



HAL
open science

Évaluation des huiles essentielles en complémentation animale préventive

Marie Lang

► **To cite this version:**

Marie Lang. Évaluation des huiles essentielles en complémentation animale préventive. Alimentation et Nutrition. Université de Bretagne Sud, 2018. Français. NNT : 2018LORIS492 . tel-04213421

HAL Id: tel-04213421

<https://theses.hal.science/tel-04213421>

Submitted on 21 Sep 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITÉ BRETAGNE SUD
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ÉCOLE DOCTORALE N° 598
Sciences de la Mer et du littoral
Spécialité : *Biotechnologies*

Par

Marie LANG

Évaluation des huiles essentielles en complémentation animale préventive

Thèse présentée et soutenue à Vannes, le 03 juillet 2018
Unité de recherche : Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA 3884
Thèse N° : 492

Rapporteurs avant soutenance :

Nathalie Guivarc'h Professeur à l'Université de Tours
Olivier Lesouhaitier Professeur à l'Université de Rouen

Composition du Jury :

Président Gilles Salvat	Directeur général délégué de l'Anses pour la recherche et la référence
Irène Gabriel	Chargée de recherche à l'Université de Tours
Nathalie Guivarc'h Olivier Lesouhaitier	Professeur à l'Université de Tours Professeur à l'Université de Rouen
Directeur de thèse Alexis Bazire	Maitre de conférence HDR à l'UBS
Co-directeur de thèse Gilles Bedoux	Maitre de conférence à l'UBS
Invité Emmanuel Duteil	Ingénieur de recherche à BioArmor SA

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du Jury, Dr. Gabriel Irène, Pr. Givarc'h Nathalie, Pr. Lesouhaitier Oliver et Dr. Salvat Gilles, pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail. Je remercie tout particulièrement les Pr. Givarc'h Nathalie et Lesouhaitier Oliver d'avoir accepté d'en être les rapporteurs.

J'adresse mes remerciements à l'équipe de CBB CapBioteck et tout particulièrement à Mme Letaconoux Nathalie qui nous a apporté son aide précieuse dans le montage de ce projet et son suivi. Je remercie également la Région Bretagne, qui a apporté le financement nécessaire à la réalisation de ce projet.

Je souhaiterais apporter mes plus sincères remerciements à mes directeurs de thèse, Alexis Bazire et Gilles Bedoux. Merci pour votre soutien, votre aide et vos conseils (ainsi que vos corrections !).

Merci Gilles de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet, me permettant de continuer la collaboration débutée il y a près de cinq ans avec BioArmor, sur ce sujet qui me passionne tant. Merci de m'avoir fait confiance pour porter le projet EVHELAP. Merci également au Pr. Nathalie Bourgougnon, directrice du LBCM, qui m'a également accompagnée dans cette aventure. Vous formez avec Gilles une fine équipe à la tête de l'antenne de Vannes. Travailler à vos côtés a été agréable et très formateur, tant quant à l'esprit d'équipe qu'à l'esprit scientifique.

Je souhaite également adresser mes remerciements à l'équipe R&D de BioArmor. Merci Emmanuel d'avoir rendu le projet EVHELAP possible. Merci également à Aude et Céline, qui ont pris le temps de relire ce manuscrit afin d'y apporter leur touche « zootechnique » ! Votre bonne humeur a rendu le travail d'équipe très agréable.

J'adresse également mes remerciements aux membres de l'équipe d'HCS-Pharma à Rennes, qui m'ont accueillie dans leurs locaux pour la réalisation du travail sur les macrophages. Merci tout particulièrement à Pierre-Jean et Kathleen qui ont partagé avec moi leurs connaissances et leurs expériences et m'ont beaucoup aidée tout au long de ces essais.

Je souhaite au passage remercier tous les membres du Laboratoire et plus particulièrement les membres de l'équipe de Vannes, anciens, éternels ou nouveaux. Merci à Anne-Sophie, Kévin, Ludo et Romain - présents lors de mon débarquement en Bretagne - merci pour votre accueil au pays de la galette et du K-way et votre bonne humeur ; Je salue également Maya et Marin-Pierre que j'ai eu la chance de rencontrer à l'occasion de leur passage au laboratoire. Merci Christel, pour ton aide en virologie (la seule chose qui n'ai jamais marché) et ton écoute. J'adresse tous mes encouragements aux futurs docteurs, Mathilde, Rhesie & Meezan, Shareen ainsi que Rexie. Merci également à Sophie, qui m'a enseigné les rudiments du biofilm, ainsi qu'à Albane.

Je souhaiterais également adresser mes remerciements aux membres de l'équipe enseignante, Annette, Bernard et Philippe qui ont fait en sorte que cette année d'ATER se déroule pour le mieux. Merci également à Jérôme pour son assistance technique lors de mes nombreux déboires informatiques.

De manière plus personnelle, je souhaite saluer mes deux acolytes de KerUBS, Nolwenn et Mélanie (alias Mildred). Merci d'avoir partagé cette aventure avec moi, de m'avoir supportée et encouragée lorsque « ça ne marchait TOUJOURS pas ». Entre nous ça commençait comme une blague « c'est l'histoire d'une Alsacienne, d'une Ch'ti et d'une Bretonne » et c'est vrai qu'on a bien rit. Notamment à l'occasion de nos soirées « Club lecture - œnologie » ou de nos ateliers cosméto... Merci Mélanie pour ta joie de vivre et ton optimisme sans faille, ton accent caché et ta tarte au chuc'. Merci Nolwenn pour ton amitié et ton temps, tes cours de chimie et bien entendu ta relecture finale (eye of the tiger).

Merci également à mes collègues Alsaciens, toujours disponibles lors de nos retours : Camille & Thomas (ou serait-ce Matthieu ?), Noémie & Alex, Géraldine & Julien, mais également Raph, Auré, Christelle, Christophe et Anne. Il paraît que la distance n'entache pas les amitiés vraies...

Enfin, je tiens également à remercier chaleureusement ma famille proche, qui a toujours su me remonter le moral : merci à mes parents qui ont accepté mon exil Breton et qui ont toujours su m'encourager dans mes études. Merci à Christophe, pour m'avoir suivie jusqu'ici et avoir supporté ces weekends en tête à tête avec mon ordinateur et pour m'avoir supporté moi, tout simplement. Merci également à Nattoo, Beagle de cirque, qui sait toujours comment me remonter le moral.

Liste des abréviations

A

ABAP : 2,2'-AzoBis(2-AmidinoPropane)

Abf : Antibiofilm

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ALC : Acide Linoléique Conjugué

ANSES : Agence Nationale de la Sécurité Sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail

ANSM : Agence Nationale de la Santé et du Médicament

APC : Antibiotiques Promoteurs de Croissance

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adenosine TriPhosphate

B

BHA : HydroxyAnisole Butylé

BHI : Brain Heart Infusion

BVDV : Virus de la Diarrhée Virale Bovine (de l'anglais « Bovine viral diarrhea »)

C

CC₅₀ : Concentration cytotoxique à 50%

CE : Communauté Européenne

CE₅₀ : Concentration Efficace à 50%

CI₅₀ : Concentration Inhibitrice à 50%

CIP : Collection de l'Institut Pasteur

CMB : Concentrations Minimales Bactéricides (MBC en anglais)

CMI : Concentrations Minimales Inhibitrices (MIC en anglais)

COX : Cyclooxygénase

CPG / CPG-MS : Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) couplée à la Spectrométrie de Masse (MS)

CS : Cellule Somatique

D

DAC : Distributeurs Automatiques de Concentré

DADS : DiAllyl DiSulfide

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
DHMEQ : DeHydroxyMethylEpoxyQuinomicin
DI₅₀ : Dose Infectieuse à 50%
Dig : Digestif
DMAPP : DiMéthylAllyl-PyroPhosphate
DMSO : DiMéthylSulfOxyde
DPPH : 2,2-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl
DTNB : 5,5-DiThio-bis-(2-NitroBenzoic acid)

E

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EVHELSENE : EVAluation des Huiles EssentieLles en Santé ANimaleE
EVHELSEAP : EVAluation des Huiles EssentieLles en Complémentation Animale Préventive

F

FAO : Food and Agriculture Organization
FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Products

G

GAE : Equivalent Acide Gallic (de l'anglais « Gallic Acid Equivalent »)

H

HE : Huile Essentielle
HRP : HorseRadish Peroxidase
HSL : HomoSerine-Lactone
HSP : Heat Shock Protein

I

IBV : Virus de la Bronchite Infectieuse (de l'anglais « Infectious Bronchitis Virus »)
Ig : Immunoglobuline
IL : InterLeukine
INAPORC : INterprofession NAtionale POrcine
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
IP : Iodure de Propidium
IPP : IsoPentenyl diPhosphate

L

LB : Luria Berthani
LOX : Lipoxygénase

LPS : LipoPolySaccharides

M

M : Millions

Mam : Mammites

MCBL : Microscope Confocal à Balayage Laser

Md : Milliards

MDA : MalonDiAldehyde

MEM : Minimal Essential Medium

MMS : Methyl MethaneSulfonate

MOI : Multiplicité d'infection (de l'anglais « Multiplicity Of Infection »)

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

N

N.T. : Non Typable (*E. coli*)

NDGA : Acide NorDihydroGuaiaretic

NGM : Nematode Growth Medium

NO : NitrOxyde

NOS : NitrOxyde Synthase

O

OmpA : Outer Membrane Protein A

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

PAC : Politique Commune Agricole

PAL : Phénylalanine Ammonia-Lyase

PAMP : Pathogen Associated Motif Pattern

PBS : Tampon phosphate (de l'anglais « Phosphate Buffered Saline »)

PC : PhosphatidylCholine

PCR : Amplification en chaine par polymérase (de l'anglais « Polymerase Chain Reaction »)

PLA2 : Phospholipase A2

PPAM : Plantes à Parfum Aromatiques et Médicinales

PQS : *Pseudomonas* Quinolone Signal

PRR : Pattern Recognition Receptor

Q

QS : Quorum Sensing

R

Resp : Respiratoire

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : Espèces réactives de l'oxygène (de l'anglais « Reactive Oxygen Species »)

RPM : Rotations Par Minutes

RSVB : Virus Respiratoire Syncytial Bovin (de l'anglais « Respiratory Syncytial Virus »)

S

SA : Société Anonyme

SAU : Surface Agricole Utile

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SOD : SuperOxyde Dismutase

SPS : Sérum Physiologique Stérile

SVF : Sérum de Veau Fœtal

T

TBARS : ThioBarbituric Acid Reactive Species

TEAC : Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

TLR : Toll Like Receptor

TMB : 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TNF : Facteur de Nécrose Tumorale (de l'anglais « Tumor Necrosis Factor »)

TPTZ : 2,4,6-Tris(2-Pyridyl)-s-TriaZine

U

UV : UltraViolets

V

VHS : Virus Herpes Simplex

Articles

Lang M., Rodrigues S., Boulho R., Duteil E., Bazire A., Bedoux G. 2016. *An Essential Oil Blend Prevents Pseudomonas aeruginosa PA01 from Forming Biofilms*. J Bacteriol Parasitol 7:268

Communications orales

Boulho R., Lang M., *Optimization of essential oil blends formulation with antioxidant, antibiotic and anti-biofilm properties*. Congrès Molécules et Ingrédients Santé, Mai 2014 Quimper.

Lang M., Rodrigues S., Boulho R., Duteil E., Bazire A., Bedoux G. 2015. *Anti-adhesive and anti-biofilm activities of an essential oil blend on Pseudomonas aeruginosa*. 7ème Colloque du Réseau National Biofilm 2015, Toulouse, 2-3 Décembre 2015.

Lang M., Duteil E., Bazire A., Bedoux G. *Essential oil blends as preventive feed supplement for animal health*. ISEO, September 2017, Pecs (Hun).

Communications par affiches

Boulho R., Lang M., *Optimization of essential oil blends formulation with antioxidant, antibiotic and anti-biofilm properties*. Congrès Molécules et Ingrédients Santé, Mai 2014 Quimper.

