poulet (Sennouni *et coll.*, 2018).

## **IV- L'ostéomyélite**

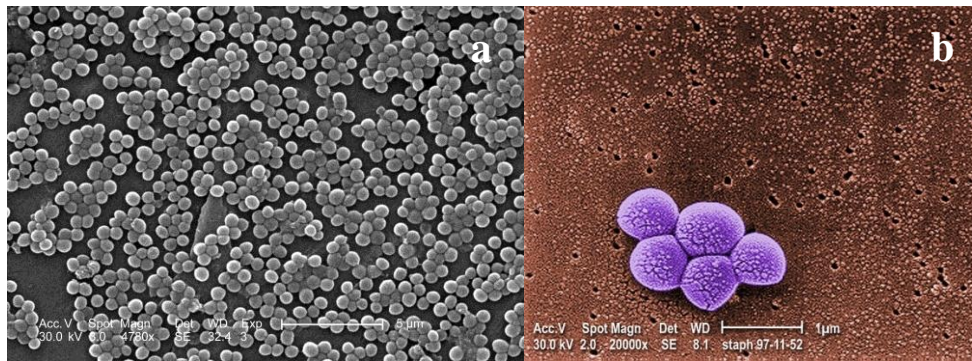
### **1- Définition**

L'ostéomyélite est une infection des os et de la moelle osseuse par voie hématogène, causée par un ou plusieurs organismes infectieux. Elle entraîne une destruction osseuse locale et est observée principalement chez l'enfant (Crone *et coll.*, 2020).

L'ostéomyélite aiguë évolue sur plusieurs heures, par opposition à l'ostéomyélite chronique, qui est définie comme une infection de longue durée qui évolue au cours de plusieurs jours ou semaines, caractérisée par la persistance des microorganismes, une inflammation de faible intensité et la présence de séquestres osseux et de tracts fistuleux (Caputo *et coll.*, 1994). Des douleurs et une fièvre est un signe qui accompagne souvent l'ostéomyélite aiguë.

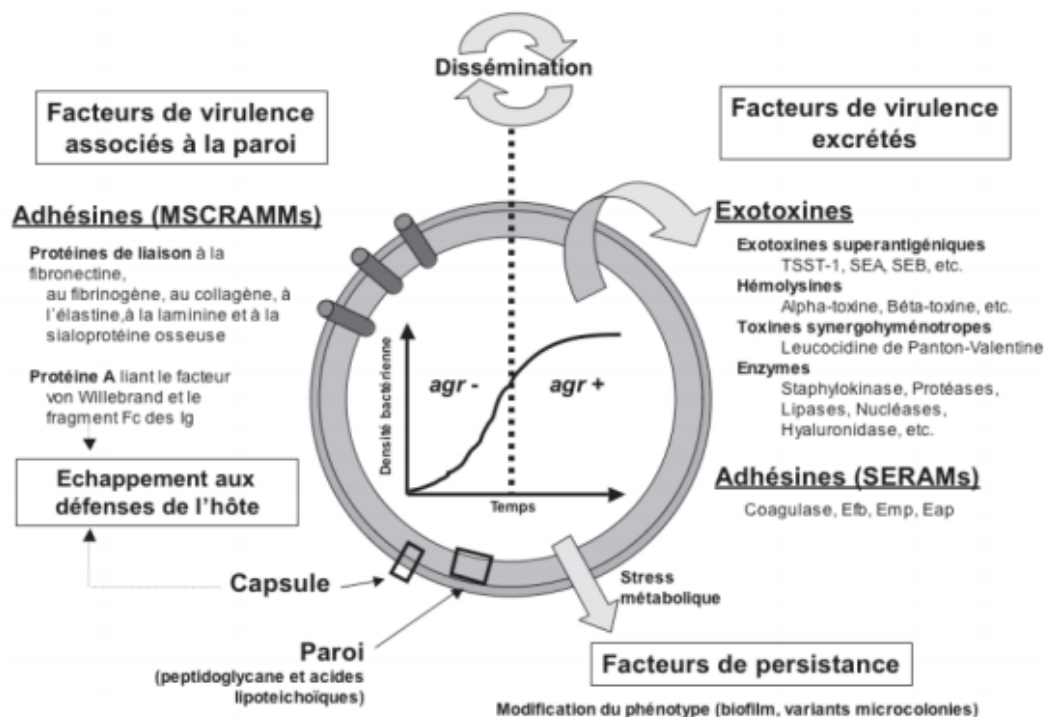
### **2- Agents infectieux**

Le développement de l'ostéomyélite est lié aux facteurs microbiens, *Staphylococcus aureus* est de loin le plus souvent impliqué et la souche *S. aureus* résistant à la méticilline SARM est la plus connue (Tong *et coll.*, 2015; Groll *et coll.*, 2018).



**Figure 5:** Souche de SARM, en microscopie électronique (a :  $\times 4780$  ; b :  $\times 2000$ )

Cet organisme élabore une gamme de facteurs extracellulaires associés à la membrane cellulaire de la bactérie et qui contribuent à sa virulence (Figure 6). Il y a tout d'abord les facteurs favorisant l'attachement aux protéines de la matrice extracellulaire, appelées adhésines bactériennes. La capacité de *S. aureus* à adhérer est cruciale pour la colonisation précoce des tissus hôtes, des biomatériaux implantés, ou des deux. *S. aureus* exprime à sa surface plusieurs adhésines (MSCRAMM, composants de surface microbiens reconnaissant des molécules de matrice adhésives), chacune interagissant spécifiquement avec un composant protéique de l'hôte, tel que le fibrinogène, la fibronectine, le collagène, la laminine, la thrombospondine, la sialoprotéine osseuse, l'élastine ou le facteur de von Willebrand (Xavier Argemi, 2017).



**Figure 6 :** Expression temporelle des facteurs de virulence chez *S. aureus* (Lays, 2012)



Le deuxième ensemble de facteurs qui favorisent l'évasion des défenses de l'hôte sont la protéine A, certaines toxines et les polysaccharides capsulaires. Le troisième ensemble favorisant l'invasion ou la pénétration dans les tissus en attaquant spécifiquement les cellules hôtes sont les exotoxines. Enfin, la capacité de *S. aureus* à envahir les cellules de mammifères peut expliquer sa capacité à coloniser les tissus et à persister après une bactériémie (Sinha *et coll.*, 1999). *S. aureus* peut favoriser son absorption par les cellules épithéliales ou endothéliales. Une fois digéré par les ostéoblastes, *S. aureus* persiste et peut devenir résistant aux antibiotiques (Groll *et coll.*, 2018; Zaborowska *et coll.*, 2017). D'autres espèces bactériennes ont été isolées en cas d'ostéomyélite ; les *streptocoques* de groupe A et B (Ammari *et coll.*, 1992) , *Haemophilus influenza* (Unkila-Kallio *et coll.*, 1994), les coliformes *E. coli* (Huff *et coll.*, 2000) et *Pseudomonas aeruginosa* (Conde-Díaz *et coll.*, 2017).

Les facteurs bactériens peuvent être importants au cours de plusieurs stades de la maladie, notamment l'adhérence initiale aux matrices osseuses et la destruction ultérieure des os. Après avoir eu accès à l'os, il est possible que *S. aureus* soit ensuite intériorisé par les ostéoblastes. *S. aureus* est certainement absorbé *in vitro* par des ostéoblastes en culture de poussins et de l'humain (Hudson *et coll.*, 1995) ainsi que par des ostéoblastes de poussins embryonnaires *in vivo* (Reilly *et coll.*, 2000). Un processus d'internalisation a été noté dans les ostéoblastes de souris *in vitro* (Ellington *et coll.*, 1999). L'absorption dépend de l'expression bactérienne de la protéine liant la fibronectine (Ahmed *et coll.*, 2001). Les avantages potentiels de l'invasion pour la bactérie par les ostéoblastes pourraient inclure la protection contre les agents antimicrobiens et la réponse immunitaire (Mal *et coll.*, 2002).

### **3- Modèles expérimentaux d'ostéomyélite**

Les modèles expérimentaux d'ostéomyélite bactérienne sont généralement reproduits sur le lapin. Moins fréquemment, sur le chien, le cochon, la souris, le rat et le hamster. Le modèle d'ostéomyélite expérimentale à SARM chez le lapin a été utilisé par Soranglou *et coll.*, (2017) pour évaluer l'efficacité de la moxifloxacine par voie intramusculaire, ainsi que par Taghipour *et coll.*, (2018) dans une étude comparative des effets de la vancomycine, de l'enrofloxacine et du triméthoprime / sulfaméthoxazole sur l'ostéomyélite à SARM.

Dans le modèle de lapin, les bactéries sont inoculées par injection intra-médullaire dans le tibia (Gaudin *et coll.*, 2011). Une technique similaire a également été utilisée pour induire l'ostéomyélite chez le rat (Lattar *et coll.*, 2014).

L'ostéomyélite peut être induite chez les poulets après une inoculation intraveineuse, mais ce modèle n'est pas couramment utilisé (Emslie et Nade, 1983). Une ostéomyélite hémotogène a également été reproduite chez la souris après une fracture du tibia (Chadha *et coll.*, 1999).

#### 4- Traitement des ostéomyélites

Le traitement a plusieurs volets associant un traitement général par antibiothérapie adaptée, un traitement local par excision des tissus infectés, associé éventuellement à une application locale d'antibiotiques.

##### 4.1- Antibiothérapie

Le traitement antimicrobien est adéquat pour le traitement de la plupart des cas d'ostéomyélite aiguë de tous types. Le tableau 3 représente le choix classique des agents antimicrobiens pour les microorganismes les plus couramment utilisés (Mader *et coll.*, 1992; Norden *et coll.*, 1992; Stengel *et coll.*, 2001). Généralement, un traitement antimicrobien à agent unique convient parfaitement, à l'exception des infections des articulations prothétiques et l'ostéomyélite chronique. En règle générale, les antibiotiques doivent être administrés pendant 4 à 6 semaines, si possible par voie intraveineuse. Lorsque des quinolones sont utilisées, un passage précoce à une administration orale est approprié. La clindamycine a une excellente pénétration dans les os et une biodisponibilité orale. Elle est recommandée pour un traitement oral à long terme dans les infections par des organismes sensibles, soit seule, soit en combinaison. Les fluoroquinolones ont gagné une popularité en raison de leur excellente biodisponibilité orale. Ils sont efficaces dans les infections expérimentales et dans certaines infections chez l'adulte (Lew et Waldvogel, 1999).

**Tableau 3:** Traitement par les antibiotiques de l'ostéomyélite chez l'adulte

Microorganisme isolé	Traitement de choix	Alternatifs
<i>Staphylococcus aureus</i> sensible au penicilline	Benzylpenicillin	Cefazoline, Clindamycine, Vancomycine
<i>Staphylococcus aureus</i> résistante au penicilline	Nafcilline/ Cefazoline	Cephalosporine 2 <sup>ème</sup> génération (Cefuroxime, Cefamandole), Clindamycine, Vancomycine, Ciprofloxacine,
<b>SARM</b>	Vancomycine	Teicoplanine
<i>Streptococcus</i>	Benzylpeniciline	Clindamycine, Erythromycine Vancomycine
<i>Serratia, pseudomonas aeruginosa</i> microorganisme Anaérobies	Piperacillin+aminoglyc oside Clindamycine	Cefepine Ampicilline sublactame
<b>Infection mixte</b>	Ampicilline sublactame	Imipeneme

Plusieurs études ont montré qu'un traitement oral par la rifampicine en association avec la ciprofloxacine, l'ofloxacine ou l'acide fusidique est efficace dans les infections staphylococciques des os en présence d'implants ou d'articulations prothétiques (Drancourt *et coll.*, 1997). Le principal avantage de la combinaison de la quinolone et de la rifampicine est son excellente biodisponibilité, ce qui permet une administration par voie orale, et les concentrations sériques atteintes sont similaires à celles obtenues pendant la thérapie intraveineuse. En outre, ces deux ATB présentent une bonne pénétration intracellulaire et une bonne activité contre les staphylocoques intracellulaires et associés aux biofilms (Chuard *et coll.*, 1991).

Le traitement actuellement recommandé pour l'ostéomyélite causée par *S. aureus* est un traitement de longue durée à la gentamicine, à la tobramycine ou à une vancomycine administrée par voie parentérale (Birt *et coll.*, 2017). Cependant, ce traitement comporte des risques de complications liées à un long séjour à l'hôpital et des effets indésirables liés à l'utilisation de cathéters intraveineux, ainsi que des coûts élevés associés au séjour prolongé à l'hôpital.

La thérapie parentérale de l'ostéomyélite à *Staph aureus* reste l'approche de choix jusqu'à ce que de nouvelles études comparatives soient terminées. Dans l'ostéomyélite hématogène de l'enfant, des traitements antibiotiques plus courts administrés par voie parentérale, suivis d'un traitement oral pendant plusieurs semaines, donnent un bon taux de réussite; à condition que le germe causal soit connu et que l'adhésion au traitement soit bonne, les signes cliniques s'atténuent rapidement (Jaberi *et coll.*, 2002).

#### **5- Les huiles essentielles comme outil de lutte contre *S. aureus***

Des études *in vitro* et d'autres études cliniques ont montré un effet bactéricide important des huiles essentielles sur les souches de *S. aureus* et précisément celles résistantes à la méthicilline (SARM) (Warnke *et coll.*, 2009). La première huile essentielle qui a montré une activité contre le SARM est celle de l'arbre de thé *Melaleuca alternifolia*. Cette huile a été testée contre 64 souches de SARM isolées en Australie et en Angleterre. Parmi ces souches 33, étaient résistantes à la Mupirocine. Les Concentrations minimales inhibitrices « CMI » et les concentrations minimales bactéricides « CMB » étaient de 0,25-0,313 % et 0,5-0,625 % respectivement, ce qui indique la sensibilité des souches testées vis-à-vis de l'huile de l'arbre à thé (Carson *et coll.*, 1995). Cinq ans après, May *et coll.* (2000) ont publié des résultats d'une étude testant l'huile essentielle de l'arbre de thé (*Melaleuca alternifolia*) sur des souches bactériennes multi-résistantes différentes contenant des souches de SARM.

## **6- Combinaison des huiles essentielles avec les antibiotiques et lutte contre les *Staphylococcus***

Du fait de l'augmentation continue de la résistance aux antibiotiques, il devient encore plus évident de tester l'effet de l'association des huiles essentielles ou de leurs composés majoritaires avec les antibiotiques. En général, l'association d'agents antimicrobiens ouvre une perspective pour booster l'activité antimicrobienne et réduire la toxicité de l'un des deux agents (Schwalbe *et coll.*, 2007). Notre laboratoire a mis au point une formule pharmaceutique associant l'amoxicilline avec le 1,8-cinéol. Cette formule a donné de très bons résultats dans le traitement des infections urinaires rebelles (Remmal et Akhmouch, 2019).

Ahmed *et coll.* (2009) ont étudié l'activité antimicrobienne de deux antibiotiques, la pénicilline et la tétracycline sur des souches de *S. aureus* individuellement et en association avec l'extrait de feuilles et de tiges de *Salvadora persica*. Un effet synergique plus élevé a été observé lorsque *S. aureus* était exposé à la tétracycline associée l'extrait de tige de *S. persica* suivi par la tétracycline associée à l'extrait de feuille de *S. persica*. Une étude réalisée par Adikwu *et coll.* (2010) a montré *in vitro* l'effet synergique entre l'érythromycine et l'extrait de feuilles d'*Euphorbia hirta* sur des souches cliniques de *S. aureus*. Enfin, une étude récente a rapporté que l'association de l'huile essentielle d'*Eucalyptus*, dont le composé majoritaire est le 1,8-cinéol, avec les antibiotiques a des effets synergiques, principalement avec l'amoxicilline et l'ampicilline sur une souche de *S. aureus* résistante à la méticilline (SARM) et une autre souche de *S. aureus* sensible à la méthicilline (Chaves *et coll.*, 2018).

**Partie I : Comparaison de l'effet du thymol à ceux de l'amoxicilline, de la colistine, et de la tylosine sur le développement de la résistance dans la flore intestinale de poulet de chair**

## I- Introduction

Depuis des décennies, les antibiotiques sont utilisés comme facteurs de croissance en aviculture pour améliorer sa productivité et pour réduire le coût pour les consommateurs (Ricke *et coll.*, 2012 ; Suresh *et coll.*, 2018). Il a été estimé que d'ici 2030, un total d'environ 105 000 tonnes d'antibiotiques seront consommés dans la production animale destinée à la consommation humaine dans le monde (Van Boeckel *et coll.*, 2015).

Cependant, l'utilisation des antibiotiques dans l'alimentation de la volaille augmente le risque de développement d'une résistance croisée à d'autres antibiotiques (Barton, 2000). Une telle utilisation induit la sélection de bactéries multi-résistantes compliquant l'antibiothérapie chez les animaux malades et les humains en cas de contamination (Kieke *et coll.*, 2006; Castanon, 2007). Pour cette raison, l'Union européenne et d'autres pays ont interdit en 2006 l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance dans l'alimentation animale (Castanon, 2007a; Dibner et Richards, 2005)

Dans un contexte où les perspectives de mise sur le marché de nouvelles molécules d'antibiotiques chimiques apparaissent aujourd'hui limitées, le développement des alternatives thérapeutiques visant l'utilisation de molécules naturelles est envisageable.

Le thème principal de recherche dans notre laboratoire est l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et de leurs composés majoritaires. Plusieurs travaux émanant dans notre laboratoire l'ont démontré ( Rhayour *et coll.*, 2003; Chami *et coll.*, 2004, 2005; Remmal *et coll.*, 2011). D'autres études ont également rapporté que le thymol, composé majoritaire de l'huile essentielle de thym et d'origan, permet l'inhibition de la croissance de plusieurs espèces bactériennes (Botelho *et coll.*, 2007; Du *et coll.*, 2015; Marchese *et coll.*, 2016). La présente étude a pour but d'étudier dans un premier temps l'effet du thymol et de l'amoxicilline sur le développement de l'anti-biorésistance chez une souche répertoriée d'*E. coli* ATCC 25922 *in vitro*. Ensuite d'évaluer *in vivo* l'effet de l'administration de trois antibiotiques; l'amoxicilline, la tylosine et la colistine ainsi que de celui d'un produit innovant breveté par notre laboratoire; le NP<sup>®</sup> sur le développement de l'anti-biorésistance de la flore intestinale des poussins de chair.

## II- Matériel et méthodes

### Test *in vitro*

Le test *in vitro* a pour objectif d'évaluer l'effet de l'amoxicilline et du thymol sur l'antibiorésistance d'*E. coli* ATCC 25922.

#### 1. Milieux de culture

La gélose nutritive Tryptocaseïne soja TSA (Biokar<sup>®</sup>) a été utilisée pour la culture d'*E. coli*. Le milieu Muller-Hinton (Biokar<sup>®</sup>) a été utilisé pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices par la méthode de micro-dilution.

#### 2. Agents utilisés

- Le thymol, un composé majoritaire de l'huile essentielle du thym et de l'origan, sous forme de cristaux a été fourni par Sigma-Aldrich (France). Il est dispersé dans une solution visqueuse d'agar-agar à 0,2 % selon la technique de Remmal *et coll.* (1993b). La concentration de la solution mère obtenue est de 100 mg de thymol/ml.
- Amoxicilline : l'amoxicilline sous forme de poudre à la concentration 900 µg/mg fournie par Sigma-Alrich a été utilisée. Un gramme d'amoxicilline est dispersé dans 9 ml d'eau distillée stérile (EDS). La concentration mère obtenue est de 90 mg/ml.
- Tylosine : la tylosine sous forme liquide, à la concentration de 8 mg/ml fournie par Sigma-Aldrich a été utilisée.
- Colistine: colistin sulfate salt<sup>®</sup> ≥15,000 U/mg sous forme de poudre fournie par Sigma-Alrich a été utilisée. Un gramme est dissout dans 9 ml d'eau distillée stérile (EDS) et la concentration obtenue est de 5 mg/ml (1000 000 UI= 3.33 mg de colistine de base).

#### 3. Souche bactérienne

La souche d'*Escherichia coli* ATCC 25922 a été utilisée. Elle a été fournie par le laboratoire de microbiologie de la faculté de médecine et de pharmacie de Fès, au Maroc.

#### 4. Préparation du milieu de repiquage

Dans des flacons contenant 20 ml du milieu TSA, stérilisé à l'autoclave et refroidi à 45°C, sont rajoutés les différents volumes de la solution mère d'amoxicilline afin d'obtenir les concentrations finales d'amoxicilline de 1 µg/ml, 1,5 µg/ml, 3 µg/ml, 6 µg/ml, 9 µg/ml, 12 µg/ml, 16 µg /ml et de 24 µg/ml. Des boîtes de Pétri contenant des concentrations croissantes de thymol ont été préparées par l'ajout de différents volumes de la solution mère de thymol à des flacons contenant le milieu TSA. Les concentrations finales de thymol obtenues dans les

boites de Pétri sont : 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,9 mg/ml, 1,2 mg/ml et 1,8 mg/ml.

Afin d'évaluer l'effet de l'amoxicilline (antibiotique choisi pour ce test) ou du thymol sur l'anti-biorésistance d'*E. coli*. La souche d'*E. coli* ATCC 25922 a été repiquée successivement sur des boites de Pétri contenant des concentrations croissantes d'amoxicilline ou de thymol.

### **5. Préparation de l'inoculum**

Après sept repiquages successifs sur sept concentrations croissantes d'amoxicilline, l'inoculum bactérien a été préparé en prélevant 2 à 3 colonies à partir de la culture d'une nuit sur gélose nutritive Trypto-caséine soja (TSA). Ces colonies sont ensuite mises en suspension dans le sérum physiologique (NaCl 0,9%) stérile puis l'inoculum est ajusté à une turbidité 0,5 MacFarland qui correspond à une densité optique de 0,08 à 0,13 mesurée à la longueur d'onde de 625 nm.

### **6. Détermination des CMI des antibiotiques et du thymol**

La détermination de la CMI de l'amoxicilline, de la tylosine, de la colistine ainsi que du thymol, a été effectuée par la méthode de macro-dilution avant et après repiquage de la souche d'*E. coli* ATCC 25922 sur les concentrations croissantes d'amoxicilline ou de thymol.

Le milieu de culture Muller-Hinton stérile a été distribué dans une série de tubes à essai à raison de 4 ml par tube. Ensuite, des concentrations croissantes (900µl) d'amoxicilline, de tylosine, de colistine ou du thymol ont été rajoutées sauf pour le tube témoin. La concentration finale dans chaque tube est calculée pour un volume final de 5 ml. Les concentrations finales obtenues vont de 0,2 µg/ml à 25,6 µg/ml pour l'amoxicilline et la tylosine et de 0,02µg/ml à 2,56 µg/ml pour la colistine. Pour le thymol, elles vont de 0,0312 mg/ml à 16 mg/ml. Tous les tubes ont étéensemencés avec 100 µl de la suspension bactérienne pour donner un inoculum final d'environ  $5.10^5$  UFC/ml dans chaque tube. L'ensemble est incubé à 37°C, sous agitation à 100 rpm pendant 24h. Chaque concentration a été testée en duplicate.

Au bout des 24h, les tubes ont été observés visuellement. La culture est considérée positive lorsqu'elle est trouble. La concentration d'agent antibactérien la plus faible ne permettant pas l'apparition d'aspect trouble indique la concentration minimale inhibitrice (Eumkeb *et coll.*, 2012).



## **Test in vivo**

### **1. Animaux et conditions d'élevage**

#### **1.1 Préparation du local**

Avant le démarrage de l'expérience, l'animalerie et le matériel d'élevage ont été désinfectés à l'eau de javel et au détergent. Chaque cage est équipée d'un abreuvoir et d'une mangeoire. L'éclairage est assuré par des ampoules de lumière blanche disposées à une hauteur de trois mètres au centre de l'animalerie avec une photopériode est de 12 heures d'obscurité et 12 heures de lumière. L'aération est assurée par un ventilateur qui permet une bonne diffusion de l'air en fournissant l'oxygène nécessaire et le maintien d'un débit constant d'air permettant son renouvellement, tout en éliminant les gaz dégagés par la litière et la vapeur d'eau (respiration des animaux). La température de l'animalerie est maintenue entre 28°C et 32°C. Afin d'assurer l'isolement des poussins du contact avec le sol et l'absorption de l'humidité des déjections, une litière à base d'argile et de sciure de bois a été utilisée. Les mangeoires et les abreuvoirs ont été mis à la disposition des poussins *ad libitum*. Les animaux sont nourris avec un aliment dit blanc, ne contenant ni antibiotiques, ni antiparasitaires. Il a été fourni par la société ALF AL-MAGHRIB.

#### **1.2- Animaux d'expérience**

Cette expérimentation a été réalisée sur 50 poussins âgés d'un jour, ayant un poids moyen de 40g. Ils proviennent d'un couvoir partenaire situé dans la province de Taounate. À leur arrivée, les poussins ont été pesés individuellement, répartis en lots expérimentaux de 10 poussins chacun et placés dans des cages séparées.

### **2. Traitement utilisé dans l'eau de boisson**

Les produits testés dans l'expérimentation sont :

#### **2.1 Le NP<sup>®</sup>**

Le NP<sup>®</sup> est un produit mis au point et breveté par notre laboratoire (FR 1670691, 2016).

Le thymol est le principe actif du NP<sup>®</sup> (15% de thymol), d'autres excipients ont été rajoutés pour assurer la stabilité et la solubilité du produit.

#### **2.2 Les antibiotiques**

Trois antibiotiques : l'amoxicilline, la colistine et la tylosine ont été utilisés. Ils sont fournis par la société Novovet de Casablanca sous les noms commerciaux montrés dans le tableau 4 :

**Tableau 4:** Données relatives aux produits utilisés avec la posologie

Produits	Noms commerciaux	Texture	Posologie
Amoxicilline	Amoxy 70 <sup>®</sup>	poudre	20 mg/kg de poids vif/jour
Colistine	COLINOVA <sup>®</sup>	liquide	0,25 ml/litre d'eau de boisson/jour
Tylosine	Tylosol <sup>®</sup>	poudre	0,5 g/litre d'eau de boisson/jour
NP	NP Boisson <sup>®</sup>	poudre	1 g/litre d'eau de boisson/jour

### 3. Lots d'animaux

Cinquante poussins âgés d'un jour ont été répartis en cinq lots de 10 poussins chacun :

**Lot N°1 (n=10):** Lot témoin; Animaux recevant l'eau potable.

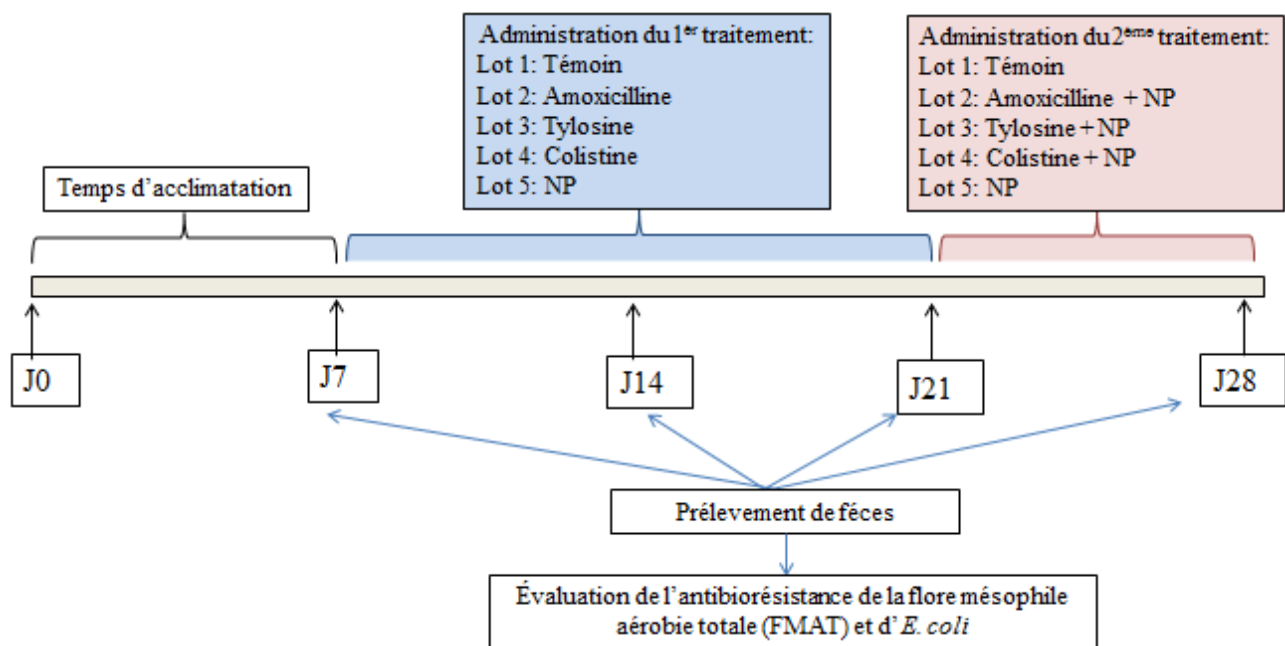
**Lot N°2(n=10):** Lot Amox; Animaux recevant 48 mg/L d'amoxicilline dans l'eau de boisson.

**Lot N°3 (n=10):** Lot Tylo; Animaux recevant 0,4g/L de tylosine dans l'eau de boisson.

**Lot N°4 (n=10):** Lot Coli; Animaux recevant l'eau de boisson contenant 0,2 mg/L de colistine.

**Lot N°5 (n=10):** lot NP; Animaux recevant l'eau de boisson contenant le produit NP<sup>®</sup> à raison de 1g/L.

La durée de l'expérience est de 28 jours. Le traitement aux antibiotiques et au NP<sup>®</sup> a duré 15 jours (du jour J7 au jour J21). Un deuxième traitement est administré pendant la dernière semaine (du jour J21 au jour J28), ce dernier a porté sur une association de l'un des trois antibiotiques avec le NP<sup>®</sup> (Tableau 5). L'anti-biorésistance de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) et d'*E. coli* entérique a été évaluée, chaque semaine, à partir des prélèvements de fèces des poussins de chaque lot (Figure 7).



**Figure 7:** Diagramme schématisé de l'expérience réalisée

**Tableau 5:** Les différents lots avec les doses et les durées de traitement durant l'expérience

Lots	1 <sup>ère</sup> traitement			2 <sup>ème</sup> traitement		
	Produit	Dose	Durée	Produit	Dose	Durée
1	Témoin	----	j7-j21	Témoin	-----	j21-j28
2	Amoxicilline	16 mg/kg	j7-j21	Amox+ NP	8 mg/kg + 0,5 g/L	j21-j28
3	Tylosine	0,4 mg/L	j7-j21	Tylo+N P	0,2 mg/L + 0,5 g/L	j21-j28
4	Colistine	0,2 mg/L	j7-j21	Coli+N P	0,1 ml/L + 0,5 g/L	j21-j28
5	NP	1 g/L	j7-j21	NP	0,5 g/L	j21-j28

#### 4. Prélèvement de fèces

Des fèces fraîches de différents lots d'animaux ont été ramassées (aux jours indiqués sur le diagramme schématisé) et chaque suspension de fèces a été préparée dans un flacon stérile en mélangeant 5 g des fèces fraîches avec 45 ml de sérum physiologique stérile (NaCl 0,9 %). La dilution ainsi obtenue est de  $10^{-1}$ . À partir de cette solution, des dilutions décimales jusqu'à  $10^{-6}$  ont été préparées.

#### 5. Milieux de culture

La gélose pour dénombrement PCA (Plate Count Agar, Biokar<sup>®</sup>) a été utilisée pour le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) sur gradient de concentration

d'antibiotique. La gélose Eosine Bleu de Méthylène EMB (Biokar<sup>®</sup>) a été utilisée pour l'isolement d'*E. coli*. Le bouillon de Muller-Hinton (Biokar<sup>®</sup>) a été utilisé afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices par la méthode de macro-dilution.

## **6. Évaluation *in vivo* de l'anti-biorésistance chez *E. coli***

### **6.1 Détermination des CMI**

Des souches d'*E. coli* ont été isolées de suspension de fèces de chaque lot d'animaux chaque semaine. Pour ce faire, un volume de 100 µl des dilutions ( $10^{-4}$  à  $10^{-6}$ ) de la suspension bactérienne des fèces est étalé sur milieu sélectif éosine bleu de méthylène (EMB). Après incubation à 37°C pendant 24h, une colonie d'*E. coli* de couleur vert métallique a été isolée. Les CMI de l'amoxicilline, de la colistine, de la tylosine et du thymol ont été déterminées par la méthode de macro-dilution comme décrit précédemment.

### **6.2 Détermination des pourcentages d'inhibition des concentrations infra-inhibitrices**

La croissance bactérienne dans les tubes, après détermination des CMI, a été évaluée par la mesure de l'absorbance à DO<sub>600</sub> après une dilution de moitié de la culture bactérienne dans le Bouillon Muller-Hinton, et cela aux jours J21 et J28. Les résultats sont traduits en pourcentage d'inhibition par rapport aux tubes témoins selon la formule suivante:

$$PI = ((C-T) / C) \times 100$$

Où **C** représente l'absorbance à 600 nm de la croissance bactérienne testée dans un tube contrôle qui ne contient ni antibiotique ni thymol.

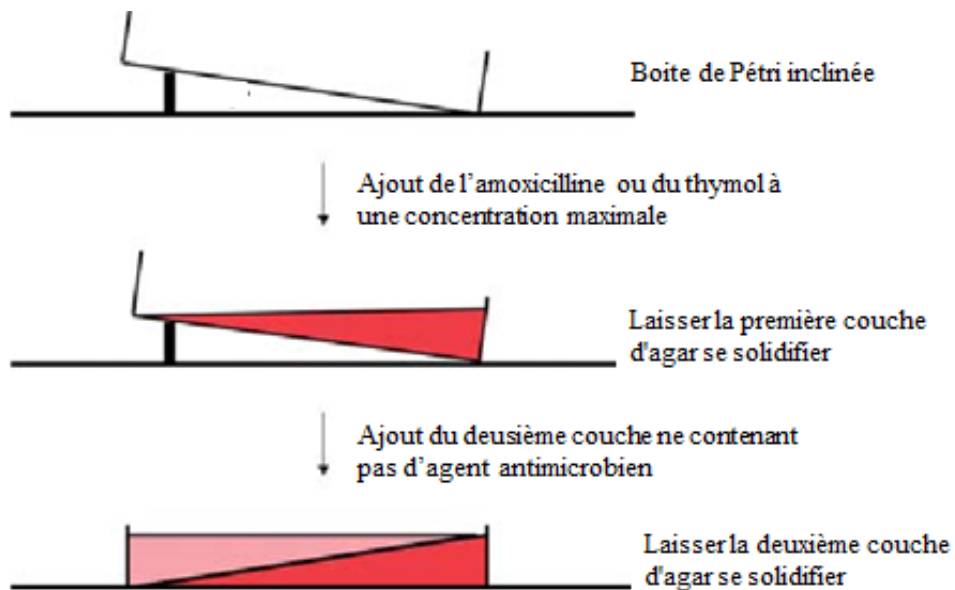
Et **T**, l'absorbance à 600 nm de la croissance bactérienne testée dans un tube en présence de l'antibiotique ou du thymol.

## **7. Évaluation de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale *in vivo***

### **7.1 Préparation des différents gradients de concentration des antibiotiques et du thymol sur milieu solide**

Les différents gradients de concentration a été préparé selon de la méthode de Bryson et Szybalski (Courvalin, 1991). Ces gradients de concentration ont pour but d'évaluer le développement de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale chez les poussins traités par les différents ATB ou par le NP<sup>®</sup> durant les 21 jours de l'expérience. Ces gradients d'ATB ou de thymol, ont été préparées en laissant 10 ml de milieu PCA (contenant une concentration maximale précise d'antibiotique ou de thymol) durcir à un angle de 12° dans une boîte de Pétri. Puis la boîte de Pétri est mise à plat et le niveau horizontale a été rétabli avec 10ml de milieu PCA et est laissé se solidifier. Le gradient de concentration a été obtenu grâce à la diffusion des antibiotiques de la gélose avec ATB vers la gélose sans ATB. Pour chaque

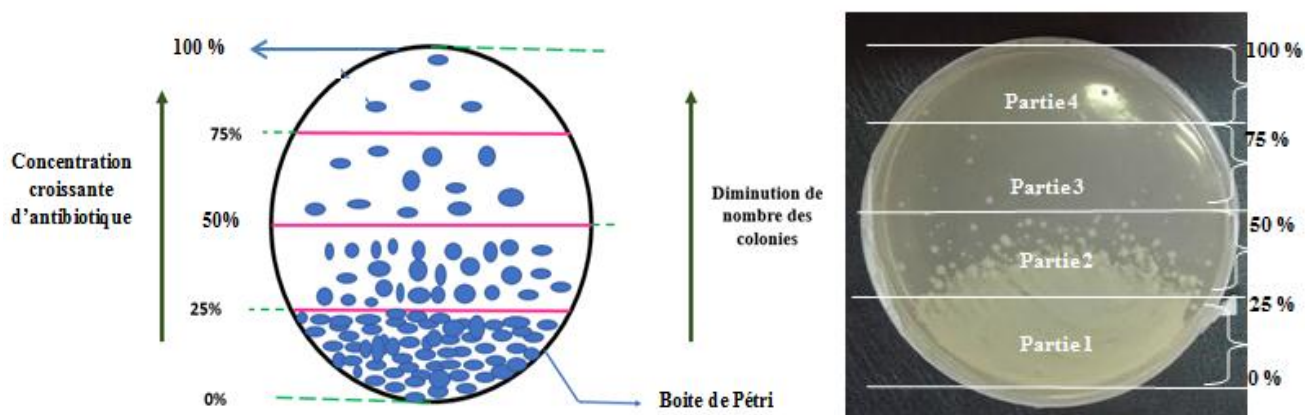
antibiotique ; trois gradients de concentration ont été préparés à partir de trois concentrations. Pour l'amoxicilline, les concentrations maximales utilisées sont 3 µg/ml, 6 µg/ml et 12 µg/ml. Pour la tylosine ; les concentrations maximales utilisées sont de 4 µg/ml, 7 µg/ml et 10 µg/ml. Pour la colistine ; les concentrations maximales choisies sont de 0,4 µg/ml, 0,8 µg/ml et 1 µg/ml. Pour le thymol, seule la concentration maximale de 0,5 mg/ml a été utilisée. Après préparation des boîtes, un volume de 100 µl de la suspension de fèces à la dilution  $10^{-2}$  de chaque lot a été étalé sur la surface des boîtes contenant les gradients des différents ATB ou du thymol. La dilution  $10^{-2}$  utilisée a été choisie après des tests préliminaires. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h (Figure 8).



**Figure 8:** Étapes de préparation du gradient de concentrations

## 7.2 Dénombrement

Afin d'évaluer le potentiel de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale au cours du traitement, les boîtes incubées ont été divisées en 4 portions allant de la concentration la plus faible d'antibiotique vers la concentration la plus forte (Figure 9). Le dénombrement a été réalisé dans les quatre parties de la boîte de 0 à 25%  $C_{max}$ , de 25%  $C_{max}$  à 50%  $C_{max}$ , de 50%  $C_{max}$  à 75%  $C_{max}$  et de 75%  $C_{max}$  à  $C_{max}$  et les résultats sont exprimés en unités formant colonies par g (UFC/g).



**Figure 9:** Méthode du dénombrement de la FMAT sur les gradients de concentrations d'antibiotiques

## 8. Mesures des paramètres zootechniques

L'effet des différents traitements sur les performances zootechniques des animaux a été évalué. Les paramètres étudiés dans cette expérience sont : le poids vif moyen, le gain de poids vif, la consommation alimentaire individuelle, l'indice de consommation.

### 8.1 Poids vif moyen

Les pesées sont effectuées le premier jour, puis à la fin de chaque semaine. Le poids vif est déterminé comme suit :

$$\text{Poids vif moyen (g)} = \frac{\text{Poids de la totalité des poussins d'un lot}}{\text{Nombre de poussins de ce lot}}$$

### 8.2 Gain de poids vif

Le gain de poids vif est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Gain de poids vif (g)} = P2 - P1$$

P2 : poids moyen final après une semaine d'élevage

P1 : poids moyen initial au début de cette semaine d'élevage

### 8.3 Consommation alimentaire individuelle (Ci)

L'aliment est pesé puis distribué chaque jour. Le reste de l'aliment contenu dans les mangeoires est pesé quotidiennement pour chaque lot. Les quantités d'aliment consommées par lot, ont été enregistrées à la fin de chaque semaine. La consommation alimentaire a été déterminée par la formule suivante :

$$\text{Consommation alimentaire} = \frac{(\text{quantité d'aliment distribuée} - \text{quantité d'aliment restante})}{\text{Nombre de poussins}}$$

#### **8.4 Indice de consommation (IC)**

C'est la quantité d'aliment nécessaire pour produire 1kg de poids vif. L'IC est déterminé chaque semaine par la formule suivante :

$$\text{IC} = \frac{\text{Quantité d'aliment consommée pendant une semaine (g)}}{\text{Gain de poids durant cette semaine (g)}}$$

#### **9. Analyse statistique**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du GraphPad Prism® 6 pour Windows et les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type. Les pourcentages d'inhibition des concentrations infra-inhibitrice de chacun des trois antibiotiques ou du NP® au jour J21 et au jour J28 ont été comparés à l'aide d'une analyse de variance One-way ANOVA en utilisant le test de comparaison Tukey's Multiple (Graph pad Prism version 5.03). Les effets du traitement sur le poids vif moyen et le gain de poids ont été évalués au moyen de la même analyse. La valeur  $p < 0,05$  est considérée comme statistiquement significative.

### III- Résultats

#### 1. Effet de l'amoxicilline sur le développement de l'anti-biorésistance chez *E. coli*

Le tableau 6 représente l'évolution de l'anti-biorésistance d'*E. coli* ATCC 25922 vis-à-vis des trois antibiotiques ; l'amoxicilline, la tylosine, la colistine et du thymol, avant et après repiquages successifs en milieu gélosé contenant des concentrations croissantes d'amoxicilline.

**Tableau 6:** Effet de l'amoxicilline sur le développement de l'anti-biorésistance chez *E. coli* ATCC 25922 *in vitro*

	CMI (µg/ml)	
	Avant repiquage	Après 7 repiquages sur amoxicilline
Amoxicilline	0,8	25,6
Colistine	0,16	0,64
Tylosine	1,6	6,4
Thymol	250	250

Les résultats montrent que la souche d'*E. coli* ATCC 25922 témoin s'est avérée sensible aux concentrations relativement faibles en antibiotiques avant repiquage. Cependant, après 7 repiquages successifs sur les boîtes contenant les concentrations 1 µg/ml, 3 µg/ml, 6 µg/ml, 9 µg/ml, 12 µg/ml, 16 µg /ml et 20 µg/ml d'amoxicilline, la souche *E. coli* ATCC 25922 a montré une augmentation de la CMI vis-à-vis de l'amoxicilline. En effet, la CMI est passé de 0,8 µg/ml à 25,6 µg/ml (multiplication par un facteur de 32). Une augmentation a été observée aussi pour la tylosine où la CMI est passée de 1,6 µg/ml à 6,4 µg/ml. Pour la colistine la CMI a augmenté de 0,16 µg/ml à 0,64 µg/ml. En ce qui concerne le thymol aucune augmentation de la CMI n'a été constatée, elle est restée la même (250 µg/ml). Cette CMI est égal à la valeur de CMB (concentration minimale bactéricide) (résultats non montrés) et est très faible aux doses toxiques sachant que pour le thymol la DL50 est comprise entre 2 et 5 g/kg (Couderc, 2001).

#### 2. Effet du thymol sur le développement de l'anti-biorésistance chez *E. coli*

**Tableau 7:** Effet du thymol sur le développement de l'anti-biorésistance chez *E. coli* ATCC 25922 *in vitro*

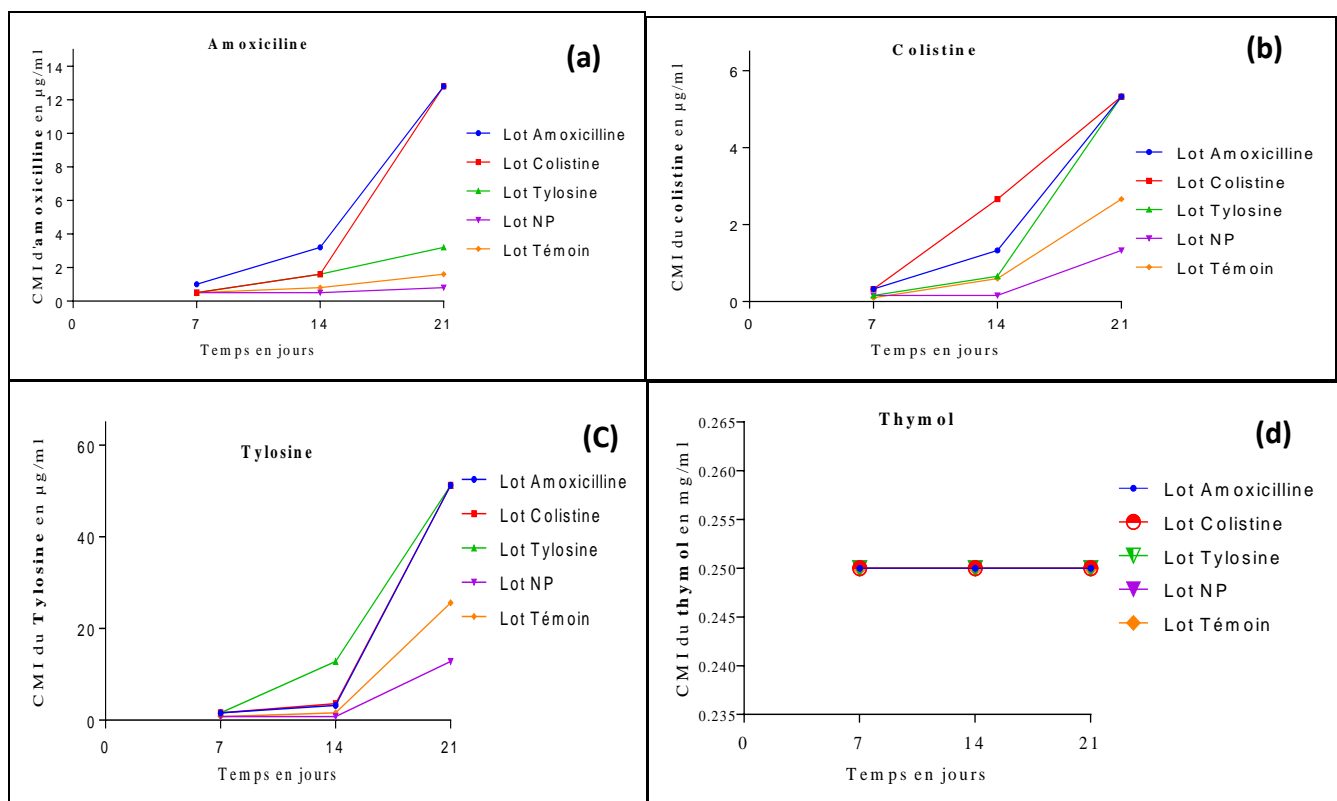
	CMI (µg/ml)	
	Avant repiquage	Après repiquages sur thymol
Amoxicilline	0,8	0,8
Colistine	0,16	0,16
Tylosine	1,6	1,6
Thymol	250	250



Lors du repiquage de la souche d'*E. coli* ATCC 25922 sur les concentrations croissantes du thymol, aucune croissance n'a été remarquée à partir de la concentration 0,3 mg/ml. L'évaluation de la CMI de l'amoxicilline, de la colistine, de la tylosine et du thymol a montré qu'après le repiquage d'*E. coli* sur les concentrations du thymol 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml et 0,3 mg/ml; aucune augmentation de la CMI n'a été constatée ni pour le thymol ni pour les trois antibiotiques testés. Les CMI respectives de l'amoxicilline, de la colistine et de la tylosine et sont 0,8 µg/ml, 0,16 µg/ml et 1,6 µg/ml. La CMI du thymol est aussi restée constante à 250 µg/ml.