Lang M., Rodrigues S., Boulho R., Duteil E., Bazire A., Bedoux G. 2015. *Anti-adhesive and anti-biofilm activities of an essential oil blend on Pseudomonas aeruginosa*. 7ème Colloque du Réseau National Biofilm 2015, Toulouse, 2-3 Décembre 2015.

Lang M., Duteil E., Bazire A., Bedoux G. *Blending essential oils to improve their biological activities*. PSE Young scientists meeting, June 2017, Lille.

Table des Matières

	Introduction Générale	1
1	Productions animales : situation et enjeux	3
1.1	Agriculture : une évolution constante	3
1.2	Conjoncture de l'agriculture et de l'élevage	4
1.2.1	Situation actuelle	4
1.2.2	Besoins de rentabilité et santé des animaux	6
1.2.3	Quelques exemples de pathogènes animaux	7
1.3	Antibiorésistance : vers une utilisation plus raisonnée des antibiotiques	10
1.4	Mise en place d'alternatives durables aux Antibiotiques Promoteurs de Croissance (APC)	12
1.5	Règlementation sur les additifs alimentaires pour animaux d'élevage.	13
2	Chimie et biochimie des huiles essentielles	14
2.1	Définition	14
2.2	Principales ressources	15
2.3	Organes de production et de stockage	17
2.4	Propriétés et activités chimiques des huiles essentielles	18
2.4.1	Composition des huiles essentielles	18
2.4.2	Activités anti-radicalaires	18
2.5	Propriétés et activités biochimiques des HE	19
2.5.1	Biosynthèse des HE	19
2.5.2	Activités anti-inflammatoires	20
3	Activités biologiques des huiles essentielles :	20
3.1	Activités antibactériennes	21
3.1.1	Mode d'action sur les bactéries planctoniques	21
3.1.2	Action sur les biofilms bactériens	24
3.2	Activités antivirales	26
3.3	Activités antifongiques	28
3.4	Activités anti-nociceptives	29
4	Activités des huiles essentielles en santé animale	30
4.1	Activités des huiles essentielles chez les ruminants.	30
4.1.1	Effet des huiles essentielles sur le rumen et lien avec le métabolisme	31
4.1.2	Effet des huiles essentielles sur la production de lait	32
4.1.3	Le cas particulier de la mammite	33
4.2	Activité des huiles essentielles chez les porcs	38
4.2.1	Impact des huiles essentielles sur la flore digestive	39
4.2.2	Effet des huiles essentielles sur le système immunitaire des porcs	40
4.3	Activité des huiles essentielles chez les volailles	43
4.3.1	Effets observés sur le système digestif	43

4.3.2	Effets sur le système immunitaire des volailles	44
4.3.3	Effets sur les performances zootechniques	45
5	Bibliographie de la partie introductive	46

Objectifs de l'étude 59

Matériels et méthodes 63

1	Huiles essentielles	66
2	Mélanges d'huiles essentielles	69
3	Mesure de l'activité anti-radicalaire et antioxydante des huiles essentielles et des mélanges	71
3.1	Essais liés à la réduction de radicaux libres	71
3.1.1	Capacité de capture des radicaux libres du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	72
3.1.2	Méthode « Ferric Reducing Antioxydant Power » (FRAP)	73
3.2	Essais liés à la peroxydation des acides gras	75
3.2.1	Méthode d'inhibition de blanchiment du β -carotène	75
3.2.2	Par la méthode « Thiobarbituric acid reactive species » (TBARS)	76
4	Mesure d'inhibition des activités enzymatiques par les huiles essentielles et les mélanges	78
4.1	Inhibition des enzymes impliquées dans la réponse inflammatoire	78
4.1.1	Mesure d'inhibition de la phospholipase A2	79
4.1.2	Mesure d'inhibition de la 15-lipoxygénase	81
4.2	Evaluation de l'inhibition de l'élastase par les huiles essentielles et les mélanges	82
5	Evaluation des activités antibactériennes	84
5.1	Bactéries utilisées au cours de cette étude et méthodes de culture	84
5.2	Mise en évidence des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des mélanges et huiles essentielles	87
6	Évaluation de l'activité antibiofilm du mélange Abf1	89
6.1	Formation du biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 en conditions statiques et dynamiques	89
6.1.1	Mesure de l'inhibition du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> PA01 par la méthode du cristal violet	89
6.1.2	Mesure d'inhibition de la formation du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> sur lame de verre	90
6.1.3	Mesure de l'inhibition du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> PA01 en cellules à flux	92
6.2	Inhibition du biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 par les HE d'ail, de menthe et de cannelle et de leurs composants principaux	95

6.2.1	Réalisation de l'analyse en microplaque a fond de verre	96
6.2.2	Observations au microscope confocal à balayage laser	96
6.2.3	Evaluation des effets des traitements sur l'expression des gènes liés au quorum sensing	97
7	Evaluation de l'activité antivirale des mélanges et des HE sur le modèle Herpès Simplex Virus de type 1 (VHS-1)	100
7.1	Culture des cellules VERO	100
7.1.1	Milieu de culture	100
7.1.2	Maintien des cellules VERO	101
7.1.3	Conservation des cellules VERO	102
7.1.4	Démarrage d'une nouvelle culture	102
7.2	Le virus Herpès simplex de type 1	103
7.2.1	Préparation du stock viral	103
7.2.2	Détermination du titre infectieux des solutions stocks	103
7.3	Évaluation de l'activité cytotoxique des huiles essentielles et mélanges	107
7.4	Mise en évidence des activités anti-herpétique	108
7.5	Recherche d'activité par mode d'action	109
7.5.1	Activité cytoprotectrice des huiles essentielles	109
7.5.2	Activité virucide des huiles essentielles	109
7.5.3	Inhibition de la réplication du virus par les huiles essentielles	110
7.6	Calcul de la viabilité cellulaire	111
8	Utilisation du modèle <i>Caenorhabditis elegans</i> pour l'évaluation de l'activité vermifuge	111
8.1	Culture des nématodes	111
8.2	Synchronisation	112
8.3	Évaluation de l'activité nématocide	113
9	Inhibition des biofilms de <i>Streptococcus agalactiae</i> , et <i>Streptococcus uberis</i>	114
9.1	Formation des biofilms bactériens	114
9.2	Révélation des biofilms par ajout de MTT	114
9.3	Observation du biofilm par microscopie confocale à balayage laser	115
10	Evaluation des activités immunomodulatrices sur le modèle cellulaire RAW 264.7	115
10.1	Méthode de culture des cellules RAW 264.7	115
10.2	Évaluation de la cytotoxicité des mélanges, des huiles essentielles et des composés majoritaires	117
10.3	Conditions de prétraitement des macrophages	118
10.4	Évaluation des activités immunomodulatrices	119
10.4.1	Effet des traitements sur la phagocytose	119
10.4.2	Effet des traitements sur l'expression de l'iNOS	120
10.4.3	Effet des traitements sur la production d'IL-1 et IL-6	121
11	Analyses statistiques	122
12	Bibliographie de la partie matériels et méthodes	123

1	Introduction	130
2	Résultats et discussion	133
2.1	Activités anti-radicalaires et antioxydantes	136
2.1.1	Évaluation de la capacité de piégeage des radicaux libres	136
2.1.2	Évaluation par des méthodes faisant appel à l'oxydation d'acides gras	140
2.2	Inhibition des enzymes pro-inflammatoires	145
2.2.1	Inhibition de la phospholipase A2	145
2.2.2	Inhibition de la 15-lipoxygénase	146
2.3	Inhibition de l'élastase	148
2.4	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB)	151
2.4.1	Activité des huiles essentielles	151
2.4.2	Activité des mélanges	154
2.5	Activités anti-herpétiques	157
2.5.1	Évaluation de la cytotoxicité sur le modèle cellulaire VERO	157
2.5.2	Mise en évidence d'activités sur le virus VHS-1	159
3	Conclusion	160
4	Bibliographie du chapitre 1	162

1	Introduction	170
2	Résultats et discussion	172
2.1	Activité du mélange Abf1 sur le biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	172
2.2	Effet des HE et de leurs composants majoritaires sur le biofilm de PAO1	181
2.2.1	Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des HE et de leurs composés majoritaires, seuls ou en mélange.	181
2.2.2	Activités antibiofilm des huiles essentielles et de leurs composés majoritaires.	183
2.2.3	Détermination des combinaisons d'HE et de composés impliquées dans l'activité du mélange Abf1.	185
2.3	Modulation des gènes de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	188
3	Conclusion	190
4	Bibliographie du chapitre 2	192

Chapitre 3

195

1	Introduction	198
2	Résultats et discussion	200
2.1	Activités anti-radicalaires et antioxydantes	200
2.1.1	Évaluation de la capacité de piégeage des radicaux libres	201
2.1.2	Évaluation de la capacité à prévenir l'oxydation d'acides gras	202
2.2	Inhibition de l'activité de la 15-lipoxygénase	204
2.3	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB)	207
2.4	Toxicité des huiles essentielles sur l'organisme modèle <i>Caenorhabditis elegans</i>	213
3	Conclusion	216
4	Bibliographie du chapitre 3	218

Chapitre 4

223

1	Introduction	226
2	Résultats et discussion	228
2.1	Activités anti-radicalaires et antioxydantes	228
2.1.1	Évaluation de la capacité de piégeage des radicaux libres	228
2.1.2	Évaluation de la capacité à inhiber l'oxydation d'acides gras	231
2.2	Inhibition de la 15-lipoxygénase	232
2.3	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB)	234
2.4	Inhibition des biofilms de <i>S. agalactiae</i> et <i>S. uberis</i>	238
2.4.1	Activités antibiofilm des HE de cannelle, d'origan et de tea tree	238
2.4.2	Activités antibiofilm du mélange Mam1	257
2.5	Confirmation des activités par observation en microscopie confocale à balayage laser	258
3	Conclusion	261
4	Bibliographie du chapitre 4	263

Chapitre 5

267

1	Introduction	269
2	Résultats et discussion	272
2.1	Activité immuno-modulatrice des huiles essentielles	272
2.2	Résultats complémentaires sur les mélanges	291
2.2.1	Modulation de la phagocytose	291
2.2.2	Effet du prétraitement sur l'expression intracellulaire de l'iNOS	293

	2.2.3 Effet du prétraitement sur la sécrétion d'IL-6	294
3	Conclusion	296
4	Bibliographie du chapitre 5	297
	Conclusion générale	299



Introduction générale

Liste des figures

Figure 1 : Alambic permettant la production d'huiles essentielles et leur séparation de l'hydrolat (Biotope des montagnes, n.d.).....	15
Figure 2: Principaux organes de plantes utilisés pour l'extraction d'huiles essentielles.....	16
Figure 3 : Exemples de molécules caractéristiques des huiles essentielles.....	18
Figure 4 : Structure de la paroi des bactéries à Gram + et à Gram - (Designua®)	19
Figure 5 : Représentation générale des étapes de la formation d'un biofilm chez l'organisme modèle <i>P. aeruginosa</i> (d'après Filloux and Vallet 2003).	19
Figure 6 : Structure du virus Herpès simplex de type 1(VHS-1)	19
Figure 7 : Schéma du cycle de réplication du virus Herpès simplex de type 1 (VHS-1).....	19
Figure 8: Processus de développement de la colibacillose et des différentes maladies associées chez le porcelet (Belot, n.d.).....	19

Liste des tableaux

Tableau 1: Exemples de pathogènes animaux responsables de maladies bovines, porcines et aviaires.	9
--	---

1 Productions animales : situation et enjeux

1.1 Agriculture : une évolution constante

À partir du Néolithique (9000 à 3000 avant J.C.), l'Homme s'est sédentarisé et a évolué de chasseur-cueilleur à agriculteur-éleveur. Dès 8500 avant J-C, les premiers troupeaux porcins, caprins et bovins apparaissent spontanément en différents points du monde. L'agriculture n'a dès lors cessé d'évoluer, que ce soit en termes de techniques de culture, de rendement ou de sélection des animaux (Ministère de l'agriculture, n.d.).

À partir de 1940, avec l'accroissement de la population mondiale et l'évolution de la société, la demande en nourriture et en produits animaux augmente. Cependant, le développement du secteur agricole reste freiné par les conflits internationaux. Dès la fin de la guerre, pour pallier aux pénuries alimentaires et aux rationnements, le développement de l'agriculture est soutenu et encouragé par les gouvernements. Certains états mettent en place des subventions pour les agriculteurs.