### 3. Évolution *in vivo* de l'anti-biorésistance d'*E. coli* isolée de la flore intestinale des poussins de chair

La figure 10 représente l'évolution des CMI de l'amoxicilline (a), de la colistine (b), de la tylosine (c) et du thymol (d) des isolats d'*E. coli* des différents lots d'animaux.



**Figure 10:** Évolution de la CMI des antibiotiques et du thymol en fonction du temps

Les résultats montrent que les isolats d'*E. coli* entérique des poussins avant le début de traitement (au J7) sont relativement sensibles aux trois ATB, avec des CMI ne dépassant pas 1 µg/ml. Au jour J14, (après 7 jours de traitement), les CMI ont augmenté en fonction de l'ATB utilisé dans le traitement ; la CMI de l'amoxicilline a atteint 3,2 µg/ml chez le lot d'animaux

ayant reçu l'amoxicilline (Figure 10a). Pour le lot d'animaux ayant reçu la colistine, la CMI de la colistine a atteint 2,33 µg/ml au jour J14 alors qu'elle était de 0,33 µg/ml au jour J7 (Figure 10b). La CMI de la tylosine a atteint 12,8 µg/ml chez le lot d'animaux traités à la tylosine (Figure 10c) alors qu'aucune augmentation de CMI n'a été notée pour les trois antibiotiques ainsi que pour le thymol chez le lot d'animaux ayant reçu le NP<sup>®</sup>.

Au jour J21, c'est-à-dire après deux semaines du traitement, la CMI augmente d'une façon plus importante vis-à-vis de l'ATB utilisé dans le traitement, mais elle augmente aussi vis-à-vis des deux autres ATB non utilisés dans le traitement. À ce jour (J21), la CMI de l'amoxicilline a atteint 12,8 µg/ml (Figure 10a) pour le lot d'animaux traités à l'amoxicilline ainsi que pour le lot d'animaux ayant reçu la colistine. De même, la CMI de la colistine est passée à 5,33 µg/ml (Figure 10b) pour le lot d'animaux traités à la colistine ainsi que pour les deux autres lots d'animaux traités à l'amoxicilline ou à la tylosine. La CMI de la tylosine a atteint 51,2 µg/ml (Figure 10c) pour les trois lots d'animaux traités à l'un ou l'autre des trois antibiotiques.

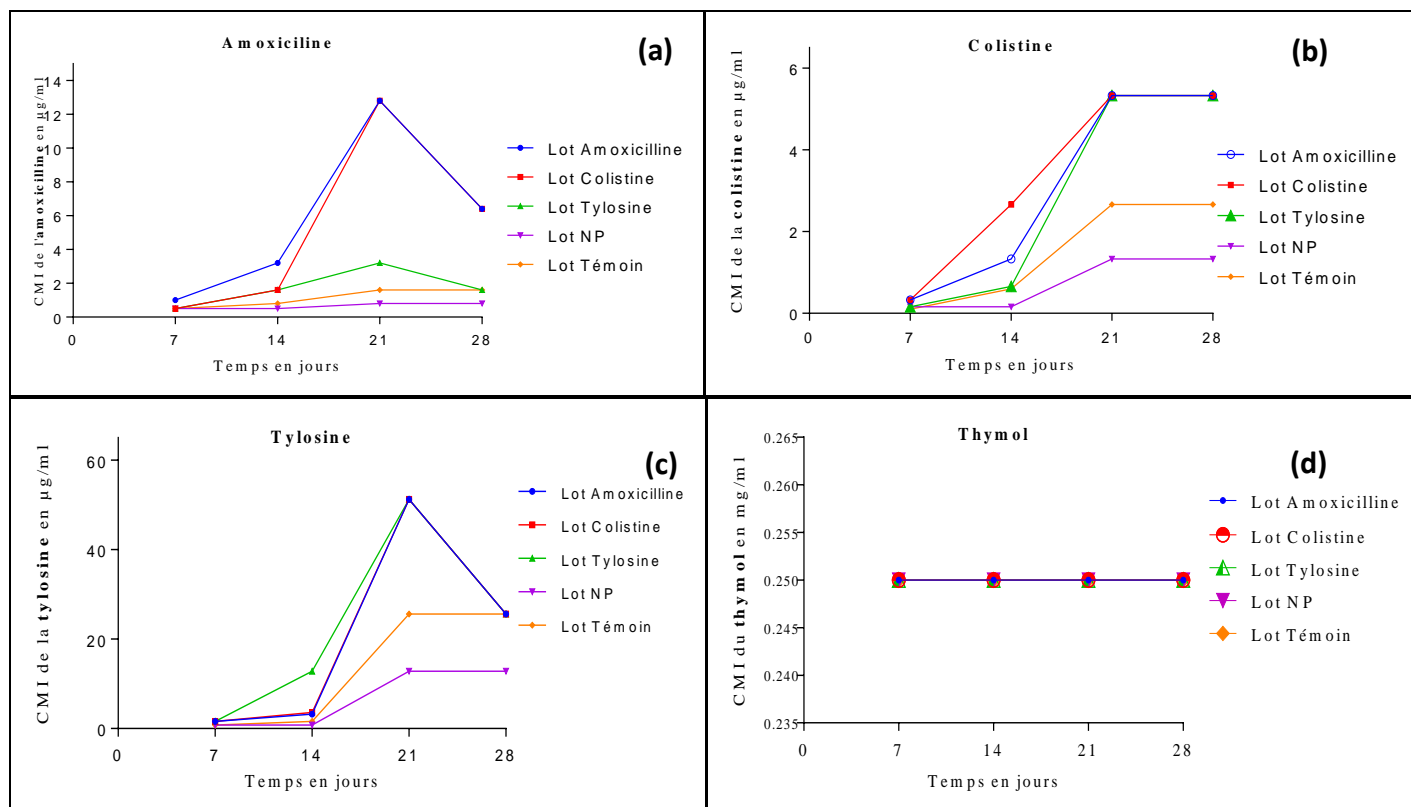
Pour le lot d'animaux ayant reçu le NP<sup>®</sup>, une légère augmentation de la CMI des trois ATB a été notée au jour J21. La CMI de l'amoxicilline est passée de 0,4 µg/ml à 0,8 µg/ml (Figure 10a), la CMI de la colistine est passée de 0,16 µg/ml à 1,33 µg/ml (Figure 10b) et la CMI de la tylosine est passée de 0,8 µg/ml à 12,8 µg/ml (Figure 10c).

Pour le lot témoin n'ayant reçu aucun ATB, une légère augmentation de la CMI a été aussi notée. La CMI de l'amoxicilline est passée de 0,4 µg/ml au jour J7 à 1,6 µg/ml au jour J21 (Figure 10a), la CMI de la colistine est passée de 0,16 µg/ml à 2,66 µg/ml (Figure 10b) et la CMI de la tylosine a atteint 25,6 µg/ml au jour J21 (Figure 10c).

Concernant la CMI du thymol (Figure 10d), elle est restée constante à 0,25 mg/ml durant les 15 jours de traitement (J7-J21) et cela pour l'ensemble des lots d'animaux.

#### **4. Effet de l'association des antibiotiques avec le NP<sup>®</sup> sur l'anti-biorésistance *in vivo* d'*E. coli***

La figure 11 représente l'évolution des CMI de l'amoxicilline, de la colistine, de la tylosine et du thymol vis-à-vis des isolats d'*E. coli* des différents lots après l'administration du 2<sup>ème</sup> traitement associant le NP<sup>®</sup> avec chacun des trois antibiotiques.



**Figure 11:** Effet de l'association de l'ATB avec NP<sup>®</sup> sur l'évolution de la CMI

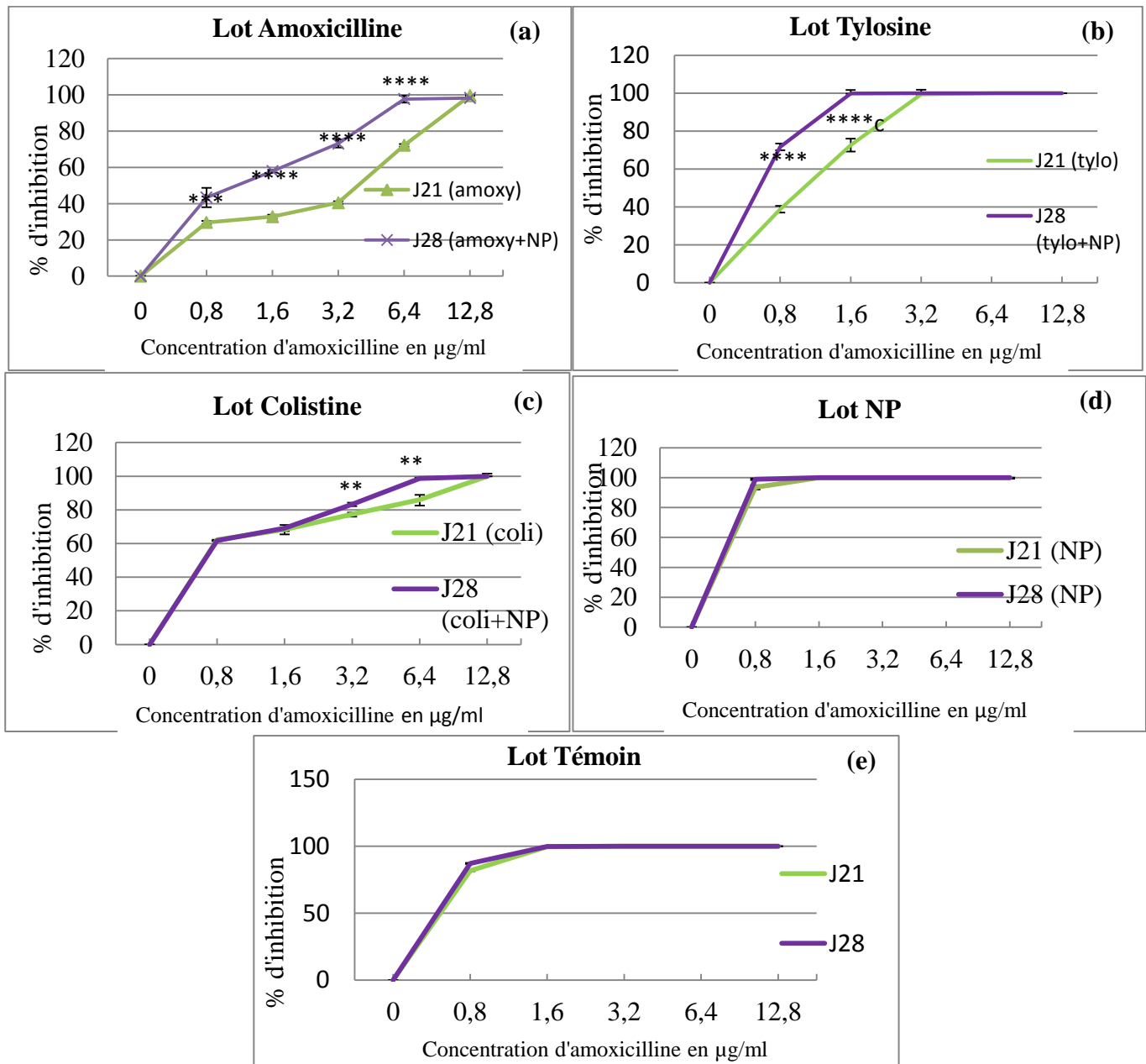
Durant la 4<sup>ème</sup> semaine (J21 au J28), les résultats montrent une grande diminution de la CMI de l'amoxicilline, elle est passé de 12,8 µg/ml à 6,4 µg/ml pour les deux lots d'animaux traités à l'amoxicilline associée au NP<sup>®</sup> ou à la colistine associée au NP<sup>®</sup> pendant cette semaine (Figure 11a). Une diminution de la CMI de l'amoxicilline de 3,2 µg/ml à 1,6 µg/ml a été notée pour le lot d'animaux traités à la tylosine associée au NP<sup>®</sup> (Figure 11a). Cependant, la CMI de la colistine est restée constante à une valeur de 5,33 µg/ml pour les trois lots d'animaux traités à l'un ou à l'autre des trois antibiotiques associé au NP<sup>®</sup> pendant la 4<sup>ème</sup> semaine (J21-J28) (Figure 11b).

Concernant la CMI du thymol durant la 4<sup>ème</sup> semaine (J21 au J28), elle est restée constante à 0,25 mg/ml pour l'isolat provenant du lot traité au NP<sup>®</sup> ainsi que pour les isolats des différents lots (Figure 11d).

## 5. Évaluation du pourcentage d'inhibition des différents antibiotiques ou du thymol pour les souches d'*E. coli* isolées

### 5.1 Pourcentage d'inhibition d'*E. coli* des différents lots par l'amoxicilline

Les résultats du pourcentage d'inhibition de l'amoxicilline vis-à-vis des isolats d'*E. coli*, avant et après traitement par les antibiotiques associés au NP<sup>®</sup>, sont représentés dans la figure 12 :



**Figure 12:** Évolution du pourcentage d'inhibition de croissance d'*E. coli* en fonction de la concentration d'amoxicilline (en µg/ml) en comparant pour chaque lot le pourcentage d'inhibition de chaque concentration d'amoxicilline le jour 21 au jour 28 (\*\* p < 0.01 ; \*\*\* p < 0.001 ; \*\*\*\* p < 0.0001)

En effet pour le lot traité à l'amoxicilline (Figure 12a), les concentrations 3.2 et 6.4 µg/ml d'amoxicilline ont montré des pourcentages d'inhibition respectifs de 40 et 72 %, alors qu'après le traitement à l'amoxicilline associée au NP<sup>®</sup> à une dose de 0,5 g/L, les pourcentages d'inhibition ont atteint 74 et 100% respectivement (Figure 12a).

En ce qui concerne le lot traité à la tylosine; la concentration 1,6 µg/ml d'amoxicilline a montré un pourcentage d'inhibition de 70% au J21, alors qu'après le traitement à la tylosine associée au NP<sup>®</sup> (J28) le pourcentage d'inhibition a atteint 100% (Figure 12b).

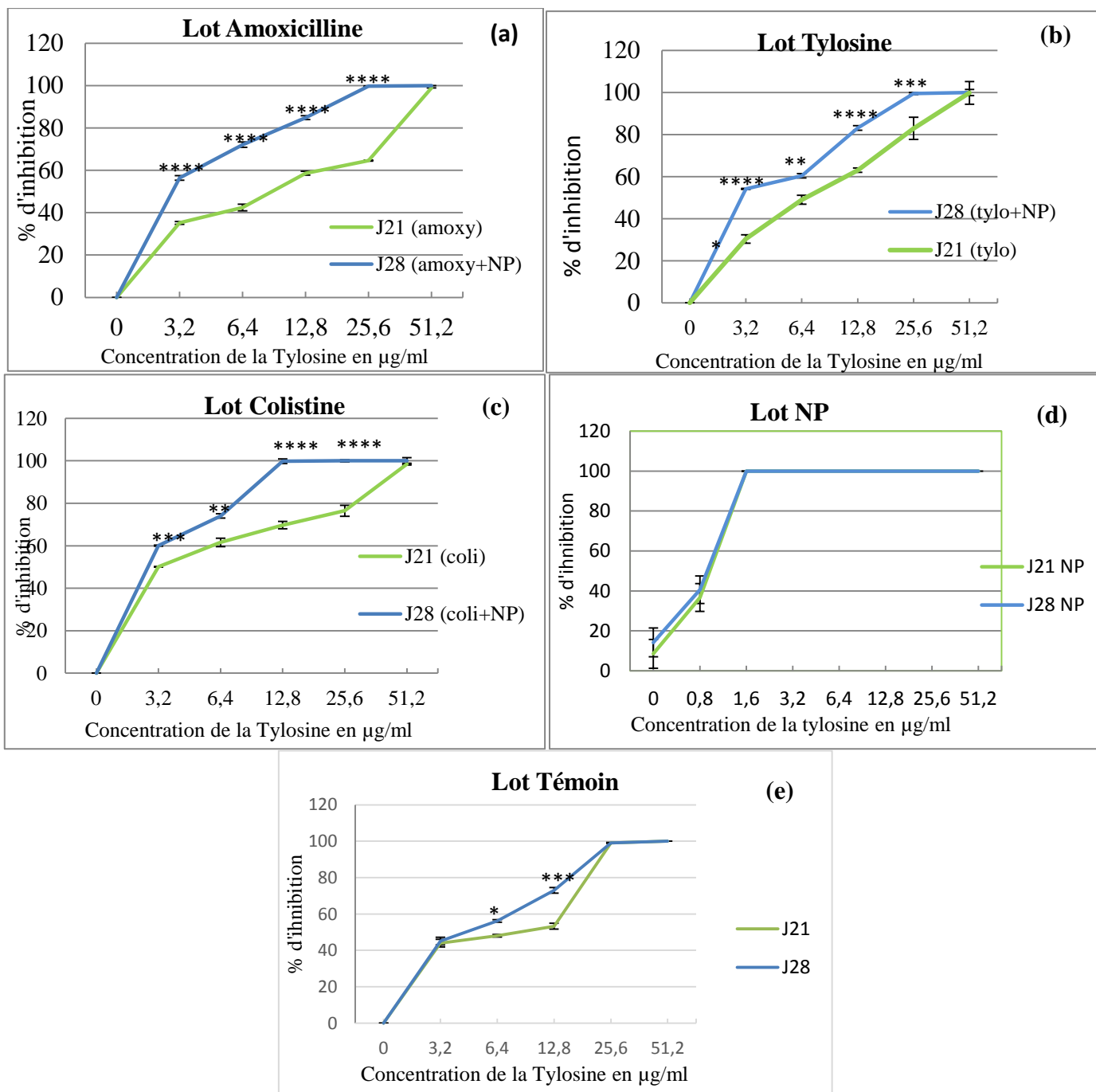
Pour le lot d'animaux ayant reçu la colistine, le pourcentage d'inhibition de 100% est obtenu pour la concentration 6,4 µg/ml d'amoxicilline (Figure 12c).

Cependant, la souche *E. coli* isolée du lot d'animaux traité au NP<sup>®</sup> a montré une forte sensibilité à l'amoxicilline, par rapport à celles des autres lots, avec un pourcentage d'inhibition de 100% à la plus faible concentration d'amoxicilline utilisée (0,8 µg/ml) durant toute la durée de l'expérimentation (Figure 12d).

Le lot témoin a montré une inhibition totale de la croissance des isolats d'*E. coli* à partir de la concentration 1.6 µg/ml d'amoxicilline, sans différence significative les jours J21 et J28 (Figure 12e).

## **5.2 Pourcentage d'inhibition de croissance d'*E. coli* des différents lots par la tylosine**

La figure 13 représente l'évolution du pourcentage d'inhibition de croissance d'*E. coli* en fonction de la concentration de la tylosine en µg /ml et cela pour les différents lots aux jours J21 et J28 de traitement.



**Figure 13:** Évolution du pourcentage d'inhibition de croissance d'*E. coli* en fonction de la concentration de tylosine (en µg /ml) en comparant pour chaque lot le pourcentage d'inhibition de chaque concentration de tylosine le jour 21 au jour 28 (\*\* p<0.01 ; \*\*\*p <0.001 ; \*\*\*\*p <0.0001)

En effet, pour le lot amoxicilline, des pourcentages d'inhibition de 60% et 63% sont obtenus avec les concentrations de tylosine de 12,8 µg/ml et 25,6 µg/ml respectivement (Figure 13a). Ces concentrations ont montré un pourcentage d'inhibition plus élevé de 85 et 100% après le traitement à l'amoxicilline associée au NP®.

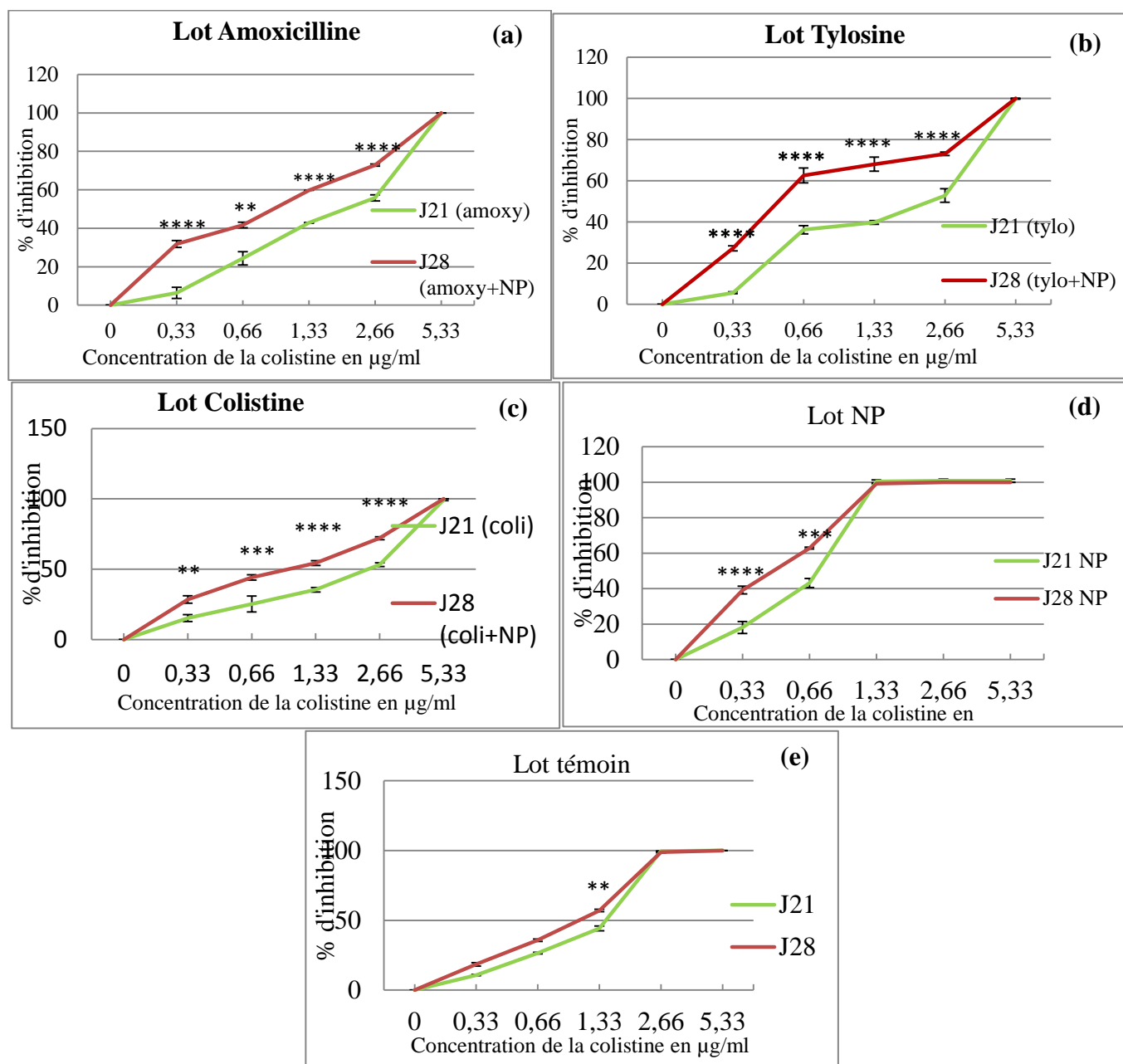
Pour les isolats d'*E. coli* du lot traité à la tylosine, les concentrations de la tylosine de 12,8 µg /ml et 25.6 µg /ml ont donné des pourcentages d'inhibition respectifs de 63 et 82% alors qu'après traitement à la tylosine associée au NP<sup>®</sup> ; le pourcentage d'inhibition a atteint 82% et 100% respectivement pour ces mêmes concentrations (Figure 13b).

En ce qui concerne l'isolat du lot colistine, les pourcentages d'inhibition notés sont de 69.71 et 76.4% pour des concentrations respectives de 12.8 et 25.6 mg/ml. Après traitement par l'association de la colistine au NP<sup>®</sup>, le pourcentage d'inhibition a augmenté à 100% pour ces deux concentrations (Figure 13c).

L'isolat du lot traité au NP<sup>®</sup> a présenté un pourcentage d'inhibition de 100% dès la concentration 1.6 µg /ml. Cette concentration a été maintenue au cours des deux semaines de traitement au NP<sup>®</sup> seul. Un pourcentage d'inhibition de 100% a été obtenu avec la concentration 25,6 µg /ml de tylosine chez le lot témoin (Figure 13e).

### 5.3 Pourcentage d'inhibition de croissance d'*E. coli* des différents lots par la colistine

Les résultats du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de la colistine sont rapportés dans la figure 14:



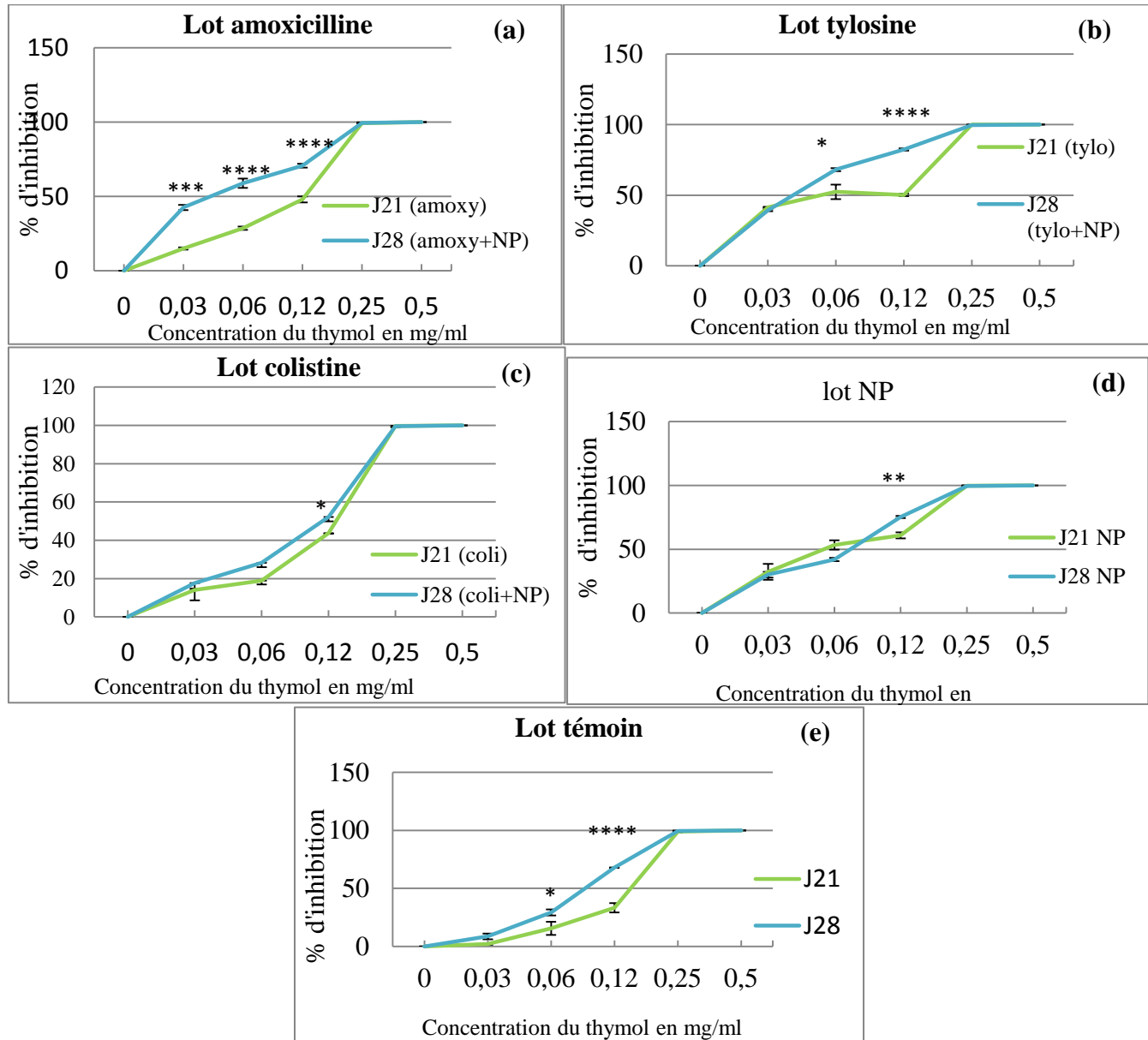
**Figure 14:** Évolution du pourcentage d'inhibition de croissance d'*E. coli* en fonction de la concentration de colistine (en µg/ml) en comparant pour chaque lot le pourcentage d'inhibition de chaque concentration de colistine le jour J21 au jour J28 (\*\* p < 0.01 ; \*\*\* p < 0.001 ; \*\*\*\* p < 0.0001)

Pour les lots amoxicilline, colistine et tylosine, après leur traitement par l'association de ces antibiotiques avec le NP®; une augmentation des pourcentages d'inhibition de différentes concentrations de la colistine a été constatée. Ainsi, un pourcentage de 100% a été obtenu à la



concentration de 5,33 µg /ml pour ces trois lots (Figure 14a, 14b, 14c). Par ailleurs, une inhibition totale des isolats du lot NP<sup>®</sup> et de celui du lot témoin a été obtenue seulement aux concentrations respectives de 1,33 µg/ml et 2,66 µg/ml (Figure 14d, 14e).

#### 5.4 Pourcentage d'inhibition de croissance d'*E. coli* des différents lots par le thymol



**Figure 15:** Évolution du pourcentage d'inhibition de croissance d'*E. coli* en fonction de la concentration du thymol (en mg /ml) en comparant pour chaque lot le pourcentage d'inhibition de chaque concentration de NP<sup>®</sup> le jour 21 au jour 28 (\*\* p<0.01 ; \*\*\*p <0.001 ; \*\*\*\*p <0.0001)

Les résultats montrent que le pourcentage d'inhibition du thymol a augmenté vis à vis des différents isolats d'*E. coli* après le traitement par le mélange des antibiotiques avec le NP<sup>®</sup>; la

concentration pour laquelle le pourcentage d'inhibition est de 100% est de 0,25 mg/ml pour l'ensemble des isolats d'*E. coli*.

## 6. Évaluation de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale par la technique du gradient de concentration

Les résultats du dénombrement de la FMAT sur les boîtes contenant les gradients de concentration des trois antibiotiques avant et après administration des antibiotiques (J7-J21) sont représentés dans les tableaux 8, 9, 10, 11 et 12 :

### 6.1 Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale des lots traités aux antibiotiques

**Tableau 8:** Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale du lot traité à l'amoxicilline.

Jour	Nombre de colonies en UFC/g											
	Jour 7 avant traitement				Jour 14				Jour 21			
Gradient en pourcentage	0-25	25-50	50-75	75-100	0-25	25-50	50-75	75-100	0-25	25-50	50-75	75-100
Amoxicilline												
3 µg/ml	>3.10 <sup>5</sup>	2,56.10 <sup>5</sup>	0	0	Tapis			2,24 10 <sup>5</sup>	Tapis			
6 µg/ml	0	0	0	0	>3.10 <sup>5</sup>	2,98.10 <sup>5</sup>	1,8.10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	Tapis		>3.10 <sup>5</sup>	
12 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	Tapis		>3.10 <sup>5</sup>	

**Tableau 9:** Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale du lot traité à la colistine

Jour	Nombre de colonies en UFC/g											
	Jour 7 avant traitement				Jour 14				Jour 21			
Gradient en pourcentage	0-25	25-50	50-75	75-100	0-25	25-50	50-75	75-100	0-25	25-50	50-75	75-100
Colistine												
0,4 µg/ml	>3.10 <sup>5</sup>	2,33.10 <sup>5</sup>	0	0	Tapis		2,54.10 <sup>5</sup>	1.10 <sup>5</sup>	Tapis			
0,8 µg/ml	0	0	0	0	>3.10 <sup>5</sup>		1,44. 10 <sup>5</sup>	1.10 <sup>5</sup>	Tapis			
1 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	Tapis	2,88.10 <sup>5</sup>	2.10 <sup>5</sup>	

**Tableau 10:** Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale du lot traité à la tylosine

Jour	Nombre de colonies en UFC/g											
	Jour 7 avant traitement				Jour 14				Jour 21			
Gradient en pourcentage	0-25	25-50	50-75	75-100	0-25	25-50	50-75	75-100	0-25	25-50	50-75	75-100
Tylosine												
4 µg/ml	2,8.10 <sup>5</sup>	2,6.10 <sup>5</sup>	0	0	Tapis			1.10 <sup>5</sup>	Tapis			
7 µg/ml	0	0	0	0	>3.10 <sup>5</sup>	2,1.10 <sup>5</sup>	5.10 <sup>5</sup>	4.10 <sup>5</sup>	Tapis			
10 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	Tapis		2,3.10 <sup>5</sup>	9,7.10 <sup>4</sup>

Les tableaux 8, 9 et 10 montrent qu'au jour J7 (avant administration des antibiotiques); la FMAT des poussins présente une sensibilité relative vis-à-vis des trois ATB. Cette sensibilité est démontrée par le fait que la FMAT ne pousse qu'au niveau des portions 0-25% et 25-50% du gradient où la concentration des antibiotiques est la plus faible : la concentration 3 µg/ml pour l'amoxicilline (Tableau 8), la concentration 0,8 µg/ml pour la colistine (Tableau 9) et la concentration 4 µg/ml pour la tylosine (Tableau 10).

Suite au traitement par les ATB (J7 – J21), la FMAT commence à croître sur toute la surface du gradient et quelle que soit la concentration d'ATB utilisée. Au jour J21, pour le lot ayant reçu l'amoxicilline (Tableau 8), une croissance sur toute la surface des boîtes a été notée et cela sur les différentes concentrations d'amoxicilline testées (3 µg/ml, 6 µg/ml et 12 µg/ml). Nous avons constaté la même chose pour les deux autres antibiotiques (Tableau 9 et 10).

## 6.2 Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale du lot témoin

**Tableau 11:** Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale du lot témoin

jour		Nombre de colonies en UFC/g									
		Jour 7		Jour 14				Jour 21			
Gradient en pourcentage		0-25	25-75	0-25	25-50	50-75	75-100	0-25	25-50	50-75	75-100
[ATB] en µg/ml											
Amoxicilline	3	>3.10 <sup>5</sup>	0	5.10 <sup>3</sup>	5.10 <sup>3</sup>	5.10 <sup>3</sup>	0	1,4.10 <sup>5</sup>	1,4.10 <sup>5</sup>	8.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tylosine	4	>3.10 <sup>5</sup>	0	8.10 <sup>4</sup>	5.10 <sup>3</sup>	2.10 <sup>3</sup>	0	>3.10 <sup>5</sup>	1,8.10 <sup>5</sup>	5,4.10 <sup>4</sup>	3.10 <sup>3</sup>
	7	0	0	0	0	0	0	2,1.10 <sup>5</sup>	1,2.10 <sup>5</sup>	1.10 <sup>4</sup>	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Colistine	0,4	2,8.10 <sup>5</sup>	0	>3.10 <sup>5</sup>	1,3.10 <sup>4</sup>	2.10 <sup>3</sup>	0	>3.10 <sup>5</sup>	2,2.10 <sup>5</sup>	4.10 <sup>3</sup>	3.10 <sup>4</sup>
	0,8	0	0	0	0	0		2,4.10 <sup>5</sup>	1.10 <sup>5</sup>	4.10 <sup>3</sup>	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Le tableau 11 montre qu'au jour J7, la croissance de la FMAT n'a été notée que sur la portion 0-25% des concentrations les plus faibles (3 µg/ml d'amoxicilline, 4 µg/ml de tylosine et 0,4 µg/ml de colistine). Au jour J14, une croissance de la FMAT a été notée vers les portions 25-50% et 50-75% des concentrations les plus faibles des trois antibiotiques testés alors qu'aucune croissance n'a été notée pour les concentrations 6 µg/ml et 12 µg/ml d'amoxicilline, ni pour les concentrations 7 µg/ml et 10 µg/ml de tylosine, ni pour 0,8 µg/ml et 1 µg/ml de colistine.

Au jour J21, une croissance sur toute la surface des boîtes contenant les faibles concentrations testées a été constatée avec une absence de croissance sur les boîtes contenant les concentrations les plus élevées testées (12 µg/ml d'amoxicilline, 10 µg/ml de tylosine et 1 µg/ml de colistine).

### 6.3 Évolution de l'anti-biorésistance aux antibiotiques de la FMAT du lot traité au NP<sup>®</sup>

**Tableau 12:** Évolution de l'anti-biorésistance aux antibiotiques et au NP<sup>®</sup> de la FMAT du lot traité au NP<sup>®</sup>

Jour		Nombre de colonies en UFC/g									
		jour7		Jour 14				Jour 21			
[ATB] en µg/ml	Gradient en pourcentage	0-25	25-100	0-25	25-50	50-75	75-100	0-25	25-50	50-75	75-100
	Amoxicilline	3	>3.10 <sup>5</sup>	0	6.10 <sup>3</sup>	8.10 <sup>3</sup>	0	0	1,4.10 <sup>4</sup>	1,2.10 <sup>4</sup>	0
6		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tylosine	4	0	0	1.10 <sup>5</sup>	1,3.10 <sup>4</sup>	0	0	1,5.10 <sup>5</sup>	4.10 <sup>5</sup>	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Colistine	0,4	2,7. 10 <sup>5</sup>	0	1.10 <sup>5</sup>	2,2.10 <sup>5</sup>	2.10 <sup>3</sup>	0	1,2.10 <sup>5</sup>	1,7.10 <sup>4</sup>	0	0
	0,8	0	0	0	0	0	0	2,4.10 <sup>5</sup>	1.10 <sup>5</sup>	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Le tableau 12 montre que pour les animaux traités au NP<sup>®</sup> entre le jour J7 et J21, aucune résistance notable ne se développe vis-à-vis des trois ATB ce qui est confirmé par l'absence de la croissance vers les portions les plus élevées (de 50 à 100%) ainsi que l'absence de la croissance sur les concentrations les plus élevées (6 µg/ml et 12 µg/ml d'amoxicilline, 7 µg/ml et 10 µg/ml de tylosine et 0,8 µg/ml et 1 µg/ml de la colistine).

### 6.4 Évaluation de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale au thymol

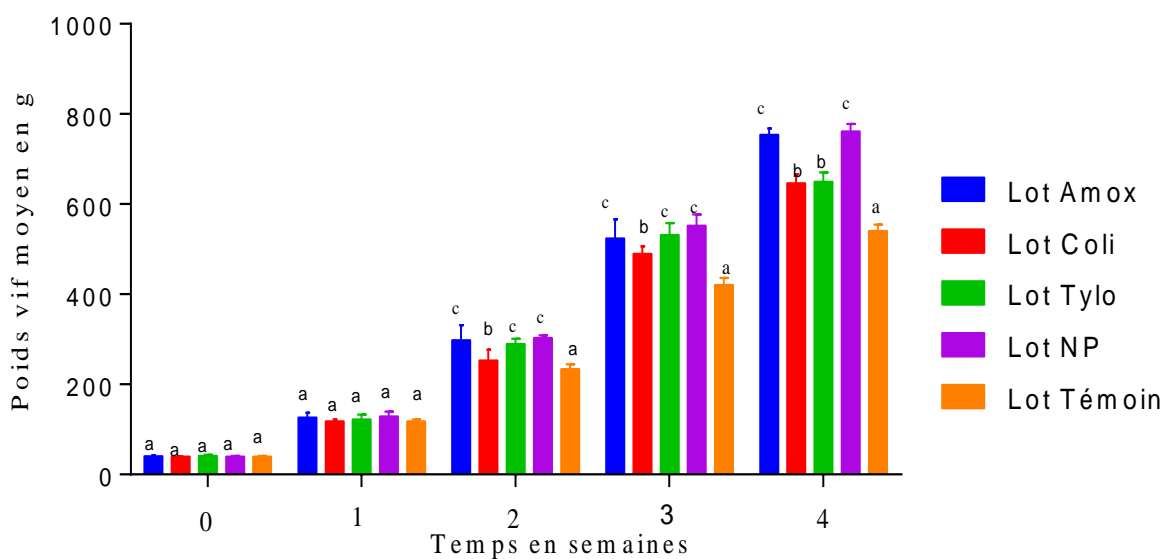
Les résultats du dénombrement de la FMAT sur le gradient de concentration du thymol sont représentés dans le tableau 13. Ils montrent qu'au jour J7 (avant traitement) aucune croissance n'a été détectée sur le gradient de la concentration maximale 0,5 mg/ml du thymol. Au jour J14 et J21, une croissance de la FMAT est notée sur une concentration du thymol inférieure à 0,25 mg/ml et cela pour l'ensemble des lots d'animaux.

**Tableau 13 :** Évaluation de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale au thymol

Nombre de colonies en UFC/g												
Jour	J7 avant traitement				J14				J21			
	0-12	0,12-0,25	0,25-0,37	0,37-0,5	0-12	0,12-0,25	0,25-0,37	0,37-0,5	0-12	0,12-0,25	0,25-0,37	0,37-0,5
Lot Amox	0	0	0	0	$3,5 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^4$	0	0	$4,1 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^4$	0	0
Lot Coli	0	0	0	0	$4,4 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	0	0	$6,9 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^4$	0	0
Lot Tylo	0	0	0	0	$4,8 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^4$	0	0	$7 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^4$	0	0
Lot NP	0	0	0	0	$4,5 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^4$	0	0	$6,6 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^4$	0	0
Lot témoin	0	0	0	0	$4,7 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^4$	0	0	$6,1 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	0	0

## 7. Effet des antibiotiques sur les performances zootechniques

### 7.1 Évolution du poids vif moyen

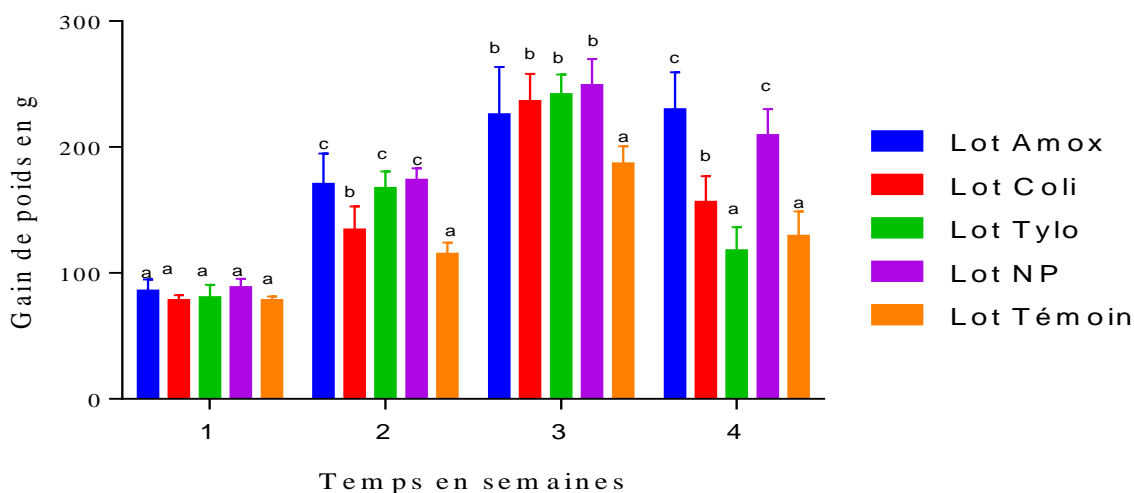


**Figure 16:** Effet des antibiotiques et du NP<sup>®</sup> sur le poids vif moyen des poussins de chair. Les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à  $p < 0,05$

L'effet de différents traitements sur l'évolution du poids vif moyen est représenté sur la figure 16. Cette figure montre qu'à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine, le poids des poussins traités commence à présenter des différences significatives par rapport à celui du lot non traité. Cette différence

devient plus importante durant la 4<sup>ème</sup> semaine, avec une supériorité du lot traité à l'amoxicilline et du lot traité au NP<sup>®</sup> suivie des lots traités à la tylosine ou à la colistine, alors que le poids vif le plus faible a été noté chez le lot témoin. Ces résultats montrent que le NP<sup>®</sup> permet d'obtenir un poids supérieur au témoin et statistiquement identique à celui obtenu avec l'amoxicilline.

### 7.2 Évolution du gain de poids vif moyen (GM)



**Figure 17:** Effet des antibiotiques et du NP<sup>®</sup> sur le gain de poids moyen des poussins de chair. Les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à  $p < 0,05$

Au cours de la 1<sup>ère</sup> semaine, il n'y a pas de différence significative ( $p < 0,05$ ) entre le GM des poulets des différents lots expérimentaux. Durant la 2<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> semaine, le GM des poulets des différents lots expérimentaux est supérieur à celui des poulets du lot témoin d'une manière significative ( $p < 0,05$ ). Durant la 4<sup>ème</sup> semaine, le GM est presque la même pour le lot témoin et le lot traité à la tylosine, avec une supériorité des GM des lots traités au NP ou à l'amoxicilline.

### 7.3 Évolution de la consommation alimentaire et de l'indice de consommation

La consommation alimentaire (CA) et les indices de consommation (IC) des différents lots sont représentés sur le tableau 14.

**Tableau 14:** Effet des antibiotiques sur la consommation alimentaire et l'IC

	Consommation alimentaire (CA)			CA totale	Indice de consommation (IC)			IC globale
	J1-J7	J7-J14	J14-J21		J1-J7	J7-J14	J14-J21	
<b>Lot témoin (n=10)</b>	350	616	820	1786	4,5	5,3	4,4	4,5
<b>Lot amoxicilline (n=10)</b>	322	605	677	1604	3,7	3,5	3	3,7
<b>Lot tylosine (n=10)</b>	325	643	657	1625	4	3,8	2,7	4
<b>Lot colistine (n=10)</b>	329	652	680	1661	4,2	4,8	2,9	4,2
<b>Lot NP (n=10)</b>	308	533	578	1419	3,5	3,1	2,3	3,5

Le tableau 14 montre que la consommation alimentaire des animaux du lot témoin est plus élevée que celles des animaux des lots traités aux antibiotiques ou au NP<sup>®</sup>. L'IC varie entre 4,4 et 5,3 pour le lot témoin alors qu'il est compris entre 2,7 et 4,8 chez les lots traités aux antibiotiques ; le lot traité au NP<sup>®</sup> présente les valeurs de l'IC les plus faibles.

## IV. Discussion

La découverte de l'effet promoteur de croissance des antibiotiques a conduit à leur utilisation comme additifs alimentaires à des doses sous-thérapeutiques dans l'alimentation animale. Cependant l'utilisation continue et non judicieuse d'antibiotiques comme promoteurs de croissance dans l'alimentation de la volaille a conduit à la sélection et à la dissémination de souches pathogènes résistantes aux antibiotiques telles que *Escherichia coli* (Franco *et coll.*, 1990; O'Brien, 2002; Suresh *et coll.*, 2018).

Le thème principal de notre laboratoire étant l'étude de l'activité antimicrobienne des HE et de leurs composés majoritaires, nous avons été sollicités par des éleveurs avicoles pour trouver une solution alternative aux antibiotiques utilisés comme facteurs de croissance chez la volaille pour lutter contre le phénomène de l'anti-biorésistance. Notre invention, le produit NP<sup>®</sup> utilisé pour ses effets antimicrobiens et qui a fait l'objet d'un dépôt de brevet en France le 18 novembre 2016 (FR 1670691), est une composition sous forme de poudre effervescente soluble dans l'eau. Le composé majoritaire utilisé dans cette composition étant le thymol. Il est stabilisé par la présence d'agents texturants, stabilisants et d'autres composés facilitant sa dispersion une fois en solution.

### Test *in vitro*

Pour montrer l'effet de l'amoxicilline sur la sélection de mécanismes de résistance chez une souche répertoriée d'*E. coli* ATCC 25922, nous avons procédé à des repiquages successifs de cette souche sur des concentrations croissantes d'amoxicilline. Après sept repiquages, nous avons évalué la CMI de l'amoxicilline et de celles de deux autres antibiotiques la colistine et la tylosine ainsi que celle du thymol, un composé d'HE de thym et d'origan, connu pour son effet antibactérien par la technique de macro-dilution. Les résultats obtenus ont montré une augmentation de la CMI de l'amoxicilline d'un facteur de 32 fois suite à des repiquages successifs sur les concentrations de 1 µg/ml, 3 µg/ml, 6 µg/ml, 9 µg/ml, 12 µg/ml, 16 µg/ml et 20 µg/ml. Donc, à partir d'une souche sensible à l'amoxicilline et qui avait une CMI pour l'amoxicilline de 0,8 µg/ml, nous avons obtenu une souche d'une CMI de 25,6 µg/m, cette souche est considérée selon les recommandations d'EUCAST comme étant résistante à l'amoxicilline (CMI > 8 µg/ml) (EUCAST, 2018). Ces résultats montrent, la facilité avec laquelle certaines bactéries résistantes peuvent être sélectionnées suite à une pression de sélection exercée par l'amoxicilline. Cebrian *et coll.* (2006) ont montré que suite à



l'exposition *in vitro* des souches de *Salmonella* à l'amoxicilline, une réduction de la sensibilité à l'amoxicilline ainsi qu'à d'autres antibiotiques a été constatée. De même, Qureshi *et coll.* (2014) ont rapporté que l'exposition *in vitro* des souches d'*Helicobacter pylori* à des concentrations croissantes d'amoxicilline a induit la sélection des souches qui ont des niveaux de résistance plus élevés.

Nos résultats montrent aussi que suite aux repiquages successifs sur des concentrations croissantes d'amoxicilline, il y a une sélection des mutants moins sensibles à la tylosine et à la colistine, alors que ces deux antibiotiques n'étaient même pas ajoutés dans le milieu de repiquage. Les CMI de la tylosine et de la colistine ont quadruplé. Cette augmentation de CMI peut être expliquée par l'existence d'une résistance croisée obtenue entre l'amoxicilline et les deux autres antibiotiques. L'acquisition de nouveaux déterminants de la résistance peut se produire beaucoup plus facilement par les plasmides R. Un seul plasmide R peut coder pour la résistance à 10 antibiotiques différents simultanément (Smith, 1969). Ce phénomène de résistance croisée représente un facteur aggravant le problème de l'anti-biorésistance (Wand *et coll.*, 2017). Ces résultats corroborent ceux obtenus par Toprak *et coll.* (2012) qui ont analysé l'évolution de la résistance d'*E. coli* à trois antibiotiques : le chloramphénicol, la doxycycline et le triméthoprime et ont montré que sur une période d'environ 20 jours de culture sur des concentrations croissantes de chacun des trois antibiotiques, les niveaux de résistance ont augmenté de façon spectaculaire. Ces auteurs ont effectué le séquençage du génome entier des souches évoluées et les résultats ont montrés des mutations spécifiques de la résistance à l'antibiotique utilisé et partageant la résistance avec plusieurs autres antibiotiques (résistance croisée). Concernant la CMI du thymol pour la souche *E. coli* ATCC 25922, elle n'a pas changé, elle est restée constante à 250 µg/ml après son repiquage sur les concentrations croissantes d'amoxicilline. Ceci nous a permis de considérer que la sélection de la résistance à l'amoxicilline n'a pas d'influence sur la sensibilité au thymol.

Afin de tester *in vitro* l'effet du thymol sur le développement de l'anti-biorésistance au thymol lui-même et à certains antibiotiques chez la même souche d'*E. coli* ATCC 25922, nous avons procédé à des repiquages successifs sur des concentrations croissantes du thymol. Lors du repiquage de la souche *E. coli* ATCC 25922 sur les concentrations croissantes du thymol, aucune croissance n'est détectée sur les boîtes contenant des concentrations supérieures à 0,3 mg/ml de thymol. Une détermination des CMI du thymol, de l'amoxicilline, de la tylosine et de la colistine a été réalisée après repiquages successifs d'*E. coli* ATCC 25922 sur les trois concentrations du thymol : 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml et 0,3 mg/ml. Les

résultats ont montrés que le thymol n'induit pas le phénomène de sélection de résistance ni au thymol lui-même ni aux antibiotiques testés. En effet, plusieurs études ont rapporté que l'usage des huiles essentielles ou de leurs composés majoritaire n'induit pas la sélection de souches résistantes (Sienkiewicz *et coll.*, 2017). Ohno *et coll.* (2003) ont déjà testé l'effet de 13 huiles essentielles sur une souche d'*Helicobacter pylori* et ont montré que ces HE étaient bactéricides contre *H. pylori* sans induire la sélection de bactéries résistantes après 10 repiquages successifs. De même, Gomes Neto *et coll.* (2012) ont montré que l'exposition d'une souche de *Staphylococcus aureus* à des concentrations infra-inhibitrices de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* et du composé majoritaire des HE d'eucalyptus et de romarin ; le 1,8-cinéol n'induit pas la sélection des souches résistantes à ces deux agents.

### **Test *in vivo***

Pour confirmer les résultats obtenus *in vitro* et afin de vérifier si l'usage des différents antibiotiques ou du thymol dans l'eau de boisson des poussins va provoquer une pression de sélection des bactéries résistantes *in vivo*, un essai a été effectué en traitant trois lots de poussins à l'un ou l'autre des trois antibiotiques (amoxicilline, tylosine, colistine) et un lot au NP<sup>®</sup> (un produit contenant le thymol comme principe actif). Des prélèvements des fèces de poussins et l'isolement des isolats d'*E. coli* intestinale de chaque lot ont été réalisés, dans le but d'évaluer leur sensibilité aux trois ATB (amoxicilline, tylosine et colistine) et au thymol.

Avant de commenter les résultats des essais *in vivo*, il est judicieux d'expliquer le choix des trois ATB testés dans ce travail. L'amoxicilline ( $\beta$ -lactamine), la tylosine (Macrolide) et la colistine (polymyxine) ont été choisis après concertation avec des vétérinaires et des zootechniciens, qui nous ont expliqué que ces trois ATB sont les plus utilisés en aviculture à tous les âges, dans l'eau d'abreuvement. Ils sont utilisés à faibles doses à titre préventif et à des doses plus importantes à titre curatif, en cas d'apparition d'infections mortelles telles que la colibacillose, la salmonellose ou l'entérite nécrotique.

Les résultats obtenus montrent que l'usage de l'amoxicilline, de la tylosine et de la colistine dans l'eau de boisson, a permis de sélectionner des mutants résistants au bout d'une semaine seulement. Ceci a été démontré par une augmentation importante de la CMI des trois antibiotiques vis-à-vis les isolats d'*E. coli* isolées à partir des animaux traités. La CMI de l'amoxicilline est multipliée par 16 pour les isolats provenant des animaux traités à l'amoxicilline. La CMI de la tylosine 32 fois plus élevée pour les isolats provenant des animaux traités à la tylosine. Pour la colistine, la CMI est multipliée par 32. Ces résultats

corroborent ceux obtenus par Miranda *et coll.* (2008) qui ont rapporté que l'incorporation de l'enrofloxacin, de la doxycycline, ou des sulfonamides dans l'eau de boisson induit la sélection des souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques. De même, Van der Horst *et coll.* (2013) ont montré que l'ajout de l'amoxicilline, de l'enrofloxacin ou de l'oxytétracycline dans l'eau de boisson de poulets soit à la dose thérapeutique soit à des doses inférieures a induit la propagation et le développement de la résistance aux antibiotiques chez *E. coli* intestinale (van der Horst *et coll.*, 2013). Simoneit *et coll.* (2015) ont aussi rapporté que l'administration de l'amoxicilline ou d'autres antibiotiques dans l'eau de boisson de poulets induit la sélection et le développement de souches d'*E. coli* résistantes. En effet, il est reconnu et bien établi que l'utilisation des antibiotiques à but thérapeutique, prophylactique ou en tant qu'additifs alimentaires, dans les différents écosystèmes (animaux, hommes) conduit à la sélection de souches bactériennes résistantes, par l'élimination des souches sensibles (Davies, 1994; Ramdane, 2015; Torumkuney *et coll.*, 2016; Suresh *et coll.*, 2018). Ces souches résistantes apparaissent suite à des mutations dans leur ADN, leur conférant un gène de résistance (Ramdane, 2015).

Pour chaque lot d'animaux traités à l'un ou à l'autre des trois antibiotiques, une augmentation des CMI des deux autres antibiotiques non utilisés dans le traitement a été notée. Pour le lot traité à l'amoxicilline, une augmentation des CMI de la tylosine et de la colistine a été notée. Pour le lot traité à la tylosine, une augmentation des CMI de l'amoxicilline et de la colistine a été notée. Ceci confirme la présence du phénomène de la résistance croisée.

Une légère augmentation de CMI de l'amoxicilline, de la colistine et de la tylosine a été constatée chez le lot d'animaux témoins sachant que ces derniers n'ont pas reçu d'amoxicilline. Ceci pourrait s'expliquer par la propagation des souches moins sensibles provenant de l'environnement contaminé. En effet, une étude effectuée par Saleha *et coll.* (2009) suggère que la colonisation du tractus intestinal des poussins et des poulets par des souches *E. coli* résistantes aux antibiotiques n'était pas nécessairement due à l'utilisation d'antibiotiques dans leur aliment, mais pouvait être acquise à partir de l'environnement contaminé, dont les aliments, l'eau et l'air. Da Costa *et coll.* (2007) ont aussi rapporté que les aliments destinés à la volaille constituent une source d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques. Des souches d'*E. coli* résistantes ont été isolées à partir de l'aliment, de l'eau de boisson et de la litière des poules pondeuses en Inde (Samanta *et coll.*, 2014).

Quant au lot traité au NP<sup>®</sup>, les valeurs de CMI de l'amoxicilline, de la tylosine et de la colistine notées sont plus faibles par rapport à celles notées chez le lot témoin. En ce qui concerne la CMI du thymol vis-à-vis les isolats d'*E. coli* des différents lots au cours de

l'administration de l'un ou l'autre des trois antibiotiques ou du thymol, elle était de 0,25 mg/ml pour l'ensembles des lots d'animaux. Ceci confirme les résultats obtenus *in vitro* qui montrent l'absence de développement de la résistance au thymol.

Sur la base des résultats obtenus, nous avons alors décidé de prolonger l'essai d'une semaine supplémentaire afin d'évaluer l'effet de l'association du NP<sup>®</sup> avec l'un ou l'autre des trois ATB. Les résultats montrent une forte diminution de la CMI de l'amoxicilline et de la tylosine vis-à-vis des isolats d'*E.coli* après le traitement des lots par l'association de ces deux ATB avec le NP<sup>®</sup> pendant la quatrième semaine. Cependant, la CMI de la colistine est restée constante pour *E. coli*, après le traitement par l'association de cet ATB avec NP<sup>®</sup>. Alors que la CMI du thymol n'a pas changé durant les trois semaines de traitement ni pour l'isolat du lot traité au NP<sup>®</sup>, ni pour les isolats des lots traités par l'un ou l'autre des trois ATB. Cela montre que l'usage du NP<sup>®</sup> ne conduit pas à la résistance au thymol, ni à la résistance aux ATB testés. Ces résultats montrent aussi qu'il y a une synergie d'action entre le NP<sup>®</sup> et l'un ou l'autre des trois ATB. Cette synergie d'action permet, en utilisant des demi-doses de NP<sup>®</sup> et d'ATB, d'obtenir une efficacité supérieure à celle de l'ATB seul. Afin de mieux apprécier l'effet de la synergie entre les ATB et le NP<sup>®</sup>, nous avons pris des isolats d'*E. coli* à partir des fèces des poussins ayant reçus l'ATB seul pendant 14 jours, pour comparer leur sensibilité avec les isolats provenant des mêmes poussins après un traitement de 7 jours supplémentaires par l'association du NP<sup>®</sup> et l'ATB à demi dose chacun. Nous avons ensuite déterminé les pourcentages d'inhibition des concentrations infra-inhibitrices des différents antibiotiques. D'après les résultats obtenus dans les figures 12, 13, 14 et 15, nous avons constaté que les isolats d'*E. coli* du jour 21 présentent une sensibilité plus faible aux ATB que celle des isolats du jour 28 pour les groupes traités. Ceci montre que les germes provenant des animaux traités par l'association du NP<sup>®</sup> aux ATB sont devenus plus sensibles à l'ATB, contre lesquels ils avaient développé une résistance. Ces résultats permettent de conclure d'une part que le NP<sup>®</sup> peut présenter une alternative qui ne provoque pas de résistance croisée avec les ATB. D'autre part, l'association de NP<sup>®</sup> avec des ATB donne des résultats bénéfiques permettant de diminuer le risque de développement de résistance aux ATB.

Après avoir observé l'efficacité du NP<sup>®</sup> sur les isolats d'*E. coli* provenant des animaux traités au NP<sup>®</sup> ou aux ATB, il était nécessaire de vérifier cette efficacité non seulement sur des isolats d'*E. coli* mais aussi sur la flore intestinale globale durant l'administration des antibiotiques. Une évaluation de la sensibilité de la FMAT aux ATB et au thymol a été effectuée par le dénombrement des colonies en UFC/g. Pour cela, la méthode de gradient de

concentration développée par Bryson et Szybalski en 1952 afin d'étudier la sélection des mutants résistants à un antibiotique donné a été utilisée (Bryson et Szybalski, 1952). Cette méthode a été utilisée en 1962 par Godzeski *et coll.* pour étudier le développement de la résistance au céfalotine chez *Staphylococcus aureus* et sur d'autres souches à Gram-, par Wootton *et coll.* (2001) pour la détection de la résistance à la vancomycine chez des souches de SARM, ainsi que par De Vecchi *et coll.* (2009) pour comparer la capacité de sélection de la résistance à différents antibiotiques. Dans la présente étude, des boîtes contenant des gradients de concentrations de l'un des trois antibiotiques ou du thymol ont été préparés dans le but d'évaluer le développement de l'anti-biorésistance à l'amoxicilline, à la colistine à la tylosine et au thymol dans la FMAT intestinale après traitement des poussins à l'un ou à l'autre de ces agents.

Les résultats montrent que, suite au traitement aux ATB (j7 – j21), la FMAT a développé une résistance vis-à-vis de l'antibiotique utilisé pour le traitement et ceci est illustré par la croissance sur toute la surface du gradient quelle que soit la concentration de l'ATB utilisé. Ces résultats montrent que l'ajout des antibiotiques dans l'eau de boisson exerce une pression de sélection sur la FMAT intestinale induisant le développement des souches résistantes à l'antibiotique utilisé. Par contre, l'ajout du NP<sup>®</sup> n'induit pas ce phénomène de sélection de résistance. Cela est démontré par le fait que la FMAT provenant du lot ayant reçu le NP<sup>®</sup> ne s'est développée que sur des concentrations d'antibiotiques plus faibles. Pour le lot témoin, aux jours J14 et J21, une croissance a été constatée sur des concentrations d'amoxicilline de 2,25 µg/ml alors qu'au jour J7 une croissance était constatée sur des concentrations inférieures à 0,75 µg/ml. Cela peut s'expliquer par la présence des souches moins sensibles dans l'environnement d'élevage et en l'occurrence, l'aliment, l'eau ou l'air (Saleha *et coll.*, 2009).

Quant au dénombrement de la FMAT sur les gradients de concentration du thymol, les mêmes résultats ont été notés pour les lots d'animaux traités aux différents antibiotiques ainsi que pour celui n'ayant reçu aucun traitement. En effet, pour les différents lots d'animaux, aucune croissance n'est notée au J7 alors qu'une croissance a été notée sur une concentration de thymol inférieure à 0,25 mg/ml aux jours J14 et J21. L'absence de croissance au jour J7 peut s'expliquer par la faible charge bactérienne dans la suspension de fèces prélevée le jour J7 ou par l'absence de certaines espèces bactériennes qui viennent ensuite coloniser l'intestin à partir de l'air, de l'eau, de l'aliment ou de la litière d'autres poussins lors de l'expérimentation. Les résultats obtenus montrent que l'ajout de l'amoxicilline, de la colistine

ou de la tylosine à l'eau de boisson de poulets induit une pression de sélection des souches résistantes à l'antibiotique utilisé ainsi qu'aux d'autres antibiotiques non utilisés dans le traitement. Notons que l'ajout de NP<sup>®</sup> dans l'eau de boisson n'induit pas le phénomène de sélection de résistance ni au thymol ni aux trois autres antibiotiques.

Enfin, pour évaluer l'effet du NP<sup>®</sup> sur les performances de croissance des poussins, nous avons évalué certains paramètres zootechniques des animaux comme le poids vif moyen, le gain de poids, la consommation alimentaire et l'indice de consommation. Il faut signaler que l'aliment reçu par ces poussins est un aliment peu énergétique. C'est pour cette raison que les poids ne sont pas aussi élevés que ceux habituellement notés dans les élevages intensifs. Pour les éleveurs, il est important d'avoir des animaux qui ont un poids assez élevé. Cependant, ce qui garantit les bénéfices des éleveurs, c'est surtout un faible indice de consommation. Cet indice montre à quel point l'aliment consommé par l'animal a été converti en chair (Souahibou, 2014). Les résultats obtenus montrent une différence significative à partir du 7<sup>ème</sup> jour au niveau du poids vif et du gain du poids entre les lots traités et le lot témoin. Le poids des poussins du lot recevant soit un antibiotique soit le NP<sup>®</sup> est significativement plus élevé que celui des poussins du lot n'ayant reçu aucun traitement. Le NP<sup>®</sup> permet d'obtenir un poids d'animaux supérieur à celui du lot témoin et quasiment identique à celui obtenu avec l'amoxicilline après 4 semaines. Cette différence significative au niveau du poids n'est pas due à une différence de la quantité d'aliment consommée, puisque le lot d'animaux témoins a consommé plus d'aliment que celui des lots ayant reçu un antibiotique ou le NP<sup>®</sup>. Ceci se voit aussi au niveau de l'indice de consommation qui est plus faible chez le lot ayant reçu le NP<sup>®</sup> par rapport aux autres lots. Ce qui s'explique par la réduction de la charge bactérienne à cause de la présence du thymol dans le NP<sup>®</sup> et qui affecte l'intégrité intestinale (Murugesan *et coll.*, 2015; Sennouni *et coll.*, 2018) Avec une flore intestinale équilibrée, les aliments peuvent être plus facilement absorbés, ce qui explique la différence de croissance entre les animaux. En effet, une étude menée par Lee *et coll.* (2003) a montré que le thymol augmente l'activité de l'amylase intestinale du poulet, ce qui améliore sa croissance en augmentant la digestibilité des nutriments et en régulant la microflore intestinale. Ces résultats montrent en effet que le traitement par de faibles doses quotidiennes d'ATB ou du NP<sup>®</sup> permet effectivement d'améliorer les performances zootechniques des poussins dans nos conditions expérimentales et que le NP<sup>®</sup> serait un bon promoteur de croissance. L'intérêt pour l'éleveur est d'obtenir de bonnes performances zootechniques. Les répercussions positives de l'utilisation du NP<sup>®</sup> contribueraient à la lutte contre l'anti-biorésistance constatée en médecine humaine et qui a

pour origine les antibiotiques administrés aux animaux d'élevage (Economou et Gousia, 2015).

Notre étude confirme que l'usage des antibiotiques dans l'aviculture contribue à l'émergence des bactéries résistantes aux antibiotiques chez les poulets de chair. Les résultats obtenus dans cette partie de travail montrent que l'incorporation du NP<sup>®</sup> dans l'eau de boisson du poussin de chair ne conduit pas uniquement à une amélioration des performances zootechnique mais participe aussi à la lutte contre les bactéries résistantes. L'association des antibiotiques avec le NP<sup>®</sup> a montré *in vivo* une diminution de la CMI des bactéries résistantes vis-à-vis des ATB utilisées. Cette association témoigne d'une très bonne synergie d'action entre le NP<sup>®</sup> et les ATB.

**Partie II : Effet de l'association des antibiotiques au NP<sup>®</sup> sur le développement de la résistance au niveau de la flore intestinale de la dinde**



## I- Introduction

Sur la base des résultats obtenus dans la partie précédente, nous avons pensé que l'association du NP<sup>®</sup> avec les antibiotiques pourrait lutter contre le développement de la résistance et qu'elle peut améliorer les performances de croissance de la volaille.

L'objectif de cette partie, consiste à évaluer l'effet, *in vivo*, du NP<sup>®</sup>, de trois antibiotiques (l'amoxicilline, l'oxytétracycline et l'enrofloxacin) ainsi que l'effet d'association de l'un ou l'autre des trois antibiotiques avec le NP<sup>®</sup> sur le phénomène de l'anti-biorésistance au niveau de la charge intestinale et sur les performances de croissance chez la dinde.

La présente partie consiste à :

- Faire une comparaison, *in vivo*, entre l'effet du traitement à l'un des trois antibiotiques; l'amoxicilline, l'oxytétracycline ou l'enrofloxacin et au NP<sup>®</sup> seuls ainsi que l'effet de l'association de ce dernier à l'un ou l'autre des trois antibiotiques sur la régulation de la charge intestinale des dindonneaux.
- Tester l'effet de ces différents traitements sur le développement de la résistance aux antibiotiques
- Mettre en évidence l'effet de ces différents traitements sur les performances de croissance des dindonneaux.

## II- Matériel et méthodes

### 1- Animaux d'expérience

Cette étude a été réalisée sur 45 dindonneaux âgés de 3 jours, ayant un poids moyen de  $62,82 \pm 6,79$ g. À leur arrivée, les animaux ont été pesés individuellement, répartis en lots expérimentaux de cinq animaux chacun et placés dans des cages séparées. L'animalerie et le matériel d'élevage ont été préparés comme décrit précédemment (Partie I). Les animaux sont nourris avec un aliment dit blanc, ne contenant ni antibiotiques, ni antiparasitaires. Il a été fourni par la société ALF AL-SAHEL.

### 2- Traitement des animaux

Les produits testés dans l'expérimentation sont représentés dans le tableau 15 :

**Tableau 15:** Données relatives aux produits utilisés

Produit	Noms commerciaux	Texture	Posologie
Amoxicilline	AMOXY 70 <sup>®</sup>	Poudre	20 mg/kg de poids vif/jour
Oxytétracycline	ANTIBIOVIT <sup>®</sup>	Poudre	0,40 g/kg de poids vif/jour
Enrofloxacin	NOVOTRYL <sup>®</sup>	Liquide	5 ml/10 litres d'eau de boisson
NP <sup>®</sup>	NP <sup>®</sup>	Poudre	1 g/litre d'eau de boisson/jour

- Le produit NP<sup>®</sup> a été fourni par le laboratoire Industriel d'Alternatives Vétérinaires (LIAV Fès).
- Les trois antibiotiques; l'amoxicilline, l'oxytétracycline et l'enrofloxacin ont été fournis par la société Novovet de Casablanca sous les noms commerciaux montrés dans le tableau 15.

### 3- Lots d'animaux

Quarante-cinq dindonneaux ont été répartis en neuf lots, de 5 animaux chacun :

**Lot N°1:** Lot témoin ; animaux recevant l'eau de robinet

**Lot N°2 (n=5):** Lot Amox ; animaux recevant 10 mg d'amoxicilline/kg de poids corporelle

**Lot N°3 (n=5):** Lot Oxy ; Animaux recevant 10 mg d'oxytétracycline /kg de poids corporelle

**Lot N°4 (n=5):** Lot Enro ; Animaux recevant 0,25 ml d'enrofloxacin /L

**Lot N°5 (n=5):** Lot NP 1 g/L ; Animaux recevant le NP<sup>®</sup> à raison de 1g/litre d'eau de boisson.

**Lot N°6 (n=5):** Lot Amox+NP ; recevant un mélange d'amoxicilline et de NP<sup>®</sup> (5 mg d'amoxicilline /kg + 0,5g de NP/L d'eau de boisson).

**Lot N°7 (n=5):** Lot Oxy+NP ; animaux recevant un mélange de l'oxytétracycline et de NP<sup>®</sup> (5mg d'oxytétracycline + 0,5g de NP<sup>®</sup>/L d'eau de boisson).

**Lot N°8 (n=5):** Lot Enro+NP ; Animaux recevant un mélange de l'enrofloxacin et de NP<sup>®</sup> (0,12 ml/L d'enrofloxacin + 0,5g de NP<sup>®</sup>/L d'eau de boisson)

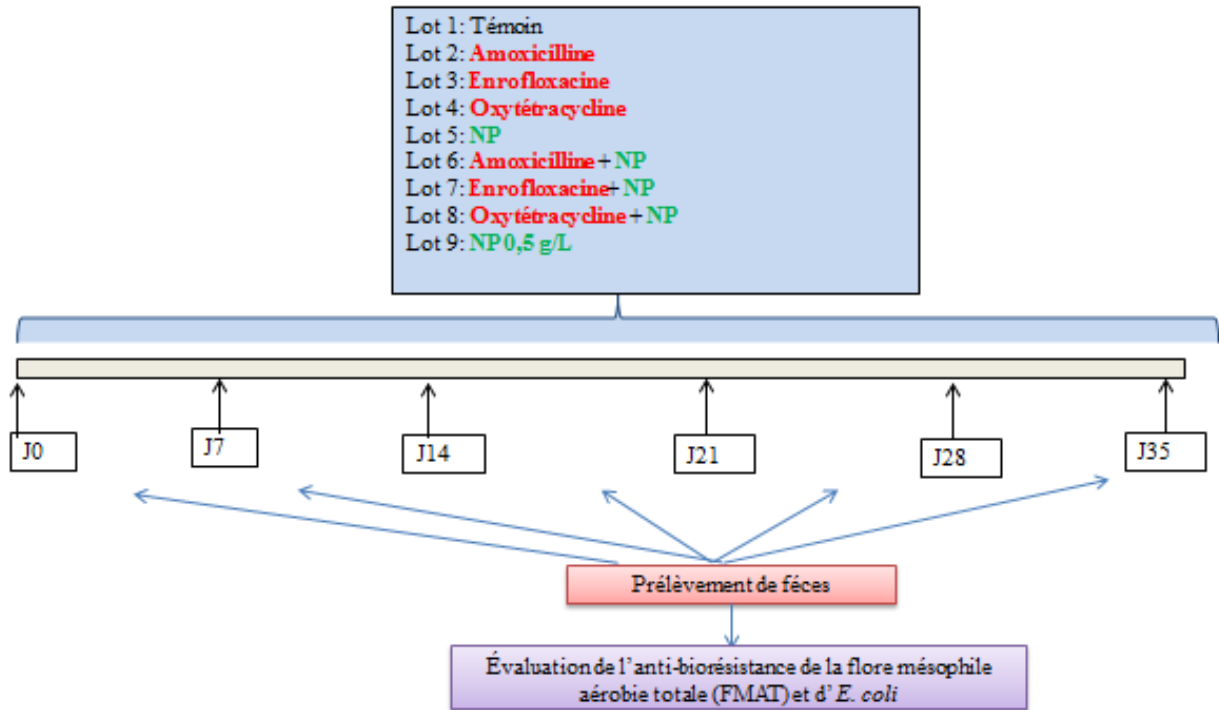
**Lot N°9 (n=5):** Lot NP 0,5g/L ; animaux recevant le NP<sup>®</sup> seul à raison de 0,5 g/L d'eau de boisson.

La durée de l'expérience est de 38 jours. Le traitement aux antibiotiques seuls et aux antibiotiques associés au NP a duré 38 jours (du jour J0 au jour J38). L'anti-biorésistance de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) et d'*E. coli* entérique a été évaluée chaque semaine à partir des prélèvements des fèces des animaux de chaque lot. Un dénombrement de la flore totale a été réalisé chaque semaine. La quantité d'aliment consommé, la quantité résiduelle pour chaque lot et le poids corporel de chaque animal ont été notés quotidiennement afin d'évaluer les paramètres zootechniques.

#### **4- Dénombrement de la FMAT**

L'effet des différents traitements sur la charge intestinale de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) a été testé sur les fientes pendant toute la période de l'expérience. Tous les sept jours, des échantillons de fientes des différents lots ont été ramassés et solubilisés dans le sérum physiologique (NaCl à 9%) à raison de 5g de fientes dans 45 ml de sérum physiologique. Des dilutions décimales jusqu'à  $10^{-8}$  sont ensuite préparées à partir de la solution mère.

Le dénombrement de la FMAT a été effectué sur le milieu nutritif PCA (Plate Count Agar, Biokar<sup>®</sup>). Ce milieu de culture a été préparé, ensuite coulé dans des boîtes de Petri (90×16mm), puis inoculé avec un volume de 100 µl de l'échantillon de fiente dilué à  $10^{-6}$  et à  $10^{-8}$ . Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h. Chaque essai est réalisé en duplicate.



**Figure 18:** Diagramme schématique de l'expérience réalisée

## 5- Évaluation de l'anti-biorésistance *in vivo* de la FMAT intestinale

### 5.1- Procédure de dispersion des antibiotiques et du thymol

Deux grammes d'amoxicilline ou d'oxytétracycline en poudre sont mis dans un tube contenant 9 ml de l'eau distillée stérile (EDS). L'ensemble est mélangé au vortex jusqu'à dispersion totale. Les concentrations respectives d'amoxicilline et d'oxytétracycline sont de 140 mg/ml et de 10 mg/ml. L'enrofloxacin a été utilisée sous sa forme liquide pure (100 mg/ml) ou diluée au 1/10 (10 mg/ml). En ce qui concerne le thymol (principe actif du NP<sup>®</sup>), il a été dispersé dans une solution visqueuse d'agar-agar à 0,2 % (Remmal *et coll.*, 1993b), et la concentration de la solution mère obtenue est de 100 mg/ml.

### 5.2- Dénombrement sur gradient de concentration

Les boîtes contenant le milieu PCA avec un gradient de concentration d'antibiotiques ont été préparées comme décrit précédemment (Partie I). Trois concentrations de chaque antibiotique ont été utilisées. Pour l'amoxicilline, les concentrations 3 µg/ml, 6 µg/ml et 12 µg/ml ont été utilisées. Pour l'oxytétracycline; les concentrations utilisées sont : 0,5 µg/ml, 1 µg/ml et de 2 µg/ml. Pour l'enrofloxacin; les concentrations 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml et de 1 µg/ml ont été utilisées. Pour le thymol, la concentration maximale 0,5 mg/ml a été utilisée. Puis, un volume de 100µl de la suspension bactérienne de fèces diluée à 10<sup>-2</sup> de chaque lot a été étalé en

surface des boîtes contenant le gradient de concentration de l'un des trois antibiotiques ou du thymol. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h. Ensuite, chaque boîte a été divisée en 4 portions et le dénombrement a été réalisé dans les parties de la boîte où le nombre de colonies est inférieur à 300 colonies. Les résultats sont exprimés en unité formant colonie par gramme de fèces (UFC/g).

## **6- Évaluation *in vivo* de l'anti-biorésistance chez *E. coli***

### **6.1- Isolement et préparation de l'inoculum**

L'isolement des souches d'*E. coli* a été effectué par l'étalement de la dilution  $10^{-2}$  de la suspension de fientes sur des boîtes de Pétri contenant le milieu sélectif Eosine Bleu de Méthylène (EMB). Puis, des colonies d'*E. coli* qui sont caractérisées par une couleur verte métallique ont été isolées.

Une souche d'*E. coli* a été isolée et purifiée de chaque lot chaque semaine. L'inoculum bactérien a été préparé en prélevant 2 à 3 colonies à partir d'une culture d'une nuit sur gélose nutritive Trypto-caséine soja (TSA). Ces colonies sont ensuite mises en suspension dans le sérum physiologique (NaCl 0,9%) stérile. Puis, l'inoculum est ajusté à 0,5 Mac Farland, ce qui correspond à une densité optique de 0,08–0,13 mesurée à une longueur d'onde de 625 nm et est équivalent à  $1,5 \cdot 10^8$  UFC/ml. Des dilutions au 1/10 ont été réalisées afin d'obtenir une concentration bactérienne de  $5 \cdot 10^5$  UFC/ml.

### **6.2- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

Les CMI de l'amoxicilline, de l'oxytétracycline, de l'enrofloxacin et du thymol ont été déterminées par des tests de micro-dilution sur des plaques à 96 puits selon les normes CLSI (CLSI, 2019). Dix concentrations d'amoxicilline, d'oxytétracycline, d'enrofloxacin et du thymol ont été préparées dans des tubes à hémolyse stériles. Ces concentrations ont été réalisées par des dilutions successives de moitié dans de l'eau distillée stérile. Elles vont de 512 µg/ml à 1 µg/ml pour l'amoxicilline, de 128 µg/ml à 0,25 µg/ml pour l'oxytétracycline et de 32 µg/ml à 0,06 µg/ml pour l'enrofloxacin. Pour le thymol, les dilutions successives réalisées vont de 16 mg/ml à 0,0312 mg/ml. Ensuite, 20 µl de chaque concentration ont été ajoutés dans chaque puit à 160 µl de bouillon Mueller Hinton (MH) et à 20 µl d'une suspension bactérienne afin d'obtenir une charge finale de  $5 \cdot 10^5$  UFC/ml. Chaque concentration a été testée en duplicate.

Les concentrations finales des antibiotiques obtenues dans les puits sont de:

Pour l'**amoxicilline** : 51,2 µg/ml, 25,6µg/ml, 12,8µg/ml, 6,4 µg/ml, 3,2 µg/ml, 1,6 µg/ml, 0,8 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,2 µg/ml et 0,1 µg/ml.

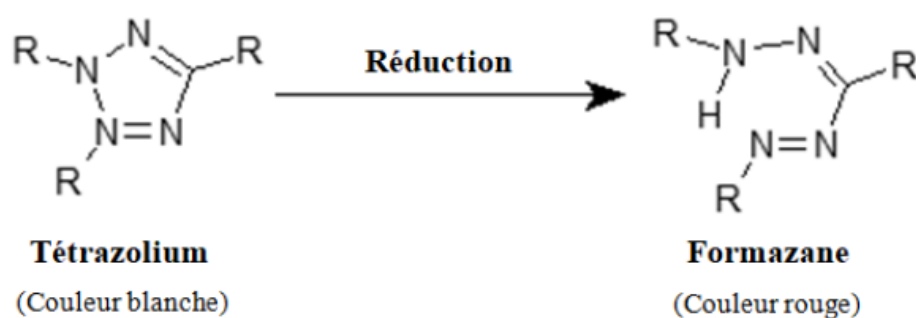
Pour l'**oxytétracycline**: 12,8 µg/ml, 6,4 µg/ml, 3,2 µg/ml, 1,6 µg/ml, 0,8 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,05 µg/ml et 0,025 µg/ml

Pour l'**enrofloxacin**: 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,12 µg/ml et 0,06 µg/ml,

Pour le **thymol**: 16 mg/ml, 8 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,062 mg/ml et 0,031 mg/ml

Les puits de la première colonne ne contenant que le milieu MH constituent les témoins négatifs, alors que les puits de la 12<sup>ème</sup> colonne ont été inoculés par la souche bactérienne et constituent les témoins positifs.

Après incubation des plaques à 37°C pendant 18h, sous agitation à 100 rpm. Le triphenyl-tetrazolium chloride (TTC) est rajouté. Le TTC est un indicateur de la croissance bactérienne, il est réduit en formazan insoluble à l'intérieur de la cellule. Cette réaction se manifeste par l'apparition d'une couleur rouge (Figure 18). 40µl de TTC à 0,5% ont été rajoutés dans chaque puit, et après 2h d'incubation, les CMI sont déterminés. Les valeurs de CMI correspondent à la concentration la plus faible pour laquelle on n'a pas obtenu de couleur rouge (Dimitrijević, 2012).



**Figure 19:** La réduction de TTC de couleur blanche en formazan de couleur rouge

## 7- Détermination des paramètres zootechniques

Les principaux paramètres zootechniques étudiés dans cette expérience sont le poids vif moyen, le gain de poids, la consommation alimentaire et l'indice de consommation. Ils ont été

évalués chaque semaine durant toute l'expérimentation de la même façon que cellz décrite dans la première partie de ce travail.

## **8- Étude statistique**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du GraphPad Prism® 6 pour Windows et les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type. L'effet des différents traitements sur le poids vif et le gain de poids a été évalué à l'aide d'une analyse de variance One-way ANOVA) en utilisant le test de comparaison Tukey's Multiple (Graph pad Prism version 5.03). La valeur  $P < 0,5$  est considérée comme statistiquement significative.

### III- Résultats

#### 1- Évaluation de la charge de la flore mésophile aérobie totale (FMAT)

**Tableau 16:** Évolution de la charge intestinale en FMAT des différents lots d'animaux (\*p<0.05 ; \*\*p<0.01 ; \*\*\*p<0.001 comparées avec le lot témoin)

Lots d'animaux	Charge bactérienne en log <sub>10</sub> UFC/g					
	J0	J7	J14	J21	J28	J35
Témoin	10,07 ±0,2	9,84 ± 0,12	10,53 ± 0,19	10,52 ± 0,21	10,41 ± 0,15	10,52 ± 0,24
Amox		9,31 ± 0,09 *	9,63 ± 0,1*	9,81 ± 0,3*	9,9 ± 0,21	10,08 ± 0,21
Oxy		9,33 ± 0,2 *	9,51 ± 0,3*	9,71 ± 0,25*	9,52 ± 0,3	10,11 ± 0,32
Enro		8,95 ± 0,21*	9,12 ± 0,29**	9,64 ± 0,32*	9,6 ± 0,41	10,08 ± 0,35
NP 1g/L		9,740 ± 0,31*	9,72 ± 0,29*	9,63 ± 0,37*	9,6 ± 0,18	9,52 ± 0,15
Amox+NP		8,92 ± 0,21**	9,03 ± 0,29***	9,06 ± 0,18***	9,18 ± 0,36**	9,04 ± 0,34*
Oxy+Np		8,9 ± 0,2**	9,1 ± 0,21**	9,11 ± 0,29**	9,09 ± 0,32**	9,09 ± 0,3**
Enro +NP		8,85 ± 0,2***	8,9 ± 0,29***	9,2 ± 0,18**	9 ± 0,35**	9,9 ± 0,31**
NP0,5g/L		9,84 ± 0,16	9,86 ± 0,09	9,9 ± 0,18	9,92 ± 0,25	9,95 ± 0,21

Au début de l'expérience (J0), la charge intestinale initiale en FMAT des animaux était de 1,2 10<sup>10</sup> UFC/g (valeur en log<sub>10</sub> UFC/g=10,07). Au jour 7, une réduction significative (p<0.05) a été constatée pour les lots d'animaux traités aux antibiotiques seuls et au NP<sup>®</sup>. Une baisse plus importante a été constatée chez les animaux des lots traités par les associations des antibiotiques avec le NP<sup>®</sup>. Après deux semaines du traitement (J14), la réduction la plus importante (à p<0.001) a été constatée chez les deux lots d'animaux traités à l'amoxicilline associée au NP<sup>®</sup> et chez ceux traités à l'enrofloxacin associée au NP<sup>®</sup>. Au J28 et J35, une réduction significative de la charge a été notée chez les animaux des lots ayant reçu le mélange des différents antibiotiques avec du NP<sup>®</sup> par rapport aux autres lots n'ayant reçu que l'antibiotique seul ou le NP<sup>®</sup> seul.

#### 2. Évolution de l'anti-biorésistance d'*E. coli* isolée de la flore intestinale des dindonneaux

##### 2.1- Évolution *in vivo* de l'anti-biorésistance à l'amoxicilline

Le tableau 17 représente l'évolution des CMI de l'amoxicilline vis-à-vis les isolats d'*E.coli* de différents lots d'animaux.



**Tableau 17:** Évolution des CMI de l'amoxicilline vis-à-vis des isolats d'*E. coli* durant l'expérience

Lot d'animaux	CMI de l'amoxicilline en µg/ml					
	J0	J7	J14	J21	J28	J35
Lot Amox	0,2	6,4	12,8	12,8	25,6	25,6
Lot Amox + NP	0,2	0,4	0,8	1,8	3,2	6,4
Lot Oxy	0,2	1,6	3,2	6,4	12,8	12,8
Lot Oxy + NP	0,2	0,4	0,4	0,8	1,6	3,2
Lot Enro	0,2	0,8	3,2	6,4	12,8	12,8
Lot Enro + NP	0,2	0,8	0,8	1,6	3,2	3,2
Lot NP (1g/L)	0,2	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2
Lot NP (0,5 g/L)	0,2	0,4	0,4	1,6	1,6	3,2
Lot Témoin	0,2	0,4	0,4	1,6	1,6	3,2

Les résultats montrent que pour les isolats d'*E. coli* des dindennaux traités aux antibiotiques seuls, il y a une augmentation notable de la CMI de l'amoxicilline au fur et à mesure du temps du traitement. Elle atteint à la fin de l'expérience 25,6 µg/ml pour le lot d'animaux traités à l'amoxicilline et de 12,8 µg/ml pour les lots traités respectivement à l'oxytétracycline ou à l'erofloxacin. Cependant, les valeurs de CMI vis-à-vis des isolats d'*E. coli* des lots traités aux antibiotiques associés au NP<sup>®</sup> sont restées relativement faibles. Elles sont de l'ordre de 6,4 µg/ml, 3,2 µg/ml et 3,2 µg/ml pour les lots traités respectivement à l'amoxicilline +NP, à l'oxytétracycline +NP ou à l'enrofloxacin+ NP.

En ce qui concerne les isolats d'*E. coli* des lots traités au NP<sup>®</sup> seul à la dose d'1g/L ou de 0,5g/L, les CMI de l'amoxicilline notées n'ont pas dépassé 3,2 µg/ml. Cela a été noté aussi pour les isolats d'*E. coli* provenant des dindennaux témoins n'ayant reçu aucun traitement

## 2.2- Évolution de l'anti-biorésistance à l'oxytétracycline

**Tableau 18:** Évolution de la CMI de l'oxytétracycline vis-à-vis des isolats d'*E. coli* en fonction du temps

Lots d'animaux	CMI de l'oxytétracycline en µg/ml					
	J0	J7	J14	J21	J28	J35
Lot Amox	0,025	0,1	0,2	0,4	0,4	0,8
Lot Amox + NP	0,025	0,05	0,05	0,1	0,2	0,2
Lot Oxy	0,025	0,05	0,1	0,4	0,8	1,6
Lot Oxy + NP	0,025	0,05	0,1	0,2	0,2	0,4
Lot Enro	0,025	0,05	0,05	0,1	0,4	0,8
Lot Enro + NP	0,025	0,05	0,05	0,05	0,1	0,1
Lot NP 1g/L	0,025	0,05	0,025	0,05	0,1	0,2
Lot NP 0,5 g/L	0,025	0,05	0,05	0,1	0,2	0,2
Lot Témoin	0,025	0,05	0,05	0,1	0,2	0,2

La CMI de l'oxytétracycline était de 0,025 µg/ml au jour J0, puis elle a augmenté en fonction du temps de traitement pour les différents lots. Cette augmentation est plus importante chez les lots traités aux antibiotiques seuls et surtout chez les dindonneaux ayant reçu l'oxytétracycline seule. Elle a atteint 1,6 µg/ml à la 5<sup>ème</sup> semaine soit une multiplication par un facteur de 64. Cependant la CMI de l'oxytétracycline vis-à-vis d'*E. coli* provenant du lot d'animaux traités à l'oxytétracycline associée au NP<sup>®</sup> a atteint seulement 0,4 µg/ml. En outre, la CMI de l'oxytétracycline vis-à-vis les isolats du lot d'animaux ayant reçu le NP<sup>®</sup> seul et du lot témoin n'a pas dépassé 0,2 µg/ml.

### 2.3- Évolution de l'anti-biorésistance à l'enrofloxacin

**Tableau 19:** Évolution de la CMI de l'enrofloxacin vis-à-vis des isolats d'*E. coli* en fonction du temps

Lots d'animaux	CMI de l'enrofloxacin en µg/ml					
	J0	J7	J14	J21	J28	J35
Lot Amox	0,12	0,48	0,96	1,92	3,84	7,68
Lot Amox + NP	0,12	0,12	0,24	0,24	0,48	0,48
Lot Oxy	0,12	0,24	0,48	1,92	3,84	3,84
Lot Oxy + NP	0,12	0,12	0,12	0,24	0,24	0,48
Lot Enro	0,12	0,48	0,96	3,84	7,68	7,68
Lot Enro + NP	0,12	0,12	0,24	0,24	0,48	0,48
Lot NP 1g/L	0,12	0,12	0,12	0,24	0,24	0,48
Lot NP 0,5 g/L	0,12	0,12	0,12	0,24	0,48	0,48
Lot Témoin	0,12	0,12	0,24	0,48	0,48	0,96

La CMI de l'enrofloxacin vis-à-vis les isolats du lot traité à l'enrofloxacin seule est passée de 0,12 à 7,68 µg/ml au bout de 5 semaines de traitement. Elle a augmenté aussi chez le lot traité à l'amoxicilline jusqu'à 7,68 µg/ml et chez le lot traité à l'oxytétracycline jusqu'à 3,84 µg/ml. Par contre, la CMI de l'enrofloxacin vis-à-vis les isolats des lots traités aux antibiotiques associés au NP<sup>®</sup> n'a pas dépassée 0,5 µg/ml. Cette valeur est aussi notée chez les deux lots d'animaux traités au NP<sup>®</sup> seul après 5 semaines. À la fin de l'expérience, la CMI de l'enrofloxacin notée chez le lot témoin était de 0,96 µg/ml.