En France, la création de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), en 1946, a pour ambition d'organiser la recherche agronomique afin de rattraper le retard de l'agriculture française (Connehaye, 2016). La « modernisation » de son agriculture par le changement de ses pratiques et de son mode d'organisation permettra à la France de devenir autosuffisante à la fin des années 60. Elle est encouragée par les différentes aides mises en place par la Politique Agricole Commune (PAC) de l'Union Européenne. Les structures mixtes familiales se transforment en entreprises agricoles spécialisées et plus productives. Le nombre d'exploitations diminue, elles se regroupent et s'agrandissent. Les secteurs adjacents tels que la grande distribution ou l'agrofourriture s'étendent, l'agriculture étant un secteur économique en pleine croissance. Au début des années 70, la France produit davantage et devient excédentaire. Cela lui permet d'accroître son exportation et favorise l'épanouissement de plusieurs domaines de la recherche agronomique. Dès les années 80-90, l'agriculture se complexifie avec des enjeux sociétaux multiples tels que les crises sanitaires, la pollution...(INRA, 2013).

1.2 Conjoncture de l'agriculture et de l'élevage

Des pénuries d'après-guerre aux crises des années 1990 en passant par les excédents agricoles de 1970, la position et les enjeux sociétaux autour de l'agriculture ont fortement évolué. Le consommateur ne souffrant plus de manque devient plus critique vis-à-vis de son alimentation et des modes de production. La production n'est plus le seul objectif des exploitations. La qualité des produits et l'impact environnemental s'ajoutent à la balance et complexifie la position de l'agriculture.

1.2.1 Situation actuelle

L'élevage concerne toutes les parties du globe mais le rapport à l'animal et aux différentes espèces se traduit de façons différentes selon les cultures. L'élevage porcin est presque absent du Moyen Orient. En Inde, la vache est une espèce sacrée. Ces particularités expliquent une répartition mondiale hétérogène des animaux.

En 2016, la production mondiale de bovins s'élevait à 1,475 milliards (Md) de têtes de bétail. Les continents américains et asiatiques sont les leaders de la production animale, regroupant respectivement 35,4% et 31,9% des animaux, alors que l'Europe n'en concentre que 8,3%. Concernant la production porcine, on recensait 982 millions (M) de têtes. L'Asie détient une large part de cette population, avec plus de 573 M d'animaux, ce qui correspond à 58,4% de la population totale.

La même année, la production mondiale de volailles s'élevait à 22 Md de têtes. À nouveau, l'Asie concentre 56,5% des effectifs, avec la Chine comme principal producteur (5 Md de têtes de bétail). L'Europe n'a quant à elle produit que 9,9% de la production avicole mondiale (FAO, n.d.).

En France, la production bovine a été la plus importante d'Europe avec 19 millions de têtes, devant l'Allemagne (12 M de têtes) et le Royaume-Uni (10 M de têtes). L'élevage porcin est également fortement présent en France même si avec 12,8 millions de têtes de bétails, le pays n'est que 3^e du podium européen derrière l'Espagne (29 M de têtes) et l'Allemagne (27 M de têtes). Concernant l'aviculture, la France est le 4^e producteur de viande de volaille en Europe devant l'Allemagne et derrière la Pologne, le Royaume-Uni et l'Espagne. Au total, 156 millions de têtes de volailles sont présentes sur le sol Français en 2016. Les effectifs français de ces

productions sont en recul en 2016 par rapport à 2015 : - 0,5% en bovins, - 1,1% en porcins et - 3.3% en avicole (Agreste, 2017; GraphAgri, 2017).

La France est donc un acteur majeur de l'élevage européen regroupant des élevages diversifiés sur une Surface Agricole Utile (SAU) d'environ 28 millions d'hectares soit 16% de la SAU européenne (Gaigné & Letort, 2017). Le Grand Ouest est une région très porteuse de l'élevage. Trois quarts du cheptel porcins français et un tiers de l'aviculture française y sont présents. La majorité des 177 000 exploitations bovines françaises se situe dans cette région (GraphAgri, 2017). La Bretagne concentre 56% des porcs, 33% des volailles et 20% des vaches laitières de France, sur seulement 6% de la SAU (Gaigné & Letort, 2017).

Aujourd'hui, au-delà de l'approvisionnement en denrées alimentaires, l'agriculture et l'élevage apportent de multiples contributions à la société dans différents domaines. C'est tout d'abord, un outil de production permettant de fournir les denrées alimentaires (les céréales, la viande, les œufs...) mais aussi d'autres produits animaux tels que la laine, le cuir... C'est également une source de coproduits (lisier, fumier...) pouvant être utilisés comme engrais pour la fertilisation des sols ou comme source d'énergie à travers des procédés tels que la méthanisation. Ainsi l'agriculture contribue à sa manière au développement des territoires. Le pâturage permet un entretien des paysages et particulièrement en zones escarpées ou montagneuses. L'implantation des haies aide au maintien de la biodiversité. Cette activité permet un développement du dynamisme territorial en zone rurale. Elle représente une source d'emplois importante directement dans les exploitations ainsi que dans les filières en amont et en aval (Ryschawy *et al.*, 2015).

L'agriculture est à la base de notre patrimoine culturel et gastronomique. Entre les vignobles alsaciens, le foie gras du Sud-Ouest, le cochon breton et la betterave sucrière des Hauts-de-France, l'agriculture française regorge de spécialités régionales reconnues à l'international.

La révolution agricole de l'après-guerre a conduit à une spécialisation des exploitations et à une séparation des cultures et de l'élevage. Cette spécialisation se traduit par une sélection des espèces selon les performances zootechniques recherchées. Les filières viande, lait, œuf, mais aussi reproducteurs sont de plus en plus différenciées. Ainsi, les animaux sont regroupés

et sélectionnés en fonction de leur productivité. Les éleveurs cherchent à tirer le meilleur de leurs animaux. Cette concentration importante d'animaux et ce besoin de productivité accroissent la fragilité de la production ainsi que son impact sur l'environnement (Phocas *et al.*, 2014).

Si la concentration des exploitations permet une réduction de coût de production grâce à une proximité des infrastructures, elle multiplie aussi la difficulté de gestion des problématiques. La gestion des effluents se complexifie ; la concentration des animaux au sein des exploitations augmente le volume d'effluents par rapport à la surface d'épandage. Cette proximité des animaux facilite également la transmission de pathogènes et augmente le taux de contamination. Les pathologies se transmettent plus facilement et affectent plus d'individus (Phocas *et al.*, 2014).

1.2.2 Besoins de rentabilité et santé des animaux

L'alimentation des animaux a également beaucoup évolué vers une alimentation complète et riche, souvent sous forme sèche. Si ce type d'aliment permet de contrôler facilement la prise alimentaire de chaque animal et d'éviter les carences, il peut également avoir des effets délétères. Ces produits peuvent provoquer un déséquilibre de la flore digestive, induisant une forte fermentation et donc la production d'acides gras volatiles et d'acides lactiques. Les acides accumulés provoquent une acidose, qui est l'une des principales pathologies digestives chez la vache laitière (FAO, 2011).

En raison de ces facteurs, les animaux d'élevages sont plus sujets à certaines pathologies intervenant à des étapes clés de leur vie. Par exemple, les jeunes veaux sont, pendant les 4 premières semaines de vie, sujets aux diarrhées néonatales. Elles s'accompagnent de déshydratation, de perte de poids et d'affaiblissement, pouvant aller jusqu'à la mort dans les cas graves. Des agents pathogènes tels que virus, bactéries ou parasites sont souvent à l'origine des maladies, même si des facteurs comme la qualité du colostrum, un vêlage difficile, les conditions d'hygiène et une forte densité influent sur l'apparition de la maladie (Zoetis Fr, n.d.-a).

Les porcelets sont quant à eux prédisposés aux colibacillooses post sevrage. En effet, le changement d'alimentation et donc l'arrêt du lait maternel avec les immunoglobulines qu'il contient favorise l'infection du jeune porcelet. À cela s'ajoute également le stress provoqué par

la séparation de la mère. La période de 21 à 28 jours est donc généralement considérée comme une période de creux immunitaire entre la perte de l'immunité colostrale et l'acquisition de l'immunité propre à l'animal. Les conditions d'élevage et une ration riche en protéines sont considérées comme des facteurs favorables (Communauté Professionnelle Porcine, 2015).

Chez le poulet, la bronchite infectieuse est une pathologie fréquente. Cette maladie, due à un coronavirus, est contagieuse et potentiellement mortelle pour les jeunes sujets. Elle affecte également le système reproducteur et peut causer une infertilité. Dans tous les cas, elle implique un retard de croissance, une perte de production chez les poules pondeuses et une déformation des œufs. Il n'existe pas de traitement spécifique à la bronchite infectieuse, même si la vaccination est possible. Le virus peut également persister et resurgir en période de stress (Martin, 2010).

Un autre cas important à souligner dans cette partie est la mammite bovine. Cette maladie multifactorielle touche une part des vaches laitières. Cette inflammation de la glande mammaire peut être d'origine traumatique, toxique ou infectieuse (ou une combinaison de ces facteurs). Provoquant une forte douleur pour l'animal, cette pathologie engendre aussi une forte baisse de productivité et un lait impropre à la consommation. L'hygiène de l'étable ou du matériel de traite est en cause, mais l'âge de l'animal et son statut immunitaire sont également des facteurs contribuant à l'apparition de la mammite (Zoetis Fr, n.d.-b).

1.2.3 Quelques exemples de pathogènes animaux

Les pathogènes présents dans les élevages sont nombreux et provoquent des affections plus ou moins graves. Les microorganismes tels que bactéries et champignons ou les virus sont les plus dangereux car facilement transmissibles et parfois responsables de zoonose (transmission possible à l'Homme). Les parasites internes ou externes sont également responsables de maladies et engendrent une perte d'état chez les animaux. Le tableau 1 recense de manière non exhaustive, quelques maladies importantes et fréquemment observées dans les élevages Français. Le classement des différentes pathologies est extrait du rapport sur la hiérarchisation de 103 maladies animales, effectué en juin 2012 par l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) (ANSES, 2012). Ce classement a été effectué en tenant compte de plusieurs paramètres, avec entre autres

la fréquence d'apparition, le risque de transmission à l'homme (zoonose) et l'impact économique causé.

Si les virus sont parfois spécifiques à une espèce, une même bactérie peut affecter les porcins, bovins et les volailles. C'est notamment le cas d'*Escherichia coli*, responsable des colibacilloses chez les trois espèces. Cette bactérie présente dans le système digestif et dans l'environnement, profite d'une variation de la flore ou d'une baisse du système immunitaire pour proliférer et provoquer une infection. C'est pourquoi les colibacilloses touchent principalement les jeunes animaux, lors du sevrage où l'alimentation est modifiée et l'apport d'anticorps maternels réduit. Cette raison a poussé les professionnels à utiliser des antibiotiques sous la forme de compléments alimentaires, permettant de contenir le développement des organismes pathogènes.

Les maladies animales récurrentes au sein des élevages et provoquant une forte baisse de productivité sont donc multifactorielles. Si un pathogène en est souvent à l'origine, les conditions d'élevages et le stress imposés aux animaux sont également en cause. Les méthodes préventives comme la complémentation, la vaccination et la valorisation du bien-être animal sont donc à privilégier pour obtenir des élevages sains et pérennes.

Tableau 1: Exemples de pathogènes animaux responsables de maladies bovines, porcines et aviaires.¹

Maladies Bovines			
Nom	Impact	Pathogène	Période d'apparition
Tuberculose bovine	+++	<i>Mycobacterium bovis</i>	Maladie chronique
Salmonellose bovine clinique	+++	<i>Salmonella sp.</i>	Tout âge
Diarrhée virale bovine	++	Virus de la diarrhée virale bovine (BVDV)	Tout âge
Infection à virus respiratoire syncytial	+	Virus respiratoire syncytial bovin (RSVB)	Veaux et jeunes bovins
Colibacillose bovine	+	<i>Escherichia coli</i>	Veaux
Maladies Porcines			
Nom	Impact	Pathogène	Période d'apparition
Maladie d'Aujesky	+++	Herpesvirus porcin 1	Chronique Mortelle chez porcelet
Salmonellose porcine	+++	<i>Salmonella sp.</i>	Tout âge
Maladie de l'œdème du porc	++	<i>E. coli</i> producteur de vérocytotoxine	Porcelets de 4 à 12 semaines
Colibacillose du porcelet	++	<i>E. coli</i>	Porcelets allaitants et post sevrage
Grippe porcine	+	Virus <i>Influenza</i> type A (H1N1)	Tout âge
Maladies Aviaires			
Nom	Impact	Pathogène	Période d'apparition
Maladie de Newcastle	+++	Virus de la maladie de Newcastle	Tout âge
Salmonellose aviaire	+++	<i>Salmonella sp.</i>	Tout âge
Influenza aviaire	+++	Virus <i>Influenza</i> (H5N1)	Tout âge
Colibacillose aviaire	++	<i>E. coli</i>	Tout âge, Risque de mort à l'éclosion
Coccidiose aviaire	++	<i>Eimeria tenella</i>	Tout âge
Bronchite infectieuse	++	Virus de la Bronchite Infectieuse (IBV)	Tout âge Mortelle pour les jeunes

¹ <https://www.anses.fr/fr/content/la-tuberculose-bovine>
<http://www.votreveto.net/veterinaire-valallier/Publication/Show.aspx?item=1451>
https://www.3trois3.com/e-coli/infections-par-escherichia-coli-chez-les-porcs-1-de-2_10606/

1.3 Antibiorésistance : vers une utilisation plus raisonnée des antibiotiques

Les antibiotiques sont utilisés en médecine humaine mais également en médecine animale, leur usage est autant curatif que préventif. L'emploi des antibiotiques a été largement répandu en productions animales car ils présentaient une réponse simple, efficace et peu onéreuse face à diverses problématiques.

Après la découverte de la pénicilline en 1928, la recherche et le développement de l'usage des antibiotiques en médecine humaine comme animale est très rapide et constitue une avancée majeure du XX^{ème} siècle. En effet, ils permettent une lutte efficace contre de nombreuses maladies infectieuses (Sanders, 2005).

De plus, utilisés par prévention, les antibiotiques distribués en petites quantités *via* l'alimentation animale permettent de prévenir certaines pathologies liées à des infections bactériennes (APC : Antibiotiques Promoteurs de Croissance). Cela module aussi le développement de la flore digestive. Cet emploi systématique à faible dose et continu permet d'améliorer les performances zootechniques des animaux, ils sont alors utilisés en tant que facteur de croissance (Sanders, 2005).

A partir des années 60, les alertes concernant l'apparition de bactéries résistantes aux antibiotiques se font plus pressantes. L'usage systématique des antibiotiques commence à être remis en question. Le rapport du comité de Swann met alors en garde contre les risques potentiels liés à la transmission de ces résistances entre les bactéries, *via* les plasmides (Swann, Baxter, & Field, 1969). Sur la base de ce rapport, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) propose en 1973 de supprimer en tant qu'APC les molécules actives sur les bactéries de type Gram négatif (Gram -) et utilisées en médecine humaine. Cette proposition sera intégrée par la suite à la réglementation européenne (Corpet, 2000; Wegener, Aarestrup, Jensen, Hammerum, & Bager, 1999). Dans les années 1990, les premiers systèmes de lutte et les premières recommandations pour un usage plus raisonné des antibiotiques se mettent en place. L'usage des antibiotiques utilisés comme additifs à visée « facteur de croissance » est interdit à partir de 2006 dans l'Union Européenne (Ministère de l'agriculture et de l'alimentation, 2017).

L'antibiorésistance est la capacité d'une souche bactérienne à survivre et à se multiplier en présence d'antibiotiques. Certaines bactéries auparavant sensibles aux antibiotiques, le sont moins aujourd'hui. Or, le panel de molécules actives est restreint et commun à la santé humaine et animale. La recherche dans ce domaine demande du temps, la découverte de nouvelles

molécules est rare. La diminution d'efficacité de cet arsenal thérapeutique devient un problème de santé publique.

La lutte contre l'antibiorésistance est devenue un enjeu majeur de santé publique aussi bien en médecine humaine qu'en médecine animale d'où l'instauration de mesures pour promouvoir l'usage raisonné des antibiotiques. Le Plan Ecoantibio a été mis en place en 2012, il avait pour objectif la réduction de l'utilisation d'antibiotiques de 25% en cinq ans. Sur les cinq années du premier Plan Ecoantibio, l'exposition des animaux aux antibiotiques a diminué de 37% toutes filières confondues en Europe et jusqu'à plus de 70% pour certains antibiotiques d'importance critique (Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt, 2017).

Suite aux excellents résultats de ce premier plan, un deuxième Plan Ecoantibio a débuté en 2017. Il a pour objectifs d'évaluer et de valoriser les résultats du premier plan et de poursuivre les actions et la dynamique engagées. Comme le premier plan, celui-ci s'articule en axes d'actions :

- La **recherche et le développement** de méthodes de prévention et de solutions alternatives
- La **communication et la formation** sur la lutte contre l'antibiorésistance
- Le **partage d'outils** d'évaluation et de suivi d'utilisation
- La mise en place de **pratiques de bons usages** aux niveaux européen et international

En France, des plans plus spécifiques à certaines pathologies sont également mis en place. On peut citer en exemple le plan « Les mammites, j'anticipe ! » visant à prévenir et à réduire l'apparition de mammites dans les élevages laitiers. Le projet Ruminflame, conduit par l'INRA, s'inscrit également dans la volonté de réduire le recours aux antibiotiques en accompagnant les éleveurs. Trois axes ont été mis en avant pour cela :

- **Améliorer le diagnostic** des maladies inflammatoires, dont les mammites, identifier des facteurs de risque et les modéliser ;
- **Mieux connaître les facteurs** alimentation, techniques de traite, pâturage, génétique qui prédisposent la mamelle aux infections ;
- **Explorer les moyens de favoriser les réponses immunitaires** de l'animal (génétique, utilisation de probiotiques, vaccination, immunomodulation...) et donc limiter les traitements antibiotiques (ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt, n.d.).

Ici aussi, les alternatives telles que l'usage des produits naturels comme compléments sont envisagées pour améliorer la santé des animaux.

Ce projet de thèse s'inscrit dans une démarche globale de recherche scientifique pour la santé et le bien-être animal.

1.4 Mise en place d'alternatives durables aux Antibiotiques Promoteurs de Croissance (APC)

Avec les plans Ecoantibio et le retrait de l'usage des antibiotiques comme facteurs de croissance, la recherche de solutions alternatives a été fortement encouragée. Cette recherche peut se faire à différents niveaux : la conduite d'élevage, la prophylaxie et l'alimentation. Plusieurs leviers permettent de travailler sur l'alimentation : l'alimentation de précision et la complémentation.

L'alimentation de précision consiste à moduler les apports en énergie et nutriments afin de développer des rations personnalisées et de prévenir certaines pathologies. L'apparition de nouvelles technologies dans les élevages a rendu possible l'optimisation de la gestion de l'alimentation. Les Distributeurs Automatiques de Concentré (DAC) permettent d'affiner l'alimentation des truies lors de la gestation ou des porcs en croissance. Les robots de traite, eux aussi, ont facilité une alimentation individualisée.

Les progrès en alimentation animale et le développement de nouveaux additifs ont permis de compenser en partie la réduction de l'usage des antibiotiques. Selon le règlement 1831/2003, les additifs sont des « substances, micro-organismes ou préparations autres que les matières premières pour aliments des animaux et les prémélanges délibérément ajoutés aux aliments pour animaux ou à l'eau pour remplir notamment une ou plusieurs des fonctions visées par l'article 5 paragraphe 3 » telles que :

- Avoir un effet positif sur les caractéristiques des aliments des animaux
- Avoir un effet positif sur les caractéristiques sur les produits d'origine animale
- Répondre aux besoins des animaux
- Avoir un effet sur les conséquences environnementales de la production animale

- Avoir un effet positif sur la production, le rendement ou le bien-être des animaux notamment en influençant la flore gastro intestinale ou la digestibilité des aliments pour animaux
- Avoir un effet coccidiostatique ou histomonostatique.

Les prébiotiques sont des substrats pour la flore bénéfique digestive, ils sont capables de stimuler l'immunité. Les probiotiques sont des microorganismes ayant un effet bénéfique sur le fonctionnement du système digestif de l'individu. Ils sont utilisés pour renforcer la santé digestive. Leurs effets sont variables selon la souche et le type d'animaux. Les enzymes améliorent la digestibilité de certains éléments comme le phosphore.

Les argiles ont un pouvoir adsorbant permettant la capture de certaines toxines et protègent le tractus digestif. Les acidifiants stabilisent les aliments en contrôlant la prolifération de certains microorganismes. Ils permettent aussi de moduler la digestibilité de certains oligo-éléments.

Les plantes sont employées comme alternatives naturelles *via* la phytothérapie et l'aromathérapie. La phytothérapie concerne les extraits de plantes (feuilles, tige, racines) ou la plante entière est utilisée broyée ou en teinture. L'aromathérapie repose sur l'activité des molécules des huiles essentielles présentes dans les plantes. (Lemoine, Calvar, & Dubois, 2016).

1.5 Règlementation sur les additifs alimentaires pour animaux d'élevage.

Ces différents types d'additifs sont soumis à une réglementation stricte, notamment au niveau européen. Ils sont régis par le règlement (CE) n° 1831/2003 relatif aux additifs destinés à l'alimentation des animaux sous la forme d'une liste positive (Parlement Européen et Conseil de l'Union Européenne, 2003). La concentration maximale autorisée dans le produit final y est également indiquée dans la plupart des cas (EFSA, n.d.).

Ces additifs sont déclinés sous différentes formes en fonction de leurs utilisations. On parle notamment :

- D'additifs technologiques : c'est-à-dire les conservateurs, antioxydants, émulsifiants ou stabilisateurs et régulateurs d'acidité.

- D'additifs sensoriels : arômes ou colorants.
- D'additifs nutritionnels : comme les vitamines, aminoacides et oligo-éléments.
- D'additifs zootechniques : tel que les produits améliorant la digestibilité, les stabilisateurs de la flore intestinale.
- D'additifs coccidiostatiques et histomonostatiques (destinés à détruire des organismes potentiellement pathogènes)

En fonction de la volonté du fabricant, un additif peut entrer dans les différentes catégories. L'utilisation d'un additif zootechnique permet notamment d'alléger sur les propriétés biologiques de l'aliment mais cela nécessite la rédaction d'un dossier preuve, constitué de données bibliographiques ou de résultats d'expérimentations, relatifs à l'allégation souhaitée (EFSA, n.d.).

Les huiles essentielles dont les propriétés biologiques vont être décrites plus loin peuvent donc entrer dans différentes catégories et notamment les additifs technologiques, sensoriels et zootechniques. Dans ce projet, elles seront considérées comme des substances aromatiques.

2 Chimie et biochimie des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont les extraits de plantes les plus cités dans le cadre de la complémentation animale. Les molécules les plus utilisées pour leur propriété antibactérienne en production porcine sont le cinnamaldehyde (cannelle), le carvacrol (origan), l'eugénol (girofle) et le thymol (thym) (Thacker, 2013; The poultry site, n.d.).

2.1 Définition

Les plantes sont des organismes sessiles et subissent de ce fait divers stress biotiques et abiotiques, qui les amènent à produire différentes molécules de défense. Les infections par des microorganismes tels que les bactéries ou champignons et les virus font partie des stress biotiques, tout comme le broutage par les herbivores. La température et l'ensoleillement, la salinité et le stress hydrique ou encore l'altitude font partie des stress abiotiques. Les molécules produites en réponse à ce stress sont des métabolites secondaires dont les plus volatils peuvent être extraits de la plante sous forme d'Huiles Essentielles (HE) (Baser & Buchbauer, 2010).