### 2.4- Évolution de l'anti-biorésistance au thymol

Le tableau 20 résume la CMI du thymol vis-à-vis des isolats d'*E. coli* de différents lots. Elle montre que la CMI du thymol est restée stable à 0,25 mg/ml durant toute la durée de l'expérimentation et cela pour les isolats de différents lots d'animaux.

**Tableau 20:** Évolution de la CMI du thymol vis-à-vis des isolats d'*E. coli* en fonction du temps

Lots d'animaux	CMI du thymol en mg/ml					
	J0	J7	J14	J21	J28	J35
Lot Amox	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Lot Amox + NP	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Lot Oxy	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Lot Oxy + NP	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Lot Enro	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Lot Enro + NP	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Lot NP 1g/L	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Lot NP 0,5 g/L	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Lot Témoin	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

### 3. Évaluation *in vivo* de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale par la technique du gradient de concentration

#### 3.1- Évaluation de l'anti-biorésistance de la FMAT à l'amoxicilline

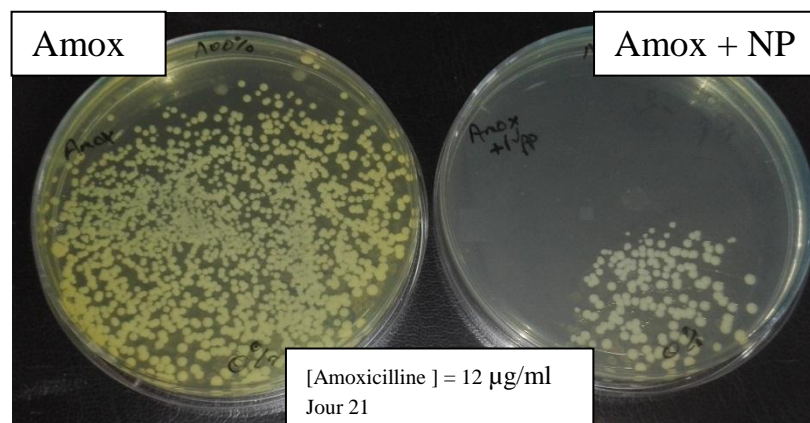
Le tableau 21 représente les résultats du dénombrement de la FMAT intestinale sur les boîtes contenant les gradients de concentration d'amoxicilline au cours du traitement, pour les lots d'animaux traités à l'amoxicilline et ceux traités à l'amoxicilline associé au NP<sup>®</sup>.

Les résultats montrent qu'après une semaine de traitement, la FMAT des dindonneaux traités à l'amoxicilline associée au NP<sup>®</sup> présente une sensibilité relative vis-à-vis de l'amoxicilline. Cette sensibilité s'explique par le fait que la FMAT ne pousse qu'au niveau des portions 0-25% du gradient des deux concentrations 3 µg/ml et 6 µg/ml avec une absence de croissance sur la concentration 12 µg/ml. Cependant, pour le lot traité à l'amoxicilline seule, une croissance a été notée sur tout le gradient de la concentration 3 µg/ml, une croissance a été aussi notée vers les portions 50-75% de la concentration de 6 µg/ml et 0-25% de la concentration 12 µg/ml. Suite au traitement à l'amoxicilline seule; la FMAT commence à croître vers les portions les plus élevées des concentrations les plus fortes de 6 µg/ml et 12 µg/ml jusqu'à une croissance sur toute la surface du gradient et quelque soit la concentration utilisée.

En ce qui concerne la FMAT des dindonneaux ayant été abreuvés à l'amoxicilline associée au NP<sup>®</sup>, avec le temps une légère croissance a été notée vers les portions les plus faibles avec toujours une absence de croissance vers les portions 50-100% de la concentration 6 µg/ml et 25-100% de la concentration de 12 µg/ml.

**Tableau 21:** Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT du lot traité à l'amoxicilline et du lot traité à l'amoxicilline associée au NP®

Jours		Nombre de la FMAT en UFC/g												
		J7				J21				J35				
		0-25	25-50	50-75	75-100	0-25	25-50	50-75	75-100	0-25	25-50	50-75	75-100	
Gradient en pourcentage														
Amoxicilline en µg/ml														
Lot	3	Tapis				>3.10 <sup>5</sup>	Tapis				Tapis			
Amoxy	6	Tapis	>3.10 <sup>5</sup>	2.10 <sup>3</sup>	0	Tapis				Tapis				
	12	>3.10 <sup>5</sup>	3,4.10 <sup>3</sup>	0	0	>3.10 <sup>5</sup>				Tapis				
Lot Amox	3	Tapis	0	0	0	Tapis	3.10 <sup>3</sup>	0	0	Tapis	>3.10 <sup>5</sup>	2.10 <sup>3</sup>	0	
+NP	6	2.10 <sup>4</sup>	0	0	0	Tapis	0	0	0	Tapis	4,3.10 <sup>4</sup>	0	0	
	12	0	0	0	0	2,4.10 <sup>4</sup>	0	0	0	>3.10 <sup>5</sup>	0	0	0	



**Figure 20:** Résultat de l'étalement sur gradient de concentration de l'amoxicilline à 12 µg/ml le jour J21

### 3.2- Évaluation de l'anti-biorésistance de la FMAT à l'oxytétracycline

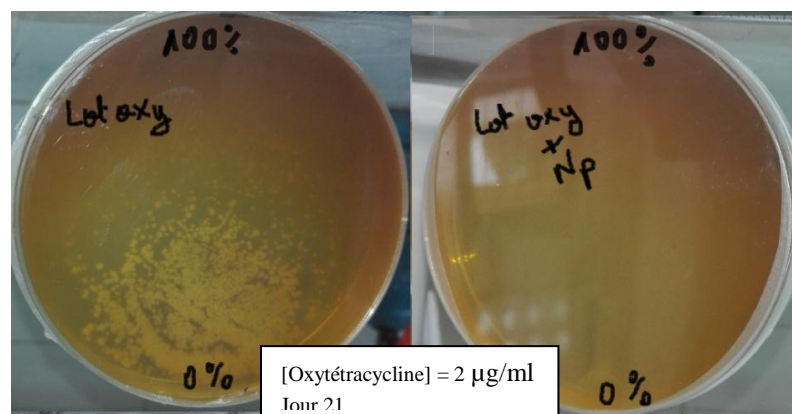
Le tableau 22 illustre les résultats du dénombrement de la FMAT intestinale des dindonneaux du lot traité à l'oxytétracycline et ceux traités à l'oxytétracycline associée au NP<sup>®</sup> sur des boîtes contenant les gradients de concentration d'oxytétracycline.

Après une semaine du traitement, une croissance de la FMAT des animaux traités à l'oxytétracycline seule a été notée sur la portion 0-25% de la concentration 0,5 µg/ml. Alors qu'aucune croissance n'a été notée pour la FMAT des dindonneaux traités à l'oxytétracycline associée au NP<sup>®</sup> sur les trois concentrations utilisées.

Suite au traitement à l'oxytétracycline seule et au bout de la 5<sup>ème</sup> semaine; la FMAT commence à croître sur toute la surface du gradient des deux concentrations 0,5 et 1 µg/ml et sur les portions 0-75% de la concentration de 2 µg/ml. Le traitement à l'oxytétracycline associée au NP<sup>®</sup> a induit une légère poussée de la FMAT vers les portions les plus élevés. En effet, avec cette association, une faible croissance de la FMAT sur la portion 0-25% des concentrations de 0,5 et 1 µg/ml a été notée le jour 22 et une croissance sur les portions 0-75% de la concentration de 0,5 µg/ml avec toujours une absence de croissance sur toutes les boîtes de la concentration de 2 µg/ml (Figure 20).

**Tableau 22:** Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT du lot traité à l'oxytétracycline et du lot traité à l'oxytétracycline associée au NP®

		Nombre de la FMAT en UFC/g											
Jours		J7				J21				J35			
Gradient en pourcentage		0-25	25-50	50-75	75-100	0-25	25-50	50-75	75-100	0-25	25-5	50-75	75-100
Oxytétracycline en µg/ml													
Lot Oxy	0,5	2.10 <sup>2</sup>	0	0	0	Tapis	>3.10 <sup>5</sup>	>3.10 <sup>5</sup>	0	Tapis			
	1	0	0	0	0	Tapis	>3.10 <sup>5</sup>	3.10 <sup>4</sup>	0	Tapis			
	2	0	0	0	0	>3.10 <sup>5</sup>	5,2.10 <sup>4</sup>		0	Tapis			0
Lot Oxy+NP	0,5	0	0	0	0	3,1.10 <sup>4</sup>	0	0	0	>3.10 <sup>5</sup>	>3.10 <sup>5</sup>	1,5.10 <sup>4</sup>	0
	1	0	0	0	0	9.10 <sup>3</sup>	0	0	0	1,7.10 <sup>4</sup>	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



**Figure 21:** Résultat de l'étalement sur gradient de concentration de l'oxytétracycline à 2 µg/ml le jour J21.

### **3.3- Évaluation de l'anti-biorésistance de la FMAT à l'enrofloxacin**

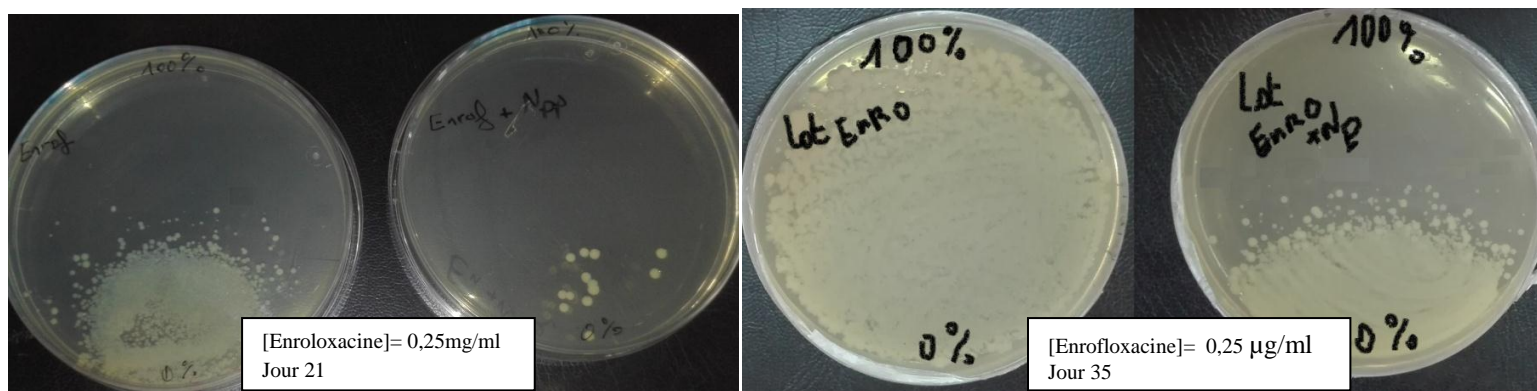
Le tableau 23 illustre les résultats du dénombrement de la FMAT des dindonneaux du lot traité à l'enrofloxacin et du lot traité à l'enrofloxacin associée au NP<sup>®</sup> sur des boîtes contenant les gradients de concentration d'enrofloxacin.

Le tableau montre que la FMAT des dindonneaux traités à l'enrofloxacin associée au NP<sup>®</sup> présente une plus grande sensibilité vis-à-vis de l'enrofloxacin par rapport à celle des dindonneaux traités à l'enrofloxacin seule. Cette sensibilité s'explique par le fait que la FMAT ne pousse qu'au niveau des portions 0-25% et 0-50% du gradient des concentrations respectives de 0,25 µg/ml et 0,5 µg/ml, même après cinq semaines de traitement avec absence de croissance sur le gradient de la concentration de 1 µg/ml.

Cependant la FMAT des dindonneaux traités à l'enrofloxacin seule devient moins sensible au fur et à mesure de la durée de traitement. Au jour J35, la FMAT commence à croître sur toute la surface du gradient des concentrations 0,25 µg/ml et 0,5 µg/ml et sur la portion 0-50% de la plus grande concentration utilisée (1 µg/ml).

**Tableau 23:** Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT du lot traité à l'enrofloxacin et de celui traité à l'enrofloxacin associée au NP®

Jours		Nombre de la FMAT en UFC/g											
		J7				J21				J35			
		0-25	25-50	50-75	75-100	0-25	25-50	50-75	75-100	0-25	25-5	50-75	75-100
Gradient en pourcentage													
Enrofloxacin en µg/ml													
Lot Enro	0,25	>3.10 <sup>5</sup>	0	0	0	Tapis	>3.10 <sup>5</sup>	0	0	Tapis			
	0,5	0	0	0	0	>3.10 <sup>5</sup>	8.10 <sup>3</sup>	0	0	Tapis			>3.10 <sup>5</sup>
	1	0	0	0	0	>3.10 <sup>5</sup>	0	0	0	Tapis		0	0
Lot Enro +NP	0,25	0	0	0	0	1,3.10 <sup>4</sup>	0	0	0	Tapis	>3.10 <sup>5</sup>	0	0
	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	1,9.10 <sup>4</sup>	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



**Figure 22:** Résultat de l'étalement sur gradient de concentration de l'enrofloxacin à 0, 25 µg/ml aux jours J21 et J35



### 3.4- Effet du NP<sup>®</sup> sur l'évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT au thymol et à d'autres antibiotiques

Pour évaluer l'effet du NP<sup>®</sup> sur l'anti-biorésistance au thymol et aux différents antibiotiques testés, nous avons réalisé le dénombrement de la FMAT intestinale des dindonneaux traités au NP<sup>®</sup> 1g/L sur le gradient de concentration du thymol et sur les gradients de concentrations de différents antibiotiques testés : l'amoxicilline, l'oxytétracycline et l'enrofloxacin. Les résultats sont présentés dans le tableau 24 :

**Tableau 24:** Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale du lot traité au NP<sup>®</sup>

Jours		Nombre de la FMAT en UFC/g							
		J7		J21		J35			
Gradient en pourcentage		0-25	25-100	0-25	25-100	0-25	25-50	50-75	75-100
[ATB] en µg/ml									
<b>Amoxicilline</b>	<b>3</b>	1,3.10 <sup>4</sup>	0	Tapis	0	Tapis	>3.10 <sup>5</sup>	4,3.10 <sup>4</sup>	0
	<b>6</b>	0	0	9.10 <sup>3</sup>	0	Tapis	>3.10 <sup>5</sup>	0	0
	<b>12</b>	0	0	0	0	3,2.10 <sup>4</sup>	0	0	0
<b>Oxytétracycline</b>	<b>0,5</b>	8.10 <sup>3</sup>	0	>3.10 <sup>5</sup>	0	Tapis	4.10 <sup>3</sup>	0	0
	<b>1</b>	0	0	3.10 <sup>3</sup>	0	>3.10 <sup>5</sup>	0	0	0
	<b>2</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Enrofloxacin</b>	<b>0,25</b>	0	0	1,9.10 <sup>4</sup>	0	>3.10 <sup>5</sup>	2,2.10 <sup>4</sup>	0	0
	<b>0,5</b>	0	0	0	0	2,8.10 <sup>4</sup>	0	0	0
	<b>1</b>	0	0	0	0	1,1.10 <sup>3</sup>	0	0	0
<b>Thymol (en mg/ml)</b>	<b>0,5</b>	2.10 <sup>4</sup>	0	2,8.10 <sup>4</sup>	0	3,5.10 <sup>4</sup>	0	0	0

Les résultats du dénombrement sont représentés dans le tableau 24. Ils montrent que la FMAT des dindonneaux traités au NP<sup>®</sup> présente une sensibilité relative vis-à-vis du thymol et des trois antibiotiques testés. Aucune résistance notable ne s'est développée ni vis-à-vis du NP<sup>®</sup> ni vis-à-vis des trois antibiotiques. Ceci se voit par l'absence de croissance de la FMAT sur les portions les plus élevés des concentrations testées ainsi qu'une absence de croissance sur les concentrations les plus élevés de chacun des trois antibiotiques testés.

### 3.5- Évaluation de l'anti-biorésistance de la FMAT chez le lot témoin

Les résultats du dénombrement de la FMAT provenant des dindonneaux du lot témoin sont représentés dans le tableau 25. Ils montrent une absence de croissance de la FMAT sur les portions les plus élevées ainsi que sur les concentrations les plus élevées des différents antibiotiques testés.

**Tableau 25:** Évolution de l'anti-biorésistance de la FMAT intestinale du lot témoin

Jour		J7		J21		J35			
Gradient en pourcentage [ATB] en µg/ml		0-25	25-100	0-25	25-100	0-25	25-50	50-75	75-100
Amoxicilline	2	$6.10^3$	0	Tapis	0	Tapis	$>3.10^5$	$2,9.10^4$	0
	4	0	0	$1,6.10^4$	0	Tapis	$>3.10^5$	0	0
	6	0	0	0	0	$3,2.10^4$	0	0	0
Oxytétracycline	0,5	$7.10^3$	0	$1,3.10^4$	0	Tapis	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Enrofloxacin	0,25	0	0	$2,1.10^4$	0	Tapis	$1,2.10^4$	0	0
	0,5	0	0	0	0	$3,1.10^4$	0	0	0
	1	0	0	0	0	$3.10^3$	0	0	0
Thymol (en mg/ml)	0,5	$2,6.10^4$	0	$3,4.10^4$	0	$2,9.10^4$	0	0	0

#### 4. Évolution des paramètres zootechniques

##### 4.1- Évolution du poids vif moyen

Les résultats de l'effet de différents traitements sur l'évolution du poids vif moyen des animaux sont représentés dans le tableau 26 :

**Tableau 26:** Évolution du poids vif moyen des différents lots d'animaux (\*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001 comparé au lot témoin)

Lots d'animaux	Poids vif moyen (g)					
	J0	J7	J14	J21	J28	J35
<b>Lot Témoin (n=5)</b>	61,36 ±6,232a	91,22 ±4,984a	131,68 ±13,096a	197,24 ±21,792a	232,48 ±15,616a	286,8 ±15,44
<b>Lot Amox (n=5)</b>	73,42 ±2,576a	109,98 ±5,456 ***a	167,12 ±17,064 ***a	205,02 ±15,216a	247,24 ±22,312a	327,04 ±22,552*a
<b>Lot Oxy (n=5)</b>	64,32 ±10,632a	95,38 ±9,448a	144,86 ±18,056a	238,5 ±30,6***a	300,2 ±51,76****a	408 ±49,6 ***a
<b>Lot Enro (n=5)</b>	65,82 ±4,984a	98,28 ±11,784a	151,64 ±17,328a	215,34 ±32,928**a	248,8 ±38,44a	310,2 ±35,44a
<b>Lot NP (1g/L) (n=5)</b>	71,02 ±4,616a	114,74 ±13,072****a	174,66 ±12,208 ****a	236,34 ±7,328****a	315,22 ±10,496****a	418,8 ±15,04 ****a
<b>Lot NP (0,5g/L) (n=5)</b>	71,94 ±3,712a	101,92 ±5,464a	133,88 ±6,448 a	198,54 ±4,168a	236,98 ±9,056a	301,6 ±9,52a
<b>Lot Amoxy+Np (n=5)</b>	70,56 ±3,312a	115,96 ±8,192 ****a	174,34 ±14,232 ****a	240,14 ±15,592****a	315,02 ±15,736****a	420,4 ±18,08 ****a
<b>Lot Oxy+NP (n=5)</b>	59,82 ±3,072a	99,875 ±14,825a	140,675 ±15,7625a	231,125 ±11,875***a	294,15 ±15,15****a	373,25 ±16,7 ****a
<b>Lot Enro+NP (n=5)</b>	64,24 ±2,784a	113,56 ±5,71 ****a	165,38 ±7,504 ****a	232,68 ±16,376 ****a	296,32 ±19,216****a	386 ±30,4 ****a

Durant toute l'expérience, les poids moyens des lots d'animaux traités à l'un ou l'autre des trois antibiotiques associés au NP<sup>®</sup> étaient significativement plus importants que ceux du lot témoin et des lots traités aux antibiotiques seuls, à l'exception du lot d'animaux ayant reçu l'oxytétracycline qui ne présente pas de différence significative à la 5<sup>ème</sup> semaine avec ceux ayant reçu l'oxytétracycline associée au NP<sup>®</sup>. Les poids moyens des dindonneaux du lot traité au NP<sup>®</sup> à la dose 1g/L dans l'eau de boisson sont plus importants que ceux des dindonneaux du lot

traité au NP à raison de 0,5 g/L. Le lot témoin a montré le taux de croissance le plus faible par rapport aux autres lots.

#### 4.2- Évolution du gain de poids moyen

Les résultats de l'effet de différents traitements sur l'évolution du gain de poids (GP) des animaux sont représentés dans le tableau 27 :

Au cours des cinq semaines, le gain de poids des dindonneaux des différents lots expérimentaux traités est supérieur à ceux des dindonneaux du lot témoin. Au bout de la 5<sup>ème</sup> semaine, les gains de poids les plus importants ( $105,38 \pm 8,216$  ;  $103,58 \pm 8,024$  et  $102,8 \pm 11,04$ ) ont été notés respectivement chez les lots traités par l'association Amoxy+Np, au NP<sup>®</sup> seul (à 1 g/L) et à l'oxytétracycline seule, alors que le GP le plus faible de 58,32 g a été noté chez le lot témoin.

**Tableau 27:** Évolution du gain de poids moyen (\*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001 comparé avec le lot témoin)

Lots	Gain de poids moyen (g)					Gain Total (g)
	J0-J7	J7-J14	J14-J21	J21-J28	J28-J35	
<b>Lot Témoin</b> (n=5)	29,86 ±4,128	40,46 ±12,112	47,56 ±9,592	49,24 ±5,872	58,32 ±5,728	1127,2
<b>Lot Amoxy</b> (n=5)	36,56 ±7,496a	57,14 ±11,608***a	37,9 ±6,68a	42,22 ±7,096a	79,8 ±4,24 ****a	1268,1
<b>Lot Oxy</b> (n=5)	31,06 ±7,688a	49,48 ±8,696a	93,64 ±14,848 ****a	61,7 ±21,16 a	102,8 ±11,04 ****a	1718,4
<b>Lot Enro</b> (n=5)	32,46 ±12,688a	53,36 ±6,152*a	63,7 ±15,6*a	33,46 ±18,472 a	61,4 ±4 a	1221,9
<b>Lot NP</b> <b>(1g/L)</b> (n=5)	43,72 ±8,456*a	59,92 ±6,024 ****a	61,68 ±5,216 a	78,88 ±6,632 ****a	103,58 ±8,024 ****a	1738,9
<b>Lot NP</b> <b>(0,5g/L)</b> (n=5)	29,98 ±2,384a	31,96 ±3,488a	64,66 ±7,608*a	38,44 ±5,392 a	64,62 ±6,896 a	1148,3
<b>Lot</b> <b>Amoxy+Np</b> (n=5)	45,4 ±6,92**a	58,38 ±7,992 ***a	65,8 ±11,32 **a	74,88 ±14,944 **a	105,38 ±8,216 ****a	1749,2
<b>Lot OXY+NP</b> (n=5)	39,525 ±14,3875a	40,8 ±8,7a	90,45 ±10,9 ****a	63,025 ±11,025 **a	79,1 ±2,4 ***a	1251,6
<b>Lot</b> <b>Enro+NP</b> (n=5)	49,32 ±3,144****a	51,82 ±6,536a	67,3 ±11,8 **a	63,64 ±20,232 a	89,68 ±11,184 ****a	1608,8

#### 4.3- Évolution de la consommation alimentaire et de l'indice de consommation

La consommation alimentaire (CA) et les indices de consommation (IC) des différents lots sont représentés sur le tableau 28 :

**Tableau 28:** Évolution de la consommation alimentaire et de l'indice de consommation

Lots	Temps en semaines	Consommation alimentaire (g)					CA totale	Indice de consommation					I C total
		S1	S2	S3	S4	S5		S1	S2	S3	S4	S5	
Lot Amoxy		102	156	176	150	160	3720	2,78	2,73	4,64	3,55	2,00	2,93
Lot Oxy		74	150	150	200	220	3970	2,38	3,03	1,60	3,24	2,04	2,31
Lot Enro		86	100	140	164	182	3360	2,64	1,87	2,19	4,90	2,96	2,74
Lot NP (1g/L)		80	100	110	102	144	1738,9	1,82	1,66	1,78	1,29	1,39	1,54
Lot NP (0,5g/L)		96	96	92	117,5	125	2390	3,20	3,00	1,42	3,05	1,93	2,08
Lot Amoxy+Np		80	100	110	121	144,2	2776	1,76	1,71	1,67	1,61	1,36	1,58
Lot OXY+NP		75	87,5	97,5	105	130	2000	1,89	2,14	1,21	1,43	1,70	1,59
Lot Enro+NP		84	87,5	100	90	105	2030	1,70	1,68	1,48	1,41	1,39	1,26
Lot Témoin		94	94,2	114,4	120,6	142	2826	3,14	2,32	2,40	2,44	2,43	2,50

Durant les cinq semaines, la consommation alimentaire des dindonneaux des lots traités aux trois antibiotiques séparément est plus élevée que celle des dindonneaux des lots d'animaux ayant été abreuvés aux antibiotiques associés au NP<sup>®</sup> ou au NP<sup>®</sup> seul. Les indices de consommation les plus faibles ont été constatés chez les lots ayant reçu l'association de l'un ou l'autre des antibiotiques testés au NP<sup>®</sup> ou le NP<sup>®</sup> seul à raison de 1g/l.

#### IV. Discussion

Après avoir constaté l'effet bénéfique du NP<sup>®</sup> dans la lutte contre le phénomène de l'anti-biorésistance et dans l'amélioration des paramètres zootechniques chez le poulet de chair (Partie I), nous avons décidé d'effectuer une deuxième expérience chez les dindonneaux dans laquelle nous avons comparé l'effet de deux types de traitement : un traitement avec l'antibiotique seul et un traitement où cet antibiotique est associé au NP<sup>®</sup>. Pour cette raison, trois antibiotiques habituellement utilisés chez la dinde ont été choisis ; l'amoxicilline, l'oxytétracycline et l'enrofloxacin.

Durant toute l'expérience, le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) intestinale des dindonneaux a été suivi. Au jour J0, les résultats montrent que la charge intestinale des animaux dépasse  $10^{10}$  UFC/g, alors qu'une diminution significative (à  $p < 0,001$ ) chez les lots traités aux antibiotiques associés au NP<sup>®</sup> a été notée durant toute la durée de l'expérience (réduction supérieure à 90%). Pour ceux traités à l'un ou l'autre des trois antibiotiques ou au NP<sup>®</sup> seul, une diminution significative à  $p < 0,05$  par rapport au lot témoin a été constatée durant les trois premières semaines. Cependant, cette flore augmente légèrement chez les groupes traités durant les deux dernières semaines pendant lesquelles aucune différence significative avec le lot témoin n'a été notée (Tableau 16). Ces résultats montrent donc une équivalence d'efficacité entre le NP<sup>®</sup> et les antibiotiques dans la réduction de la FMAT, et démontrent aussi qu'il y a un effet synergique entre le NP<sup>®</sup> et les trois ATB. L'effet inhibiteur du NP<sup>®</sup> s'explique par le fait que le thymol fait partie des terpènes les plus efficaces contre les bactéries (Botelho *et coll.*, 2007; Du *et coll.*, 2015; Marchese *et coll.*, 2016). Aussi, plusieurs études ont rapporté que l'association des antibiotiques avec les huiles essentielles ou leurs composés majoritaires montrent une activité antibactérienne synergique (Nascimento *et coll.*, 2000 ; Betoni *et coll.*, 2006). D'autre part, Langeveld *et coll.* (2014) ont démontré que l'association du thymol avec la pénicilline a donné un effet synergique sur *E. coli* et Palaniappan et Holley (2010) ont rapporté que l'association du carvacrol avec la pénicilline a aussi induit un effet synergique sur *E. coli*.

Afin d'évaluer l'effet de l'association de l'un ou l'autre des trois antibiotiques (l'amoxicilline, l'oxytétracycline et l'enrofloxacin) avec le NP<sup>®</sup> sur le développement de l'anti-biorésistance chez *E. coli* entérique, nous avons isolé des souches d'*E. coli* de différents lots chaque semaine. Nous avons ensuite évalué leur sensibilité vis-à-vis des trois antibiotiques et vis-à-vis du thymol. Les résultats obtenus ont montré que les CMI des antibiotiques vis-à-vis des isolats d'*E. coli* des

lots traités aux antibiotiques seuls ont augmenté au fur et à mesure de la durée du traitement. Au bout de la 5<sup>ème</sup> semaine; les souches d'*E. coli* obtenues des lots traités à l'un des trois antibiotiques étaient résistantes à l'amoxicilline selon les recommandations d'EUCAST car la CMI est supérieure à 8 µg/ml (EUCAST, 2018), moins sensibles à l'oxytétracycline (CMI ≥ 0,8 µg/ml et à l'enrofloxacin avec une CMI supérieure à 3,84 µg/ml. Ces CMI étaient supérieures à celles obtenues avec les *E. coli* isolées des lots traités aux antibiotiques associés au NP<sup>®</sup>, au NP<sup>®</sup> seul ou du lot témoin. Les valeurs de CMI qui déterminent la résistance à l'enrofloxacin ou à l'oxytétracycline ne sont pas disponibles dans les recommandations d'EUCAST.

Ces résultats corroborent ceux obtenus par Van der Horst *et coll.* (2013) dans une étude réalisée chez les poulets où ils ont montré que l'ajout de l'amoxicilline, de l'enrofloxacin ou de l'oxytétracycline dans l'eau de boisson de poulets a induit la propagation et le développement de la résistance aux antibiotiques chez *E. coli* intestinale. Nos résultats confirment aussi ceux obtenus dans l'expérience précédente chez les poussins et appuient le fait que l'ajout des ATB dans l'eau de boisson de la volaille, permet de sélectionner des mutants résistants au bout d'une période de traitement assez courte (deux semaines). Nos résultats montrent aussi que l'association d'un antibiotique au NP<sup>®</sup> ne conduit pas à la sélection des souches d'*E. coli* résistantes. En effet, l'association des huiles essentielles ou de leur composés majoritaires aux antibiotiques, afin de lutter contre les bactéries résistantes a été rapporté (Ejim *et coll.*, 2011). Cette association a montré une activité antibactérienne synergique contre les bactéries résistantes aux antibiotiques ( Nascimento *et coll.*, 2000; Langeveld *et coll.*, 2014).

Concernant la CMI du thymol, elle n'a pas dépassée 0,25 mg/ml pour l'ensemble des isolats d'*E. coli* provenant de différents lots d'animaux. En effet, le thymol a un effet antibactérien sur *E. coli*. Cet effet a été attribué à la capacité de perméabiliser et de dépolariser la membrane cytoplasmique (Xu *et coll.*, 2008). En effet, plusieurs études ont rapporté que le thymol permet l'inhibition de la croissance de plusieurs espèces bactériennes (Botelho *et coll.*, 2007; Du *et coll.*, 2015; Marchese *et coll.*, 2016).

Après avoir observé l'efficacité de l'association du NP<sup>®</sup> aux antibiotiques sur les isolats d'*E. coli* provenant des animaux traités aux ATB seuls ou aux antibiotiques associés au NP<sup>®</sup>, il était nécessaire de vérifier cette efficacité non seulement sur des isolats d'*E. coli* mais aussi sur la flore intestinale globale. Une évaluation de la sensibilité de la FMAT aux ATB et au thymol a été effectuée par le dénombrement du nombre des colonies exprimé en UFC/g, sur des boîtes

contenant un gradient de concentration d'antibiotiques chez tous les groupes des animaux de l'expérience.

Les résultats obtenus montrent que suite au traitement aux ATB, la FMAT intestinale développe une résistance vis-à-vis de l'antibiotique utilisé pour le traitement et cela est illustré par la croissance sur toute la surface du gradient quelle que soit la concentration de l'ATB utilisée. Cependant, pour les animaux traités aux antibiotiques associés au NP<sup>®</sup>, la croissance de la FMAT est détectée seulement sur les faibles portions des faibles concentrations testées. Ceci montre qu'aucune résistance notable ne s'est développée ni vis-à-vis du thymol ni vis-à-vis de l'ATB utilisé pour le traitement. Ces résultats permettent de confirmer que l'association du NP<sup>®</sup> aux antibiotiques n'induit pas le phénomène de résistance aux antibiotiques.

Afin de voir l'effet de l'association des antibiotiques au NP<sup>®</sup> sur les performances de la croissance, nous avons évalué certains paramètres zootechniques ; le poids vif, le gain de poids, la consommation alimentaire et l'indice de consommation. Les résultats obtenus ont montré que les animaux du groupe témoin ont consommé une quantité de nourriture similaire à celle des groupes traités. Pourtant, les animaux de ce groupe ont montré le gain du poids le plus faible. Cependant, la meilleure performance zootechnique a été notée chez les animaux traités à l'amoxicilline associée au NP<sup>®</sup>, à l'oxytétracycline associée au NP<sup>®</sup>, à l'enrofloxacin associée au NP<sup>®</sup> ou au NP<sup>®</sup> seul. Ceci, apparaît aussi au niveau de l'indice de consommation qui est plus faible chez ces lots par rapport aux autres lots ayant reçu l'un ou l'autre des trois antibiotiques. Cela peut s'expliquer par la potentialisation de l'action des antibiotiques par le thymol, ce qui réduit la flore bactérienne qui affecte l'intégrité intestinale. Avec une flore intestinale équilibrée, les aliments peuvent être plus facilement absorbés, ce qui explique la différence de croissance entre les animaux. Une étude menée par Lee *et coll.* (2003) a également montré que le thymol augmentait l'activité de l'amylase intestinale du poulet, ce qui améliorerait leur croissance en augmentant la digestibilité des nutriments et en régulant la microflore intestinale. Cela confirme que le NP<sup>®</sup> pourrait jouer le rôle des antibiotiques promoteurs de croissance qui sont ajoutés à l'aliment pour diminuer la flore intestinale, afin que l'animal profite mieux des nutriments (Schwarz *et coll.*, 2001; Toghyani *et coll.*, 2010). En effet, au cours des dernières années, des extraits des plantes aromatiques ont été utilisés comme facteurs de croissance naturels, dans les industries du porc et de la volaille (Windisch *et coll.*, 2008; Franz *et coll.*, 2010; Suresh *et coll.*, 2018). Une large variété des plantes aromatiques et d'épices tels que le thym, l'origan, le romarin, la marjolaine, l'achillée, l'ail, le gingembre, le thé vert, le cumin noir, la coriandre et la



cannelle ont été utilisées en aviculture comme alternatives aux antibiotiques promoteurs de croissance (Suresh *et coll.*, 2018).

Notre étude a confirmé que l'usage du NP<sup>®</sup>, dont le principe actif est le thymol, soit seul soit en association avec les antibiotiques dans l'aviculture contribue à l'amélioration des performances de la croissance sans induire le phénomène de développement de résistance. Les résultats obtenus confirment qu'il y a une très bonne synergie d'action entre le NP<sup>®</sup> et les ATB.

**Partie III : Évaluation de l'action du NP<sup>®</sup> sur la charge bactériologique au niveau de la moelle osseuse du poulet de chair**

## **I- Introduction**

Les antibiotiques utilisés dans l'alimentation de la volaille conduisent à l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques (Barton, 2000; Aarestrup *et coll.*, 2001), compliquant ainsi l'antibiothérapie chez les animaux malades et les humains en cas de contamination (Castanon, 2007; Kieke *et coll.*, 2006). De toute évidence, la contamination des aliments par des agents pathogènes d'origine alimentaire résistants aux antibiotiques représente un risque majeur pour la santé publique (Van *et coll.*, 2007). Price *et coll.* (2007) ont démontré que les agents pathogènes zoonotiques résistants aux antibiotiques peuvent conduire à l'infection de l'Homme par différentes voies, y compris les produits carnés et avicoles.

Certaines bactéries intestinales chez la volaille peuvent passer dans le sang par rupture de la muqueuse intestinale, causée par des maladies entériques antérieures, telles que la coccidiose ou l'entérite nécrotique bactérienne et se retrouvent dans la moelle osseuse (Braga *et coll.*, 2016).

Dans cette partie du travail, nous avons mené une étude comparative de la charge bactériologique de la moelle osseuse prélevée au niveau des fémurs de poulets appartenant à un élevage ayant reçu les antibiotiques comme facteurs de croissance et de ceux ayant reçu le NP<sup>®</sup> comme additif alimentaire. Une évaluation de la fréquence de résistance aux antibiotiques des souches isolées a été effectuée.

Cette étude consiste à:

- Réaliser des prélèvements à partir de la moelle osseuse de fémurs de poulets, et mettre en culture la moelle osseuse après enrichissement sur des milieux spécifiques afin d'isoler et de purifier les germes présents.
- Étudier le profil de résistance des germes isolés par antibiogramme.

## **II- Matériel et méthodes**

### **1- Échantillonnage**

Vingt cuisses de poulets ont été prélevées à partir de l'élevage utilisant les antibiotiques comme facteurs de croissance dans l'alimentation, et vingt autres cuisses de poulets ont été prélevées à partir de l'élevage utilisant le NP<sup>®</sup> comme additif alimentaire. Puis les bouts de fémurs ont été découpés aseptiquement à l'aide d'un petit couteau stérile et aiguisé en les séparant de la chair.

### **2- Préparation des milieux de culture**

- ✓ Le milieu d'enrichissement bouillon cœur-cerveille (Brain Heart Infusion, BHI Biokar<sup>®</sup>) a été réparti dans des tubes à essai à raison de 5ml/tube puis stérilisé à l'autoclave et refroidi. Il a été utilisé pour l'enrichissement des échantillons prélevés.
- ✓ Le milieu gélose au sang a été utilisé pour l'isolement et la purification des germes enrichis. Après stérilisation à l'autoclave du milieu gélose au sang et refroidissement à 45°C, la quantité de sang nécessaire pour obtenir une concentration finale de sang de 5% a été ajoutée stérilement à l'aide d'une seringue stérile. Puis le milieu a été réparti dans des boîtes de Pétri.
- ✓ Le milieu tryptone caséine soja (TSA, Biokar<sup>®</sup>) a été préparé. Après répartition du milieu en tubes et autoclavage, les tubes ont été inclinés de manière à obtenir une pente oblique et un culot de 3 cm. Ils sont ensuite laissés se solidifier. Des boîtes de Pétri contenant le milieu TSA ont été aussi préparées. Les tubes ont été utilisés pour conservation des germes à 4°C et les boîtes ont été utilisées pour la culture.

### **3- Prélèvement et mise en culture de la moelle osseuse**

À l'aide de ciseaux stérilisés à l'alcool et à la flamme, un petit fragment d'os de fémur a été coupé aseptiquement, puis une partie de la moelle osseuse a été prélevée à l'aide d'un cure-dent stérile puis transféré dans des tubes contenant le milieu BHI et cela en duplicate. Une série de tubes a été incubée en aérobiose et l'autre en anaérobiose.

Afin d'assurer l'incubation en anaérobiose une couche d'huile de paraffine a été ajoutée à chaque tube. Les tubes inoculés ont été incubés à 37 °C pendant 24h.

### **4- Culture sur gélose au sang**

Après incubation des tubes inoculés par les échantillons de la moelle osseuse pendant 24h, des épuisements ont été effectués sur gélose au sang. Puis, les boîtesensemencées à partir des tubes

anaérobies ont été incubées en anaérobiose à 37°C pendant 24h dans des jarres anaérobies. Alors que les boîtes ensemencées à partir des tubes aérobies ont été incubées en aérobie à 37°C pendant 24h.

## **5- Purification des isolats**

La purification des isolats a été réalisée par épuisement de chaque colonie sur gélose au sang puis incubation à 37°C pendant 24h. Concernant les colonies obtenues sur les boîtes incubées en anaérobiose, elles ont été épuisées en duplicate dans le but d'une double incubation en aérobie et en anaérobiose afin de rechercher les isolats anaérobies stricts. Le type d'hémolyse produit sur gélose au sang a été noté.

Les isolats purifiés ont été transférés sur gélose nutritive TSA en tubes inclinés puis incubés à 37°C pendant 24h et ensuite stockés à 4°C.

## **6- Identification biochimique**

L'identification biochimique des bactéries isolées comporte une série d'étapes qui se succèdent dans un ordre déterminé. Les germes isolés ont été identifiés par des techniques microbiologiques standards : la coloration de Gram, le test catalase, le test oxydase et le test de fermentation du glucose et de lactose. Puis la galerie Api 20E a été utilisée pour l'identification des entérobactéries. Un test d'agglutination au latex a été aussi effectué pour identifier les isolats suspectés d'être des Streptocoques et un test de coagulation pour identifier ceux suspectés d'être du genre Staphylocoques. Les résultats obtenus au cours de chaque étape permettent l'orientation des démarches ultérieures.

### **6-1- Coloration de Gram**

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi des bactéries isolées, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme.

Elle nécessite d'avoir un frottis fixé, en effectuant classiquement une fixation simple à l'eau sur une lame en déposant une goutte d'eau distillée et en ajoutant à l'anse une colonie. La colonie est étalée et fixée à la chaleur. La coloration se fait ensuite en 4 étapes :

- La coloration au cristal violet : on laisse agir pendant une minute, et on rince à l'eau distillée

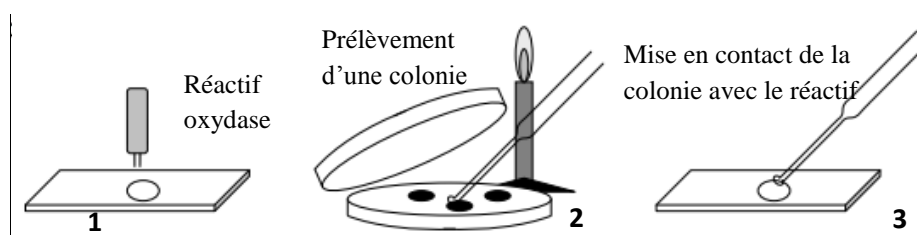
- La coloration au lugol où on laisse agir pendant une minute, et on rince à l'eau distillée.
- La décoloration rapide à l'alcool où on laisse agir 15 secondes, puis on rince abondamment à l'eau distillée pour stopper la décoloration.
- La recoloration à la fuchsine ; là aussi, on laisse agir pendant une minute puis on rince doucement à l'eau distillée.

Après ces 4 étapes, l'observation sous microscope avec une goutte d'huile à immersion est réalisée.

### 6-2- Test oxydase

La recherche de l'oxydase est parmi les critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif. Ce test consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semi-quinonique rose violacée.

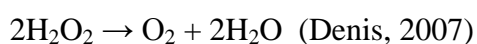
À l'aide d'une pince stérile, un disque d'oxydase est placé sur une lame porte objet. Puis, une colonie bien isolée et représentative de la culture fraîche est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur (Figure 22). Un frottement de la colonie sur le disque est réalisé et l'observation du résultat se fait après 30 secondes. Une réaction positive est indiquée par une coloration bleu foncé à violet apparaissant dans un délai de 30 secondes alors qu'une absence de coloration ou coloration au-delà de 30 secondes représente une réaction négative.



**Figure 23:** Le test oxydase

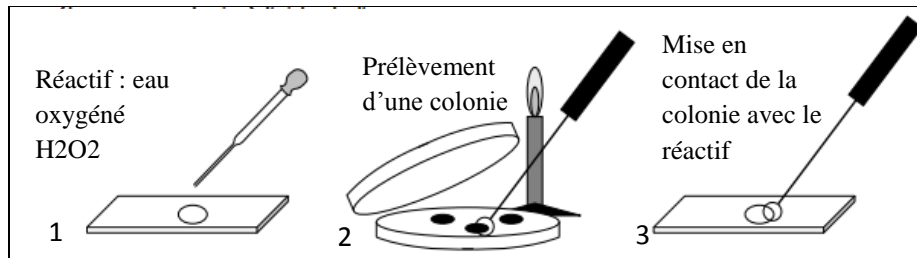
### 6-3- Test catalase

Le test catalase consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact avec le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène visible par la formation de bulles selon la réaction :



Une goutte d'eau oxygénée (= peroxyde d'hydrogène) est déposée sur une lame en verre, puis une colonie bactérienne est prélevée et dissociée dans la goutte déposée (Figure 23).

La recherche de la catalase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram positif. Elle permet de différencier les staphylocoques (catalase positifs) des streptocoques (catalase négatifs).



**Figure 24:** Le test catalase

#### 6-4- Test de fermentation de sucres (glucose, lactose)

Le milieu de Kligler (Biokar<sup>®</sup>) permet l'identification des entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose et du glucose (avec ou sans production de gaz), ainsi que de la production de sulfure d'hydrogène H<sub>2</sub>S. Ce milieu est préparé en tubes inclinés. L'utilisation du glucose ou du lactose par les bactéries fermentatives entraîne une acidification du milieu qui fait virer au jaune le rouge de phénol (indicateur pH) avec ou sans production de gaz. La révélation de la production de H<sub>2</sub>S se manifeste par un noircissement au niveau du culot.

Une colonie est ensemencée en réalisant une piqure centrale dans le culot et des stries serrées sur la pente de la gélose inclinée, puis les tubes sont incubés à 37°C pendant 24h.

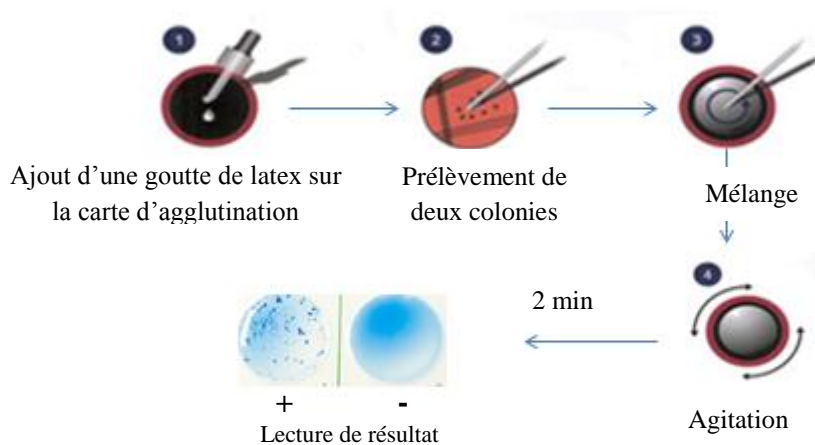
- Un virage au jaune de la pente indique un résultat positif pour l'utilisation du lactose et du saccharose.
- Un virage au jaune du culot indique un résultat positif pour l'utilisation du glucose.
- Un noircissement du milieu dans la zone joignant la pente et le culot indique une production de H<sub>2</sub>S.
- La présence de bulles de gaz dans le culot indique la production de gaz par les bactéries.

#### 7- Test d'agglutination au latex pour les streptocoques

L'identification des sérotypes bactériens fait appel aux méthodes d'agglutination fondées sur l'utilisation d'immuno-sérums polyvalents et monovalents reconnaissant des antigènes bactériens (Denis, 2007). Trois isolats Cocci à Gram positif, catalase négatif et oxydase négatif ont été suspectés d'être des Streptocoques. Sur la base du type d'hémolyse noté, les deux groupes B et D ont été recherchés en utilisant le test d'agglutination au latex.

Ce test est utilisé pour le groupage et l'identification des streptocoques des groupes A, B, C, D, F, et G. L'antigène spécifique de groupe, retrouvé au niveau de la paroi bactérienne (le polyoside C) est identifié par des particules de latex sensibilisées par un antisérum anti-streptocoque spécifique de ce groupe. La réaction antigène-anticorps se traduit par une agglutination visible à l'œil nu. Le latex reste en suspension homogène si l'antigène n'est pas présent (Slotved *et coll.*, 2004).

La suspension de latex a été homogénéisée avant utilisation par agitation du flacon puis une goutte est déposée dans un cercle d'une carte d'agglutination. Quelques colonies bien isolées sont prélevées à l'aide d'une pipette pasteur et déposées à côté de la goutte de latex. Ensuite, on mélange avec un bâtonnet de manière à répandre la suspension à la surface du cercle, puis un mouvement de rotation de la carte d'agglutination pendant deux minutes est effectué (Figure 24). Une réaction positive se traduit par une agglutination visible en deux minutes dans le cercle.



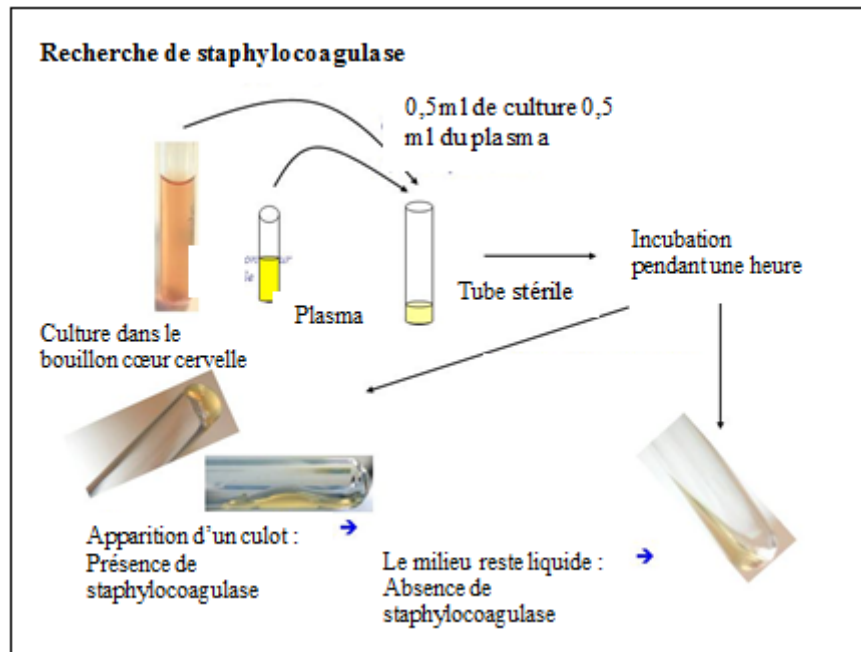
**Figure 25:** Les étapes du test d'agglutination au Latex

## 8- Test coagulase

La staphylocoagulase est une enzyme capable de faire coaguler le plasma sanguin. Elle permet de faire la distinction entre *Staphylococcus aureus* (coagulase positif) et les autres espèces de Staphylocoques (coagulase négatif).

Une culture de quelques colonies dans le bouillon BHI est incubée à 37°C pendant 24h. Ensuite, 500µl de la culture sont ajoutés à 500µl de plasma de lapin, puis incubés à 37°C pendant une heure. En cas de réaction positive, le fibrinogène, soluble dans le plasma, se transforme en fibrine solide, un caillot se forme alors au fond du tube (Figure 25).





**Figure 26:** Les étapes du test coagulase

### 9- Identification par Api 20 E

Les isolats à Gram négatif qui ont montré un pouvoir fermenteur du glucose ou du lactose ont été identifiés par la galerie Api 20E.

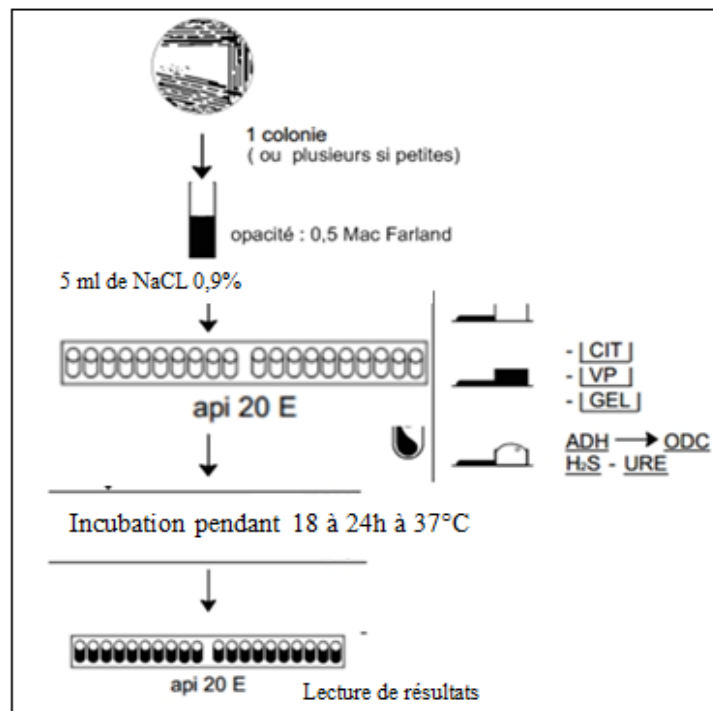
La galerie API 20E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et les autres bacilles à Gram négatif, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. Ce système comporte 20 cupules tests qui contiennent un milieu réactionnel déshydraté. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

Pour identifier les germes isolés, une colonie d'un isolat est transférée dans 5 ml de sérum physiologique stérile puis dispersée au vortex. Un inoculum bactérien de 0,5 Mac Farland est préparé. Ensuite, la galerie estensemencée avec une pipette Pasteur stérile ouverte remplie de suspension bactérienne, pointe posée sur un côté de la cupule, en laissant couler doucement la suspension dans la cupule, ceci en tenant la boîte légèrement inclinée pour éviter la formation de bulles d'air.

Pour les tests biochimiques encadrés (CIT, VP, GEL) : la cupule est remplie entièrement (tube et orifice) pour une mise en aérobiose (Figure 26).

Pour les tests biochimiques soulignés (ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE) : l'orifice de la cupule est rempli avec de l'huile de paraffine stérile pour une culture en anaérobiose. Après l'inoculation, les boîtes sont refermées et incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures (Figure 26).

L'interprétation de la galerie s'effectue après incubation, en se référant au tableau de lecture.



**Figure 27:** Procédure d'identification par la galerie Api 20E.

### 10- Test de sensibilité aux antibiotiques par antibiogramme

Le test de sensibilité des souches isolées et identifiées a été réalisé par la technique d'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton. Cette technique repose sur le principe de la compétition entre la croissance d'une bactérie et la diffusion, à partir de disques pré-imprégnés d'un antibiotique de concentration connue. On pratique, un ensemencement en tapis d'une suspension bactérienne d'une charge de 0,5 Mac Farland (préalablement préparée) sur le milieu MH gélosé, puis les disques pré-imprégnés d'antibiotiques sont placés à la surface du milieu et incubés à 37°C pendant 18 h à 24h. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice. La souche *E. coli* ATCC a été utilisée comme souche de référence pour le contrôle de la qualité des antibiotiques

utilisés. La résistance et la sensibilité ont été évaluées selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CASFM) (EUCAST, 2018).

Après 18 h d'incubation, les différents diamètres d'inhibition sont notés et comparés aux abaques de lecture.

Les antibiotiques utilisés sont choisis sur la base de la liste de CASFM (2020) (Tableau 29):

**Tableau 29:** les antibiotiques utilisés pour le test de sensibilité par antibiogramme

<b>Pour les souches à Gram négatif</b>	<b>Pour <i>Enterococcus</i></b>	<b>Pour <i>Streptococcus</i></b>	<b>Pour <i>Staphylococcus</i></b>
Ampicilline AMP, Amoxicilline/acide clavulanique AMC, Cefotaxime CTX, Céfoxitine FOX, Imipinème IPM, Norfloxacin NOR, Aztrioname AZT, Cefepime CFP, Amikacine AK, Acide nalidixique AN, Fosfomycine FOS, Fosfomycine/trometamol FOT, Triméthoprim-sulphaméthoxazole SXT, Céfixime CFM, Gentamicine GEN	Ampicilline AMP, Gentamicine GEN, Vancomycine VAN, Amoxicilline-acide clavulanique AMC, Penicilline Gp, Imipinème IPM, Norfloxacin NOR	Amoxicilline AMX Penicilline Gp, Cefotaxime CTX, Erythromycine E, Clindamycine CLI, Tétracycline TE, Gentamicine GEN, Vancomycine VAN, Norofloxacin NOR, Rifampicine RA, Bacitracine B, Cefepime CFP, Triméthoprim-sulphaméthoxazole SXT	Céfoxitine FOX, Gentamicine GEN, Erythromycine E, Clindamycine CLI, Norfloxacin NOR, Rifampicine RA, Pénicilline G, Vancomycine VAN, Tobramycine TOB, Tétracycline TE, Fosfomycine FOS

### **III- Résultats**

#### **1- Fréquence de prélèvements positifs**

La culture microbienne sur gélose au sang après enrichissement sur le milieu BHI a montré un résultat positif pour la totalité des prélèvements de moelle osseuse de poulets provenant d'un élevage utilisant les antibiotiques dans l'alimentation (20/20 sont positifs), alors que pour les prélèvements de moelle osseuse de poulets provenant d'un élevage utilisant le NP<sup>®</sup> comme additif alimentaire, nous avons noté une croissance pour 16 échantillons et aucune colonie bactérienne n'a poussé pour les 4 échantillons restants.

#### **2- Isolats identifiés**

##### **2.1- À partir de l'élevage utilisant les antibiotiques comme facteurs de croissance**

À partir des échantillons de moelle osseuse de fémurs de poulets provenant de l'élevage utilisant les antibiotiques, 34 souches ont été isolées. Elles sont représentées dans le tableau 30. La coloration de Gram des souches isolées a mis en évidence : des Coccis sphériques à Gram positif, en grappe de raisin ou en paires, colorés en violet (6 isolats), ainsi que des bacilles à Gram négatif colorés en rose souvent incurvés non sporulés (28 isolats). L'identification biochimique (test oxydase, test catalase, utilisation du glucose et du lactose) ainsi que l'utilisation de la galerie Api 20E ont identifiés des isolats à Gram négatif dont 15 isolats ont été identifiés *Aeromonas hydrophila* (provenant de 15 prélèvements différents), 4 isolats *Enterobacter aerogenes*, 5 isolats *Escherichia coli*, 2 isolats *Raoutella terrigena* et 2 isolats *Proteus mirabilis*. Concernant les 6 isolats à Gram positif, 3 isolats ont été identifiés *Streptococcus*, 2 isolats *Enterococcus* et un isolat *Staphylococcus aureus* (Tableau 30).

À partir de l'élevage utilisant les antibiotiques comme facteurs de croissance, aucune bactérie anaérobie stricte n'a été isolée.

**Tableau 30 :** Les souches bactériennes isolées à partir des fémurs de poulets de l'élevage utilisant les antibiotiques comme facteurs de croissance

Numéro d'échantillons	Isolats identifiés
1	<i>Aeromonas hydrophila, Enterobacter aerogenes</i>
2	<i>Aeromonas hydrophila</i>
3	<i>Aeromonas hydrophila, Streptococcus</i>
4	<i>Aeromonas hydrophila, Escherichia coli</i>
5	<i>Raoutella terrigena</i>
6	<i>Aeromonas hydrophila, Raoutella terrigena</i>
7	<i>Aeromonas hydrophila, Escherichia coli</i>
8	<i>Aeromonas hydrophila, Enterococcus</i>
9	<i>Aeromonas hydrophila, Proteus mirabilis</i>
10	<i>Aeromonas hydrophila,</i>
11	<i>Aeromonas hydrophila</i>
12	<i>Aeromonas hydrophila, Streptococcus</i>
13	<i>Proteus mirabilis</i>
14	<i>Aeromonas hydrophila, Escherichia coli</i>
15	<i>Aeromonas hydrophila, Streptococcus</i>
16	<i>Enterobacter aerogenes</i>
17	<i>Escherichia coli, Enterococcus</i>
18	<i>Aeromonas hydrophila, Staphylococcus aureus</i>
19	<i>Enterobacter aerogenes</i>
20	<i>Aeromonas hydrophila, Enterobacter aerogenes, Escherichia coli</i>

### 2.1- Isolats identifiés à partir de l'élevage utilisant le NP<sup>®</sup> comme additif alimentaire

À partir des échantillons de moelle osseuse de fémurs de poulets provenant de l'élevage utilisant le NP<sup>®</sup>, dix-sept souches ont été isolées (Tableau 31). Elles sont toutes à Gram négatif. L'identification biochimique (test oxydase, test catalase, utilisation du glucose et du lactose) ainsi que l'utilisation de la galerie Api 20E ont identifiés: 13 isolats d'*Aeromonas hydrophila* et 4 isolats d'*Escherichia coli*. Aucune bactérie anaérobie stricte n'a été isolée et aucune souche à Gram positif n'a été identifiée.

**Tableau 31:** Les souches bactériennes isolées à partir de la moelle osseuse de fémurs de poulets provenant de l'élevage utilisant le NP<sup>®</sup> comme additif dans l'aliment

Numéro d'échantillons	Isolats identifiés
1	<i>Aeromonas hydrophila</i>
2	<i>Escherichia coli</i>
3	----
4	<i>Aeromonas hydrophila</i>
5	<i>Escherichia coli</i>
6	<i>Aeromonas hydrophila</i>
7	<i>Aeromonas hydrophila</i>
8	<i>Escherichia coli</i>
9	<i>Aeromonas hydrophila</i>
10	---
11	<i>Aeromonas hydrophila</i>
12	<i>Aeromonas hydrophila</i>
13	<i>Aeromonas hydrophila</i>
14	---
15	<i>Aeromonas hydrophila</i>
16	<i>Aeromonas hydrophila, Escherichia coli</i>
17	---
18	<i>Aeromonas hydrophila</i>
19	<i>Aeromonas hydrophila</i>
20	<i>Aeromonas hydrophila</i>

### 3- Caractéristiques des souches identifiées

Les différentes souches isolées ont été identifiées en se basant sur les différents caractères étudiés, ce sont:

- ❖ ***Aeromonas hydrophyla***: Bacille à Gram négatif, β-hémolytique, oxydase positive, catalase positive, fermente le glucose avec production de gaz, ne fermente pas le lactose, ne produisant pas le H<sub>2</sub>S et les résultats de l'identification par la galerie Api 20E a donné une prédominance du biotype 7247124.
- ***Escherichia coli*** : Bacille à Gram négatif, non hémolytique, oxydase négative, catalase négative, fermente le glucose et le lactose avec production du gaz, ne produisant pas de H<sub>2</sub>S, l'Api20E a révélé une prédominance du biotype 5144572 (Figure 27).



**Figure 28:** Résultats de l'identification d'*E. coli* 5144572 par Api20E

- ***Raoutella terrigena*** : Bacille à Gram négatif, oxydase négative, catalase positive, fermente le glucose et le lactose avec production de gaz, ne produisant pas le H<sub>2</sub>S. L'identification par Api 20E a révélé le code 5205773 qui correspond à *Raoutella terrigena* à 68% et à *Klebsiella pneumonias* à 26% (Figure 28).



**Figure 29:** Résultats de l'identification de *Raoutella terrigena* 5205773 par Api20E

- ***Proteus mirabilis*** : Bacille à Gram négatif, oxydase négative, catalase positive, fermente le glucose avec production de gaz, ne fermente pas le lactose mais produit H<sub>2</sub>S. Le code donné par la galerie Api est 0737000.



**Figure 30:** Identification de *Proteus mirabilis* 0737000 par Api20E

- ***Enterobacter aerogenes*** : Bacille à Gram négatif, oxydase négative, catalase positive, fermente le glucose et le lactose sans production de gaz ni de H<sub>2</sub>S. Le code révélé par l'Api 20E est de 5105773.



**Figure 31:** Identification d'*Enterobacter aerogenes* 5105773 par Api20E

- *Enterococcus sp*: Cocci à Gram positif, disposés en diplocoques, oxydase négative, catalase négative, Ils croient en présence de 6,5 % de NaCl.
- *Streptococcus sp* : cocci à Gram positif disposé en chainettes, α-hémolytique, oxydase négative, catalase positive, le test d'agglutination au latex a montré un résultat positif avec le groupe D pour les 3 germes isolés.



**Figure 32:** Résultat positif du test d'agglutination au latex

- *Staphylococcus aureus* : Cocci à Gram positif disposés en amas, colonies jaunes dorés sur milieu Chapman, oxydase négative, catalase positive et coagulase positive.

#### 4- Taux de résistance aux antibiotiques des souches isolées partir de l'élevage utilisant les antibiotiques comme facteurs de croissance

##### 4.1- Profil de résistance des souches isolées

Le profil de résistance des 34 isolats obtenus à partir de l'élevage utilisant les antibiotiques, vis-à-vis des antibiotiques sélectionnés à partir de la liste d'antibiotiques proposés par le CA-SFM, est représenté sur les tableaux 32, 33, 34 et 35. Les 3 isolats de *Streptococcus* ont montré le même profil de résistance vis-à-vis des antibiotiques utilisés (Tableau 32), ils sont résistants à 7



antibiotiques qui sont: l'ampicilline, la pénicilline, la vancomycine, la bacitracine, l'érythromycine, la clindamycine et la tétracycline. Les deux isolats d'*Enterococcus sp* sont résistants à 3 antibiotiques : l'ampicilline, la pénicilline et à la vancomycine (Tableau 33). La souche de *Staphylococcus aureus* isolée a montré une résistance à la pénicilline G, à la gentamycine, à la tobramycine TOB et à la tétracycline.

Concernant les souches à Gram négatif, la résistance a été observée à des niveaux variables entre les 16 antibiotiques utilisés et selon l'échantillon (Tableau 35). Concernant la souche *Enterobacter aerogenes*, la résistance à l'amoxicilline, à l'ampicilline et à la céfoxitine est une résistance naturelle selon le CASFM, 2020.

**Tableau 32:** Profil de résistance des 3 souches de *Streptococcus sp*

Isolats	AMP	P	CFP	CTX	NOR	GEN	RA	VA	B	E	CLI	TE
<i>Streptococcus sp (3)</i>	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
<i>Streptococcus sp (12)</i>	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
<i>Streptococcus sp (15)</i>	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R

**Tableau 33:** Profil de résistance des 2 *Enterococcus sp*

Isolats	AMP	P	AMC	IPM	GEN	OFX	VA
<i>Enterococcus sp (8)</i>	R	R	S	S	S	S	R
<i>Enterococcus sp (17)</i>	R	R	S	S	S	S	R

**Tableau 34:** Profil de résistance de *Staphylococcus aureus*

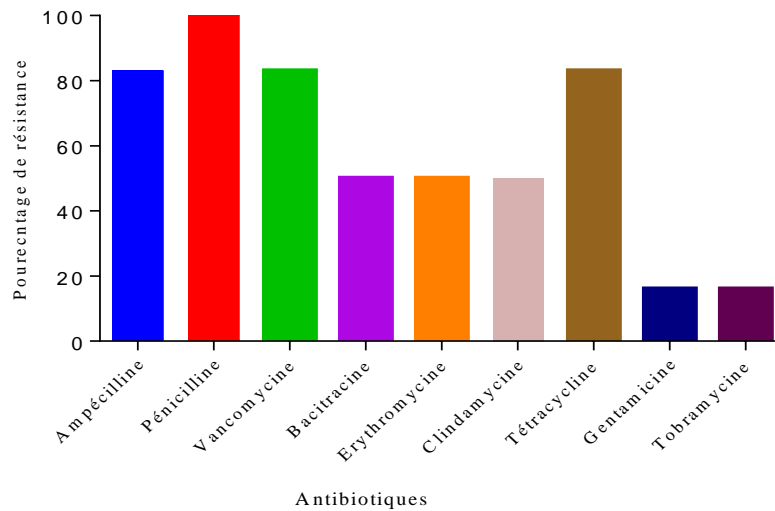
Isolat	PG	NOR	FOX	E	CLI	RA	VAN	FOS	GEN	TOB	TE
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R

**Tableau 35:** Profils de résistance des isolats à Gram négatif

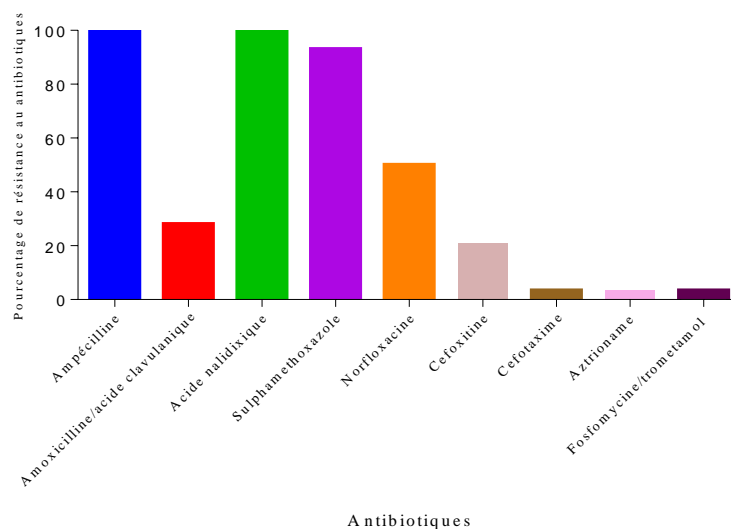
Prélèvement	Isolats	AMP	AMC	CTX	CAZ	CFP	AZT	IPM	FOT	GN	AK	SXT	CFM	CFP	NOR	FOX	NA
1	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
2	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R
3	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R
4	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R
	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
5	<i>Raoutella terrigena</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R
6	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R
	<i>Raoutella terrigena</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R
7	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R
	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	R
8	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R
9	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R
	<i>Proteus mirabilis</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R
10	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
11	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R
12	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R
13	<i>Proteus Mirbilis</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	R
14	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R
	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R
15	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R
16	<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R
17	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	R
18	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R
19	<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R
20	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R
	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	R

## 4.2- Résistance aux différents antibiotiques

Les pourcentages de résistance aux différents antibiotiques sont représentés sur les figures 32 et 33.



**Figure 33:** Taux de résistance des souches à Gram positif aux antibiotiques



**Figure 34:** Taux de résistance des souches à Gram négatif aux antibiotiques

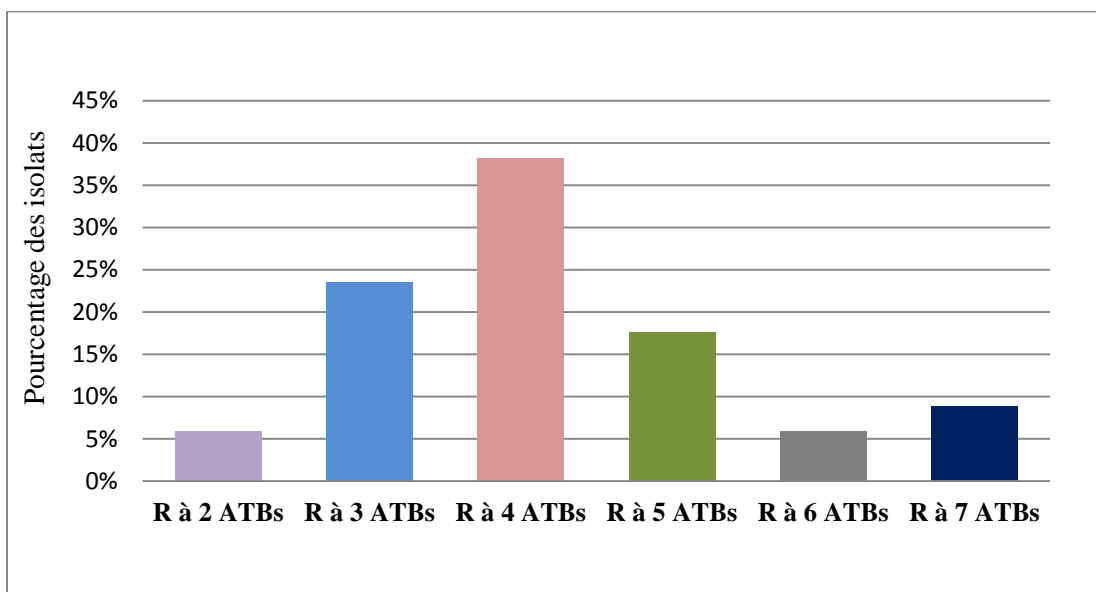
Pour les souches à Gram positif, un pourcentage de résistance de 100% a été noté pour la pénicilline. Pour l'ampicilline, la vancomycine et la tétracycline, un pourcentage de résistance des souches de 83% a été noté. Pour la bacitracine, l'érythromycine et la tétracycline, un

pourcentage de résistance de 50% a été constaté et un pourcentage de résistance de 16% a été noté pour la gentamicine et la tobramycine.

Pour les 28 souches à Gram négatif, elles sont toutes résistantes à 100% à l'ampicilline et à l'acide nalidixique. 26 isolats sont résistants à la triméthoprim-sulphaméthoxazole SXT (taux de 93%), 14 souches sont résistantes à la norfloxacine NOR (50%) et 4 autres souches ont montré un niveau de résistance intermédiaire (14%), 8 souches sont résistantes à l'amoxicilline/acide clavulanique (avec un taux de 28%), 6 isolats sont résistants à la cefoxitine Fox à 21%. Une seule souche est résistante à la cefotaxime CTX, à l'aztrioname AZT et à la fosfomycine/trometamol FOT.

#### 4.3-Multi-résistance des souches isolées

La fréquence de multi-résistance chez les souches isolées de l'élevage utilisant les antibiotiques dans l'alimentation de poulet est représentée sur la figure 34.



**Figure 35:** Pourcentage de multi-résistance chez les souches isolées à partir de l'élevage utilisant les antibiotiques comme facteurs de croissance.

Les résultats montrent que sur les 34 souches étudiées, il en ressort que 9% des isolats sont résistants à 7 antibiotiques (les trois isolats de *Streptococcus*), 6% des isolats sont résistants à 6 antibiotiques (2 isolats d'*Escherichia coli*), 18% sont résistants à 5 antibiotiques (6 isolats dont trois *Aeromonas hydrophyla* et trois *Enterobacter aerogenes*), 38% sont résistants à 4 antibiotiques (13 isolats dont 9 souches d'*Aeromonas hydrophyla*, une de *Proteus mirabilis*, une d'*Escherichia coli*, une *Raoutella terrigena* et une souche *Staphylococcus aureus*), 24% des isolats sont résistants à 3 antibiotiques (8 isolats dont deux *Enterococcus*, deux

*Escherichia coli*, deux *Aeromonas hydrophyla*, une *Raoutella terrigena* et une *Proteus mirabilis*) et 6% sont résistants à 2 antibiotiques au même temps (2 isolats, une *Aeromonas hydrophyla* et une *Enterobacter aerogenes*).

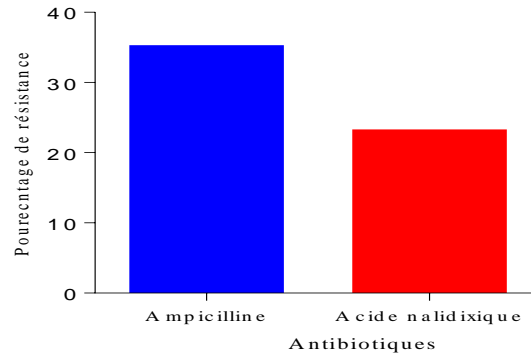
## **5- Profil de résistance aux différents antibiotiques des souches isolées à partir de l'élevage utilisant le NP<sup>®</sup> comme additif alimentaire**

### **5.1- Taux de résistance des souches isolées**

Le profil de résistance des 17 isolats obtenus de la moelle osseuse de fémurs de poulets provenant de l'élevage utilisant le NP<sup>®</sup> comme additif alimentaire, vis-à-vis des antibiotiques sélectionnés à partir de la liste des antibiotiques proposés par le CA-SFM, est représenté dans le tableau 36. Pour l'ensemble des souches testées, le niveau de résistance est très bas par rapport à celui obtenu chez les isolats provenant de l'élevage utilisant les antibiotiques comme facteurs de croissance. Un taux de résistance des bactéries isolées de 35% a été obtenu pour l'ampicilline (6 isolats résistants à l'ampicilline) et un taux de 24% a été obtenu pour l'acide nalidixique (4 isolats résistants à l'AN). Pour les autres antibiotiques testés aucune résistance n'a été notée (Figure 35).

**Tableau 36:** Profil de résistance des bactéries à Gram négatif provenant de la moelle osseuse de fémurs de poulet provenant de l'élevage utilisant le NP® comme additif alimentaire

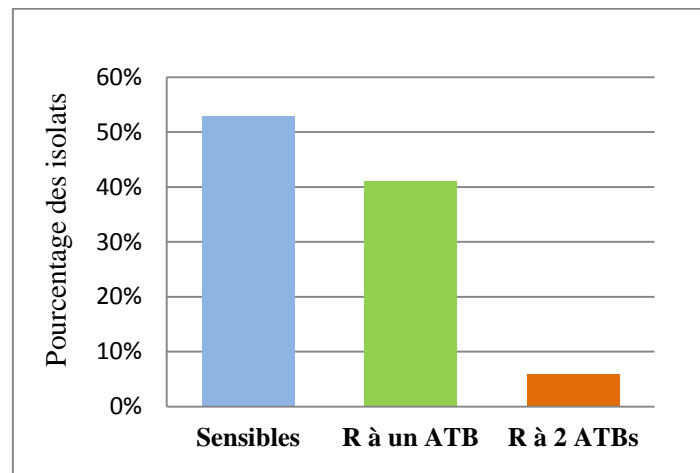
Prélèvements	Isolats	AMP	AMC	CTX	CAZ	CFP	AZT	IPM	FOT	GN	AK	SXT	CFM	NOR	FOX	NA
1	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
8	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
11	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	<i>Aeromonas hydrophila</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
13	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
16	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
19	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
20	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S



**Figure 36:** Pourcentage de résistance des souches isolées aux antibiotiques

### 5.2 - La multi-résistance des souches isolées

En ce qui concerne la multi-résistance (Figure 36), une résistance à deux antibiotiques ; l’ampicilline et l’acide nalidixique a été notée chez une seule souche d’*Aeromonas hydrophyla*, alors que 40% des souches sont résistantes à un seul antibiotique seulement. Pour les 47% des isolats restants, ils n’ont pas montré de résistance et ils sont sensibles à tous les antibiotiques testés (Figure 36).



**Figure 37:** Illustration de multi-résistance chez les souches isolées de la moelle osseuse de fémurs de poulets provenant de l’élevage utilisant la NP<sup>®</sup>

## VI. Discussion

Le but de la présente étude était de comparer la charge bactérienne au niveau de la moelle osseuse de fémurs de poulets provenant d'un élevage ayant reçu des antibiotiques comme promoteurs de croissance à celle d'un autre élevage ayant utilisé le NP<sup>®</sup> comme additif alimentaire (le NP<sup>®</sup> est un produit à base du thymol, connu pour son effet antimicrobien, mis au point et breveté par notre laboratoire).

À partir de différents échantillons prélevés des os de fémurs, nous avons isolé au total 51 souches bactériennes. Après caractérisation préliminaire de ces souches (forme, coloration de Gram, test catalase, test oxydase), leur identification s'est faite à l'aide des galeries API 20E pour les bactéries à Gram négative, par le test d'agglutination au latex pour les souches de Streptocoques, par le test de coagulase pour les Staphylocoques et par la culture en présence de 6,5% de NaCl pour les Enterocoques.

Nous avons remarqué que les germes *Raoutella terrigena*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Staphylococcus aureus* n'ont été isolées qu'à partir des poulets de chair provenant de l'élevage ayant utilisé les antibiotiques comme facteurs de croissance alors qu'ils n'ont pas été isolés à partir des échantillons prélevés de l'élevage ayant utilisé le NP<sup>®</sup>. Seules *Escherichia coli* et *Aeromonas hydrophyla* ont été isolés des deux élevages. Ces résultats indiqueraient que le NP<sup>®</sup> lutte contre le passage des germes pathogènes dans la moelle osseuse de poulet.

Concernant les souches isolées de la moelle osseuses de poulets provenant de l'élevage ayant utilisé les antibiotiques comme facteurs de croissance: une seule souche de *Staphylococcus aureus* a été isolée. Elle était résistante à 4 antibiotiques. Il a été rapporté que *S. aureus* est une cause importante de maladies chez la volaille (McCullagh *et coll.*, 1998; Hazariwala *et coll.*, 2002). Hazariwala *et coll.* (2002) et white *et coll.* (2003) ont rapporté que *S. aureus* est un isolat commun du sac vitellin et du foie de poulets de chair et de dindes comme germe pathogène. De plus, *S. aureus* est généralement associé aux infections osseuses et articulaires, aux abcès et aux dermatites aviaires (Mal *et coll.*, 2002; White *et coll.*, 2003).

Également, deux souches d'*Enterococcus* ont été identifiées. Elles étaient aussi résistantes à la vancomycine (ERV : *Enterococcus* Résistant à la Voncomycine). En Europe, les infections par les ERV tout au long de la chaîne alimentaire, allant des animaux à l'homme, ont été rapportées (Wegener *et coll.*, 1999). D'après Boerlin *et coll.* (2001), l'utilisation de l'avoparcine et de la tylosine a été associée à un taux élevé d'entérocoques résistants à la vancomycine et à l'érythromycine chez les animaux d'élevage. Des isolats d'*Enterococcus*



résistants aux antibiotiques issus de productions animales ont été rapportés (Hazariwala *et coll.*, 2002; Jackson *et coll.*, 2007; Aslam *et coll.*, 2012). Les deux isolats d'*Enterococcus* identifiés dans cette étude sont tous les deux résistants à l'ampicilline, à la pénicilline et à la vancomycine. Un taux de résistance de 100% a été révélé dans une étude réalisée en Afrique du Sud sur 341 isolats d'*Enterococcus* provenant de vaches laitières (Iweriebor *et coll.*, 2016). Les germes du genre *Proteus* ont été isolés à partir de deux échantillons. En effet, les *Proteus* sont des pathogènes opportunistes, responsables de diarrhées chez la volaille (Gaastra *et coll.*, 1996). Les souches *Proteus* isolées ont montré une résistance à 4 antibiotiques : l'ampicilline, la triméthoprim-sulphaméthoxazole, la norfloxacine et l'acide nalidixique.

Le genre *Streptococcus* a été isolé à partir de trois échantillons, les trois souches isolées ont été identifiées comme étant des souches du groupe D et ont présenté une résistance à 7 antibiotiques. C'est en Hollande et au Royaume-Uni en 1950 que les premiers cas de septicémie chez le porc dus à une infection à streptocoques ont été mis en évidence. Des streptocoques ont été isolés également chez des poulets de chair adultes atteints de septicémie par Collins *et coll.* en 2002.

Deux souches de *Raoultella terrigena* ont été identifiées. Il est rapporté que cette souche est répandue chez les oiseaux (Marietto-Gonçalves *et coll.*, 2018). Les espèces de *Raoultella* se trouvent généralement dans l'environnement (sol, plantes et eau) et certaines souches peuvent également être présentes dans les voies respiratoires et intestinales des volailles (Sękowska, 2017).

Quant aux deux souches d'*Escherichia coli* et d'*Aeromonas hydrophyla*, elles ont été les plus isolées à la fois à partir des poulets ayant reçus des antibiotiques (15 souches d'*A. hydrophyla* et 5 souches d'*Escherichia coli*) et ceux ayant reçu le NP<sup>®</sup> (13 souches d'*A. hydrophyla* et trois souches d'*Escherichia coli*). Le germe *A. hydrophyla* est le plus fréquemment isolé puisqu'il est présent dans environ 75% des échantillons. La présence d'*Aeromonas* sp dans la flore intestinale des poules a déjà été révélée par Dho et Mouline en 1983 (Dho et Mouline, 1983). Concernant la souche d'*E.coli*, elle est communément retrouvée dans le tractus intestinal des animaux, mais seuls certains sérotypes pathogènes présentant des facteurs de virulence sont généralement responsables de maladies dont la colibacillose aviaire qui désigne toute infection localisée ou systémique provoquée entièrement ou partiellement par *E.coli* pathogène (Gonzalez *et coll.*, 1990). En effet, la souche *E. coli* est connue comme agent pathogène majeur en aviculture, contribuant de manière significative aux pertes économiques des poulets et des dindes (Dadheech *et coll.*, 2016). Dans cette étude, la présence d'*E. coli* et d'*A. hydrophyla* ainsi que des autres souches identifiées dans la moelle osseuse peut

s'expliquer par le passage dans le sang par rupture de la muqueuse intestinale, causée par des maladies entériques antérieures, telles que la coccidiose ou l'entérite nécrotique bactérienne et qui se retrouvent dans la moelle osseuse (Braga *et coll.*, 2016), ou par le passage à travers des fissures au niveau des pattes de poulets souffrant des maladies tels que les pododermatites et les arthrites nécrotiques (Maier *et coll.*, 2015).

En comparant la fréquence de résistance chez les deux souches d'*A. hydrophyla* et d'*E. coli*, nous avons constaté que celles isolées à partir des poulets ayant reçu le NP<sup>®</sup> sont plus sensibles : 53% des isolats d'*A. hydrophyla* et d'*E. coli* ont montré une sensibilité à tous les antibiotiques testés, 41% ont montré une résistance à un seul antibiotique et seulement 6% ont montré une résistance aux deux antibiotiques; l'ampicilline et l'acide nalidixique. Par contre, les souches d'*A. hydrophyla* et d'*E. coli* provenant des poulets ayant reçu des antibiotiques comme facteurs de croissance présentaient une multi-résistance jusqu'à six antibiotiques. Ces résultats, ainsi que le profil de résistance de la totalité des souches isolées confirment que l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissance dans le domaine avicole exercent inévitablement une pression de sélection qui favorise le développement des bactéries multi-résistantes. En 1998, Boonmar *et coll.* avaient déjà relevé une augmentation des bactéries anti-biorésistantes chez des poulets congelés en Thaïlande (de 1993 à 1994). Ces auteurs ont expliqué cette augmentation de la résistance par l'ajout incontrôlé d'antibiotiques dans l'alimentation des poulets. Et d'après le rapport de l'Office Fédérale de la Santé Publique en Suisse sur la multi-résistance des bactéries dans le domaine de la médecine vétérinaire, ces multi-résistances pourraient être acquises suite à l'usage des antibiotiques dans les élevages avicoles.

En analysant le profil de résistance des souches provenant des poulets ayant reçu les antibiotiques, nous remarquons aussi que tous les germes isolés ont présenté une résistance à l'acide nalidixique, à l'ampicilline, et à la pénicilline (cas des germes à Gram positif). La fréquence de résistance à l'acide nalidixique est très élevée. En se référant à l'étude réalisée par Farsal *et coll.* (2004), au Maroc, un taux de résistance à l'acide nalidixique de 72,54% a été rapporté chez des souches d'*Escherichia coli* isolées des poussins au Maroc, alors qu'un taux moins élevé de 44% a été rapporté par Blanco *et coll.* en Espagne en 1997. Concernant le taux élevé de résistance à l'ampicilline ( $\beta$ -lactamine), il est supérieur au taux de résistance à l'amoxicilline rapporté par Abd El Tawab *et coll.* en 2015 (73%). Un taux moins élevé a été noté pour l'amoxicilline/acide clavulanique, cela peut s'expliquer par le fait que l'acide clavulanique ajouté à l'amoxicilline inhibe les  $\beta$ -lactamases. Donc, en alimentation animale

les trois antibiotiques ; l'acide nalidixique, l'ampicilline et la pénicilline devraient être utilisés de façon très prudente afin de limiter l'expansion de la résistance chez les bactéries. L'ampicilline et la pénicilline appartiennent à la famille des bêta-lactamines qui agissent en inhibant la synthèse du peptidoglycane après fixation sur un récepteur protéique membranaire : le PBP (Penicillin Binding Protein). Ainsi, la résistance à l'ampicilline induit la résistance à la pénicilline (Fernandes *et coll.*, 2013). De plus, les bactéries résistantes aux bêta-lactamines (pénicilline, amoxicilline, ampicilline, céfixime, etc) produisent des bêta-lactamases qui inactivent les antibiotiques appartenant à cette famille. L'utilisation de bêta-lactamines et des inhibiteurs de bêta-lactamases (acide clavulanique, sulbactame) peut résoudre ce problème (Fernandes *et coll.*, 2013), cela s'illustre dans nos résultats par la diminution du pourcentage de résistance après utilisation de l'amoxicilline + acide clavulanique (23% des souches). Cependant une résistance à ces inhibiteurs comme l'acide clavulanique et la sulbactame a aussi été rapportée (Oteo *et coll.*, 2008).

Quant à l'enrofloxacin, nous avons obtenus un taux de résistance de 50%. En le comparant avec des taux de 23%, 13%, 4 %, rapportés par d'autres auteurs (Zian *et coll.*, 1992 ; Chorfi *et coll.*, 1994 ; Zekhnini *et coll.*, 2009) on peut dire qu'il y a eu une nette augmentation de la résistance vis-à-vis cet antibiotique. Une étude plus récente réalisée par Gazzar *et coll* en 2015 a révélé un taux de résistance plus élevé de 93,81% chez des souches d'*E. coli* isolées chez le poulet de chair au Maroc. Cette augmentation du taux de résistance peut s'expliquer par le mécanisme de résistance non compliqué associé à une utilisation abusive et anarchique de cet antibiotique mais aussi au non-respect des posologies au cours du traitement (Ndiaye, 2010).

Enfin, en analysant le profil de résistance des souches isolées, nous pouvons déceler la présence de résistances croisées causées par les antibiotiques appartenant à la même classe. En effet, les antibiotiques qui appartiennent à la même classe agissent par le même mécanisme d'action (Courvalin, 2008), et les bactéries cibles peuvent leur résister par un mécanisme identique. C'est ce qui est à l'origine des résistances croisées (Courvalin, 2008). C'est l'exemple de l'acide nalidixique et la norfloxacin qui appartiennent à la classe des quinolones et sont utilisées en élevage avicole. Ces antibiotiques agissent par l'inhibition sélective de la synthèse de l'ADN bactérien en agissant sur deux enzymes impliqués dans cette synthèse: l'ADN gyrase et l'ADN topo- isomérase IV (Hooper, 1995).

Notre étude a confirmé que l'utilisation irraisonnée des antibiotiques dans les élevages des animaux entraîne la sélection des bactéries résistantes aux antibiotiques. Actuellement, il est bien connu qu'il y a un transfert de gènes de résistances des souches résistantes aux antibiotiques des animaux à l'Homme par la chaîne alimentaire, par contamination à travers le

personnel d'élevage avicole ainsi que dans les abattoirs et les usines de production (Van den Bogaard, 2000; Liu *et coll.*, 2016).

Dans cette étude, l'évaluation de la charge bactériologique au niveau de la moelle osseuse des fémurs de poulets a révélé un taux de contamination élevé chez les échantillons provenant de l'élevage utilisant les antibiotiques comme facteurs de croissance par rapport à celui détecté chez les échantillons provenant de l'élevage utilisant le NP<sup>®</sup> comme additif alimentaire. À partir de l'élevage utilisant les antibiotiques, 34 souches (28 isolats à Gram négatif et 6 isolats à Gram positif) ont été isolées et l'évaluation de leur anti-biorésistance a démontré un taux de résistance élevé par rapport à celui trouvé chez les souches isolées de l'élevage utilisant le NP<sup>®</sup> comme additif alimentaire (13 isolats à Gram négatif seulement).

Notre étude a confirmé que l'usage des antibiotiques dans l'aviculture contribue à l'émergence des bactéries résistantes aux antibiotiques chez les poulets de chair. Les résultats obtenus ont démontré que le NP<sup>®</sup> serait une bonne alternative aux antibiotiques utilisés dans l'alimentation de la volaille car il lutterait contre le phénomène de l'anti-biorésistance.

**Partie IV : Mise au point d'un traitement alternatif pour la lutte contre l'ostéomyélite à SARM utilisant l'amoxicilline/acide clavulanique, la gentamicine ou quatre composés majoritaires d'HE *in vitro* et *in vivo***

## I- Introduction

L'ostéomyélite est une infection bactérienne de la moelle osseuse dont l'agent causal le plus courant est *Staphylococcus aureus* ( Tong *et coll.*, 2015; Groll *et coll.*, 2018). L'infection osseuse à *S. aureus* provoque une destruction rapide de l'os et une propagation de l'infection aux tissus environnants (Gaudin *et coll.*, 2011). *Escherichia coli* est également impliquée dans l'ostéomyélite et a été isolée chez les patients atteints d'ostéomyélite chronique (Carek *et coll.*, 2001; Nolla *et coll.*, 2002). Cette infection est responsable chaque année de mortalité et de morbidité dans le monde et les coûts de traitement sont élevés (Gaudin *et coll.*, 2011). Pour le traitement des infections des os, la vancomycine est l'antibiotique de choix. Cependant, la résistance des staphylocoques à la vancomycine a été rapportée dans plusieurs travaux (Walters *et coll.*, 2015, Taghipour *et coll.*, 2018). Dans ce contexte, de nouvelles alternatives s'imposent pour surmonter la résistance de plus en plus croissante des souches de *S. aureus* et pour améliorer le traitement des infections des os.

Les travaux réalisés dans notre laboratoire, dont le thème principal est l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et de leurs composés majoritaires, ont démontré l'activité antibactérienne *in vitro* et *in vivo* sur des espèces à Gram+ et à Gram- ( Rhayour *et coll.*, 2003; Remmal *et coll.*, 2011; Mzabi *et coll.*, 2019). Il s'est avéré que les huiles essentielles ont l'avantage de ne pas induire la production de mécanismes de résistance contrairement aux agents antimicrobiens classiquement utilisés (Ohno *et coll.*, 2003; Gomes Neto *et coll.*, 2012; Sienkiewicz *et coll.*, 2017). En outre, l'association des huiles essentielles ou de leur composés majoritaires aux antibiotiques afin de lutter contre les bactéries résistantes a été rapportée (Ejim *et coll.*, 2011). Cette association a montré une activité antibactérienne synergique contre les bactéries résistantes aux antibiotiques (Nascimento *et coll.*, 2000; Langeveld *et coll.*, 2014).

La présente étude a pour objectif de mettre au point une alternative aux antibiotiques utilisés pour traiter l'ostéomyélite à SARM en les associant aux composés majoritaires des HE. Cette étude a consisté à tester, *in vitro*, l'effet de la combinaison des composés majoritaires: le thymol, le carvacrol, l'eugénol ou le 1,8-cinéol à deux antibiotiques ; l'amoxicilline/acide clavulanique (AMC) et la gentamycine en utilisant la méthode d'association en microplaque (Checkerboard Assay) à la recherche d'une éventuelle synergie d'action. Nous avons ensuite évalué, *in vivo*, l'effet de l'amoxicilline et de la gentamicine soit séparément soit en combinaison avec le 1,8-cinéol sur un modèle d'ostéomyélite expérimentale aiguë chez le lapin.