Une HE est définie par l'Agence Nationale de la Santé et du Médicament (ANSM) comme un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'HE est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ». La composition des huiles essentielles est par ailleurs règlementée par la pharmacopée Française et Européenne. Son chémotype, c'est-à-dire la nature de ses composés majoritaires, fait office d'empreinte. La composition des HE est généralement déterminée par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) couplée à la spectrométrie de masse (CPG-MS) et parfois par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (Baser & Buchbauer, 2010). Le procédé classique d'extraction est l'alambic, qui permet d'entraîner les molécules volatiles avec la vapeur d'eau et de séparer l'HE de l'hydrolat par simple décantation (figure 1).

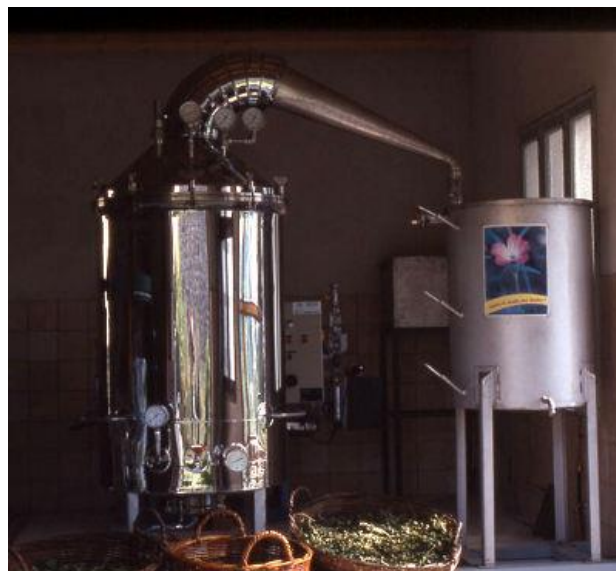


Figure 1 : Alambic permettant la production d'huiles essentielles et leur séparation de l'hydrolat (Biotope des montagnes, n.d.).

2.2 Principales ressources

Toutes les plantes sont normalement capables de produire des HE, mais elles sont retrouvées à l'état de trace dans la plupart d'entre elles. Pour la production à grande échelle, les plantes à parfums aromatiques et médicinales (PPAM) sont utilisées. Ces espèces appartiennent à des familles réparties dans l'ensemble du règne végétal :

- Des *Cupressaceae* (genévriers, cyprès) et des *Pinaceae* (cèdres, pins) parmi les gymnospermes
- Parmi les angiospermes Monocotylédones des *Acoraceae* (jonc odorant), des *Liliaceae* (ail, oignon), des *Zingiberaceae* (gingembre, curcuma) et certaines *Poaceae* (citronnelle, vétivier)
- Parmi les Angiospermes Eudicotylédones qui sont les plus représentés, des *Apiaceae* (aneth, coriandre), des *Asteraceae* (absinthe, armoise), des *Geraniaceae* (géranium, pélargonium), des *Lamiaceae* (lavande, menthe, thym, origan) - qui sont les plus utilisées -, des *Lauraceae* (laurier, bois de rose), des *Myristicaceae* (noix de muscade), des *Myrtaceae* (arbre à thé, girofle), des *Oleaceae* (jasmin), des *Rosaceae* (rose) des *Santalaceae* (bois de santal), des *Schisandraceae* (badiane) et des *Rutaceae* (citron, orange). (Baser & Buchbauer, 2010; Murbach Teles Andrade, Nunes Barbosa, da Silva Probst, & Fernandes Júnior, 2014)

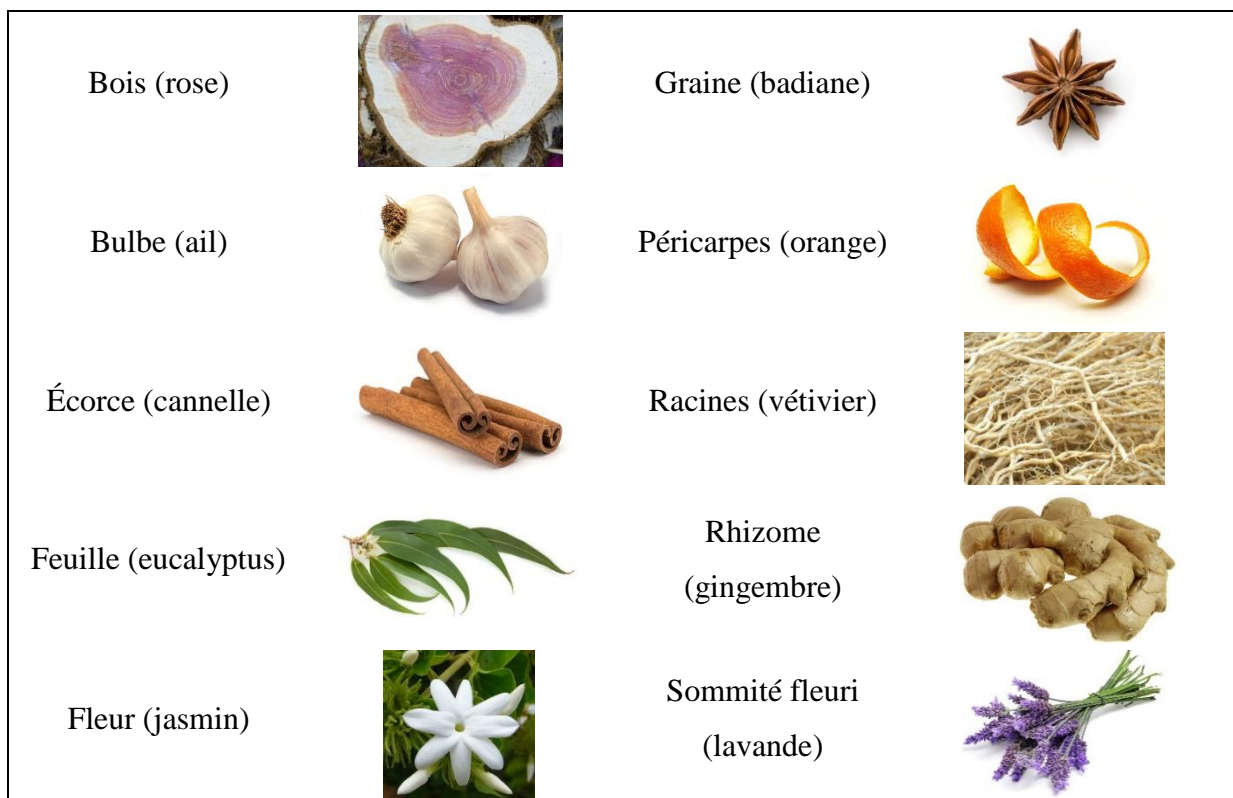


Figure 2: Principaux organes de plantes utilisés pour l'extraction d'huiles essentielles

L'HE peut être contenue dans l'ensemble de la plante ou seulement dans certains organes, présentés dans la figure 2. La composition de l'HE peut par ailleurs évoluer d'un

organe à l'autre pour une même plante : par exemple, les boutons floraux ou clous de giroflier (*Syzygium aromaticum*) renferment généralement plus d'eugénol que la feuille, ou la cannelle (*Cinamomum cassia*) dont l'écorce renferme une HE riche en cinnamaldehyde, alors que l'HE extraite des feuilles est plus riche en eugénol (Murbach Teles Andrade *et al.*, 2014).

2.3 Organes de production et de stockage

Les molécules volatiles constituant les HE sont synthétisées, stockées et excrétées par des structures dédiées, issues des tissus de l'épiderme ou du mésophile. Parmi ces structures variées et spécifiques à chaque groupe taxonomique (Sangwan, Farooqi, Shabih, & Sangwan, 2001) se retrouvent :

- Les idioblastes sécréteurs : ce sont des cellules isolées et spécialisées, présentes dans différents organes et tissus de plantes, capables de produire et stocker de grandes quantités de molécules volatiles. Les idioblastes sont présents dans la zone corticale des racines du vétivier, mais également dans les fleurs de rose ou de jasmin.
- Les cavités ou canaux : ces structures de stockages extracellulaires sont d'origines schisogénique ou schisolysigénique, c'est-à-dire créés soit par simple espacement des cellules bordant la lumière ou par lyse de ces cellules. La synthèse et la sécrétion de molécules volatiles sont alors assurées par les cellules épithéliales tapissant la cavité. Les cavités ou canaux schisogéniques sont caractéristiques des *Apiaceae* et des *Pinaceae*, alors que les cavités schisolysigéniques sont représentatives des *Rutaceae* et des *Myrtaceae*.
- Les poils sécréteurs ou trichomes, qui sont typiques des *Lamiaceae* (menthe, thym). Les trichomes sont composés d'une cellule basale surmontée d'une cellule-tige allongée et d'une tête sécrétrice. Le nombre de cellules de cette tête permet de définir deux catégories de trichomes : les capités dont la tête possède 1 à 4 cellules et les peltés dont la tête peut être constituée de 4 à 16 cellules. (Baser & Buchbauer, 2010)

Le nombre et le stade de développement de ces structures sont en rapport direct avec la quantité d'HE produite ainsi qu'avec leur qualité. Par exemple, chez la menthe (*Mentha piperita*) il existe 3 types de trichomes dont un accumulant les monoterpènes comme le menthol et la menthone (Turner, Gershenzon, & Croteau, 2000).

2.4 Propriétés et activités chimiques des huiles essentielles

2.4.1 Composition des huiles essentielles

Une HE est un mélange complexe, pouvant contenir jusqu'à 100 molécules différentes. Ces molécules sont pour la plus grande part identifiées. Bien qu'il existe une grande variété chimique, ces molécules restent structurellement proches.

La majeure partie des molécules rencontrées appartient aux familles des terpenoïdes, des phénylpropanoïdes et des dérivés d'hydrocarbures aliphatiques à chaîne courte, dont quelques exemples sont présentés en figure 3. Les monoterpénoïdes, diterpénoïdes et sesquiterpénoïdes sont les plus fréquents et peuvent être de type mono-, bi- ou tricycliques. Les terpenoïdes sont retrouvés sous la forme d'hydrocarbures, de cétones, d'alcools, d'oxydes, d'aldéhydes, de phénols (composés acides) ou encore d'esters (Turek & Stintzing, 2013). Certains de ces composés présentent des activités anti-radicalaires et/ou antioxydantes.

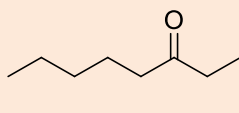
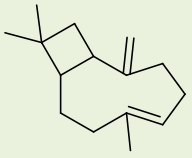
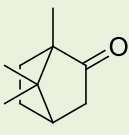
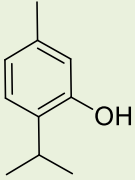
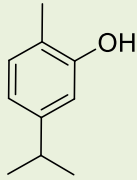
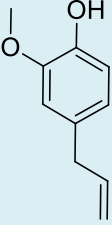
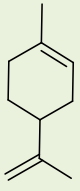
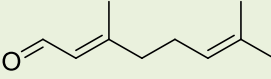
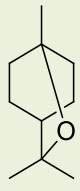
Aliphatiques à chaîne courte	Terpenoïdes			
 Octan-3-one	 β -caryophyllène	 Camphre	 Thymol	 Carvacrol
Phénylpropanoïdes				
 Eugénol	 Limonène	 Citral	 1,8-Cinéol	

Figure 3 : Exemples de molécules caractéristiques des huiles essentielles.

2.4.2 Activités anti-radicalaires

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et radicaux libres sont les produits d'un métabolisme normal et jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire. Des systèmes de régulation enzymatiques (catalase, peroxydase, superoxyde dismutase, ...) sont mis en place par l'organisme pour évacuer les ROS pouvant être délétères (Miguel, 2010). Le stress oxydant

est le résultat d'un déséquilibre entre la production d'oxydants et leur élimination et est souvent lié au vieillissement ou à des affections tels que l'artériosclérose, le cancer, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, le diabète et l'asthme (Mimica-Dukic *et al.*, 2010).

La présence d'antioxydants circulants d'origine externe permet alors de maintenir l'équilibre au niveau cellulaire. Les flavonoïdes, les terpènes et les constituants phénoliques des HE sont particulièrement intéressants pour leurs qualités antioxydantes (Miguel, 2010). Différents tests existent pour mesurer la potentielle activité des HE et ceux-ci doivent être multipliés pour obtenir une réponse globale. En effet, certains tests sont liés au ralentissement de la peroxydation des lipides (blanchiment du β -Carotène, Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)) alors que d'autres reposent sur la capacité des HE à capturer des radicaux libres (test au 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Ferric reducing/antioxidant power (FRAP)) (Miguel, 2010). Le test DPPH est celui le plus fréquemment utilisé car simple de réalisation et peu coûteux. Dans leur étude, Alinkina *et al.* (2012) ont obtenu des résultats équivalents pour les huiles essentielles d'origan, de thym et de sarriette ($CI_{50} = 0,223 ; 0,245$ et $0,262$ g/L respectivement).

2.5 Propriétés et activités biochimiques des HE

2.5.1 Biosynthèse des HE

Les constituants des HE sont produits *via* deux principales voies de synthèse à savoir la voie de l'IsoPentenyl diPhosphate (IPP) pour les terpènes et la voie de l'acide shikimique pour les phénylpropanoïdes (Figure 3) (Turek & Stintzing, 2013).

Plus en détail, le squelette des terpènes est issu de l'assemblage de la brique de base l'IsoPentenyl diPhosphate (IPP), et de son isomère le DiMethylAllyl PyroPhosphate (DMAPP), deux composés à 5 atomes de carbone. Les briques sont assemblées jusqu'à obtenir le nombre de carbones souhaités : dix pour les monoterpènes, quinze pour les sesquiterpènes, vingt pour les diterpènes *etc...* Ce squelette de base va ensuite subir des transformations secondaires telles que des oxydations, des réductions, des isomérisations, des conjugaisons ou des dérivations. Le nombre important de combinaisons possibles entre squelette de base et transformation secondaire est à l'origine de la diversité des terpénoïdes. (Baser & Buchbauer, 2010; Sangwan *et al.*, 2001; Turek & Stintzing, 2013)

Les phénylpropanoïdes, plus rares, sont quant à eux dérivés de la phénylalanine et parfois de la tyrosine, deux acides aminés issus de la voie de l'acide shikimique. Globalement, cette voie de synthèse donne naissance aux acides aminés aromatiques. La phénylalanine est alors transformée en acide cinnamique par la Phénylalanine Ammonia-Lyase (PAL). Des réductions enzymatiques successives de l'acide cinnamique sont sources d'aldéhydes cinnamiques (parfum de la cannelle) puis de monolignols. Enfin les phénylpropanoïdes tels que l'eugénol, ou l'estragol sont des dérivés de ces monolignols (Baser & Buchbauer, 2010; Sangwan *et al.*, 2001; Turek & Stintzing, 2013).

2.5.2 Activités anti-inflammatoires

La recherche d'activité anti-inflammatoire est souvent liée à l'activité anti-radicalaire. En effet, lors d'une inflammation, il y a production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Différentes enzymes sont impliquées dans le signal inflammatoire, notamment la lipoxygénase, la cyclooxygénase et la phospholipase, qui interviennent en cascade. Les HE sont capables d'inhiber l'activité de ces enzymes, ce qui réduit le signal pro-inflammatoire. Les HE sont également capables d'inhiber la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et du facteur de nécrose tumorale (TNF, de l'anglais : *Tumor Necrosis Factor*) et de réguler l'expression des gènes pro-inflammatoires. (Miguel, 2010)

Les HE de girofle, cannelle, thym, origan, eucalyptus et de gingembre sont parmi les plus actives pour réduire le signal inflammatoire (Daniel *et al.*, 2009; Landa, Kokoska, Pribylova, Vanek, & Marsik, 2009; Miguel, 2010; Silva *et al.*, 2003; Tung, Chua, Wang, & Chang, 2008). Comme dans le cadre des activités antioxydantes, les méthodes de mesures doivent être multipliées pour obtenir une réponse globale. Les HE de thym et de tea tree ont par exemple de bonnes activités inhibitrice de la 5-lipoxygénase, avec des CI_{50} respectives de 0,005 et 0,06 $\mu\text{g/ml}$ (Tsai, Lin, Lin, & Yang, 2011).

3 Activités biologiques des huiles essentielles :

De par leur composition chimique, les HE possèdent de nombreuses activités biologiques. Leur caractère lipophile leur permet de traverser rapidement les membranes

lipidiques des cellules eucaryotes ou procaryotes et d'interférer avec le métabolisme de l'organisme (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008).

3.1 Activités antibactériennes

3.1.1 Mode d'action sur les bactéries planctoniques

L'activité antimicrobienne des HE est globalement la plus référencée et de nombreuses HE sont reconnues comme antibactériennes. Leur activité - ou celle de leurs molécules de tête - est décrite sur un grand nombre de bactéries pathogènes ou responsables d'intoxications alimentaires (Burt, 2004; Murbach Teles Andrade *et al.*, 2014). Les HE sont particulièrement efficaces contre les bactéries, car la large palette de structures moléculaires permet d'atteindre plusieurs cibles cellulaires et donc un large spectre de bactéries. Leur efficacité face aux bactéries développant des résistances aux antibiotiques a par ailleurs été démontrée (De Billerbeck, 2007).

Les HE présentent des activités sur les bactéries à Gram positif (Gram +) et à Gram négatif (Gram -) bien que ces dernières soient plus difficiles à éliminer en raison de leur particularité physiologique (Figure 4). La présence d'une membrane externe composée de lipopolysaccharides limite en effet la perméabilité des HE à travers la membrane cytoplasmique et donc leur activité.

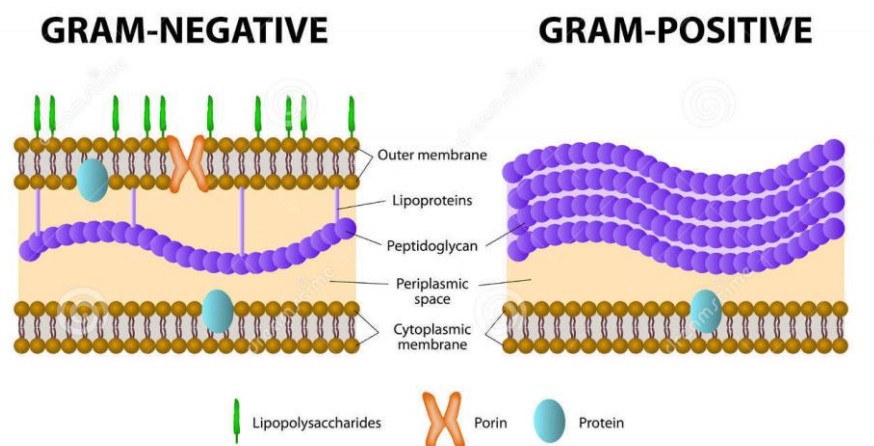


Figure 4 : Structure de la paroi des bactéries à Gram + et à Gram - (Crédit photo : Designua®)

Les HE de bois de santal (*Santalum album*), de manuka (*Leptospermum scoparium*) et de vétivier (*Chrysopogon zizanioides*), qui ont en commun une richesse en sesquiterpènes, présentent par exemple une bonne activité contre les bactéries à Gram +, mais ne sont pas actives contre les bactéries à Gram - (Raut & Karuppaiyil, 2014). En effet, la couche de

peptidoglycane présente à l'extérieur des parois des bactéries Gram +, permet aux molécules hydrophobes de pénétrer, ce qui les rend vulnérables aux huiles essentielles. Par contre, la membrane externe des bactéries à Gram - est composée de deux couches de phospholipides avec une couche externe composée de LipoPolySaccharides (LPS). Ces LPS sont constitués d'une chaîne latérale polysaccharidique avec un antigène O hydrophile, qui crée une barrière pour les molécules lipophiles. Seules de petites molécules hydrophiles peuvent passer par les porines (Nazzaro, Fratianni, De Martino, Coppola, & De Feo, 2013). Les bactéries du genre *Pseudomonas*, à Gram -, sont d'ailleurs les bactéries les moins sensibles aux HE.

En raison du nombre important de motifs moléculaires, les HE agissent sur différentes cibles dans la cellule bactérienne. Il est important de connaître les mécanismes mis en jeu pour définir une méthode de lutte antibactérienne (Faleiro, 2011). Les connaissances sur ces cibles augmentent ces dernières années grâce à des études mécanistiques. L'activité des HE est notamment reliée à leur caractère lipophile. Elles s'insèrent dans la membrane et la déstabilisent, augmentant la perméabilité cellulaire. Une réaction en chaîne s'instaure alors, provoquant la mort de la cellule *via* différents processus qui peuvent apparaître seuls ou de manière combinée. Les différents mécanismes d'action sont décrits ci-dessous (Faleiro, 2011) :

- Perturbation de la membrane ou de la paroi cellulaire

L'impact d'une HE sur la membrane ou la paroi cellulaire peut être évalué par la perte des constituants internes tels que l'Adénosine TriPhosphate (ATP). Le carvacrol (phénol monoterpénoïde, HE d'origan, thym, sarriette et marjolaine) et le thymol (isomère du carvacrol, HE de thym) sont des composés particulièrement concernés par ce mode d'action. Chez les bactéries Gram -, un relargage des LPS situés dans la membrane est également constaté, entraînant une instabilité des fonctions cellulaires (Faleiro, 2011). Une des conséquences indirectes des effets sur la membrane est l'inhibition de la sécrétion de toxines, limitant la virulence des bactéries, même si celles-ci ne sont pas détruites (Faleiro, 2011).

- Effet sur la production d'ATP

L'ATP est une source d'énergie nécessaire aux processus de conversion comme l'assimilation des nutriments, la synthèse des éléments de structures (lipides, protéines, ADN) et la production enzymatique. Chez les procaryotes, l'ATP est produite au cours de la glycolyse, dans le cytosol et dans la membrane. Une déstabilisation de la membrane comme évoquée plus haut par, les HE riches en carvacrol ou thymol, peut donc provoquer un arrêt de la production

d'ATP en plus de sa diffusion hors de l'organisme (Faleiro, 2011; Nazzaro *et al.*, 2013; Oussalah, Caillet, & Lacroix, 2006).

- Modification du pH

Le maintien du pH physiologique est essentiel à la plupart des processus cellulaires, tels que la transcription de l'ADN, la synthèse protéique et la plupart des activités enzymatiques. La perméabilité membranaire induite par les HE se traduit par une perte de sa capacité à retenir les protons dans la cellule. Cet efflux de proton provoque une baisse du pH intracellulaire (Faleiro, 2011; Nazzaro *et al.*, 2013; Oussalah *et al.*, 2006).

- Effet sur les protéines

Les protéines de choc thermique ou Heat Shock Protein (HSP) en anglais sont des protéines chaperonnes impliquées dans les processus d'assemblage des polypeptides dont les quantités augmentent lorsque la bactérie est en contact avec une toxine ou fait face à un stress. Il a été montré que l'incubation des bactéries avec des HE se traduit par une augmentation de la synthèse d'HSP dans le cytoplasme (Di Pasqua, Mamone, Ferranti, Ercolini, & Mauriello, 2010; Domadia, Swarup, Bhunia, Sivaraman, & Dasgupta, 2007).

- Modifications cellulaires

Chez certaines bactéries traitées, d'importantes modifications au niveau du cytoplasme sont observées comme l'apparition d'inclusions ; l'augmentation de l'espace périplasmique ou la présence d'irrégularités du périplasme chez les bactéries à Gram -, accompagnées d'une absence de *pili*. (Becerril, Gómez-Lus, Goñi, López, & Nerín, 2007).

3.1.2 Action sur les biofilms bactériens

Les biofilms sont des communautés bactériennes devenues sessiles. L'adhésion du biofilm peut se faire sur une surface biotique (peau, dent, épithélium intestinal) ou abiotique (surface inox, valves cardiaques, prothèses) de manière résistante (de Chalvet de Rochemonteix, 2009). De plus, les cellules associées sous forme de biofilm sont protégées par une matrice extracellulaire constituée d'exopolysaccharides (par exemple l'alginate dans le cas de *P. aeruginosa*), ce qui leur confère une forte résistance aux agressions extérieures (antibiotiques ou produits sanitaires) (Filloux & Vallet, 2003; Tolker-Nielsen & Sternberg, 2011). Des contaminations secondaires ont également lieu en cas de présence de biofilms, puisque les bactéries peuvent s'en détacher pour coloniser un autre espace. La forte résistance des biofilms aux antibiotiques et leur implication dans les domaines de la santé ou de l'alimentaire a provoqué un regain d'intérêt pour les HE (Filloux & Vallet, 2003). La formation du biofilm se fait en plusieurs étapes décrites dans la figure 5, selon le modèle de *P. aeruginosa*.