## II- Matériel et méthodes

### Test in vitro

#### 1. Composés majoritaires

Les quatre composés majoritaires phénoliques utilisés à l'état pur dans ce travail sont: le thymol, l'eugénol, le carvacrol, et le 1,8-cinéol. Ils ont été fournis par Sigma (France).

##### 1.1- Procédure de dispersion des composés majoritaires des huiles essentielles

Les composés majoritaires utilisés dans cette étude ont été mis en émulsion à la concentration 1/10<sup>ème</sup>, préparée en ajoutant 100 µl de chacun des composés majoritaires à 900 µl d'une solution stérile d'agar-agar à 0,2 % (w/v) selon la technique mise au point dans notre laboratoire par Remmal *et coll.* (1993b). Le choix de cette concentration d'agar-agar a été fixé après des tests préalables de concentrations croissantes (allant de 0,1 % à 0,9 %). La concentration de 0,2 % a été retenue car elle permet l'obtention d'une solution colloïdale sans gélification et où l'HE reste bien dispersée.

##### 1.2- Préparation de la suspension mère de thymol

Le thymol, constituant majoritaire de l'HE de thym commercialisé par Sigma (France) sous forme de poudre cristallisée a été liquéfié dans un bain-marie à 50 °C ou dans l'étuve à 40 °C puis ajouté à une solution de 0,2 % d'agar à la concentration de 10 % (Remmal *et coll.*, 1993b).

#### 2. Antibiotiques

##### Amoxicilline/acide clavulanique (AMC)

L'amoxicilline (beta-lactamine) associée à l'acide clavulanique (inhibiteur des bêta-lactamases) (AMC) utilisée dans ce travail est commercialisée sous le nom Augmentin 1g/200mg sous forme de poudre pour solution injectable par le laboratoire GlaxoSmithKline (Maroc). Elle a été dissoute dans 9 ml d'eau distillée stérile puis agitée jusqu'à dispersion totale. La concentration de l'AMC obtenue est de 100 mg/ml.

##### Gentamicine

La gentamicine est un antibiotique de la famille des aminoglycosides, commercialisée sous le nom Gentosyl sous forme d'une solution injectable à la concentration de 10 mg/ml. Elle est produite par le laboratoire Laprophan (Maroc) et a été utilisée dans cette étude telle quelle.

### 3. Souches bactériennes

Dans cette partie de notre travail, l'activité antibactérienne des deux antibiotiques et des quatre composés majoritaire a été testée sur 23 souches de *S. aureus* et d'*E. coli* isolées à partir de la moelle osseuse de patients souffrants d'une ostéomyélite au niveau du Centre Hospitalier Universitaire de Fès.

L'identification moléculaire ainsi que l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des 23 souches par antibiogramme (mentionnés sur le tableau 37) ont été effectuées au Laboratoire de Microbiologie de la faculté de médecine et de pharmacie de Fès. Vingt souches de *S. aureus* à Gram positif, et trois souches d'*E. coli* à Gram négatif. Les souches utilisées sont présentées dans le tableau suivant :

**Tableau 37:** les souches bactériennes utilisées avec leur profil de résistance

Numéro de la souche	Bactéries	Résistance aux antibiotiques
1	<i>S. aureus</i>	Pénicilline
2	<i>S. aureus</i>	Pénicilline, Tétracycline
3	<i>S. aureus</i>	Pénicilline, Tétracycline
4	<i>S. aureus</i>	Pénicilline, Tétracycline
5	<i>S. aureus</i>	Pénicilline, Tétracycline
6	<i>S. aureus</i>	Pénicilline, Tétracycline
7	<i>S. aureus</i>	Pénicilline, Tétracycline
8	<i>S. aureus</i>	Pénicilline, Tétracycline
9	<i>S. aureus</i>	Pénicilline, Tétracycline
10	<i>S. aureus</i>	Pénicilline, Tétracycline
11	<i>S. aureus</i>	Pénicilline
12	<i>S. aureus</i>	Acide fusidique
13	<i>S. aureus</i>	Pénicilline, Tobramycine
14	<i>S. aureus</i>	Pénicilline, Tobramycine, gentamycine, Tétracycline
15	<i>S. aureus</i>	Pénicilline, céfoxitine, gentamycine, Erythromycine, Norfloxacin, cotinoxazole, SXT, Acide nalidixique, Tobramycine, tétracycline
16	<i>S. aureus</i>	Pénicilline
17	<i>S. aureus</i>	Pénicilline
18	<i>S. aureus</i>	Sensible
19	<i>S. aureus</i>	Pénicilline
20	<i>S. aureus</i>	Acide fusidique
21	<i>E. coli</i>	Famille de pénicilline, cefepime
22	<i>E. coli</i>	Ampicilline, SXT, acide nalidixique
23	<i>Es. coli</i>	Ampicilline, SXT, acide nalidixique



#### 4. Préparation de l'inoculum bactérien

L'inoculum bactérien des souches utilisées a été préparé en prélevant 2 à 3 colonies à partir d'une culture d'une nuit sur gélose nutritive Trypto-caséine soja (TSA). Ces colonies sont ensuite mises en suspension dans le sérum physiologique stérile. Puis l'inoculum est ajusté à une turbidité de 0,5 McFarland, ce qui correspond à une densité optique de 0,08–0,13 mesurée à la longueur d'onde de 625 nm. Des dilutions au  $1/10^{\text{ème}}$  ont été réalisées afin d'obtenir une concentration bactérienne de  $5.10^5$  UFC/ml (Orhan *et coll.*, 2005; Dimitrijević, 2012).

#### 5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les CMI de l'AMC, de la gentamicine et des quatre composés majoritaires ont été déterminées par des tests de micro-dilution sur des plaques à 96 puits selon les normes CLSI (CLSI, 2019). Pour cela, dix concentrations de thymol, de carvacrol, d'eugénol et de 1,8-cinéol et des deux antibiotiques l'amoxicilline/acide clavulanique et la gentamycine ont été préparées dans des tubes à hémolyse stériles. Ces concentrations ont été réalisées par des dilutions successives de moitié dans de l'eau distillée stérile. Elles vont de 320  $\mu\text{g/ml}$  à 0,62  $\mu\text{g/ml}$  pour l'AMC et de 40  $\mu\text{g/ml}$  à 0,078  $\mu\text{g/ml}$  pour la gentamycine. Pour le carvacrol et thymol, les dilutions successives réalisées vont de 20 mg/ml à 0,035 mg/ml. Pour l'eugénol, elles vont de 40 mg/ml à 0,078 mg/ml et pour le 1,8-cinéol, les dilutions successives réalisées vont de 320 mg/ml à 0,625 mg/ml. Ensuite, 20 $\mu\text{l}$  de chaque concentration ont été ajoutés dans chaque puit à 160  $\mu\text{l}$  de bouillon Mueller Hinton (MH) et à 20 $\mu\text{l}$  d'une suspension bactérienne à  $5.10^5$  UFC/ml. Chaque concentration a été testée en duplicate.

Les concentrations finales des antibiotiques obtenues dans les puits sont de:

- Pour l'**AMC** : 32  $\mu\text{g/ml}$  ; 16 $\mu\text{g/ml}$  ; 8 $\mu\text{g/ml}$  ; 4  $\mu\text{g/ml}$  ; 2  $\mu\text{g/ml}$  ; 1  $\mu\text{g/ml}$  ; 0,5  $\mu\text{g/ml}$  ; 0,25  $\mu\text{g/ml}$  ; 0,125  $\mu\text{g/ml}$  et 0,062  $\mu\text{g/ml}$ .
- Pour la **gentamicine** : 4  $\mu\text{g/ml}$  ; 2  $\mu\text{g/ml}$  ; 1  $\mu\text{g/ml}$  ; 0,5  $\mu\text{g/ml}$  ; 0,25  $\mu\text{g/ml}$  ; 0,125  $\mu\text{g/ml}$  ; 0,062  $\mu\text{g/ml}$  ; 0,031  $\mu\text{g/ml}$  ; 0,015  $\mu\text{g/ml}$  et 0,0078  $\mu\text{g/ml}$
- Pour le **thymol** et le **carvacrol** : 2 mg/ml ; 1 mg/ml ; 0,5 mg/ml ; 0,25 mg/ml ; 0,125 mg/ml ; 0,062 mg/ml ; 0,031  $\mu\text{g/ml}$  ; 0,015 mg/ml ; 0,0078 mg/ml et 0,035 mg/ml
- Pour l'**eugénol** : 4 mg/ml ; 2 mg/ml ; 1 mg/ml ; 0,5 mg/ml ; 0,25 mg/ml ; 0,125 mg/ml ; 0,062 mg/ml ; 0,031  $\mu\text{g/ml}$  ; 0,015 mg/ml et 0,0078 mg/ml
- Pour le **1,8-cinéol**: 32 mg/ml ; 16mg/ml ; 8mg/ml ; 4 mg/ml ; 2 mg/ml ; 1 mg/ml ; 0,5 mg/ml ; 0,25 mg/ml ; 0,125 mg/ml et 0,062mg/ml

Les puits de la première colonne ne contenant que le milieu MH constituent les témoins négatifs, alors que les puits de la 12<sup>ème</sup> colonne ont été inoculés par la souche bactérienne et constituent les témoins positifs.

Après incubation des plaques à 37°C pendant 18 à 20h, sous agitation de 100 rpm, le triphenyl-tetrazolium chloride (TTC) est rajouté. 40 µl de TTC à 0,5% ont été rajoutés dans chaque puit, et après 2h d'incubation, les CMI sont déterminés. Les valeurs de CMI correspondent à la concentration la plus faible n'ayant pas produit de couleur rouge (Dimitrijević, 2012).

## **6. Test d'association des composés majoritaire avec les antibiotiques**

### **6.1- Souches utilisées**

Pour étudier l'effet de l'association de chacun des deux antibiotiques (Amoxicilline/acide clavulanique et gentamicine) avec chacun des quatre composés majoritaire (thymol, carvacrol, eugénol ou 1,8-cinéol), quatre souches ont été utilisées : trois souches de *S. aureus* : 2, 15 (SARM) et 18 et une souche d'*E. coli* (21) (Tableau 37).

### **6.2- Étude de la combinaison des composés majoritaires avec les antibiotiques**

L'évaluation de l'interaction entre les antibiotiques et les composés majoritaires des HE a été réalisée selon la méthode décrite par Mulyaningsih *et coll.* en 2010. Pour cela, les huit concentrations d'antibiotiques et de composés majoritaires ont été préparées dans des tubes à hémolyse stériles par des dilutions successives de moitié. Pour les antibiotiques, les concentrations sont introduites verticalement dans huit puits de manière décroissante allant de la CMI×2 jusqu'à CMI/64, tandis que les concentrations des composés majoritaires ont été introduites horizontalement dans huit puits de manière décroissante de la CMI×2 jusqu'à CMI/64 (voir tableau 38). L'effet de l'association des deux antibiotiques a été également testé. Pour chaque isolat, chaque combinaison a été réalisée en double.

L'analyse du résultat de l'association a été obtenue en calculant l'indice de concentration inhibitrice fractionnaire (CFI) en utilisant la formule suivante (Khay *et coll.*, 2016) :

$$\sum CFI = CFI (A) + CFI (B).$$

Où (A) représente l'antibiotiques à tester et où (B) représente le composé majoritaire à tester.

$$\text{CFI (A)} = \frac{\text{MIC (A) en combinaison}}{\text{MIC (A) seule}} \text{ et } \text{CFI (B)} = \frac{\text{MIC (B) en combinaison}}{\text{MIC (B) seule}}$$

Les valeurs des indices des concentrations inhibitrices fractionnaires obtenues sont interprétées comme suit:  $\text{CFI} \leq 0,5$  = synergie ;  $0,5 < \text{CFI} \leq 0,75$  = synergie partielle ;  $0,76 \leq \text{CFI} \leq 1$  = effet additif ;

$1 < \text{CFI} \leq 4$  = pas d'interaction ;  $\text{CFI} > 4$  = antagonisme.

**Tableau 38 :** Les concentrations obtenues dans l'ensemble des puits de la microplaque pour l'association de l'AMC avec le thymol

Puit	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Témoin -	AMC 16µg/ml +  Thymol 2mg/ml	AMC 8µg/ml +  Thymol 2mg/m	AMC 4µg/ml +  Thymol 2mg/m	AMC 2µg/ml +  Thymol 2mg/m	AMC 1µg/ml +  Thymol 2mg/m	AMC 0,5µg/ml +  Thymol 2mg/m	AMC 0,25µg/ml +  Thymol 2mg/m	AMC 0,125µg/ml  Thymol 2mg/m	AMC 0,062µg/ml+  Thymol 2mg/m	AMC 0,031µg/ml +  Thymol 2mg/m	Témoin +
<b>B</b>	Témoin -	AMC 16µg/ml+  Thymol 1mg/m	AMC 8µg/ml+  Thymol 1mg/m	AMC 4µg/ml+  Thymol 1mg/m	AMC 2µg/ml+  Thymol 1mg/m	AMC 1µg/ml+  Thymol 1mg/m	AMC 0,5µg/ml+  Thymol 1mg/m	AMC 0,25µg/ml+  Thymol 1mg/m	AMC 0,125µg/ml +  Thymol 1mg/m	AMC 0,062µg/ml+  Thymol 1mg/m	AMC 0,031µg/ml +  Thymol 1mg/m	Témoin +
<b>C</b>	Témoin -	AMC 16µg/ml+  Thymol 0,5mg/ml	AMC 8µg/ml+  Thymol 0,5mg/ml	AMC 4µg/ml+  Thymol 0,5mg/ml	AMC 2µg/ml+  Thymol 0,5mg/ml	AMC 1µg/ml+  Thymol 0,5mg/ml	AMC 0,5µg/ml+  Thymol 0,5mg/ml	AMC 0,25µg/ml+  Thymol 0,5mg/ml	AMC 0,125µg/ml +  Thymol 0,5mg/ml	AMC 0,062µg/ml+  Thymol 0,5mg/ml	AMC 0,031µg/ml +  Thymol 0,5mg/ml	Témoin +
<b>D</b>	Témoin -	AMC 16µg/ml+  Thymol 0,25mg/ml	AMC 8µg/ml+  Thymol 0,25mg/ml	AMC 4µg/ml+  Thymol 0,25mg/ml	AMC 2µg/ml+  Thymol 0,25mg/ml	AMC 1µg/ml+  Thymol 0,25mg/ml	AMC 0,5µg/ml+  Thymol 0,25mg/ml	AMC 0,25µg/ml+  Thymol 0,25mg/ml	AMC 0,125µg/ml +  Thymol 0,25mg/ml	AMC 0,062µg/ml+  Thymol 0,25mg/ml	AMC 0,031µg/ml +  Thymol 0,25mg/ml	Témoin +
<b>E</b>	Témoin -	AMC 16µg/ml+  Thymol 0,125mg/ml	AMC 8µg/ml+  Thymol 0,125mg/ml	AMC 4µg/ml+  Thymol 0,125mg/ml	AMC 2µg/ml+  Thymol 0,125mg/ml	AMC 1µg/ml+  Thymol 0,125mg/ml	AMC 0,5µg/ml+  Thymol 0,125mg/ml	AMC 0,25µg/ml+  Thymol 0,125mg/ml	AMC 0,125µg/ml +  Thymol 0,125mg/ml	AMC 0,062µg/ml+  Thymol 0,125mg/ml	AMC 0,031µg/ml +  Thymol 0,125mg/ml	Témoin +
<b>F</b>	Témoin -	AMC 16µg/ml+  Thymol 0,062mg/ml	AMC 8µg/ml+  Thymol 0,062mg/ml	AMC 4µg/ml+  Thymol 0,062mg/ml	AMC 2µg/ml+  Thymol 0,062mg/ml	AMC 1µg/ml+  Thymol 0,062mg/ml	AMC 0,5µg/ml+  Thymol 0,062mg/ml	AMC 0,25µg/ml+  Thymol 0,062mg/ml	AMC 0,125µg/ml +  Thymol 0,062mg/ml	AMC 0,062µg/ml+  Thymol 0,062mg/ml	AMC 0,031µg/ml +  Thymol 0,062mg/ml	Témoin +
<b>G</b>	Témoin -	AMC 16µg/ml+  Thymol 0,031mg/ml	AMC 8µg/ml+  Thymol 0,031mg/ml	AMC 4µg/ml+  Thymol 0,031mg/ml	AMC 2µg/ml+  Thymol 0,031mg/ml	AMC 1µg/ml+  Thymol 0,031mg/ml	AMC 0,5µg/ml+  Thymol 0,031mg/ml	AMC 0,25µg/ml+  Thymol 0,031mg/ml	AMC 0,125µg/ml +  Thymol 0,031mg/ml	AMC 0,062µg/ml+  Thymol 0,031mg/ml	AMC 0,031µg/ml +  Thymol 0,031mg/ml	Témoin +
<b>H</b>	Témoin -	AMC 16µg/ml+  Thymol 0,015mg/ml	AMC 8µg/ml+  Thymol 0,015mg/ml	AMC 4µg/ml+  Thymol 0,015mg/ml	AMC 2µg/ml+  Thymol 0,015mg/ml	AMC 1µg/ml+  Thymol 0,015mg/ml	AMC 0,5µg/ml+  Thymol 0,015mg/ml	AMC 0,25µg/ml+  Thymol 0,015mg/ml	AMC 0,12µg/ml+  Thymol 0,015mg/ml	AMC 0,06µg/ml+  Thymol 0,015mg/ml	AMC 0,03µg/ml+  Thymol 0,015mg/ml	Témoin +

### **Test in vivo**

Cette étude a pour but d'évaluer, *in vivo*, l'activité de l'AMC, de la gentamicine et du 1,8-cinéol soit séparément, soit en les combinant pour traiter une ostéomyélite aiguë expérimentale provoquée chez le lapin.

#### **1. Agents antibactériens**

Les agents antibactériens utilisés dans cette expérience sont l'AMC, la gentamicine et le 1,8-cinéol. Ils ont été préparés comme décrits précédemment, sauf qu'ils ont été dissous dans du sérum physiologique à la place de l'eau distillée stérile.

#### **2. Animaux d'expérience**

Quarante-deux lapins blancs femelles de la souche New Zélandaise âgées de 5 à 6 semaines, et dont le poids va de à 1,2 à 1,8 kg ont été utilisées dans cette étude. Elles ont été divisées en sept lots de six lapins chacun. Les animaux avaient l'accès à l'aliment et à l'eau *ad libitum* et ont été traités conformément aux lignes directrices du comité d'éthique du conseil national de la santé et de la recherche. La température de l'animalerie est maintenue à  $21^{\circ}\text{C} \pm 1$  ou  $2^{\circ}\text{C}$  avec une ventilation adéquate.

Les animaux de l'expérience sont gardés pendant une semaine d'acclimatation après leur arrivée avant de commencer l'expérimentation.



**Figure 38:** Lapins en cages

### 3. Préparation de l'inoculum

Parmi les souches étudiées, *in vitro*, la souche *S. aureus* SARM (n° 15) est choisie pour l'étude *in vivo*. L'inoculum est préparé à partir d'une culture de la souche SARM d'une nuit dans 9 ml de bouillon de soja tryptique (TSB), et des aliquotes de 100 µl sont transférés dans des tubes stériles contenant 3 ml de TSB. Ces tubes sont ensuite incubés pendant 3h à 37 °C afin d'obtenir une croissance bactérienne en phase logarithmique. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 1000 g. Le surnageant est éliminé et le culot restant est lavé deux fois avec une solution tampon phosphate saline (PBS), puis le culot bactérien est ajouté à 3 ml de PBS. Une suspension contenant 10<sup>9</sup> UFC/ml est obtenue par une vérification spectrophotométrique par le score Mc Farland (Gaudin *et coll.*, 2011).

### 4. Induction de l'ostéomyélite chez le lapin

Les procédures utilisées dans ce modèle expérimental sont décrites par Amador *et coll.* (2010) et Jacqueline *et coll.* (2010). Au jour J0, les lapins ont été anesthésiés par voie intraveineuse au niveau de la veine marginale de l'oreille, avec un mélange de xylazine à 1 mg/kg de poids corporel et de kétamine à 20 mg/kg de poids corporel (Gaudin *et coll.*, 2011; Jacqueline *et coll.*, 2010). Les faces latérales et frontales du genou droit de chaque animal ont été rasées et désinfectées à la Bétadine. Une trépanation du tibia a été réalisée par voie transcutanée à l'aide d'une aiguille de biopsie de la moelle osseuse (Jamshidi 8 Gauges) (Figure 38). Avant l'inoculation, des prélèvements de la moelle osseuse ont été réalisés. Ensuite, un millilitre de la suspension de la souche contenant 10<sup>9</sup>UFC/ml a été injecté dans le tibia.



**Figure 39** : Réalisation d'une trépanation au niveau du tibia à l'aide d'une aiguille de Jamshidi 8 Gauges.

## 5. Quantification de l'infection

Trois jours après l'inoculation, et pour évaluer le degré d'infection, les lapins ont été anesthésiés comme précédemment. Des prélèvements de la moelle osseuse ont été effectués à l'aide de seringues (8Ga), puis pesés et placés aseptiquement dans des tubes contenant 200 µl de sérum physiologique et ensemencés sur milieu Chapman aux dilutions de  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$  obtenues par dilution au 1/10 dans le sérum physiologiques. Après incubation à 37°C pendant 48h, la charge bactérienne est calculée en UFC par unité de masse de moelle osseuse. Des prélèvements de la moelle osseuse des lapins témoins positif et négatif ont été également réalisés.



**Figure 40:** Prélèvement de la moelle osseuse à l'aide d'une seringue 8 Ga au niveau du tibia.

## 6. Lots d'animaux

Les animaux ont été répartis au hasard en 5 lots expérimentaux de 6 lapins chacun:

Lot 1 (n=6): Animaux infectés non traités servant de témoins positifs

Lot 2 (n=6): Animaux infectés et traités à l'AMC à raison de 30 mg/kg

Lot 3 (n=6): Animaux infectés et traités à la gentamicine à raison de 3 mg/kg

Lot 4 (n=6): Animaux infectés et traités au 1,8-cinéol à raison de 12 mg/kg

Lot 5 (n=6): Animaux infectés et traités à l'AMC à la dose de 15 mg/kg associée à la gentamicine à la dose 1,5 mg/kg

Lot 6 (n=6): Animaux infectés et traités à l'AMC à 15 mg/kg associé au 1,8-cinéol à la dose de 6 mg/kg

Lot 7 (n=6): Animaux non infectés non traités servant de témoins négatifs

## 7. Traitement

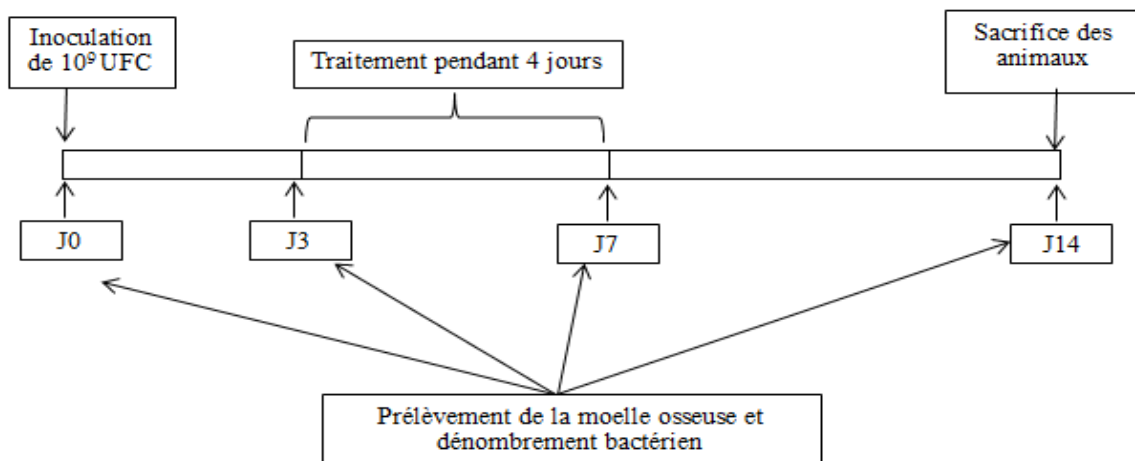
Le traitement des animaux a commencé 72 heures après l'inoculation (J3). Les traitements ont été effectués par des injections par voie intramusculaire de l'agent antimicrobien à raison de 2 fois par jour pendant 4 jours.

## 8. Évaluation de la charge bactérienne

Après 4 jours de traitement (de J3 à J7), les prélèvements de la moelle osseuse ont été effectués à J7, placés dans des tubes stériles contenant 200 µl de sérum physiologique, puis ensemencés sur milieu Chapman à différentes dilutions  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$ . La charge bactérienne a été évaluée en nombre d'UFC par unité de masse de prélèvement après incubation à 37°C pendant 48h.

## 9. Sacrifice des animaux et dénombrement bactérien

Au jour J14, donc 7 jours après l'arrêt du traitement, les animaux ont été euthanasiés par l'injection intraveineuse d'une dose létale de 100 mg de thiopental dans la veine marginale de l'oreille (Hamel *et coll.*, 2008), et la moitié proximale du tibia a été disséquée dans des conditions d'asepsie puis des prélèvements de la moelle osseuse ont été effectués. La charge bactérienne a été ensuite évaluée de la même façon qu'au troisième et septième jour.



**Figure 41:** Digramme schématisé du modèle d'ostéomyélite expérimentale aiguë à *S. aureus* chez le lapin. S.



## **10. Prise de la température corporelle**

Une prise individuelle de température rectale de tous les lapins a été réalisée aux jours J0, J3, J7 et J14 à l'aide un thermomètre digital souple placé au niveau anal.

## **11. Poids vif moyen**

Les pesées individuelles ont été effectuées chaque jour durant la première semaine, puis à la fin de l'expérimentation, le jour J14.

Le poids vif moyen est déterminé comme suit:

$$\text{Poids vif moyen (g)} = \frac{\text{Poids de la totalité des lapins d'un lot}}{\text{Nombre des lapins de ce lot}}$$

## **12. Gain du poids vif**

Le gain de poids vif est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Le gain de poids vif (g)} = \text{Poids au J2} - \text{Poids au J1}$$

## **13. Taux de mortalité :**

Le taux de mortalité est noté quotidiennement. Il est déterminé pour chaque lot par la formule suivante:

$$\text{Taux de mortalité (\%)} = \frac{\text{Effectif des lapins morts d'un lot au jour J} \times 100}{\text{Effectif total des lapins de ce lot le même jour}}$$

## **14. Analyse statistique**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du GraphPad Prism® 6 pour Windows et les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  écart type. Les effets du traitement sur la charge bactérienne osseuse, le gain de poids et la température corporelle ont été évalués au moyen d'une analyse de variance (One-way ANOVA) en utilisant le test de comparaison Tukey's Multiple (Graph pad Prism version 5.03). La valeur  $p < 0,05$  est considérée comme statistiquement significative.

### III. Résultats

#### 1. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

**Tableau 39:** Valeurs des CMI obtenues par la méthode de micro-dilution

Souches	CMI des Composés majoritaires				CMI des antibiotiques	
	Thymol mg/ml	Carvacrol mg/ml	Eugénol mg/ml	1,8-cinéol mg/ml	AMC µg/ml	Gentamicine µg/ml
1	0,25	0,25	0,5	16	0,5	0,5
2	0,25	0,25	1	16	0,5	0,5
3	0,25	0,5	2	16	0,5	0,5
4	0,25	0,25	0,5	16	0,25	0,5
5	0,25	0,5	1	32	0,5	0,5
6	0,25	0,25	0,5	16	0,5	0,5
7	0,125	0,25	1	16	0,25	0,5
8	0,25	0,25	0,5	16	0,5	0,5
9	0,25	0,25	0,5	16	0,5	0,5
10	0,25	0,25	1	16	0,5	0,5
11	0,25	0,25	0,5	16	0,5	0,5
12	0,25	0,25	1	16	0,5	0,5
13	0,5	0,25	1	32	1	1
14	0,25	0,25	0,5	16	0,5	2
15	0,5	0,25	1	32	1	2
16	0,25	0,25	0,5	16	0,5	0,5
17	0,25	0,25	0,5	16	0,5	0,5
18	0,25	0,25	0,5	32	0,25	1
19	0,25	0,125	0,5	16	0,25	0,5
20	0,25	0,125	1	16	0,25	0,5
21	0,25	0,125	0,5	16	0,5	0,5
22	0,25	0,125	2	8	0,5	0,5
23	0,25	0,25	0,5	8	0,5	0,5

Les valeurs des CMI de l'AMC, de la gentamicine, du thymol, du carvacrol, de l'eugénol et du 1,8-cinéol sont présentées dans le tableau 39. Le carvacrol a la CMI la plus faible de 0,125 mg/ml sur 4 souches (19, 20, 21 et 22). Le thymol a la CMI la plus faible (CMI=0,125 mg/ml) pour la souche 7. Pour l'eugénol, la CMI la plus faible obtenue est de 0,5 mg/ml pour 13 souches. Le 1,8-cinéol a une CMI de 8 mg/ml obtenue pour deux souches seulement (22 et 23) et des CMI plus élevées ont été notées pour les autres souches.

Pour ce qui est de l'activité antimicrobienne des deux antibiotiques testés; l'AMC a la CMI la plus faible ; 0,25µg/ml pour 6 souches. Pour la gentamicine, la CMI la plus faible a été obtenue pour 19 souches. Elle est de 0,5 µg/ml.

## 2. Effet de l'association des antibiotiques aux composés majoritaires (CM)

Les tableaux suivants (de 40 à 48), montrent l'action de l'AMC associée à la gentamicine ainsi que l'association de chacun des deux antibiotiques aux composés majoritaires des HE sur quatre souches bactériennes. La concentration inhibitrice fractionnaire (CFI) a été utilisée afin d'évaluer une éventuelle activité synergique.

### ✚ Association de l'AMC à la GEN

Le tableau 40 montre l'effet de l'association de l'AMC avec la GEN sur trois souches de *S. aureus* et une souche d'*E. coli*. D'après ces résultats, l'association des deux antibiotiques n'a donné aucun effet synergique. Cependant, un effet additif a été noté pour les souches SARM, *S. aureus* (n° 18) et *E. coli* avec un CFI =1.

**Tableau 40** : Effet de l'association de l'AMC avec la gentamicine

Souche bactérienne	AMC (A)			Gentamicine (B)			ΣCFI	Type d'interaction
	CMI seule (µg/ml)	CMI combinée à B (µg/ml)	CFI (A)	CMI seule (µg/ml)	CMI combinée à A (µg/ml)	CFI (B)		
<i>S aureus</i> SARM (15)	1	0,5	0,5	2	1	0,5	1	additif
<i>S aureus</i> (2)	0,5	0,5	1	0,5	0,25	0,5	1,5	non interaction
<i>S aureus</i> (18)	0,25	0,125	0,5	1	0,5	0,5	1	additif
<i>E.coli</i> (21)	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	1	additif

### ✚ Combinaison de l'AMC aux quatre composés majoritaires des HE

Les tableaux 41, 42, 43 et 44 montrent l'effet de l'association de l'AMC avec le thymol, le carvacrol, l'eugénol ou le 1,8-cinéol sur les trois souches de *S. aureus* et la souche d'*E. coli*. Parmi les seize combinaisons testées, 10 ont montré un effet synergique (62,50%) alors que les six autres combinaisons n'ont montré qu'une synergie partielle (37,50%). L'association de l'AMC avec le thymol (Tableau 41) a induit un effet synergique sur *S. aureus* SARM et *S. aureus* n° 18 et une synergie partielle a été obtenue avec *S. aureus* n° 2 et *E. coli*. L'association de l'AMC avec le carvacrol (Tableau 42) a donné un effet synergique sur les trois souches de *S. aureus* et une synergie partielle avec *E. coli*. Concernant l'association de l'AMC avec l'eugénol (Tableau 43), une synergie totale a été obtenue avec *S. aureus* n° 18 alors qu'une synergie partielle a été obtenue avec les trois autres souches. Par contre, les meilleurs résultats ont été obtenus lors de l'association de l'AMC avec le 1,8-cinéol (Tableau 44). Ces résultats montrent une synergie totale sur les quatre souches utilisées avec des

réductions de la CMI respectivement de l'AMC de 4 fois et de 8 fois pour les trois souches de *S. aureus* et celle pour celle d'*E. coli*.

**Tableau 41 :** Effet de l'association de l'AMC avec le thymol

Souche bactérienne	AMC(A)			Thymol(B)			ΣCFI	Type d'interaction
	CMI seule (µg/ml)	CMI combinée à B (µg/ml)	CFI (A)	CMI seul (mg/ml)	CMI combiné à A (mg/ml)	CFI (B)		
<i>S aureus</i> SARM (15)	1	0,25	0,25	0,5	0,125	0,25	0,5	synergie
<i>S aureus</i> (2)	0,5	0,25	0,5	0,25	0,0625	0,25	0,75	synergie partielle
<i>S aureus</i> (18)	0,25	0,0625	0,25	0,25	0,0625	0,25	0,5	synergie
<i>E. coli</i> (21)	0,5	0,25	0,5	0,25	0,0625	0,25	0,75	synergie partielle

**Tableau 42:** Effet de l'association de l'AMC avec le carvacrol

Souche bactérienne	AMC (A)			Carvacrol (B)			ΣCFI	Type d'interaction
	CMI seule (µg/ml)	CMI combinée à B (µg/ml)	CFI (A)	CMI seul (mg/ml)	CMI combiné à A (mg/ml)	CFI (B)		
<i>S aureus</i> SARM (15)	1	0,0625	0,0625	0,25	0,0625	0,25	0,3125	synergie
<i>S aureus</i> (2)	0,5	0,125	0,25	0,25	0,0625	0,25	0,5	synergie
<i>S aureus</i> (18)	0,25	0,0625	0,25	0,25	0,0625	0,25	0,5	synergie
<i>E. coli</i> (21)	0,5	0,0625	0,125	0,125	0,0625	0,5	0,625	synergie partielle

**Tableau 43:** Effet de l'association de l'AMC avec l'eugénol

Souche bactérienne	AMC (A)			Eugénol (B)			ΣCFI	Type d'interaction
	CMI seule (µg/ml)	CMI combinée à B (µg/ml)	CFI (A)	CMI seul (mg/ml)	CMI combiné à A (mg/ml)	CFI (B)		
<i>S aureus</i> SARM (15)	1	0,5	0,50	1	0,125	0,125	0,625	synergie partielle
<i>S aureus</i> (2)	0,5	0,25	0,5	1	0,125	0,125	0,625	synergie partielle
<i>S aureus</i> (18)	0,25	0,0625	0,25	0,5	0,0625	0,125	0,375	synergie
<i>E. coli</i> (21)	0,5	0,25	0,5	0,5	0,0652	0,0625	0,5625	synergie partielle

**Tableau 44:** Effet d'association de l'AMC avec le 1,8-cinéol

Souche bactérienne	AMC (A)			1,8-cinéol (B)			ΣCFI	Type d'interaction
	CMI seule (µg/ml)	CMI combinée à B (µg/ml)	CFI (A)	CMI seul (mg/ml)	CMI combiné à A (mg/ml)	CFI (B)		
<i>S aureus</i> SARM (15)	1	0,25	0,25	32	4	0,125	0,375	synergie
<i>S aureus</i> (2)	0,5	0,125	0,25	16	4	0,25	0,5	synergie
<i>S aureus</i> (18)	0,25	0,0625	0,25	32	2	0,125	0,25	synergie
<i>E. coli</i> (21)	0,5	0,0625	0,125	16	2	0,125	0,25	synergie

### ✚ Combinaison de la gentamicine aux quatre composés majoritaires des HE

Les tableaux 45, 46, 47 et 48 montrent l'effet de l'association de la gentamicine avec le thymol, le carvacrol, l'eugénol ou le 1,8-cinéol. Sur les seize combinaisons testées, cinq d'entre elles (31.25%) ont donné une synergie totale et les onze restantes (68.75%) ont présenté une interaction synergique partielle. L'association de la gentamicine avec le thymol (Tableau 45) a induit un effet synergique total sur les deux souches: *S. aureus* SARM et *E. coli* avec des  $\sum CFI= 0,5$  et  $\sum CFI=0,375$  respectivement. En outre, une synergie partielle a été obtenue avec les deux autres souches de *S. aureus* ( $0,5 < \sum CFI \leq 0,75$ ). L'association de la gentamicine avec le carvacrol (Tableau 46) n'a donné qu'une synergie partielle sur les quatre souches. Concernant son association avec l'eugénol (Tableau 47), un effet synergique total a été obtenu avec *S. aureus* n° 18 et *E. coli* avec des  $\sum CFI$  de 0,5 alors qu'une synergie partielle a été obtenue avec la souche *S. aureus* SARM et *S. aureus* n° 2. Lors de l'association de la gentamicine avec le 1,8-cinéol (Tableau 48), un effet synergique total a été obtenu seulement pour la souche *S. aureus* SARM alors qu'une synergie partielle a été notée avec les trois autres souches.

**Tableau 45 :** Effet de l'association de la gentamicine avec le thymol

Souche bactérienne	Gentamicine (A)			Thymol (B)			$\sum CFI$	Type d'interaction
	CMI seule (µg/ml)	CMI combinée à B (µg/ml)	CFI (A)	CMI seul (mg/ml)	CMI combiné à A (mg/ml)	CFI (B)		
<i>S aureus</i> SARM (15)	2	0,5	0,25	0,5	0,125	0,25	0,5	synergie
<i>S aureus</i> (2)	0,5	0,25	0,5	0,25	0,0625	0,25	0,75	synergie partielle
<i>S aureus</i> (18)	1	0,0625	0,0625	0,25	0,125	0,5	0,562	synergie partielle
<i>E. coli</i> (21)	0,5	0,0625	0,125	0,25	0,0625	0,25	0,375	synergie

**Tableau 46:** Effet de l'association de la gentamicine avec le carvacrol

Souche bactérienne	Gentamicine (A)			Carvacrol (B)			$\sum CFI$	Type d'interaction
	CMI seule (µg/ml)	CMI combinée à B (µg/ml)	CFI (A)	CMI seul (mg/ml)	CMI combiné à A (mg/ml)	CFI (B)		
<i>S aureus</i> SARM (15)	2	0,5	0,25	0,25	0,125	0,5	0,75	synergie partielle
<i>S aureus</i> (2)	0,5	0,125	0,25	0,25	0,125	0,5	0,75	synergie partielle
<i>S aureus</i> (18)	1	0,25	0,25	0,25	0,125	0,5	0,75	synergie partielle
<i>E. coli</i> (21)	0,5	0,0625	0,125	0,125	0,0625	0,5	0,625	synergie partielle

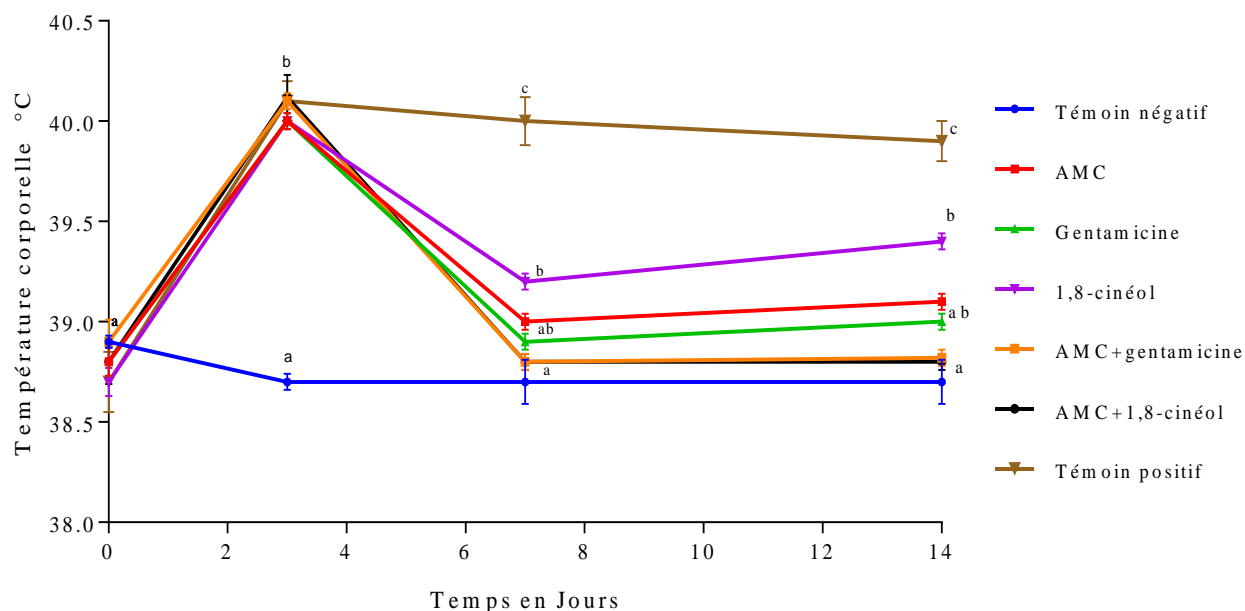
**Tableau 47:** Effet de l'association de la gentamycine avec l'eugénol

Souche bactérienne	Gentamycine (A)			Eugénol (B)			ΣCFI	Type d'interaction
	CMI seule (µg/ml)	CMI combinée à B (µg/ml)	CFI (A)	CMI seul (mg/ml)	CMI combiné à A (mg/ml)	CFI (B)		
<i>S aureus</i> SARM (15)	2	1	0,50	1	0,25	0,25	0,75	synergie partielle
<i>S aureus</i> (2)	0,5	0,25	0,5	1	0,125	0,125	0,625	synergie partielle
<i>S aureus</i> (18)	1	0,25	0,25	0,5	0,125	0,25	0,5	synergie
<i>E. coli</i> (21)	0,5	0,125	0,25	1	0,25	0,25	0,5	synergie

**Tableau 48:** Effet de l'association de la gentamicine avec le 1,8-cinéol

Souche bactérienne	Gentamicine			Cinéol			Somme CFI	Type d'interaction
	CMI seule	CMI combinée	CFI	CMI seul	CMI combiné	CFI		
<i>S aureus</i> SARM (15)	2	0,5	0,25	32	8	0,25	0,5	synergie
<i>S aureus</i> (2)	0,5	0,25	0,5	16	4	0,25	0,75	synergie partielle
<i>S aureus</i> (18)	1	0,5	0,5	32	8	0,25	0,75	synergie partielle
<i>E. coli</i> (21)	0,5	0,25	0,5	16	4	0,25	0,75	synergie partielle

### 3. Évolution de la température corporelle



**Figure 42:** Évolution de la température corporelle des lapins. Les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à  $p < 0,05$ .

La figure 41 montre l'évolution de la température corporelle des lapins des différents lots tout au long de l'expérience. Cette figure montre que, suite à l'inoculation (J0), nous avons constaté une augmentation de la température corporelle de la totalité des animaux de l'expérience excepté les lapins non infectés. La température était de 38,6°C pour la totalité des animaux au début de l'expérience. Après deux jours de l'infection, elle a dépassé 40°C pour les lots d'animaux infectés. Durant les 4 jours du traitement, la température corporelle des lapins traités à l'AMC, à l'AMC+ gentamicine, et à l'AMC+1,8-cinéol, a baissé progressivement. Elle a atteint des valeurs de température à peu près normales. La température corporelle des lapins infectés mais non traités est restée supérieure à 40°C tout au long de l'expérience. Concernant la température corporelle du lot non infecté non traité, elle était aux alentours de 38,6°C durant toute l'expérience.

#### **4. Taux de mortalité**

Aucune mortalité n'a été notée pour les lots d'animaux traités. Chez le lot d'animaux infectés non traités le taux de mortalité était de 1/6 au jour J8.

#### **5. Poids vif moyen**

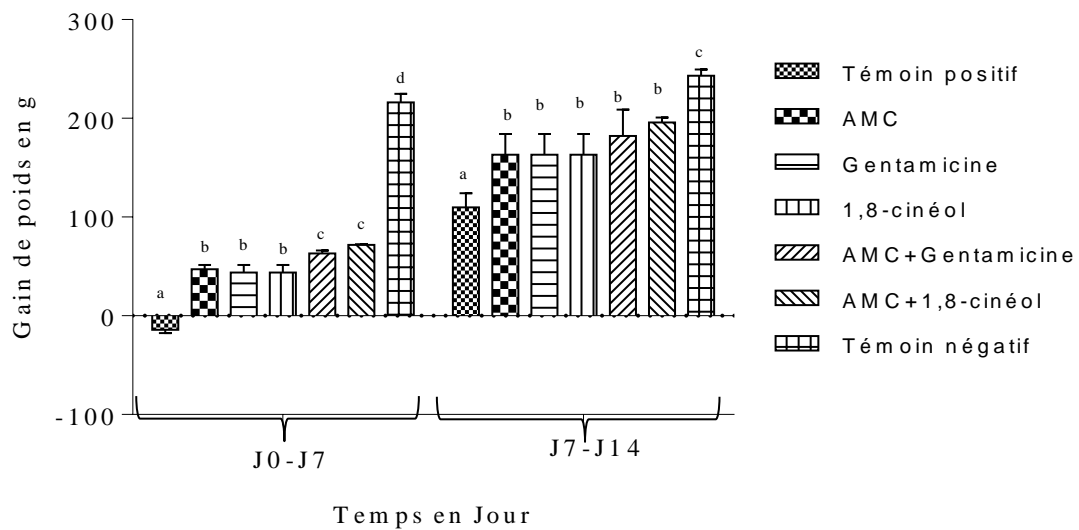
Le tableau 49 représente l'évolution du poids vif moyen des lapins durant l'expérimentation. Nous avons constaté, que le poids de tous les lots d'animaux infectés a baissé après inoculation. Durant les quatre jours du traitement (de J3 au J7), nous avons constaté une augmentation du poids des lapins traités quelque soit le type de traitement, sans différence significative entre les différents lots. À la fin de l'expérimentation (J14), les poids moyens des deux lots d'animaux non infectés et ceux traités à l'AMC+1,8-cinéol étaient significativement ( $p < 0,05$ ) plus importants que ceux des autres lots.