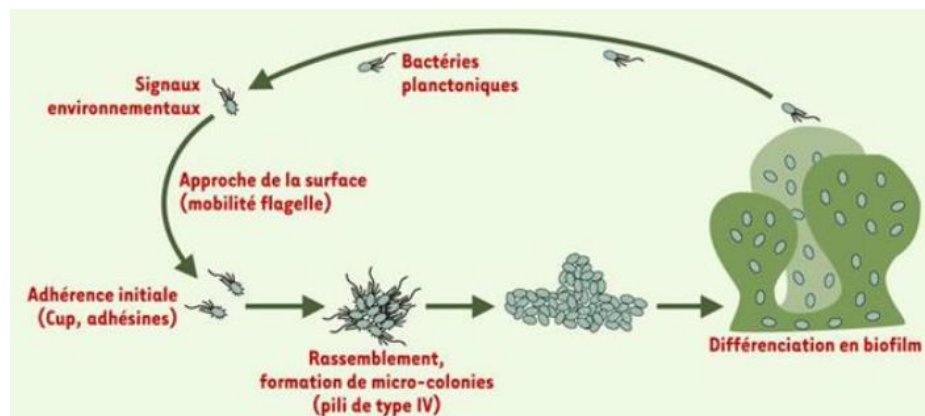


Figure 5 : Représentation générale des étapes de la formation d'un biofilm chez l'organisme modèle *P. aeruginosa* (d'après Filloux and Vallet 2003).

Dans un premier temps, les bactéries planctoniques vont approcher puis adhérer de manière transitoire à la surface à coloniser. Ceci fait appel aux flagelles et à des protéines d'adhésion tels que les adhésines. Des rassemblements de bactéries ont alors lieu et l'adhésion devient irréversible, notamment grâce aux *pili* de type IV. Ces structures fibrillaires sont présentes au pôle de certaines bactéries à Gram -, dont *P. aeruginosa* et sont également impliquées dans un type particulier de mobilité appelée « twitching motility ». Les microcolonies ainsi créées vont former le biofilm à proprement parler en synthétisant les exopolysaccharides qui représenteront à terme 85% du volume total du biofilm. En se développant, des structures particulières et spécifiques à chaque espèce se forment ensuite. Les

microcolonies sont séparées par des canaux permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments dans toutes les parties du biofilm et l'évacuation des déchets. Un gradient de concentration en nutriments et en oxygène a d'ailleurs été observé entre les différentes couches cellulaires du biofilm, impliquant des différences de métabolisme selon la position de la bactérie dans celui-ci (Filloux & Vallet, 2003).

Le biofilm peut être établi et maintenu grâce à un système de communication mis en place entre bactéries de la même espèce appelé « quorum sensing » (QS). Chez les bactéries de type Gram - comme *P. aeruginosa*, cette communication est basée sur la production d'acyl-homoserine-lactones (Acyl-HSL, produit de l'enzyme I), phéromones ayant la capacité de diffuser à travers les membranes. A des concentrations critiques, ces Acyl-HSL activent des régulateurs transcriptionnels (R) de gènes cibles permettant aux bactéries de s'informer sur la densité cellulaire au sein du biofilm. Chez *P. aeruginosa*, trois systèmes ont été mis en évidence : LasR/LasI, RhlR/RhlI et QscR qui est un régulateur solo sans HSL spécifique. Le QS est un des système permettant le contrôle de gènes impliqués dans la virulence (Filloux & Vallet, 2003; Kavanaugh & Ribbeck, 2012).

La connaissance des étapes clés de la formation d'un biofilm est importante pour la mise en place d'une méthode d'éradication. Les HE ont démontré leur activité sur les biofilms de différentes bactéries, dont certaines présentent de fortes résistances aux antibiotiques : *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ou *S. enterica* entre autres (Lang *et al.*, 2016; Szczepanski & Lipski, 2014). Potentiellement, elles peuvent agir aux différentes étapes de la formation : au moment de l'adhésion réversible en rendant la surface non favorable, au cours de la mise en place du biofilm en inhibant l'adhésion irréversible ou la prolifération cellulaire, ou en déstructurant le biofilm établi en interférant avec le QS.

Knowles *et al.* (2005) ont par exemple montré que le carvacrol appliqué au stade d'attachement inhibait la mise en place d'un biofilm mature par *S. aureus* et *S. enterica*. Burt *et al.* (2007) ont également montré que des concentrations non létales de carvacrol appliquées sur *E. coli* O157 :H7 provoquaient une absence de flagelles, indispensable pour la formation du biofilm. L'activité du carvacrol engendrerait un stress auquel la bactérie s'adapte en réduisant la production de flagelline, coûteuse en énergie.

Le biofilm de *P. aeruginosa* qui se révèle difficile à traiter, est sensible à certaines HE et notamment celle de cannelle (Kim, Lee, Kim, Baek, & Lee, 2015; Ooi *et al.*, 2006). En effet, des concentrations non létales permettent d'inhiber la maturation du biofilm sans affecter les

cellules bactériennes (Kim *et al.*, 2015). Ces travaux suggèrent que l'HE de cannelle et plus particulièrement le cinnamaldéhyde inhibe plus spécifiquement le quorum sensing de *P. aeruginosa* bien que le processus n'ait pas été clairement élucidé. De plus, l'HE de cannelle et le cinnamaldéhyde affectaient également la production de toxines et possédaient une activité sur le biofilm et ses effets néfastes (Kim *et al.*, 2015).

Les HE peuvent donc moduler la formation des biofilms bactériens, en les inhibant ou en les promouvant dans certains cas (Sandasi, Leonard, Van Vuuren, & Viljoen, 2011; Sandasi, Leonard, & Viljoen, 2008). Ces mécanismes d'action sont complexes et n'ont pas encore tous été élucidés.

3.2 Activités antivirales

Les HE possèdent également des activités antivirales. Ces activités sont liées à la présence de mono et sesquiterpènes, ainsi qu'à certains composés dérivés du phénylpropane (Astani, Reichling, & Schnitzler, 2011). Les virus Herpès simplex de type 1 et 2 (VHS-1 et VHS-2) sont des modèles intéressants pour évaluer l'activité des HE. VHS-1 est un virus enveloppé à ADN, appartenant à la famille des *Herpesviridae*, dont la structure est présentée dans la figure 6.

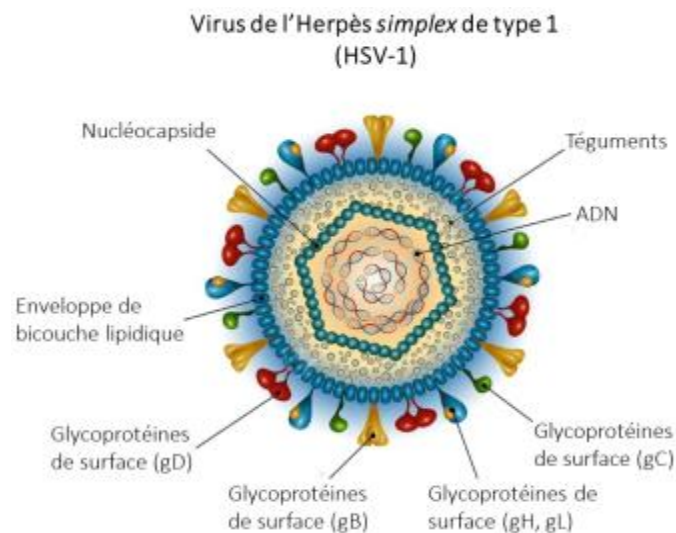


Figure 6 : Structure du virus Herpès simplex de type 1 (VHS-1)

Constitué de plus de quatre-vingt souches, on estime qu'il a infecté près de 45% de la population. Ce virus a la particularité d'être neurotrophique, c'est-à-dire qu'il possède la faculté

de persister au niveau des neurones sensoriels puis de migrer pour se répliquer dans les cellules épithéliales.

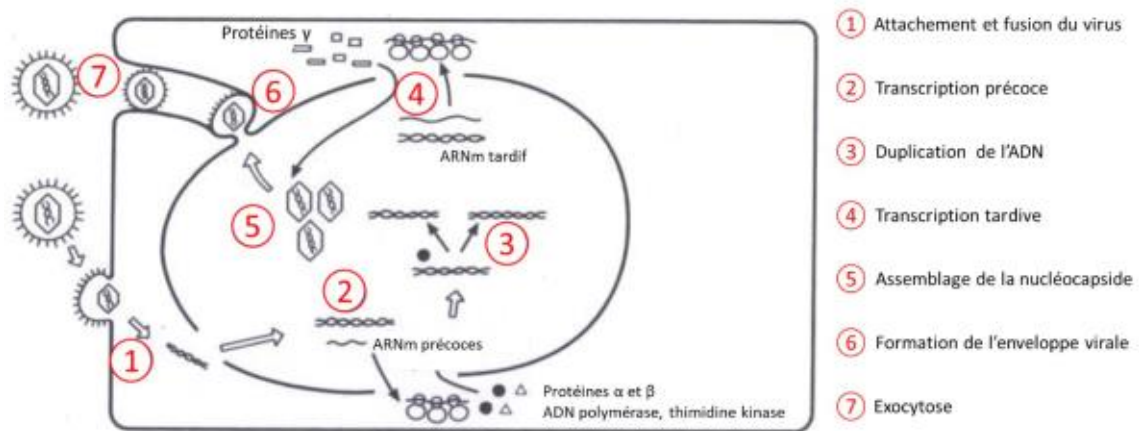


Figure 7 : Schéma du cycle de répllication du virus *Herpès simplex de type 1 (VHS-1)*

Le cycle répliatif du virus (figure 7) démarre par une étape d'adsorption, faisant suite à l'interaction entre l'enveloppe du virus et les récepteurs cellulaires spécifiques. La capside virale est ensuite introduite dans la cellule avant libération du brin d'ADN. L'intégration de l'ADN viral dans le noyau de la cellule hôte rend possible sa transcription et sa répllication. L'ARNm issu de ces étapes va être traduit pour permettre la formation d'une nouvelle capside virale. L'enveloppe du virus est formée au moment du bourgeonnement, à partir de la membrane cellulaire (Boulho, 2017).

Les activités des HE de menthe poivrée sur VHS-1 ont par ailleurs été rapportées avec des CE_{50} respectives de 0,002% et de 0,001%. Lors de ces essais, les cellules mammaliennes RC37 ont été utilisées, et l'activité antivirale était déterminée par la méthode de réduction de la formation de plages de lyses (Schnitzler, Koch, & Reichling, 2007; Schuhmacher A, Reichling J, 2003). L'HE de tea tree (*M. alternifolia*) est également efficace contre les formes récurrentes de l'infection par VHS-1. Elle est notamment active sur le virus avec une CE_{50} de 0,0009%, lorsqu'elle est testée dans les mêmes conditions que celles évoquées plus tôt (Carson *et al.*, 2006). Cette HE entre dans la composition de plusieurs traitements de l'herpès labial (gel « SOS labial » de Puresentiel®). Les HE et notamment l'HE d'origan ont pour propriété de déstabiliser les enveloppes virales, de manière à réduire l'interaction avec la cellule hôte (Schuhmacher A, Reichling J, 2003). De manière générale, elles possèdent une activité virucide directe et n'agissent pas sur la cellule affectée comme d'autres antiviraux tels que les carraghénanes (Boulho *et al.*, 2017).

Les concentrations actives *in vitro* sont très variables et peuvent présenter une légère cytotoxicité mais certaines HE présentent des activités à de très faibles concentrations. L'HE de camomille allemande est par exemple active sur VHS-1 dès la concentration de $3.10^{-5}\%$ (Raut & Karuppayil, 2014).