**Tableau 49:** Évolution du poids vif moyen en grammes. Les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes par rapport aux valeurs du lot témoin positif à  $p < 0,05$

<b>Temps en jours</b>	<b>Témoin positif</b>	<b>AMC</b>	<b>Gentamicine</b>	<b>1,8-cinéol</b>	<b>AMC+ gentamicine</b>	<b>AMC+ 1,8-cinéol</b>	<b>Témoin négatif</b>
J0	1473 ±157a	1450,33 ±11a	1450,33 ± 118,44a	1443,66 ±109,56a	1531,33 ±179a	1735,33 ±149a	1513 ±128a
J1	1445 ±169a	1416,33 ±111a	1416,33 ±118,44a	1409,66 ±109,5a	1500,67 ±180a	1703 ±137a	1545 ±126a
J2	1414 ±178a	1391,33 ±112a	1391,33 ±119,11a	1381,33 ±112,44a	1471 ±186a	1683 ±142a	1574 ±136a
J3	1419 ±16a	1401,67 ±113a	1401,66 ±119,56a	1395 ±115a	1476 ±189a	1687 ±142a	1596,33 ±132a
J4	1426,33 ±152a	1417,67 ±109a	1417,66 ±116,22a	1407,66 ±109,56a	1497 ±187a	1712 ±144a	1629 ±138a
J5	1431,67 ±144a	1436 ±106a	1433,66 ±110,22a	1426 ±107a	1525 ±190a	1736 ±147a	1654,33 ±140a
J6	1442,67 ±142a	1463,33 ±114a	1463,33 ±121,11a	1452 ±115a	1554 ±184a	1765 ±144a	1690,33 ±144a
J7	1458,67 ±114a	1497,33 ±113a	1497,33 ±119,78a	1487,33 ±113a	1594 ±182a	1807 ±148a	1729,67 ±140a
J14	1568,33 ±135a	1660,67 ±140a	1660,66 ±147,56a	1650,66 ±140a	1777 ±147a	2002 ±145b	1973 ±148b



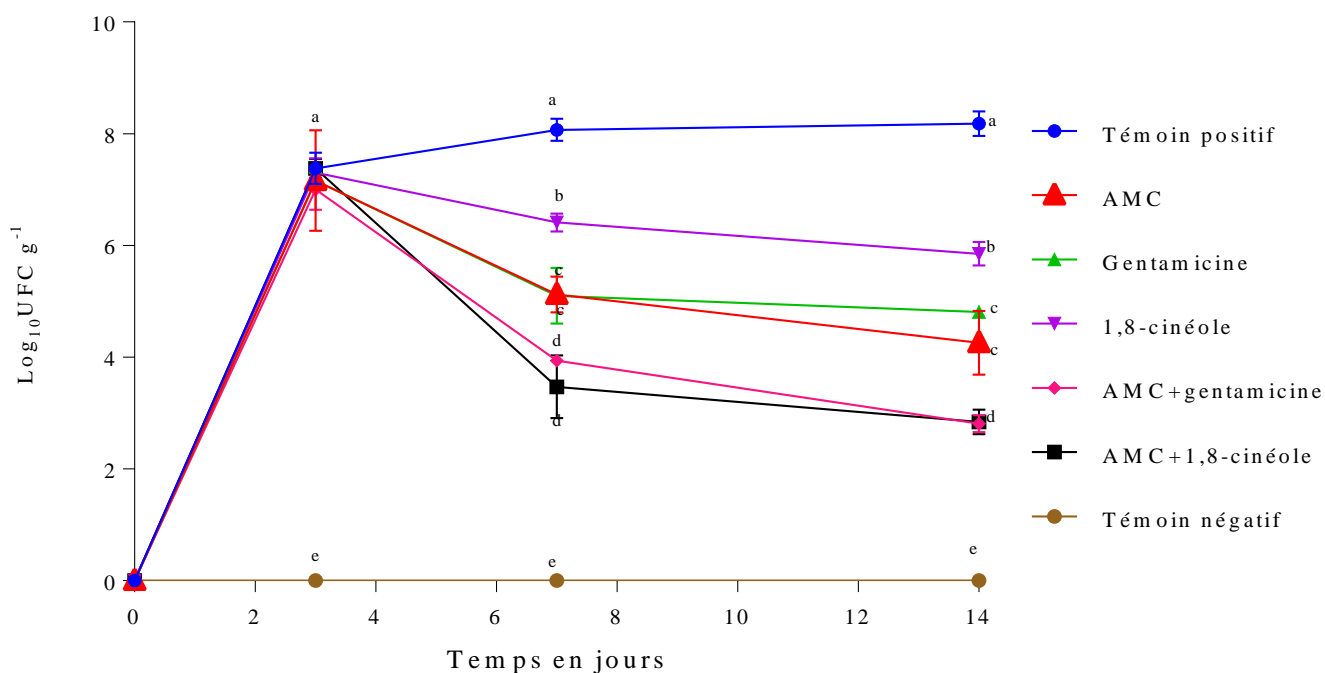
## 6. Gain de poids vif moyen



**Figure 43:** Évolution du gain de poids moyen. Les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à  $p < 0,05$ .

L'évolution du gain de poids vif moyen des différents lots durant les deux semaines de l'expérience est représentée sur la figure 42. Du jour J0 au jour J7, le gain de poids le plus élevé a été noté chez le lot d'animaux non infecté, alors qu'une perte de poids a été notée chez le lot d'animaux infectés non traités. Du jour J7 au jour J14, une augmentation de gain de poids a été constatée chez tous les lots d'animaux. Le gain de poids le plus faible a été noté chez les animaux infectés n'ayant reçu aucun traitement (témoin positif).

## 7. Évaluation de la charge bactérienne de la moelle osseuse



**Figure 44:** Évolution de la charge bactérienne dans la moelle osseuse en  $\log_{10}$  UFC durant les 14 jours de l'expérience. Les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à  $p < 0,05$ .

**Tableau 50:** Différence de la charge bactérienne au niveau de la moelle osseuse entre le jour J7 et J3 et entre le jour J14 et J3 en  $\log_{10}$  UFC/g. Les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à  $p < 0,05$ .

Lots d'animaux	Moyenne $\pm$ Écart type $\log_{10}$ UFC/g (J7-J3)	Moyenne $\pm$ Écart type $\log_{10}$ UFC/g (J14-J3)
Témoin non infecté (n=6)	(0 $\pm$ 0) a	(0 $\pm$ 0) a
Témoin infecté non traité (n=6)	(0,68 $\pm$ 0,48) b	(0,79 $\pm$ 0,42) b
AMC (n=6)	(-2,04 $\pm$ 0,47) d	(-2,90 $\pm$ 0,34) d
Gentamicine (n=6)	(-2,06 $\pm$ 0,49) d	(-2,35 $\pm$ 0,20) d
1,8-cinéol (n=6)	(-0,56 $\pm$ 0,06) c	(-1,03 $\pm$ 0,62) c
AMC + Gentamicine (n=6)	(-3,40 $\pm$ 0,4) e	(-4,2 $\pm$ 0,11) e
AMC + 1,8-cinéol (n=6)	(-3,43 $\pm$ 0,41) e	(-4,52 $\pm$ 0,36) e

La figure 43 représente l'évolution de la charge bactérienne dans la moelle osseuse. Trois jours après l'inoculation (J0-J3), et pour tous les lots à l'exception du lot d'animaux non infectés, la charge bactérienne était aux alentours de  $10^7$  UFC/g. Après 4 jours de traitement (J3-J7), nous avons assisté à une diminution de la charge bactérienne pour le lot d'animaux traités à l'AMC+1,8-cinéol (-3,43  $\log_{10}$  UFC au jour 7), suivie de celle du lot d'animaux

traités à l'AMC+ gentamicine (-3,40 log<sub>10</sub> UFC au jour 7) par rapport aux groupes traités à l'AMC seule, à la gentamicine seule ou au 1,8-cinéol seul (Tableau 50). Cependant, une légère augmentation de la charge bactérienne a été notée pour le lot d'animaux infectés non traités. Durant la deuxième semaine (J7-J14), et malgré l'arrêt du traitement, la charge bactérienne a diminué légèrement chez les différents lots d'animaux traités.

## VI. Discussion

Il est bien connu que la souche *S. aureus* a la propriété de posséder de nombreuses protéines de surface « microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules » (MSCRAMMs) qui se lient spécifiquement à de nombreux composants de la matrice extracellulaire incluant le fibrinogène, la fibronectine, le collagène et les laminines. Tout ceci favorise son adhérence à la matrice osseuse. Une fois digérée par les ostéoblastes, *S. aureus* persiste et peut devenir résistant aux antibiotiques (Zaborowska *et coll.*, 2017; Groll *et coll.*, 2018). Zaborowska *et coll.* (2017) et Groll *et coll.* (2018) ont rapporté que *S. aureus*, la bactérie causale la plus courante de l'ostéomyélite, bloque la protéolyse dans les structures musculo-squelettiques. De plus, *S. aureus* peut produire des variantes de petites colonies (SCVs), ce qui peut entraîner une modification du profil de virulence et de résistance aux antibiotiques (Birt *et coll.*, 2017). La souche d'*E. coli* est aussi impliquée et a été isolée chez les patients atteints d'ostéomyélite chronique (Carek *et coll.*, 2001; Nolla *et coll.*, 2002).

Dans le présent travail, nous avons utilisé vingt-trois souches bactériennes hospitalières, dont vingt souches de *S. aureus* et trois souches d'*E. coli*. Elles ont été isolées de patients souffrant d'ostéomyélite. Les 23 souches ont été utilisées pour la détermination des CMI de deux antibiotiques : l'amoxicilline/acide clavulanique et la gentamicine et de quatre composés majoritaires d'HE: le thymol, le carvacrol, l'eugénol et le 1,8-cinéol connus pour avoir une activité antibactérienne (Moleyar et Narasimham, 1992; Dorman et Deans, 2000). Puis, quatre souches ont été choisies pour évaluer l'effet de l'association des antibiotiques d'une part et de leur combinaison avec les composés majoritaires d'autre part. Le choix des quatre souches a été basé sur leur profil de résistance déterminé au préalable par antibiogramme. Une souche *S. aureus* sensible à tous les antibiotiques (souche n° 18), une souche résistante à deux antibiotiques (souche n° 2), une souche SARM résistante à dix antibiotiques (souche n° 15) et une souche d'*E. coli* (souche n° 21) résistante à la famille des pénicillines et à la cefipime (Tableau 37).

Notre laboratoire travaille depuis plusieurs années sur l'activité antibactérienne des HE et de leurs composés majoritaires (Remmal *et coll.*, 1993a; Rhayour *et coll.*, 2003). Nous avons choisi d'étudier l'activité anti-staphylococcique du thymol, du carvacrol, de l'eugénol et du 1,8-cinéol qui ont la réputation d'être de bons agents antimicrobiens sans risque de développer de résistances (Gomes Neto *et coll.*, 2012). D'autres travaux ont montré l'intérêt

d'utiliser l'amoxicilline/acide clavulanique associée à la gentamicine pour traiter l'ostéomyélite à *S. aureus* (Melzer *et coll.*, 2000; Maffulli *et coll.*, 2016), ou en les associant avec la metronidazole (Peravali *et coll.*, 2012). D'où l'idée de tester la sensibilité des souches de *S. aureus* et d'*E. coli* à l'AMC, la gentamicine et aux quatre composés majoritaires soit séparément, soit en combinaison. À notre connaissance c'est la première fois qu'un test *in vitro* de l'association des deux antibiotiques amoxicilline/acide clavulanique et gentamicine et la combinaison de l'un ou de l'autre des deux avec les composés majoritaires sur des souches hospitalières de *S. aureus* et d'*E. coli* a été réalisé.

Les valeurs de CMI de l'amoxicilline/acide clavulanique et de la gentamicine obtenues avec les souches testées, sont inférieures aux celles décrites par Entenza *et coll.* (2010) avec d'autres souches de *S. aureus* et d'*E. coli*. Cette différence est probablement due à l'utilisation de techniques différentes. En effet, Entenza *et coll.*, ont utilisé la méthode de macro-dilution avec une taille de l'inoculum plus élevée de  $10^7$  UFC/ml alors que nous avons utilisé un inoculum de taille  $5 \times 10^5$  UFC/ml. En effet, l'activité bactéricide des antibiotiques diminue lorsque la taille l'inoculum augmente, notamment pour *S. aureus* (Tuomanen *et coll.*, 1986). La stade de croissance des bactéries est également un paramètre important qui influe l'activité antibactérienne des agents antimicrobiens (Tuomanen *et coll.*, 1986). En outre, la CMI de la gentamicine que nous avons obtenue pour la souche SARM (2 µg/ml) confirme les résultats de l'antibiogramme où une résistance à la gentamicine a été constatée selon la Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM/EUCAST, 2020).

Par ailleurs, les CMI de l'AMC variait de 0,25 µg/ml à 1 µg/ml. La CMI de 1 µg/ml a été obtenue pour la souche SARM (souche n° 15) et pour la souche n° 13. Et selon les recommandations de l'EUCAST (2020), les souches de Staphylocoques résistantes à la céfoxitine (SARM) doivent être interprétées comme étant résistantes à l'AMC. En effet, la résistance à la méthicilline est médiée par un penicillin-binding-protein supplémentaire (PBP2a) ayant une faible affinité pour les agents bêta-lactamines et conférant une résistance à la méthicilline ainsi qu'à d'autres antibiotiques bêta-lactamines (Kali, 2015). Cependant, la concentration minimale inhibitrice standard qui détermine la résistance à l'AMC n'est pas disponible dans les recommandations d'EUCAST (Käppeli *et coll.*, 2019).

En ce qui concerne les composés majoritaires, les deux isomères carvacrol et thymol ont montré des propriétés antimicrobiennes similaires et meilleures que celles de l'eugénol et du 1,8-cinéol. Ces résultats confirment ceux d'Oussalah *et coll.* (2007) et ceux de Michiels *et coll.* (2007) qui ont également montré l'équivalence de l'activité antimicrobienne du carvacrol

et du thymol et de leur supériorité à celle de l'eugénol et du 1,8-cinéol sur des souches de *S. aureus*. Les valeurs de CMI du thymol et du carvacrol obtenues sont similaires à celles obtenues par Guarda *et coll.* (2011) avec d'autres souches de *S. aureus* et d'*E. coli*. Ces derniers ont obtenu des CMI de 0,25mg/ml pour le thymol et des CMI allant de 0,225mg/ml à 0,375mg/ml pour le carvacrol. Cependant, les valeurs de CMI du thymol, du carvacrol et de l'eugénol que nous avons obtenues restent inférieures à celles rapportées par Gallucci *et coll.* (2009) avec d'autres souches de *S. aureus* et d'*E. coli* en utilisant la méthode de micro-dilution avec un inoculum de  $10^6$  UFC/ml.

Concernant le 1,8-cinéol, les valeurs de CMI obtenues varient de 16 mg/ml à 32 mg/ml pour les souches de *S. aureus* et de 8 mg/ml à 16 mg/ml pour les souches d'*E. coli*. Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues par Silva *et coll.* (2011), ces derniers ont utilisé la méthode de diffusion sur disque. Ils ont obtenus une CMI de 50 mg/ml pour la souche de *S. aureus*. Mulyaningsih *et coll.* (2010) eux, ont obtenus une valeur de CMI plus élevée ; de 64mg/ml, en utilisant la méthode de micro-dilution avec un inoculum de  $5.10^5$ UFC/ml. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'ils aient dispersé les composés majoritaires d'HE en utilisant du diméthylsulfoxyde (DMSO) ou du Tween 80. Il a été démontré que ces derniers pourraient réduire l'activité antimicrobienne des composés majoritaires des huiles essentielles (Remmal *et coll.*, 1993a). En effet; notre laboratoire avait déjà démontré que les détergents tels que le Triton-X100 et le Tween 80 ou des solvants tels que l'éthanol diminuaient l'effet antimicrobien des huiles essentielles et de leurs composés majoritaires (Remmal *et coll.*, 1993a). L'utilisation d'une solution d'agar à 0,2% en tant qu'agent dispersant mise au point par notre laboratoire et confirmée par la suite par Griffin *et coll.* (2000) explique pourquoi nos CMI sont plus faibles.

Pour ce qui est de l'effet de l'association de l'amoxicilline/acide clavulanique avec la gentamicine et de la combinaison de chacun des deux ATB avec les composés majoritaires, sur les quatre souches testées: trois souches de *S. aureus* (n° 2, n° 15 et n°18) et une souche d'*E. coli* (n° 21) (Tableau 37), nous avons utilisé la méthode de Checkerboard en déterminant la concentration inhibitrice fractionnaire (CFI) afin de tester une éventuelle synergie (Dimitrijević, 2012). L'association de l'AMC avec la gentamicine n'a pas montré d'effet synergique sur les quatre souches testées. Une étude menée par Snyderman *et coll.* (2005) a rapporté que l'association de la gentamicine avec la daptomycine, un ATB utilisé également pour son effet sur *S. aureus*, n'a montré d'effet synergique que sur 5% des isolats de *S. aureus* testés.

Quant à la combinaison de chacun des deux antibiotiques avec les composés majoritaires, et pour toutes les combinaisons testées, un effet synergique total ou partiel a été obtenu. Les meilleurs résultats ont été obtenus lors de l'association de l'AMC avec le 1,8-cinéol qui a induit à un effet synergique total pour les trois souches de *S. aureus* avec une valeur de CMI 4 fois plus faible ainsi que pour la souche d'*E. coli* avec une valeur de CMI 8 fois plus faible que la CMI de l'AMC seule. Pour la gentamicine, son association avec le 1,8-cinéol a induit un effet synergique total pour la souche SARM avec une réduction de la CMI de 4 fois. Une synergie partielle a été obtenue pour les deux autres souches de *S. aureus* avec une réduction de 2 fois la CMI de la gentamicine. Nos résultats corroborent ceux obtenus par Nascimento *et coll.* (2000) et Betoni *et coll.* (2006), qui ont rapporté que l'association des antibiotiques avec les extraits des plantes ou leurs composés majoritaires montrent une activité antibactérienne synergique sur les bactéries résistantes aux antibiotiques y compris *S. aureus*. D'autre part, Langeveld *et coll.* (2014) ont démontré que l'association du thymol avec la pénicilline a donné un effet antibactérien synergique sur *E. coli* et l'association du carvacrol avec la pénicilline a aussi induit un effet synergique sur *E. coli* d'après Palaniappan et Holley (2010). Une étude très récente (Chaves *et coll.*, 2018) a rapporté que l'association de l'huile essentielle d'*Eucalyptus*, dont le composé majoritaire est le 1,8-cinéol, avec les antibiotiques a des effets synergiques, principalement avec l'amoxicilline et l'ampicilline sur une souche de *S. aureus* résistante à la méticilline (SARM) et une autre souche de *S. aureus* sensible à la méticilline. Une activité synergique a également été démontrée entre le digluconate de chlorhexidine (un désinfectant/antiseptique largement utilisé possédant une activité antimicrobienne à large spectre) et le 1,8-cinéol vis-à-vis des SARM (Hendry *et coll.*, 2009). Une étude réalisée par Fadli *et coll.* (2012), a montré que l'association de l'huile essentielle du *Thymus maroccanus* avec la gentamicine ou la pristinamycine a montré un effet synergique total vis-à-vis de neuf souches bactériennes parmi lesquelles une souche de *S. aureus*. Enfin, une autre étude a montré qu'un effet synergique a été obtenu lors de l'association de la gentamicine avec l'huile essentielle de l'*Origanum vulgare* sur *S. aureus* et d'autres souches à Gram négatif (Rosato *et coll.*, 2010). Cette interaction synergique semblait être due à différents mécanismes, dont l'inhibition des enzymes protectrices des voies métaboliques et l'inhibition séquentielle des voies biochimiques communes (Ait Dra *et coll.*, 2017).

Les résultats obtenus *in vitro* nous ont incités à faire des tests, *in vivo*, sur un modèle expérimental d'ostéomyélite aigue chez le lapin. Nous avons donc décidé de tester l'effet du 1,8-cinéol associé à l'AMC en le comparant à celui de l'AMC associée à la gentamicine et à l'AMC, la gentamicine ou le 1,8-cinéol seuls. Nous avons choisi le 1,8-cinéol car il a montré

un effet synergique total lorsqu'il est associé à l'AMC vis-à-vis de *S. aureus*. À notre connaissance, c'est la première fois que le 1,8-cinéol est utilisé à cette fin.

Les modèles expérimentaux d'ostéomyélite bactérienne sont généralement testés sur le lapin, moins fréquemment sur le chien, le cochon, la souris, le rat et le hamster (Yin *et coll.*, 2005). Le modèle d'ostéomyélite expérimentale à SARM a été utilisé par Soranglou *et coll.* en 2017 chez le lapin pour évaluer l'efficacité de la moxifloxacine par voie intramusculaire, ainsi que par Taghipour *et coll.* en 2018 dans une étude comparative des effets de la vancomycine, de l'enrofloxacine et du triméthoprime / sulfaméthoxazole sur l'ostéomyélite à SARM.

L'inoculation bactérienne est le plus souvent réalisée directement par injection intra-articulaire au niveau de l'articulation fémoro-tibiale (Bremell, 1999; Hamel *et coll.*, 2008). Avant l'inoculation, des prélèvements de la moelle osseuse ont été réalisés pour vérifier l'absence de *S. aureus*. Nous avons utilisé la voie transcutanée pour réaliser une trépanation à l'aide d'une aiguille de biopsie, suivie de l'injection d'une suspension de *Staphylocoque aureus* directement à l'intérieur du tibia. La taille de l'inoculum utilisée a été de  $10^9$  UFC/ml ; la même que celle utilisée par Gaudin *et coll.* (2011) qui a mis au point un modèle expérimental d'ostéomyélite aiguë chez le lapin et a obtenu une charge bactérienne élevée au niveau de la moelle osseuse, permettant à l'infection de persister pendant au moins 14 jours. Après inoculation des animaux, les charges bactériennes que nous avons atteintes étaient de  $10^7$  à  $10^8$  UFC/g au niveau de la moelle osseuse, ceci confirme que nous avons réussi à reproduire le modèle d'ostéomyélite de Gaudin *et coll.* pour évaluer *in vivo* l'activité antibactérienne des agents testés.

La souche de *S. aureus* que nous avons utilisée pour évaluer l'effet de l'association de l'AMC avec le 1,8-cinéol est la souche SARM, résistante à la gentamicine ainsi qu'à d'autres antibiotiques et résistante à l'AMC avec une CMI de  $2\mu\text{g/ml}$ . Si une efficacité de traitement est obtenue avec cette souche, cela signifierait qu'il y aurait de fortes chances d'avoir une efficacité encore meilleure avec les souches les plus sensibles.

Pour le mode de traitement, nous avons choisi la voie intramusculaire plutôt que de la voie intraveineuse car l'administration de médicament par voie intraveineuse chez le lapin est extrêmement difficile en raison du manque de veines très apparentes sachant qu'il est impossible de maintenir un cathéter intraveineux pendant une longue période chez un lapin éveillé. De plus, après administration des antibiotiques par voie intramusculaire, les concentrations sériques sont maximales après quelques minutes et atteignent des niveaux comparables à ceux obtenus après injection intraveineuse (Soranoglou *et coll.*, 2017).



Au cours de l'expérimentation, nous avons suivi non seulement la charge bactérienne au niveau de la moelle osseuse mais aussi la température corporelle qui est un indice de l'inflammation, le poids vif moyen et le gain de poids. Les résultats obtenus ont montré qu'après inoculation, on assiste à une augmentation de température et une perte de poids chez tous les animaux infectés. La perte de poids peut être causée par un manque d'appétit résultant du stress et de la douleur provoquée par l'infection. Cependant, le traitement des lapins surtout à l'AMC associé au 1,8-cineol est suivi d'un retour de température corporelle à ses valeurs normales et une reprise de poids similaire à celle des animaux non infectés et ceci au bout du 14<sup>ème</sup> jour. Ces résultats montrent que ces paramètres étaient utiles pour surveiller l'ostéomyélite. Lors de la mise au point d'un modèle animal d'ostéomyélite péri-implantaire à SARM, Helbig *et coll.* (2014) ont suivi l'évolution de l'infection en mesurant la température corporelle et le poids corporel ainsi que d'autres paramètres tels que le nombre de leucocytes dans le sang.

Après 4 jours de traitement, les charges bactériennes dans la moelle osseuse ont montré que le traitement à l'AMC en association avec du 1,8-cinéol ou de la gentamicine donnait la même efficacité avec un pourcentage de réduction de 99,99% et 99,98% respectivement, soit une réduction de 4,5 unité log décimal UFC/g à la fin de l'expérience. Cette efficacité est significativement supérieure à celle obtenue avec l'AMC seule (99,81% de réduction) ou avec la gentamicine seule (99,49% de réduction). Le traitement au 1,8-cinéol seul a montré le pourcentage de réduction le plus faible (89,91%).

Rondevaldova *et coll.* (2018) ont rapporté que, parmi les stratégies possibles pour traiter les infections liées à *S. aureus*, l'administration simultanée d'au moins deux antibiotiques. Cette utilisation simultanée de deux antibiotiques est efficace mais elle conduit à l'apparition de plusieurs souches multi-résistantes (Cazzola et Matera, 2003; Drawz et Bonomo, 2010), surtout en milieu hospitalier où il y a une forte pression de sélection des souches résistantes par des antibiotiques couramment utilisés (Turner *et coll.*, 2019). D'où l'intérêt de la substitution de l'un des deux antibiotiques par un agent antimicrobien naturel tel que le 1,8-cinéol afin de réduire des doses minimales efficaces, minimisant ainsi leurs éventuels effets secondaires toxiques et en luttant contre le phénomène de résistance.

Il est connu que les antibiotiques possédant un noyau  $\beta$ -lactames agissent en se liant à des protéines cibles de la paroi bactérienne (Protéines liant les Pénicillines PLP), interférant ainsi avec la synthèse des peptidoglycanes dans la paroi bactérienne. Ce processus conduit à la formation d'une paroi mécaniquement plus faible qui prédispose les bactéries à la mort par

lyse de la paroi cellulaire en raison d'altérations de la pression osmotique (Walsh, 2000). Les mécanismes de résistance de ces antibiotiques incluent soit :

- (1) la substitution des PLP par d'autres PLP présentant une affinité moindre avec les médicaments;
- (2) la production de  $\beta$ -lactamase, qui désactive les  $\beta$ -lactamines de l'antibiotique en l'inactivant
- (3) la limitation d'accès de l'antibiotique aux PLP cibles par modification de la perméabilité de la membrane bactérienne externe ou par la présence de pompes d'efflux (Tang *et coll.*, 2014).

La combinaison de  $\beta$ -lactames avec les molécules naturelles a été bien démontrée par Souza *et coll.* (2013) et Chaves *et coll.* (2016) et présente des résultats prometteurs.

Dans cette étude, l'amélioration de l'activité de l'AMC a été observée lorsqu'elle est associée au 1,8-cinéol. Remmal et Akhmouch (2019) ont rapporté que le 1,8-cinéol permet d'augmenter l'efficacité de l'amoxicilline. En effet, ils ont démontré que l'association de l'amoxicilline et du 1,8-cinéol permet d'obtenir un effet synergique qui renforce considérablement l'activité antibactérienne de l'amoxicilline. Remmal et Akhmouch ont expliqué cela par le fait qu'en présence de 1,8-cinéol, des complexes d'amoxicilline stables comprenant au moins trois molécules d'amoxicilline se forment et protègent l'antibiotique contre l'action des  $\beta$ -lactamases chez les bactéries résistantes. IL a été démontré que les composés majoritaires d'HE ont la capacité de déstabiliser la membrane cellulaire ou d'affecter la respiration cellulaire (Chaves *et coll.*, 2018). Par conséquent, l'association de ces composés avec les antibiotiques peut agir simultanément sur différents sites cibles, ce qui améliore les résultats observés par rapport à l'utilisation de l'antibiotique seul.

À notre connaissance, c'est la première fois qu'une étude approfondie sur l'association des antibiotiques AMC et gentamicine et la combinaison de chacun des deux avec le 1,8-cinéol contre les *S. aureus* est réalisée. Les résultats obtenus montrent que le boostage de l'effet antimicrobien des antibiotiques en utilisant le 1,8-cinéol semble être un moyen prometteur pour étudier de nouvelles voies dans le développement de nouveaux médicaments antimicrobiens.

## Conclusions et perspectives

Le présent travail a pour objectif, d'une part, d'essayer de trouver des substances naturelles comme alternatives aux antibiotiques promoteurs de croissance, utilisés dans l'alimentation de la volaille. D'autre part, de tester l'effet de l'association des composés majoritaires des HE connus pour leur effet antimicrobien avec des antibiotiques à faibles doses à la recherche d'une éventuelle synergie. Les résultats obtenus sont intéressants, et encore jamais rapportés dans la littérature scientifique.

Lorsque nous avons testé l'effet *in vitro* du thymol en comparaison à celui de l'amoxicilline sur le développement de l'anti-biorésistance chez une souche d'*E. coli*, les résultats obtenus ont montré que le thymol a un effet antibactérien sur la souche d'*E. coli in vitro* sans induire le développement de l'anti-biorésistance, à la différence de l'amoxicilline, qui a induit une résistance à l'amoxicilline en plus d'une résistance croisée à d'autres antibiotiques.

Quand nous avons comparé l'effet *in vivo* du NP<sup>®</sup> (produit innovant à base du thymol utilisé comme additif alimentaire) à celui de l'amoxicilline, de la tylosine et de la colistine sur la flore intestinale des poussins, les résultats ont montré que l'ajout des antibiotiques (amoxicilline, tylosine ou colistine) dans l'eau de boisson des animaux induit la sélection des bactéries résistantes à l'antibiotique utilisé et à d'autres antibiotiques non utilisés (phénomène de la résistance croisée). Ce qui nous permet de conclure que :

- L'utilisation *in vitro* et *in vivo* des antibiotiques en aviculture exerce une pression de sélection favorisant l'émergence des bactéries résistantes alors que l'utilisation du thymol n'induit pas le phénomène de l'anti-biorésistance.

L'évaluation de l'effet de l'association *in vivo* du NP<sup>®</sup> à l'un ou l'autre des trois antibiotiques utilisés en aviculture (l'amoxicilline, l'oxytétracycline et l'enrofloxacin) sur le phénomène de l'anti-biorésistance a montré que l'incorporation du NP<sup>®</sup> dans l'eau de boisson des dindonneaux soit seul, soit en association avec l'un ou l'autre des antibiotiques testés a induit une amélioration des paramètres zootechniques des animaux sans provoquer la sélection des souches résistantes.

Dans une autre partie de ce travail, nous avons évalué le profil de résistance des bactéries isolées à partir de la moelle osseuse de fémurs de poulets appartenant à deux élevages différents, utilisant l'un les antibiotiques comme facteurs de croissance, et l'autre le NP<sup>®</sup> comme additif alimentaire. Les résultats obtenus ont révélé un taux de résistance élevé chez les échantillons provenant de l'élevage utilisant les antibiotiques par rapport à celui trouvé

chez les échantillons provenant de l'élevage utilisant le NP<sup>®</sup>. Ces résultats nous permettent de conclure que :

- Le NP<sup>®</sup> pourrait être une alternative pour remplacer les antibiotiques utilisés en aviculture afin de prévenir et/ou de lutter contre le phénomène de l'anti-biorésistance sans nuire à la santé du consommateur ni à l'environnement.

Enfin, dans la dernière partie de ce travail, nous avons étudié, *in vitro*, l'effet antibactérien de l'association de l'un ou l'autre des composés majoritaires des HE: le thymol, le carvacrol, l'eugénol ou le 1,8-cinéol à l'un des deux antibiotiques ; l'amoxicilline/acide clavulanique (AMC) et la gentamycine sur des souches de *S. aureus* et d'*E. coli*. Les résultats obtenus ont montré que l'association des antibiotiques avec 1,8-cinéol a induit un effet synergique sur les bactéries utilisées.

Les résultats de l'évaluation *in vivo* de l'effet de l'amoxicilline et de la gentamicine soit séparément soit en associant l'un ou l'autre avec le 1,8-cinéol sur un modèle d'ostéomyélite expérimentale aiguë chez le lapin ont montré une meilleure efficacité de l'AMC associée au 1,8-cinéol suivie de celle de la gentamycine associée au 1,8-cinéol en comparaison à celles obtenus lors du traitement à l'AMC, à la gentamicine ou au 1,8-cinéol seuls,

Cela permet de tirer les conclusions suivantes :

- L'association de l'AMC au 1,8-cinéol pourrait être utilisée pour traiter l'ostéomyélite à *Staphylococcus aureus* résistante à la méthiciline (SARM).
- Le boostage de l'effet antimicrobien des antibiotiques en utilisant les composés majoritaires des HE semble être un moyen prometteur pour étudier de nouvelles voies dans le développement de nouveaux médicaments antimicrobiens.

**En perspectives**, il serait intéressant:

- d'étudier le phénomène de l'anti-biorésistance chez d'autres espèces bactériennes telles que *Salmonella*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*.
- d'étudier les mécanismes et les gènes de résistance par des techniques plus sophistiquées de la biologie moléculaire.
- d'étudier l'effet du NP<sup>®</sup> dans la lutte contre l'anti-biorésistance chez d'autres espèces animales telles que les bovins et les ovins.
- de tester l'effet de l'association d'autres antibiotiques avec les composés majoritaires
- de collaborer avec des médecins pour traiter les infections osseuses rebelles à *Staphylococcus aureus* chez l'homme.
- de tester l'effet de l'AMC associé au 1,8-cinéol dans le traitement d'autres maladies infectieuses.

## Références bibliographiques

- Aarestrup, F.M., Agersø, Y., Ahrens, P., Jørgensen, J.C.Ø., Madsen, M., and Jensen, L.B. (2000). Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. *Vet. Microbiol.* 74, 353–364.
- Aarestrup, F.M., Seyfarth, A.M., Emborg, H.-D., Pedersen, K., Hendriksen, R.S., and Bager, F. (2001). Effect of Abolishment of the Use of Antimicrobial Agents for Growth Promotion on Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fecal Enterococci from Food Animals in Denmark. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 45, 2054–2059.
- Abd El Tawab, A., M. Ammar, A., A. Nasef, S., and M. Reda, R. (2015). Prevalence of *E.Coli* in diseased chickens with its antibiogram pattern. *Benha Veterinary Medical Journal.* 224-230.
- Acamovic, T., and Brooker, J.D. (2005). Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proc. Nutr. Soc.* 64, 403–412.
- Adikwu, M., Jackson, C., & Esimone, C. (2010). Evaluation of *in vitro* antimicrobial effect of combinations of erythromycin and Euphorbia hirta leaf extract against *Staphylococcus aureus*. *Research in Pharmaceutical Biotechnology.* 2, 022-024.
- AFSSA. (2006). Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. Rapport du groupe de travail “Antibiorésistance”. Maisons-Alfort : AFSSA, 214 p.
- Ahmed, S., Meghji, S., Williams, R.J., Henderson, B., Brock, J.H., and Nair, S.P. (2001). *Staphylococcus aureus* Fibronectin Binding Proteins Are Essential for Internalization by Osteoblasts but Do Not Account for Differences in Intracellular Levels of Bacteria. *Infect. Immun.* 69, 2872–2877.
- Ahmed, Z., Khan, S. S., Khan, M., Tanveer, A., & Lone, Z. A. (2010). Synergistic effect of *Salvadora persica* extracts, tetracycline and penicillin against *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Basic & Applied Sciences.* 2, 25-29.
- Ait Dra, L., Ait Sidi Brahim, M., Boualy, B., Aghraz, A., Barakate, M., Oubaassine, S., Markouk, M., and Larhsini, M. (2017). Chemical composition, antioxidant and evidence antimicrobial synergistic effects of *Periploca laevigata* essential oil with conventional antibiotics. *Ind. Crops Prod.* 109, 746–752.
- Alborn, W.E., Allen, N.E., and Preston, D.A. (1991). Daptomycin disrupts membrane potential in growing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 2282–2287.
- Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., and Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 251–259.

- Allignet, J., and el Solh, N. (1995). Diversity among the gram-positive acetyltransferases inactivating streptogramin A and structurally related compounds and characterization of a new staphylococcal determinant, vatB. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2027–2036.
- Amador, G., Gautier, H., Le Mabecque, V., Miegerville, A.F., Potel, G., Bouler, J.-M., Weiss, P., Caillon, J., and Jacqueline, C. (2010). *In Vivo* Assessment of the Antimicrobial Activity of a Calcium-Deficient Apatite Vancomycin Drug Delivery System in a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Rabbit Osteomyelitis Experimental Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 950–952.
- Ammari, L.K., Offit, P.A., and Campbell, A.B. (1992). Unusual presentation of group B *Streptococcus* osteomyelitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 11, 1066–1067.
- Andersen, S.J., Quan, S., Gowan, B., and Dabbs, E.R. (1997). Monooxygenase-like sequence of a *Rhodococcus equi* gene conferring increased resistance to rifampin by inactivating this antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 218–221.
- Andremont, A. (2016). Antibiotiques et antibiorésistance, un avatar singulier de l’histoire planétaire. *Quest. Commun.* 29, 15–27.
- Aslam, M., Diarra, M.S., Checkley, S., Bohaychuk, V., and Masson, L. (2012). Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus spp.* isolated from retail meats in Alberta, Canada. *International Journal of Food Microbiology.* 156, 222–230.
- Bârka, M.S. (2000). Résistance aux antibiotiques des Entérobactéries isolées de la volaille dans l’Ouest Algérien. Université Aboubakr Betkaid Tlemcen Fâculte Des Sciences.
- Barreto, M., Menten, J., Racanicci, A., Pereira, P., and Rizzo, P. (2008). Plant extracts used as growth promoters in broilers. *Rev. Bras. Ciênc. Avícola.* 10, 109–115.
- Barton, M.D. (2000). Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutr. Res. Rev.* 13, 279.
- Baya, A.M., Brayton, P.R., Brown, V.L., Grimes, D.J., Russek-Cohen, E., and Colwell, R.R. (1986). Coincident plasmids and antimicrobial resistance in marine bacteria isolated from polluted and unpolluted Atlantic Ocean samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 1285–1292.
- Bebora, L.C., Oundo, J.O., and Yamamoto, H. (1994). Resistance of *E. coli* strains, recovered from chickens to antibiotics with particular reference to trimethoprim-sulfamethoxazole (septrin). *East Afr. Med. J.* 71, 624–627.
- Bennis S., Chami F., Chami N., Rayour K., Tantaoui-Elaraki A. and Remmal A. (2004b). Eugenol induces damage of bacterial and fungal envelope. *Moroccan J. Biol.* 1: 33- 39.
- Bennis, S., Chami, F., Chami, N., Bouchikhi, T., and Remmal, A. (2004a). Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Lett. Appl. Microbiol.* 38, 454–458.

- Berchieri Jr, A. (1999). Intestinal colonization of a human subject by vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin. Microbiol. Infect.* 5, 97–100.
- Betoni, J.E.C., Mantovani, R.P., Barbosa, L.N., Di Stasi, L.C., and Fernandes Junior, A. (2006). Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101, 387–390.
- Birt, M.C., Anderson, D.W., Bruce Toby, E., and Wang, J. (2017). Osteomyelitis: Recent advances in pathophysiology and therapeutic strategies. *J. Orthop.* 14, 45–52.
- Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A., and Blanco, J. (1997). Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2184–2185.
- Boerlin, P., Wissing, A., Aarestrup, F.M., Frey, J., and Nicolet, J. (2001). Antimicrobial Growth Promoter Ban and Resistance to Macrolides and Vancomycin in Enterococci from Pigs. *Journal of Clinical Microbiology.* 39, 4193–4195.
- Bok, H.E., Holzapfel, W.H., Odendaal, E.S., and van der Linde, H.J. (1986). Incidence of foodborne pathogens on retail broilers. *Int. J. Food Microbiol.* 3, 273–285.
- Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1–14.
- Boonmar, S., Bangtrakulnonth, A., Pornruangwong, S., Samosornsuk, S., Kaneko, K., and Ogawa, M. (1998). Significant increase in antibiotic resistance of *Salmonella* isolates from human beings and chicken meat in Thailand. *Vet. Microbiol.* 62, 73–80.
- Botelho, M.A., Nogueira, N.A.P., Bastos, G.M., Fonseca, S.G.C., Lemos, T.L.G., Matos, F.J.A., Montenegro, D., Heukelbach, J., Rao, V.S., and Brito, G.A.C. (2007). Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40, 349–356.
- Bradford, P.A. (2001). Extended-Spectrum -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 933–951.
- Braga, J.F.V., Silva, C.C., Teixeira, M. de P.F., Martins, N.R. da S., and Ecco, R. (2016). Vertebral osteomyelitis associated with single and mixed bacterial infection in broilers. *Avian Pathology.* 45, 640–648.
- Bremell, T. (1999). Experimental Models of Infectious Arthritis. In *Handbook of Animal Models of Infection*, (Elsevier), pp. 539–547.
- Brenes, A., and Roura, E. (2010). Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Anim. Feed Sci. Technol.* 158, 1–14.
- Brisson-Noël, A., Delrieu, P., Samain, D., and Courvalin, P. (1988). Inactivation of lincosaminide antibiotics in *Staphylococcus*. Identification of lincosaminide O-

- nucleotidyltransferases and comparison of the corresponding resistance genes. *J. Biol. Chem.* 263, 15880–15887.
- Bryson, V., and Szybalski, W. (1952). Microbial selection. *Science* 45–51.
- Bugg, T.D., and Walsh, C.T. (1992). Intracellular steps of bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis: enzymology, antibiotics, and antibiotic resistance. *Nat. Prod. Rep.* 9, 199–215.
- Burdock, G.A., and Fenaroli, G. (2010). *Fenaroli's handbook of flavor ingredients* (Boca Raton [Fla.: CRC Press/Taylor & Francis Group).
- Burns, J.L. (1995). Mechanisms of Bacterial Resistance. *Pediatr. Clin. North Am.* 42, 497–507.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253.
- Caputo, G.M., Cavanagh, P.R., Ulbrecht, J.S., Gibbons, G.W., and Karchmer, A.W. (1994). Assessment and Management of Foot Disease in Patients with Diabetes. *N. Engl. J. Med.* 331, 854–860.
- Carek, P.J., Dickerson, L.M., and Sack, J.L. (2001). Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am. Fam. Physician.* 63, 2413–2420.
- Carmo, E.S., Lima, E. de O., and Souza, E.L. de (2008). The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Braz. J. Microbiol.* 39, 362–367.
- Carson, C.F., Cookson, B.D., Farrelly, H.D., and Riley, T.V. (1995). Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Antimicrob. Chemother.* 35, 421–424.
- Castanon, J.I.R. (2007). History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. *Poult. Sci.* 86, 2466–2471.
- Cazzola, M., and Matera, M.G. (2003). Current and future management of pneumonia. In *Drugs for the Treatment of Respiratory Diseases*, D. Spina, C.P. Page, W.J. Metzger, and B.J. O'Connor, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), pp. 363–402.
- Cebrian, L., Rodriguez, J.C., Escribano, I., and Royo, G. (2006). Effect of exposure to fluoroquinolones and beta-lactams on the *in vitro* activity of other groups of antibiotics in *Salmonella spp.* *APMIS.* 114, 523–528.
- Chadha, H.S., Fitzgerald, R.H., Wiater, P., Sud, S., Nasser, S., and Wooley, P.H. (1999). Experimental acute hematogenous osteomyelitis in mice. I. Histopathological and immunological findings: osteomyelitis in mice. *J. Orthop. Res.* 17, 376–381.
- Chain E, Florey A, and Gardner N. (1940). Penicillin as a chemotherapeutic agent.



- Chami, F., Chami, N., Bennis, S., Bouchikhi, T., and Remmal, A. (2005a). Oregano and clove essential oils induce surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytother. Res.* 19, 405–408.
- Chami, F., Chami, N., Bennis, S., Trouillas, J., and Remmal, A. (2004a). Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 909–914.
- Chami, N., Bennis, S., Chami, F., Aboussekhra, A., and Remmal, A. (2005b). Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*. *Oral Microbiol. Immunol.* 20, 106–111.
- Chami, N., Chami, F., Bennis, S., Trouillas, J., and Remmal, A. (2004b). Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz. J. Infect. Dis. Off. Publ. Braz. Soc. Infect. Dis.* 8, 217–226.
- Chaves, T.P., Fernandes, F.H.A., Santana, C.P., Santos, J.S., Medeiros, F.D., Felismino, D.C., Santos, V.L., Catão, R.M.R., Coutinho, H.D.M., and Medeiros, A.C.D. (2016). Evaluation of the Interaction between the *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz Extract and Antimicrobials Using Biological and Analytical Models. *Plos One.* 11, e0155532.
- Chaves, T.P., Pinheiro, R.E.E., Melo, E.S., Soares, M.J. dos S., Souza, J.S.N., Andrade, T.B. de, Lemos, T.L.G. de, and Coutinho, H.D.M. (2018). Essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn potentiates  $\beta$ -lactam activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* resistant strains. *Ind. Crops Prod.* 112, 70–74.
- Chen, C.-R., Malik, M., Snyder, M., and Drlica, K. (1996). DNA Gyrase and Topoisomerase IV on the Bacterial Chromosome: Quinolone-induced DNA Cleavage. *J. Mol. Biol.* 258, 627–637.
- Chopra, I. (1998). Research and development of antibacterial agents. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 495–501.
- Chopra, I., and Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR.* 65, 232-260.
- Chorfí, O. (1994). Evaluation de l'antibiorésistance d'*Escherichia coli* dans le traitement de la colibacillose chez le poulet de chair. IAV Hassan II, Rabat.
- Chuard, C., Herrmann, M., Vaudaux, P., Waldvogel, F.A., and Lew, D.P. (1991). Successful therapy of experimental chronic foreign-body infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antimicrobial combinations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 2611–2616.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. M100, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2019.

- Collins, M.D. (2002). *Streptococcus gallinaceus* sp. nov., from chickens. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*. 52, 1161–1164.
- Colomb-Cotinat, M., Lacoste, J., Brun-Buisson, C., Jarlier, V., Coignard, B., and Vaux, S. (2016). Estimating the morbidity and mortality associated with infections due to multidrug-resistant bacteria (MDRB), France, 2012. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*. 5, 56.
- Conde-Díaz, C., Llenas-García, J., Parra Grande, M., Terol Esclapez, G., Masiá, M., and Gutiérrez, F. (2017). Severe skull base osteomyelitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* with successful outcome after prolonged outpatient therapy with continuous infusion of ceftazidime and oral ciprofloxacin: a case report. *J. Med. Case Reports*. 11.
- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., and Palmas, F. (1999). *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian Thymus* essential oils. *Lett. Appl. Microbiol*. 29, 130–135.
- Couderc V.L. (2001). Toxicité des huiles essentielles. Thèse de Doctorat. École Nationale Vétérinaire Toulouse.
- Coumba, K.N.D. (2006). Surveillance de la resistance aux antibiotiques des souches de *Salmonella spp* et *Escherichia coli* isolees de la viande de poulet de chair au Senegal. Université Cheikh Anta Diop de Dakar.
- Courvalin, P. (1991). Bactericidie: aspects theoriques et therapeutiques (Paris: Editions Maloine).
- Courvalin, P. (2008). Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*. 264, 4–16.
- Cox, S. D., Gustafson, J. E., Mann, C. M., Markham, J. L., Liew, Y. C., Hartland, R. P., & Wyllie, S. G. (1998). Tea tree oil causes K<sup>+</sup> leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. 26, 355-358.
- Craig, W.J. (1999). Health-promoting properties of common herbs. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 491s–499s.
- Crone, A. M., Wanner, M. R., Cooper, M. L., Fox, T. G., Jennings, S. G., & Karmazyn, B. (2020). Osteomyelitis of the ribs in children: a rare and potentially challenging diagnosis. *Pediatric Radiology*, 50(1), 68-74.
- Da Costa, P.M., Oliveira, M., Bica, A., Vaz-Pires, P., and Bernardo, F. (2007). Antimicrobial resistance in *Enterococcus spp.* and *Escherichia coli* isolated from poultry feed and feed ingredients. *Vet. Microbiol.* 120, 122–131.
- Dadheech, T., Vyas, R., and Rastogi, V. (2016). Prevalence, Bacteriology, Pathogenesis and Isolation of *E. coli* in Sick Layer Chickens in Ajmer Region of Rajasthan, India. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 5, 129–136.

- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., and Polissiou, M.G. (2000). GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and Their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. J. Agric. Food Chem. 48, 2576–2581.
- Davies, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science. 264, 375–382.
- Davies, J., and Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 74, 417–433.
- Davison, H.C., Woolhouse, M.E.J., and Low, J.C. (2000). What is antibiotic resistance and how can we measure it? Trends Microbiol. 8, 554–559.
- De Vecchi, E., Nicola, L., Ossola, F., and Drago, L. (2009). *In vitro* selection of resistance in *Streptococcus pneumoniae* at *in vivo* fluoroquinolone concentrations. J. Antimicrob. Chemother. 63, 721–727.
- Demain, A.L., and Elander, R.P. (1999). The beta-lactam antibiotics: past, present, and future. Antonie Van Leeuwenhoek. 75, 5–19.
- Denis, F. (2007). Bactériologie médicale: techniques usuelles (Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson).
- Dho, M., and Mouline, C. (1983). Analyse qualitative et quantitative de flore bacterienne dans la trachee du poulet sain. Annals of Veterinary Research.
- Diarra, M.S., Delaquis, P., Rempel, H., Bach, S., Harlton, C., Aslam, M., Pritchard, J., and Topp, E. (2014). Antibiotic Resistance and Diversity of *Salmonella enterica* Serovars Associated with Broiler Chickens. J. Food Prot. 77, 40–49.
- Dibner, J.J., and Richards, J.D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. Poult. Sci. 84, 634–643.
- Dimitrijević, D. (2012). Antioxidant and antimicrobial activity of different extracts from leaves and roots of *Jovibarba heuffelii* (Schott.) A. Löve and D. Löve. J. Med. Plants Res. 6.
- Dorman, H.J.D., and Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88, 308–316.
- Douthwaite, S. (1992). Interaction of the antibiotics clindamycin and lincomycin with *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 20, 4717–4720.
- Drancourt, M., Stein, A., Argenson, J.N., Roiron, R., Groulier, P., and Raoult, D. (1997). Oral treatment of *Staphylococcus spp.* infected orthopaedic implants with fusidic acid or ofloxacin in combination with rifampicin. J. Antimicrob. Chemother. 39, 235–240.
- Drawz, S.M., and Bonomo, R.A. (2010). Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. Clin. Microbiol. Rev. 23, 160–201.

- Du, E., Gan, L., Li, Z., Wang, W., Liu, D., and Guo, Y. (2015). *In vitro* antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6, 58.
- DuPont, H.L., and Steele, J.H. (1987). Use of antimicrobial agents in animal feeds: implications for human health. *Rev. Infect. Dis.* 9, 447–460.
- Dutta, G.N., and Devriese, L.A. (1982). Susceptibility of fecal streptococci of poultry origin to nine growth-promoting agents. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 832–837.
- Ebimieowei, E., and Ibemologi, A. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.*
- Ejim, L., Farha, M.A., Falconer, S.B., Wildenhain, J., Coombes, B.K., Tyers, M., Brown, E.D., and Wright, G.D. (2011). Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nat. Chem. Biol.* 7, 348–350.
- El hamdi, F. Z. (2016). Le Profil Epidemiologique des Infections Osteo- Articulaires Chez l'enfant (A Propos de 264 Cas), Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Faculté de médecine et de pharmacie, Fes, Morocco,
- Eliopoulos, G.M. (2004). Quinolone Resistance Mechanisms in Pneumococci. *Clin. Infect. Dis.* 38, S350–S356.
- Ellington, J.K., Reilly, S.S., Ramp, W.K., Smeltzer, M.S., Kellam, J.F., and Hudson, M.C. (1999). Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. *Microb. Pathog.* 26, 317–323.
- Elson, C.E., Underbakke, G.L., Hanson, P., Shrago, E., Wainberg, R.H., and Qureshi, A.A. (1989). Impact of lemongrass oil, an essential oil, on serum cholesterol. *Lipids.* 24, 677–679.
- Emslie, K.R., and Nade, S. (1983). Acute hematogenous staphylococcal osteomyelitis. A description of the natural history in an avian model. *Am. J. Pathol.* 110, 333–345.
- Enright, M.C. (2003). The evolution of a resistant pathogen--the case of MRSA. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3, 474–479.
- Entenza, J.M., Giddey, M., Vouillamoz, J., and Moreillon, P. (2010). *In vitro* prevention of the emergence of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus* and enterococci following combination with amoxicillin/clavulanic acid or ampicillin. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 35, 451–456.
- EUCAST (2018). Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters.
- Eumkeb, G., Siriwong, S., and Thumanu, K. (2012). Synergistic activity of luteolin and amoxicillin combination against amoxicillin-resistant *Escherichia coli* and mode of action. *J. Photochem. Photobiol. B* 117, 247–253.

- Evers, E.G., Blaak, H., Hamidjaja, R.A., de Jonge, R., and Schets, F.M. (2016). A QMRA for the Transmission of ESBL-Producing *Escherichia coli* and *Campylobacter* from Poultry Farms to Humans Through Flies: QMRA for Transmission from Poultry Farms Through Flies. *Risk Anal.* 36, 215–227.
- Ezzat Abd El-Hack, M., Alagawany, M., Ragab Farag, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., & Adel, M. (2016). Beneficial impacts of thymol essential oil on health and production of animals, fish and poultry: a review. *Journal of Essential Oil Research*, 28, 365-382.
- Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N.-E., Pagès, J.-M., and Hassani, L. (2012). Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*. 19, 464–471.
- Fajardo, A., and Martínez, J.L. (2008). Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 161–167.
- Falagas, M.E., Rafailidis, P.I., and Matthaiou, D.K. (2010). Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist. Updat.* 13, 132–138.
- FAOSTAT. (2009). Production mondiale de viandes en 2009. [www.faostat.fao.org](http://www.faostat.fao.org)
- Farag, R.S., Daw, Z.Y., and Abo-Raya, S.H. (1989). Influence of Some Spice Essential Oils on *Aspergillus Parasiticus* Growth and Production of Aflatoxins in a Synthetic Medium. *J. Food Sci.* 54, 74–76.
- Farsal, M., and Ait EL Atrach, M. (2004). Qualité microbiologique et d'*Escherichia coli* dans les unités de production de poussins d'un jour au Maroc. IAV Hassan II, Rabat.
- Fauchère, J.-L. (2002). *Bactériologie générale et médicale* (Paris: Ellipses).
- Fernandes, R., Amador, P., and Prudêncio, C. (2013).  $\beta$ -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology*. 24, 7–17.
- FISA. (2016). Fédération Interprofessionnelle du Secteur Avicole.
- Fleming (1929). On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* 226–236.
- Franco, D.A., Webb, J., and Taylor, C.E. (1990). Antibiotic and Sulfonamide Residues in Meat: Implications for Human Health. *J. Food Prot.* 53, 178–185.
- Franz, C., Baser, K., and Windisch, W. (2010). Essential oils and aromatic plants in animal feeding - a European perspective. A review. *Flavour Fragr. J.* 25, 327–340.
- Gaastra, W., van Oosterom, R.A.A., Pieters, E.W.J., Bergmans, H.E.N., van Dijk, L., Agnes, A., and ter Huurne, H.M. (1996). Isolation and characterisation of dog uropathogenic *Proteus mirabilis* strains. *Veterinary Microbiology*. 48, 57–71.

- Gallucci, M.N., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygadlo, J., and Demo, M. (2009). Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour Fragr. J.* 24, 348–354.
- Gandra, S., Barter, D.M., and Laxminarayan, R. (2014). Economic burden of antibiotic resistance: how much do we really know? *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 973–980.
- Garrod, L.P., Lambert, H.P., O'Grady, F., and Barber, M. (1973). *Antibiotic and chemotherapy* (Edinburgh: Churchill Livingstone).
- Gaskins, H.R., Collier, C.T., and Anderson, D.B. (2002). Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Anim. Biotechnol.* 13, 29–42.
- Gaudin, A., Amador Del Valle, G., Hamel, A., Le Mabecque, V., Miegerville, A.-F., Potel, G., Caillon, J., and Jacqueline, C. (2011). A new experimental model of acute osteomyelitis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rabbit: A new acute osteomyelitis model due to MRSA. *Lett. Appl. Microbiol.* 52, 253–257.
- Gazzar, K. (2015). Identification biochimique, serotypage et antibiorésistance d'*Escherichia coli* isolée chez le poulet de chair au Maroc. IAV Hassan II, Rabat.
- Godzeski, C. W., Brier, G., & Pavey, D. E. (1963). Cephalothin, a New Cephalosporin with a Broad Antibacterial Spectrum: I. *In Vitro* Studies Employing the Gradient Plate Technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 11(2), 122-127.
- Golkar, Z., Bagasra, O., and Pace, D.G. (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J. Infect. Dev. Ctries.* 8, 129–136.
- Gomes Neto, N.J., Luz, I. da S., Tavares, A.G., Honório, V.G., Magnani, M., and de Souza, E.L. (2012). *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil and Its Majority Compound 1,8-Cineole at Sublethal Amounts Induce No Direct and Cross Protection in *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. *Foodborne Pathog. Dis.* 9, 1071–1076.
- Gonzalez, E.A., Blanco, J., Baloda, S.B., Fröman, G., Dho, M., Lafont, J.P., and Wadström, T. (1990). Virulent *Escherichia coli* strains for chicks bind fibronectin and type II collagen. *Microbios.* 62, 113–127.
- Greathead, H. (2003). Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 279–290.
- Griffin, S.G., Markham, J.L., and Leach, D.N. (2000). An Agar Dilution Method for the Determination of the Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils. *J. Essent. Oil Res.* 12, 249–255.
- Grohs, P. (2017). Impact d'une politique proactive de surveillance et de gestion des risques infectieux dans un centre hospitalo-universitaire parisien, sur la diffusion des bacteries multi-resistantes aux antibiotiques. Université Paris-EST.

- Groll, M.E., Woods, T., and Salcido, R. (2018). Osteomyelitis: A Context for Wound Management. *Adv. Skin Wound Care.* 31, 253–262.
- Guarda, A., Rubilar, J.F., Miltz, J., and Galotto, M.J. (2011). The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 144–150.
- Haenni M., Jouy E., Madec J.-Y., Laurent F. (2012). *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) : un passage entre l’homme et l’animal Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation. 53, 40–42 p.
- Hall, R.M. (2007). Mobile Gene Cassettes and Integrins: Moving Antibiotic Resistance Genes in Gram-Negative Bacteria. In *Novartis Foundation Symposia*, D.J. Chadwick, and J. Goode, eds. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.), pp. 192–205.
- Hamel, A., Caillon, J., Jacqueline, C., Batard, E., Boutoille, D., Bugnon, D., Miégevill, A.-F., Rogez, J.-M., and Potel, G. (2008). Intermittent active motion versus immobilization in the treatment of *Staphylococcus aureus* -induced arthritis in a rabbit model. *J. Child. Orthop.* 2, 491–495.
- Hancock, R.E.W., and Brinkman, F.S.L. (2002). Function of *Pseudomonas* Porins in Uptake and Efflux. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 17–38.
- Happi, C.T., Gbotosho, G.O., Folarin, O.A., Akinboye, D.O., Yusuf, B.O., Ebong, O.O., Sowunmi, A., Kyle, D.E., Milhous, W., Wirth, D.F., et al. (2005). Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps genes and age related *in vivo* sulfadoxine–pyrimethamine resistance in malaria-infected patients from Nigeria. *Acta Trop.* 95, 183–193.
- Hazariwala, A., Sanders, Q., Hudson, C.R., Hofacre, C., Thayer, S.G., and Maurer, J.J. (2002). Distribution of Staphylococcal Enterotoxin Genes Among *Staphylococcus aureus* Isolates from Poultry and Humans with Invasive Staphylococcal Disease. *Avian Diseases.* 46, 132–136.
- Hein, I., Schneck, C., Knögler, M., Feierl, G., Pless, P., Köfer, J., Achmann, R., and Wagner, M. (2003). *Campylobacter jejuni* isolated from poultry and humans in Styria, Austria: epidemiology and ciprofloxacin resistance. *Epidemiol. Infect.* 130, 377–386.
- Helbig, L., Simank, H.G., Lorenz, H., Putz, C., Wöfl, C., Suda, A.J., Moghaddam, A., Schmidmaier, G., and Guehring, T. (2014). Establishment of a new methicillin resistant *Staphylococcus aureus* animal model of osteomyelitis. *Int. Orthop.* 38, 891–897.
- Hendry, E.R., Worthington, T., Conway, B.R., and Lambert, P.A. (2009). Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 1219–1225.
- Höltje, J.V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 62, 181–203.

- Hong, W., Zeng, J., and Xie, J. (2014). Antibiotic drugs targeting bacterial RNAs. *Acta Pharm. Sin. B* 4, 258–265.
- Hooper, D.C. (1995). Quinolone Mode of Action: *Drugs*. 49, 10–15.
- Hotchkiss, R. D., and R. J. Dubos. (1941). The isolation of bactericidal substances from cultures of *Bacillus brevis*. *J. Biol. Chem.* 141:155-162.
- Houang, E.T.S., Chu, Y.-W., Lo, W.-S., Chu, K.-Y., and Cheng, A.F.B. (2003). Epidemiology of Rifampin ADP-Ribosyltransferase (*arr-2*) and Metallo-β-Lactamase (*blaIMP-4*) Gene Cassettes in Class 1 Integrons in *Acinetobacter* Strains Isolated from Blood Cultures in 1997 to 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1382–1390.
- Hu, Y., Yang, X., Li, J., Lv, N., Liu, F., Wu, J., Lin, I.Y.C., Wu, N., Weimer, B.C., Gao, G.F., et al. (2016). The Bacterial Mobile Resistome Transfer Network Connecting the Animal and Human Microbiomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 6672–6681.
- Hudson, M.C., Ramp, W.K., Nicholson, N.C., Williams, A.S., and Nousiainen, M.T. (1995). Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb. Pathog.* 19, 409–419.
- Huff, G.R., Huff, W.E., Rath, N.C., and Balog, J.M. (2000). Turkey Osteomyelitis Complex. *Poult. Sci.* 79, 1050–1056.
- Hughes, V.M., and Datta, N. (1983). Conjugative plasmids in bacteria of the ‘pre-antibiotic’ era. *Nature.* 302, 725–726.
- Huovinen, P. (1997). Increases in Rates of Resistance to Trimethoprim. *Clin. Infect. Dis.* 24, S63–S66.
- ITAVI. (2016). Situation de la production et du marché des volailles de chair bilan 2016
- Iweriebor, B.C., Obi, L.C., and Okoh, A.I. (2016). Macrolide, glycopeptide resistance and virulence genes in *Enterococcus* species isolates from dairy cattle. *Journal of Medical Microbiology.* 65, 641–648.
- Jaberi, F.M., Shahcheraghi, G.H., and Ahadzadeh, M. (2002). Short-term intravenous antibiotic treatment of acute hematogenous bone and joint infection in children: a prospective randomized trial. *J. Pediatr. Orthop.* 22, 317–320.
- Jackson, C.R., Fedorka-Cray, P.J., Barrett, J.B., Hiott, L.M., and Woodley, T.A. (2007). Prevalence of streptogramin resistance in enterococci from animals: identification of *vatD* from animal sources in the USA. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 30, 60–66.
- Jacobs-Reitsma, W.F., Kan, C.A., and Bolder, N.M. (1994). The induction of quinolone resistance in *Campylobacter* bacteria in broilers by quinolone treatment. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 228–231.



- Jacqueline, C., Amador, G., Caillon, J., Le Mabecque, V., Batard, E., Miegerville, A.-F., Biek, D., Ge, Y., Potel, G., and Hamel, A. (2010). Efficacy of the new cephalosporin ceftaroline in the treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acute osteomyelitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1749–1752.
- Jamroz, D., Wertelecki, T., Houszka, M., and Kamel, C. (2006). Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 90, 255–268.
- Jang, I.S., Ko, Y.H., Kang, S.Y., and Lee, C.Y. (2007). Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 134, 304–315.
- Jankowsky, E. (2011). RNA helicases at work: binding and rearranging. *Trends Biochem. Sci.* 36, 19–29.
- Josephine, H.R., Kumar, I., and Pratt, R.F. (2004). The Perfect Penicillin? Inhibition of a Bacterial DD-Peptidase by Peptidoglycan-Mimetic  $\beta$ -Lactams. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 8122–8123.
- Juliano, C., Mattana, A., and Usai, M. (2000). Composition and *in vitro* Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Thymus herba-barona* Loisel Growing Wild in Sardinia. *J. Essent. Oil Res.* 12, 516–522.
- Kahne, D., Leimkuhler, C., Lu, W., and Walsh, C. (2005). Glycopeptide and Lipoglycopeptide Antibiotics. *Chem. Rev.* 105, 425–448.
- Kalembe, D., and Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10, 813–829.
- Kali, A. (2015). Antibiotics and bioactive natural products in treatment of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: A brief review. *Pharmacogn. Rev.* 9, 29.
- Käppeli, N., Morach, M., Corti, S., Eicher, C., Stephan, R., and Johler, S. (2019). *Staphylococcus aureus* related to bovine mastitis in Switzerland: Clonal diversity, virulence gene profiles, and antimicrobial resistance of isolates collected throughout 2017. *J. Dairy Sci.*
- Katz, L., and Ashley, G.W. (2005). Translation and Protein Synthesis: Macrolides. *Chem. Rev.* 105, 499–528.
- Kazwala, R.R., Collins, J.D., Hannan, J., Crinion, R.A., and O'Mahony, H. (1990). Factors responsible for the introduction and spread of *Campylobacter jejuni* infection in commercial poultry production. *Vet. Rec.* 126, 305–306.
- Kelley, T.R., Pancorbo, O.C., Merka, W.C., and Barnhart, H.M. (1998). Antibiotic resistance of bacterial litter isolates. *Poult. Sci.* 77, 243–247.

- Khay, E.O., Bouyahya, A., El Issaoui, K., Zinebi, S., and Abrini, J. (2016). Study of Synergy between *Mentha pulegium* Essential Oil, Honey and Bacteriocin-like Inhibitory Substance E204 against *Listeria monocytogenes* CECT 4032 and *Escherichia coli* K12. *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol.* 3, 29–35.
- Kieke, A.L., Borchardt, M.A., Kieke, B.A., Spencer, S.K., Vandermause, M.F., Smith, K.E., Jawahir, S.L., Belongia, E.A., and Marshfield Enterococcal Study Group (2006). Use of Streptogramin Growth Promoters in Poultry and Isolation of Streptogramin-Resistant *Enterococcus faecium* from Humans. *J. Infect. Dis.* 194, 1200–1208.
- Kliebe, C., Nies, B.A., Meyer, J.F., Tolxdorff-Neutzling, R.M., and Wiedemann, B. (1985). Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28, 302–307.
- Kotra, L.P., and Mobashery, S. (1999). Mechanistic and clinical aspects of beta-lactam antibiotics and beta-lactamases. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 47, 211–216.
- Krishan, G., and Narang, A. (2014). Use of essential oils in poultry nutrition: A new approach. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* 1, 156.
- Kummerer, K. (2004). Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 311–320.
- Landoni, M.F., and Albarellos, G. (2015). The use of antimicrobial agents in broiler chickens. *Vet. J.* 205, 21–27.
- Langeveld, W.T., Veldhuizen, E.J.A., and Burt, S.A. (2014). Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Crit. Rev. Microbiol.* 40, 76–94.
- Langton, K.P., Henderson, P.J.F., and Herbert, R.B. (2005). Antibiotic resistance: multidrug efflux proteins, a common transport mechanism? *Nat. Prod. Rep.* 22, 439.
- Lattar, S.M., Noto Llana, M., Denoël, P., Germain, S., Buzzola, F.R., Lee, J.C., and Sordelli, D.O. (2014). Protein Antigens Increase the Protective Efficacy of a Capsule-Based Vaccine against *Staphylococcus aureus* in a Rat Model of Osteomyelitis. *Infect. Immun.* 82, 83–91.
- Lays, C. (2012). ARN régulateurs de *Staphylococcus aureus* : Rôle de RsaA dans la formation du biofilm et de la capsule, Niveaux d'expression des ARN dans les prélèvements cliniques. Université Claude Bernard Lyon 1.
- Lee, K.-W. (2002). Essential oils in broiler nutrition. s.n.
- Lee, K.-W., Everts, H., Kappert, H.J., Frehner, M., Losa, R., and Beynen, A.C. (2003). Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 44, 450–457.
- Lerminiaux, N.A., and Cameron, A.D.S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can. J. Microbiol.* 65, 34–44.

- Leski, T.A., and Tomasz, A. (2005). Role of penicillin-binding protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross-linking of *Staphylococcus aureus*: evidence for the cooperative functioning of PBP2, PBP4, and PBP2A. *J. Bacteriol.* 187, 1815–1824.
- Levy, S.B. (1997). Antibiotic resistance: an ecological imbalance. *Ciba Found. Symp.* 207, 1–9; discussion 9–14.
- Levy, S.B. (2001). Antibiotic Resistance: Consequences of Inaction. *Clin. Infect. Dis.* 33, S124–S129.
- Lew, D.P., and Waldvogel, F.A. (1999). Use of Quinolones in Osteomyelitis and Infected Orthopaedic Prosthesis: *Drugs.* 58, 85–91.
- Lipsitch, M., Singer, R.S., and Levin, B.R. (2002). Antibiotics in agriculture: When is it time to close the barn door? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 5752–5754.
- Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., et al. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases.* 16, 161–168.
- Mader, J.T., Norden, C., Nelson, J.D., and Calandra, G.B. (1992). Evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of osteomyelitis in adults. *Infectious Diseases Society of America and the Food and Drug Administration. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 15 Suppl 1, S155–161.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., and Brock, T.D. (1997). *Brock biology of microorganisms* (Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall).
- Maffulli, N., Papalia, R., Zampogna, B., Torre, G., Albo, E., and Denaro, V. (2016). The management of osteomyelitis in the adult. *The Surgeon.* 14, 345–360.
- Maier, K., Fischer, D., Hartmann, A., Kershaw, O., Prenger-Berninghoff, E., Pendl, H., and Lierz, M. (2015). Vertebral osteomyelitis and septic arthritis associated with *Staphylococcus hyicus* in a juvenile peregrine falcon (*Falco peregrinus*). *Journal of avian medicine and surgery.* 29, 216–223.
- Mal, S., Berendt, A.R., and Peacock, S.J. (2002). *Staphylococcus aureus* Bone and Joint Infection. *J. Infect.* 44, 143–151.
- Marchese, A., Orhan, I.E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S.F., Gortzi, O., Izadi, M., and Nabavi, S.M. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chem.* 210, 402–414.
- Marietto-Gonçalves, G., Lima, E., Nagayoshi, B., Tonin, A., Knöbl, T., and Adreatti Filho, R. (2018). *Raoultella ornithinolytica* Isolation in Cloacal Microbiota of *Tinamus solitarius*: Preliminary Data. *Brazilian Journal of Poultry Science.* 20, 189–192.

- Marshall, B., Petrowski, D., and Levy, S.B. (1990). Inter- and intraspecies spread of *Escherichia coli* in a farm environment in the absence of antibiotic usage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 6609–6613.
- Massin, P., Legrand, E., Cronier, P., Chappard, D., and Audran, M. (2006). Diagnostic et traitement des ostéomyélites chroniques de l'adulte à pyogène. *Rev. Rhum.* 73, 380–386.
- Matsuoka, M., and Sasaki, T. (2004). Inactivation of macrolides by producers and pathogens. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 4, 217–240.
- May, J. (2000). Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 639–643.
- McCullagh, J.J., McNamee, P.T., Smyth, J.A., and Ball, H.J. (1998). The use of pulsed field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in commercial broiler flocks. *Vet. Microbiol.* 63, 275–281.
- Melzer, M., Goldsmith, D., and Gransden, W. (2000). Successful Treatment of Vertebral Osteomyelitis with Linezolid in a Patient Receiving Hemodialysis and with Persistent Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Vancomycin-Resistant *Enterococcus Bacteremias*. *Clin. Infect. Dis.* 31, 208–209.
- Mevius, D.J., Rutter, J.M, Hart, C.A., (1999). Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines. Report and qualitative risk assessment by the committee for veterinary medicinal products, Editions Le point vétérinaire. 1-57 p.
- Michiels, J., Missotten, J., Fremaut, D., De Smet, S., and Dierick, N. (2007). *In vitro* dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. *Livest. Sci.* 109, 157–160.
- Miranda, J.M., Vazquez, B.I., Fente, C.A., Barros-Velazquez, J., Cepeda, A., and Franco, C.M. (2008). Evolution of Resistance in Poultry Intestinal *Escherichia coli* During Three Commonly Used Antimicrobial Therapeutic Treatments in Poultry. *Poult. Sci.* 87, 1643–1648.
- Mitsuhashi, S. (1993). Drug Resistance in Bacteria: History, Genetics and Biochemistry. *J. Int. Med. Res.* 21, 1–14.
- Moleyar, V., and Narasimham, P. (1992). Antibacterial activity of essential oil components. *Int. J. Food Microbiol.* 16, 337–342.
- Moritz V. (2001). Résistance aux antibiotiques, notamment en aviculture, Université de Pretoria, Afrique du Sud, 123-134 p.
- Moyer, A.J., and Coghill, R.D. (1946). Penicillin: VIII. Production of Penicillin in Surface Cultures. *J. Bacteriol.* 51, 57–78.

- Muloi, D., Ward, M.J., Pedersen, A.B., Fèvre, E.M., Woolhouse, M.E.J., and van Bunnik, B.A.D. (2018). Are Food Animals Responsible for Transfer of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* or Their Resistance Determinants to Human Populations? A Systematic Review. *Foodborne Pathog. Dis.* 15, 467–474.
- Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J., and Wink, M. (2010). Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine.* 17, 1061–1066.
- Munita, J.M., and Arias, C.A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. In *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition*, I.T. Kudva, N.A. Cornick, P.J. Plummer, Q. Zhang, T.L. Nicholson, J.P. Bannantine, and B.H. Bellaire, eds. (American Society of Microbiology), pp. 481–511.
- Mzabi, A., Tanghort, M., Chefchaou, H., Moussa, H., Chami, N., Chami, F., and Remmal, A. (2019). A Comparative Study of the Anticlostridial Activity of Selected Essential Oils, Their Major Components and a Natural Product with Antibiotics. *Int. J. Poult. Sci.* 18, 187–194.
- Nascimento, G.G.F., Locatelli, J., Freitas, P.C., and Silva, G.L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 31.
- Ndiaye, C. (2010). Etude anatomo-clinique et bacteriologique sur des cas suspects de colibacillose aviaire dans les regions de dakar et thies (senegal). Universite Cheikh anta Diop de Dakar.
- Nijsten, R., London, N., Bogaard, A. van den, and Stobberingh, E. (1995). *In-vivo* transfer of resistance plasmids in rat, human or pig-derived intestinal flora using a rat model. *J. Antimicrob. Chemother.* 36, 975–985.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 67, 593–656.
- Nolla, J.M., Ariza, J., Gómez-Vaquero, C., Fiter, J., Bermejo, J., Valverde, J., Escofet, D.R., and Gudiol, F. (2002). Spontaneous pyogenic vertebral osteomyelitis in non-drug users. *Semin. Arthritis Rheum.* 31, 271–278.
- Norden, C., Nelson, J.D., Mader, J.T., and Calandra, G.B. (1992). Evaluation of New Anti-Infective Drugs for the Treatment of Infections of Prosthetic Hip Joints. *Clin. Infect. Dis.* 15, S177–S181.
- O'Brien, T.F. (1997). The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 24 Suppl 1, S2-8.
- O'Brien, T.F. (2002). Emergence, Spread, and Environmental Effect of Antimicrobial Resistance: How Use of an Antimicrobial Anywhere Can Increase Resistance to Any Antimicrobial Anywhere Else. *Clin. Infect. Dis.* 34, S78–S84.

- OCDE/FAO. (2018). Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO. Statistiques agricoles de l'OCDE (base de données), kcck.
- Ohno, T., Kita, M., Yamaoka, Y., Imamura, S., Yamamoto, T., Mitsufuji, S., Kodama, T., Kashima, K., and Imanishi, J. (2003). Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 8, 207–215.
- Orhan, G., Bayram, A., Zer, Y., and Balci, I. (2005). Synergy Tests by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 140–143.
- Oteo, J., Campos, J., Lázaro, E., Cuevas, Ó., García-Cobos, S., Pérez-Vázquez, M., de Abajo, F.J., and Spanish Members of EARSS (2008). Increased Amoxicillin–Clavulanic Acid Resistance in *Escherichia coli* Blood Isolates, Spain. *Emerging Infectious Diseases*. 14, 1259–1262.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., and Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 18, 414–420.
- Palaniappan, K., and Holley, R.A. (2010). Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 164–168.
- Park, J.T., and Uehara, T. (2008). How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR.* 72, 211–227, table of contents.
- Patel, G., and Bonomo, R.A. (2011). Status report on carbapenemases: challenges and prospects. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 9, 555–570.
- Pedersen, L.C., Benning, M.M., and Holden, H.M. (1995). Structural investigation of the antibiotic and ATP-binding sites in kanamycin nucleotidyltransferase. *Biochemistry*. 34, 13305–13311.
- Pellecuer J., Allegrini J. and Siineon De Buochberg M. (1976). Huiles essentielles bactéricides et fongicides. *Rev. Inst. Pasteur (Lyon)*. 9, 135-159
- Peravali, R.K., Jayade, B., Joshi, A., Shirganvi, M., Bhasker Rao, C., and Gopalkrishnan, K. (2012). Osteomyelitis of Maxilla in Poorly Controlled Diabetics in a Rural Indian Population. *J. Maxillofac. Oral Surg.* 11, 57–66.
- Platel, K., and Srinivasan, K. (2000). Influence of dietary spices and their active principles on pancreatic digestive enzymes in albino rats. *Nahrung/Food*. 44, 42–46.
- Price, L.B., Lackey, L.G., Vailes, R., and Silbergeld, E. (2007). The Persistence of Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter* in Poultry Production. *Environmental Health Perspectives*. 115, 1035–1039.

- Putman, M., van Veen, H.W., and Konings, W.N. (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR.* 64, 672–693.
- Qureshi, N.N., Gallaher, B., and Schiller, N.L. (2014). Evolution of Amoxicillin Resistance of *Helicobacter pylori* *In Vitro*: Characterization of Resistance Mechanisms. *Microb. Drug Resist.* 20, 509–516.
- Ramdane, M.S. (2015). Etudes qualitatives et quantitatives des résidus d'antibiotiques dans la viande de volaille et les œufs dans la région de la Mitidja. Utilisation des probiotiques comme alternative.
- Raper, K.B., and Fennell, D.I. (1946). The Production of Penicillin X in Submerged Culture. *J. Bacteriol.* 51, 761–777.
- Rees, J.R., Morris, C.B., Peacock, J.L., Ueland, P.M., Barry, E.L., McKeown-Eyssen, G.E., Figueiredo, J.C., Snover, D.C., and Baron, J.A. (2017). Unmetabolized Folic Acid, Tetrahydrofolate, and Colorectal Adenoma Risk. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)*. 10, 451–458.
- Reilly, S.S., Hudson, M.C., Kellam, J.F., and Ramp, W.K. (2000). *In vivo* internalization of *Staphylococcus aureus* by embryonic chick osteoblasts. *Bone.* 26, 63–70.
- Remmal, A., Achahbar, S., Bouddine, L., Chami, N., and Chami, F. (2011). *In vitro* destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. *Vet. Parasitol.* 182, 121–126.
- Remmal, A., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A., and Ettayebi, M. (1993a). Inhibition of antibacterial activity of essential oils by tween 80 and ethanol in liquid medium. *J. Pharm. Belg.* 48, 352–356.
- Remmal, A., Bouchikhi, T., Rhayour, K., Ettayebi, M., and Tantaoui-Elaraki, A. (1993b). Improved Method for the Determination of Antimicrobial Activity of Essential Oils in Agar Medium. *J. Essent. Oil Res.* 5, 179–184.
- Rhayour, K., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A., Sendide, K., and Remmal, A. (2003). The Mechanism of Bactericidal Action of Oregano and Clove Essential Oils and of Their Phenolic Major Components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Essent. Oil Res.* 15, 356–362.
- Remmal, A., & Akhmouch, A. A. (2019). Pharmaceutical formulation comprising cineole and amoxicillin. U.S. Patent Application No. 16/306,262.
- Remmal, A, Oukhouia, M, Sennouni, C.I, et al. Stable solid composition based on an aromatic compound and uses thereof. U.S. Patent Application No 16/462,123, 31 oct. 2019.
- Ricke, S.C., Jarquin, R., and Hanning, I. (2012). Antimicrobials in animal feed: benefits and limitations. In *Animal Feed Contamination*, (Elsevier), pp. 411–431.
- Ronald, A.R., Turck, M., and Petersdorf, R.G. (1966). A critical evaluation of nalidixic acid in urinary-tract infections. *N. Engl. J. Med.* 275, 1081–1089.

- Rondevaldova, J., Hummelova, J., Tauchen, J., and Kokoska, L. (2018). *In Vitro* Antistaphylococcal Synergistic Effect of Isoflavone Metabolite Demethyltexasin with Amoxicillin and Oxacillin. *Microb. Drug Resist.* 24, 24–29.
- Rosato, A., Piarulli, M., Corbo, F., Muraglia, M., Carone, A., Vitali, M.E., and Vitali, C. (2010). *In vitro* synergistic antibacterial action of certain combinations of gentamicin and essential oils. *Curr. Med. Chem.* 17, 3289–3295.
- Saleha, A. A., Myaing, T. T., Ganapathy, K. K., Zulkifli, I., Raha, R., & Arifah, K. (2009). Possible effect of antibiotic-supplemented feed and environment on the occurrence of multiple antibiotic resistant *Escherichia coli* in chickens. *International Journal of Poultry Science.* 8(1), 28-31.
- Samanta, I., Joardar, S.N., Das, P.K., Das, P., Sar, T.K., Dutta, T.K., Bandyopadhyay, S., Batabyal, S., and Isore, D.P. (2014). Virulence Repertoire, Characterization, and Antibiotic Resistance Pattern Analysis of *Escherichia coli* Isolated from Backyard Layers and Their Environment in India. *Avian Dis.* 58, 39–45.
- Sambyal, D.S., and Baxi, K.K. (1980). Bacterial flora of the respiratory tract of wild birds in Ludhiana (Punjab). *Zentralblatt Veterinärmedizin Reihe B* 27, 165–168.
- Santoro, G.F., das Graças Cardoso, M., Guimarães, L.G.L., Salgado, A.P.S.P., Menna-Barreto, R.F.S., and Soares, M.J. (2007). Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol. Res.* 100, 783–790.
- Schatz, A., Bugle, E., and Waksman, S.A. (1944). Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.\*. *Exp. Biol. Med.* 55, 66–69.
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L., and Goodwin, A.C. (2007). *Antimicrobial susceptibility testing protocols* (Boca Raton: CRC Press).
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., and Walsh, T.R. (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 17, 431–437.
- Sękowska, A. (2017). *Raoultella spp.*—clinical significance, infections and susceptibility to antibiotics. *Folia Microbiologica.* 62, 221–227.
- Senatore, F. (1996). Influence of Harvesting Time on Yield and Composition of the Essential Oil of a Thyme (*Thymus pulegioides* L.) Growing Wild in Campania (Southern Italy). *J. Agric. Food Chem.* 44, 1327–1332.
- Sennouni, C., Oukhouia, M., Jabeur, I., Hamdani, H., Chami, F., and Remmal, A. (2018). Antibacterial effect of thymol on poultry drinking water: *in vitro* and *in vivo* study. *WORLD J. Adv. Healthc. Res.*



- Shah, A.A., Hasan, F., Ahmed, S., and Hameed, A. (2004). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBLs): Characterization, Epidemiology and Detection. *Crit. Rev. Microbiol.* 30, 25–32.
- Sienkiewicz, M., Łysakowska, M., Kowalczyk, E., Szymańska, G., Kochan, E., Krukowska, J., Olszewski, J., and Zielińska-Bliźniewska, H. (2017). The ability of selected plant essential oils to enhance the action of recommended antibiotics against pathogenic wound bacteria. *Burns.* 43, 310–317.
- Silva, S.M., Abe, S.Y., Murakami, F.S., Frensch, G., Marques, F.A., and Nakashima, T. (2011). Essential Oils from Different Plant Parts of *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth. (Myrtaceae) as a Source of 1,8-Cineole and Their Bioactivities. *Pharmaceuticals.* 4, 1535–1550.
- Slotved, H.-C., Kalsoft, M., Skovsted, I.C., Kern, M.B., and Espersen, F. (2004). Simple, Rapid Latex Agglutination Test for Serotyping of Pneumococci (Pneumotest-Latex). *Journal of Clinical Microbiology.* 42, 2518–2522.
- Smith, H.W. (1965). The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *The Journal of Pathology and Bacteriology.* 90, 495–513.
- Simoneit, C., Burow, E., Tenhagen, B.-A., and Käsbohrer, A. (2015). Oral administration of antimicrobials increase antimicrobial resistance in *E. coli* from chicken – A systematic review. *Prev. Vet. Med.* 118, 1–7.
- Singh, S.B., and Barrett, J.F. (2006). Empirical antibacterial drug discovery—Foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* 71, 1006–1015.
- Sinha, B., François, P.P., Nüsse, O., Foti, M., Hartford, O.M., Vaudaux, P., Foster, T.J., Lew, D.P., Herrmann, M., and Krause, K.H. (1999). Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin  $\alpha 5\beta 1$ . *Cell. Microbiol.* 1, 101–117.
- Smith, H.W. (1970). The Transfer Of Antibiotic Resistance Between Strains Of Enterobacteria In Chicken, Calves And Pigs. *J. Med. Microbiol.* 3, 165–180.
- Smith, W.H. (1969). Transfer of antibiotic resistance from animal and human strains of *Escherichia coli* to resident *E. coli* in the alimentary tract of man. *The Lancet.* 293, 1174–1176.
- Snydman, D.R., McDermott, L.A., and Jacobus, N.V. (2005). Evaluation of *In Vitro* Interaction of Daptomycin with Gentamicin or Beta-lactam Antibiotics Against *Staphylococcus aureus* and Enterococci by FIC Index and Timed-Kill Curves. *J. Chemother.* 17, 614–621.
- Soranoglou, V., Galanopoulos, I., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Papalois, A., Giannitsioti, E., Poultsides, L.A., Choreftaki, T., and Kanellakopoulou, K. (2017). Efficacy of intramuscular moxifloxacin in the treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 50, 186–190.

- Souahibou S. (2014). Performances zootechnico-economique des poulets de chair. Université cheikh anta diop de dakar, 125-130 p.
- Soussy, C.J., Cluzel, R., and Courvalin, P. (1994). Definition and determination of *in vitro* antibiotic susceptibility breakpoints for bacteria in France. The Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. 13, 238–246.
- Souza, H., Fernandes, C., Tintino, S., Morais-Braga, M., Araújo, A., Coutinho, H., Menezes, I., and Kerntopf, M. (2013). Phytochemical composition, antibacterial and modulatory of antibiotic activity of the extract and fractions from *Annona squamosa* L. Ethnobiol. Conserv.
- Spratt, B.G. (1994). Resistance to antibiotics mediated by target alterations. Science. 264, 388–393.
- Stengel, D., Bauwens, K., Sehouli, J., Ekkernkamp, A., and Porzsohl, F. (2001). Systematic review and meta-analysis of antibiotic therapy for bone and joint infections. Lancet Infect. Dis. 1, 175–188.
- Suresh, G., Das, R.K., Kaur Brar, S., Rouissi, T., Avalos Ramirez, A., Chorfi, Y., and Godbout, S. (2018). Alternatives to antibiotics in poultry feed: molecular perspectives. Crit. Rev. Microbiol. 44, 318–335.
- Taghipour, A., Rafiei, S.M., Masouleh, M.N., and Mortazavi, S.P. (2018). A comparative study on the effects of vancomycin, enrofloxacin, and trimethoprim/sulfamethoxazole on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in an animal model. Comp. Clin. Pathol.
- Talaro K. P. & Chess B. (2008). Foundations in microbiology. 8th Ed. McGraw Hill, New York
- Tang, S.S., Apisarnthanarak, A., and Hsu, L.Y. (2014). Mechanisms of  $\beta$ -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. Adv. Drug Deliv. Rev. 78, 3–13.
- Toghyani, M., Tohidi, M., GHeisari, A.A., and Tabeidian, S.A. (2010). Performance, immunity, serum biochemical and hematological parameters in broiler chicks fed dietary thyme as alternative for an antibiotic growth promoter. 6819–6825.
- Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., and Fowler, V.G. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. Clin. Microbiol. Rev. 28, 603–661.
- Toprak, E., Veres, A., Michel, J.-B., Chait, R., Hartl, D.L., and Kishony, R. (2012). Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. Nat. Genet. 44, 101–105.

- Torumkuney, D., Gur, D., Soyletir, G., Gurler, N., Aktas, Z., Sener, B., Tunger, A., Bayramoglu, G., Koksall, I., Yalcin, A.N., *et al.* (2016). Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2002–09 in Turkey. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, i85–i91.
- Tuomanen, E., Durack, D.T., and Tomasz, A. (1986). Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30, 521–527.
- Turner, N.A., Sharma-Kuinkel, B.K., Maskarinec, S.A., Eichenberger, E.M., Shah, P.P., Carugati, M., Holland, T.L., and Fowler, V.G. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat. Rev. Microbiol.*
- Unkila-Kallio, L., Kallio, M.J., Eskola, J., and Peltola, H. (1994). Serum C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, and white blood cell count in acute hematogenous osteomyelitis of children. *Pediatrics.* 93, 59–62.
- Usera, M.A., Aladueña, A., González, R., De la Fuente, M., García-Peña, J., Frías, N., and Echeita, M.A. (2002). Antibiotic resistance of *Salmonella spp.* from animal sources in Spain in 1996 and 2000. *J. Food Prot.* 65, 768–773.
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., and Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 5649–5654.
- Van den Bogaard, A. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 14, 327–335.
- Van der Horst, M.A., Fabri, T.H., Schuurmans, J.M., Koenders, B.B., Brul, S., and ter Kuile, B.H. (2013). Effects of Therapeutical and Reduced Levels of Antibiotics on the Fraction of Antibiotic-Resistant Strains of *Escherichia coli* in the Chicken Gut. *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 55–61.
- Van Veen, H.W., and Konings, W.N. (1997). Drug efflux proteins in multidrug resistant bacteria. *Biol. Chem.* 378, 769–777.
- Van, T.T.H., Moutafis, G., Istivan, T., Tran, L.T., and Coloe, P.J. (2007). Detection of *Salmonella spp.* in Retail Raw Food Samples from Vietnam and Characterization of Their Antibiotic Resistance. *Applied and Environmental Microbiology.* 73, 6885–6890.
- Varel, V.H. (2002). Livestock manure odor abatement with plant-derived oils and nitrogen conservation with urease inhibitors: A review1. *J. Anim. Sci.* 80, E1–E7.
- Vetting, M.W., Magnet, S., Nieves, E., Roderick, S.L., and Blanchard, J.S. (2004). A bacterial acetyltransferase capable of regioselective N-acetylation of antibiotics and histones. *Chem. Biol.* 11, 565–573.
- Von Eiff, C., Becker, K., and Peters, G. (1997). Multiresistenz bei klinisch relevanten grampositiven Kokken. *Intensivmed. Notfallmedizin.* 34, 655–663.

- Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. 406, 775–781.
- Walters, M.S., Eggers, P., Albrecht, V., Travis, T., Lonsway, D., Hovan, G., Taylor, D., Rasheed, K., Limbago, B., and Kallen, A. (2015). Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* — Delaware, 2015. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 64, 1056.
- Wand, M.E., Bock, L.J., Bonney, L.C., and Sutton, J.M. (2017). Mechanisms of Increased Resistance to Chlorhexidine and Cross-Resistance to Colistin following Exposure of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates to Chlorhexidine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, 1162
- Warnke, P.H., Becker, S.T., Podschun, R., Sivananthan, S., Springer, I.N., Russo, P.A.J., Wiltfang, J., Fickenscher, H., and Sherry, E. (2009). The battle against multi-resistant strains: Renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* 37, 392–397.
- Webber, M.A., and Piddock, L.J.V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 9–11.
- Wegener, H.C., Aarestrup, F.M., Jensen, L.B., Hammerum, A.M., and Bager, F. (1999). Use of Antimicrobial Growth Promoters in Food Animals and *Enterococcus faecium* Resistance to Therapeutic Antimicrobial Drugs in Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 5, 329–335.
- White, D.G., Ayers, S., Maurer, J.J., Thayer, S.G., and Hofacre, C. (2003). Antimicrobial Susceptibilities of *Staphylococcus aureus* Isolated from Commercial Broilers in Northeastern Georgia. *Avian Diseases*. 47, 203–210.
- Windisch, W., Schedle, K., Plitzner, C., and Kroismayr, A. (2008). Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry1. *J. Anim. Sci.* 86, E140–E148.
- Wolfgang, M., van Putten, J.P.M., Hayes, S.F., and Koomey, M. (1999). The comP locus of *Neisseria gonorrhoeae* encodes a type IV prepilin that is dispensable for pilus biogenesis but essential for natural transformation. *Mol. Microbiol.* 31, 1345–1357.
- Wootton, M. (2001). A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 47, 399–403.
- Ziani, Z. (1992). Contribution à l'étude de l'antibiorésistance d'*Escherichia coli* d'origine aviaire au Maroc. IAV Hassan II, Rabat.
- Xavier A. (2017). Etude de la virulence de *Staphylococcus lugdunensis*. Bactériologie. Université de Strasbourg. Français.
- Xu, J., Zhou, F., Ji, B.-P., Pei, R.-S., and Xu, N. (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 174–179.

- Yamashita, S.K., Louie, M., Simor, A.E., and Rachlis, A. (2000). Microbiologic Surveillance and Parenteral Antibiotic Use in a Critical Care Unit. *Can. J. Infect. Dis.* 11, 107–111.
- Yang, W., Moore, I.F., Koteva, K.P., Bareich, D.C., Hughes, D.W., and Wright, G.D. (2004). TetX Is a Flavin-dependent Monooxygenase Conferring Resistance to Tetracycline Antibiotics. *J. Biol. Chem.* 279, 52346–52352.
- Yazawa, K., Mikami, Y., Maeda, A., Morisaki, N., and Iwasaki, S. (1994). Phosphorylative inactivation of rifampicin by *Nocardia otitidiscaviarum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 33, 1127–1135.
- Yin, L.-Y., Lazzarini, L., Li, F., Stevens, C.M., and Calhoun, J.H. (2005). Comparative evaluation of tigecycline and vancomycin, with and without rifampicin, in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* experimental osteomyelitis in a rabbit model. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 995–1002.
- Zaborowska, M., Tillander, J., Brånemark, R., Hagberg, L., Thomsen, P., and Trobos, M. (2017). Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of staphylococci and enterococci from osteomyelitis associated with percutaneous orthopaedic implants: biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 105, 2630–2640.
- Zaman, S.B., Hussain, M.A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K.T., and Hossain, N. (2017). A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus.* 9, 1403.