Enfin une étude menée *in vitro* et *in vivo* a montré que l'eugénol possédait une activité virucide sur VHS-1 et VHS-2 à des concentrations de 25,6 et 16,2 µg/ml respectivement. Une application topique permettait également d'inhiber le développement de la kératite induite par l'infection à VHS-1 et 2, chez le modèle de la souris (Benencia & Courrèges, 2000).

3.3 Activités antifongiques

Les champignons pathogènes étant également des eucaryotes, il est difficile d'obtenir des médicaments antifongiques ciblés. Les infections fongiques affectent principalement une population de patients immunodéprimés et sont souvent reliées à d'autres formes de pathogènes tels que les biofilms bactériens. Les affections liées aux pathogènes tels que *Candida spp*, *Aspergillus spp* et *Cryptococcus spp* sont donc liées à une forte morbidité et à une mortalité élevée. Le pathogène le plus souvent répertorié dans le cadre des études sur les HE est *Candida albicans*. Il existe près de 200 espèces de *Candida* connues, dont une vingtaine est responsable d'infection chez l'homme mais également chez l'animal. Les candidoses concernent la peau mais également les muqueuses, comme la cavité buccale, la muqueuse vaginale ou l'œsophage (Institut Pasteur, 2013).

Les HE de cannelle, de citronnelle, de menthe japonaise, de gingembre, de géranium et de clou de girofle présentent des activités contre *C. albicans* à des concentrations comprises entre 0,01 et 0,15% (Raut & Karuppayil, 2014). *C. albicans*, qui est un des principaux pathogènes fongiques de l'homme, peut présenter des résistances aux antibiotiques mais également former des biofilms le rendant plus résistant. Les HE riches en terpenoïdes semblent plus actives sur ces souches. Cette activité semble être reliée à la modulation des concentrations en ergostérols dans la membrane, ou de certaines voies de signalisation. Le citronellol et le géraniol ont par exemple la capacité de bloquer le champignon dans la phase S de son cycle cellulaire (Zore, Thakre, Jadhav, Karuppayil 2011). Les HE de *Rutaceae* sont également particulièrement actives sur les champignons *Aspergillus Niger*, *A. flavus*, *Penicillium verrucosum* et *P. chrysogenum*, à des concentrations inférieures à 1%. (Viuda-Martos, Ruiz-

Navajas, Fernandez-Lopez, & Perez-Alvarez, 2008). Par ailleurs l'HE de tea tree sous forme de nanocapsules a également montré une activité contre le dermatophyte *Trichophyton rubrum*. L'encapsulation permettait de réduire fortement le diamètre des colonies fongiques par rapport au témoin et à l'HE émulsionnée (Flores *et al.*, 2013).

3.4 Activités anti-nociceptives

La douleur est une sensation qui accompagne généralement l'inflammation et qui survient lors d'une « lésion tissulaire réelle ou potentielle ou décrite dans ces termes ». Il s'agit d'un message nerveux transmis au cerveau par le système nerveux périphérique, *via* la moelle épinière. Les douleurs aiguës ou brèves sont généralement distinguées des douleurs chroniques, lorsque celles-ci persistent au-delà de trois mois (Société Française d'Étude et de Traitement de la Douleur (SFETD) n.d.). L'effet anti-nociceptif correspond à une réduction de la douleur obtenue par effet de l'endorphine ou d'opiacées sur les récepteurs spécifiques (Adorjan & Buchbauer, 2010). La nature de la douleur et sa perception subjective, obligent à avoir recours à un modèle vivant comme les rats ou les souris. La douleur peut être infligée par voie chimique par injection de formaldéhyde ou d'acide acétique, ou par voie physique en utilisant une plaque chaude sur laquelle l'animal est déposé (Lahlou, 2004).

Plusieurs études sur la réduction de la douleur par les HE ou leurs composants majoritaires ont été recensées. Dans une étude de 2008 réalisée par Takaki *et al.*, l'activité anti-nociceptive de l'HE de *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) est démontrée par le test de contorsion induite par l'acide acétique et par le test de la plaque chaude. Des doses d'HE de romarin de 75, 125 et 250 mg/kg de masse corporelle permettent d'inhiber significativement la douleur induite par acide acétique en comparaison aux animaux témoins non traités. Aucun effet n'étant observé lors du test à la plaque chaude, l'étude conclut que l'HE de romarin possède une activité anti-nociceptive périphérique c'est-à-dire à l'endroit de la douleur comme le paracétamol ou l'aspirine.

Globalement, parmi les molécules actives recensées peuvent être cités de manière non exhaustive le 1,8-cinéol (dose de 0,3 mg/kg) présentant une synergie avec la morphine d'après les travaux effectués par Liapi *et al.* (2007) sur des rongeurs par le test de la plaque chaude ; le γ -terpinène et le β -terpinène, constituants majoritaires de l'HE de bergamote, testés dans le cadre d'une inhibition de la douleur provoquée par une injection intra-plantaire de capsaïcine

chez les souris (Adorjan & Buchbauer, 2010) ; l'eugénol, constituant majoritaire de l'HE de clou de girofle, utilisé pour ses propriétés en dentisterie et efficace contre les contorsions induites par l'acide acétique chez les souris dès 50 mg/kg (Daniel *et al.*, 2009). Ces molécules sont également souvent citées pour leurs autres propriétés pharmacologiques.

4 Activités des huiles essentielles en santé animale

Si les HE présentent de bonnes activités biologiques *in vitro*, elles ont également été le sujet de différents tests *in vivo*, pour la recherche d'applications aux élevages (Alleman, Gabriel, Dufourcq, Perrin, & Gabarrou, 2013; Franz, Baser, & Windisch, 2010; Gabriel, Alleman, & Dufourcq, 2013). Leur utilisation peut avoir des objectifs multiples : l'optimisation des performances zootechniques, l'amélioration du bien-être, la réduction des pathologies et des impacts environnementaux de l'élevage quelle que soit l'espèce concernée (Jiang *et al.*, 2014; Mitsch *et al.*, 2004; Schären *et al.*, 2017). Dans cette partie, les différentes activités recensées sont décrites pour chaque catégorie animale.

4.1 Activités des huiles essentielles chez les ruminants.

Les ruminants sont des mammifères herbivores possédant un estomac séparé en quatre poches à savoir la panse (ou rumen), le bonnet, le feuillet et la caillette et dont la digestion a lieu à travers un processus de rumination (Benchaar & Greathead, 2011; Ferran, n.d.). Les ruminants regroupent les bovins, caprins et ovins, mais également les cervidés. D'un point de vue agronomique, l'élevage des ruminants est intéressant car contrairement aux non ruminants, ils peuvent tirer profit de la cellulose contenue dans leur alimentation. La flore anaérobie contenue dans la panse est indispensable à la dégradation de la cellulose (Ferran, n.d.). La digestion est toutefois responsable d'une importante émission de méthane et de CO₂, pouvant atteindre 600 L/jour pour une vache adulte (Ferran, n.d.).

En raison de la production importante de méthane, un gaz à effet de serre, les HE ont été utilisées pour moduler la flore digestive des ruminants (Benchaar & Greathead, 2011). L'apport des HE sur la prise de poids et la qualité de la carcasse ou des productions de lait ou de laine, mais également sur la santé générale des animaux (immunité, résistance aux

pathogènes, fertilité) a été étudié (Benchaar *et al.*, 2008; Rochfort, Parker, & Dunshea, 2008). Ces différentes thématiques de recherche sont détaillées ci-dessous.

4.1.1 Effet des huiles essentielles sur le rumen et lien avec le métabolisme

L'activité antibactérienne reconnue des HE a provoqué un fort intérêt pour leur utilisation dans la modulation de la fermentation du rumen et donc plus généralement du métabolisme des bovins. Dès 1967, Oh *et al.* ont démontré que l'utilisation de l'HE de pin Douglas inhibait *in vitro* l'activité des bactéries du rumen de cervidés. Des doses croissantes d'HE (0,1 à 0,3 mL pour 7 mL de rumen) ont été utilisées. Des degrés d'inhibition différents, estimés en gaz total produit, ont été obtenus selon la nature du composé chimique : les monoterpènes oxygénés à savoir l'alpha-terpinéol, le terpinen-4-ol, le linalool, le citronellol, et le fenchyl alcohol étant les plus actifs. Nagy & Tengerdy (1968) ont obtenu des résultats similaires avec l'HE d'*Artemisia tridentata*, en estimant cette fois le nombre total de bactéries au cours du temps d'incubation.

La symbiose mise en place avec la microflore du rumen permet à l'animal de récupérer de l'azote non protéique pour son métabolisme. Par ailleurs, les protéines bactériennes permettent également de contribuer à l'apport en azote, qui reste cependant insuffisant pour la production intensive. La modulation du métabolisme au sein du rumen est donc intéressante (Benchaar *et al.*, 2008). La difficulté réside dans le fait de diminuer cette production de méthane sans impacter le rendement de la digestion.

Le complément commercial Crina®¹, contenant d'après l'article 100–300 g/kg de composés phénoliques dont le crésol, le résorcinol, le thymol, le gaïacol et l'eugénol a été étudié dès 1994. Chez des vaches nourries à l'ensilage et complémentées avec 1 g de Crina®¹ par jour, une baisse de 9% de la désamination était observée (Benchaar *et al.*, 2008).

Par ailleurs, des bactéries telles que *Peptostreptococcus sp.* et *Clostridium sp.* présentent une forte capacité à produire de l'ammoniac bien qu'elles ne soient pas présentes en grande quantité dans le rumen. Chez des animaux avec un régime pauvre en protéine, l'apport de

¹ Crina®, produit et commercialisé par le groupe DSM (Heerlen, Pays-bas).
https://www.dsm.com/markets/anh/en_US/products/products-eubiotics/products-eubiotics-crina.html.

Crina® peut réduire l'activité de ces bactéries jusqu'à 77%. En revanche, en présence d'une diète riche en protéine, aucun effet n'est observé (Benchaar *et al.*, 2008; Wallace, 2004).

Cependant, les différents travaux publiés sur l'utilisation des HE pour optimiser le métabolisme protéique montrent qu'il n'y a pas d'amélioration de la production animale. (Benchaar *et al.*, 2008)

Un autre point crucial dans la modulation du rumen est l'inhibition de la production de méthane par les animaux. Une étude réalisée *in vitro* sur des extraits de rumen a montré que le thymol dès 300 mg/L et le carvacrol dès 225 mg/L inhibaient la production de méthane lors d'incubations de 16h. Parallèlement, ce traitement impactait également la production de propionate et d'acétate, des acides gras volatils produits lors de la fermentation des sucres et source d'énergie principale pour les animaux (Benchaar & Greathead, 2011). L'apport d'extraits d'ail permettait d'inhiber *in vitro* la production de méthane sans effets secondaires : cet effet a pu être relié à la présence de diallyl disulfide, composant majoritaire de l'HE d'ail, permettant d'inhiber de 69% la production de méthane à la concentration de 300 mg/L de l'extrait de rumen. Cet effet n'a pas été retrouvé avec les ionophores de synthèse tel que le Monensine utilisé comme référence (Benchaar & Greathead, 2011).

4.1.2 Effet des huiles essentielles sur la production de lait

Différents extraits végétaux ont pu démontrer leur capacité à augmenter la production de lait chez les animaux. Chez les brebis, les fourrages riches en tanins condensés tels que le lotier corniculé (*Lotus corniculatus L.*) permettent d'augmenter la production laitière au printemps et en été. L'apport d'acide nicotinique chez les vaches laitières permet d'augmenter le rendement laitier. Il a également été rapporté que la caféine permettait d'augmenter le développement de la glande mammaire ainsi que la production en lait chez les souris et les porcs. L'amélioration du rendement de production s'accompagne également d'une croissance plus rapide chez les animaux nouveaux nés (Rochfort *et al.*, 2008).

Si les HE ne présentent globalement pas d'effets sur le rendement laitier, leurs activités antibactériennes permettent de moduler la composition du lait. Les différentes bactéries de type Gram + présentes dans le rumen et responsable de l'hydrogénation des acides gras insaturés issus de l'alimentation peuvent effectivement être inhibées. L'utilisation de mélanges d'HE du

produit Crina®¹ a notamment pour effet l'augmentation de la concentration en Acide Linoléique Conjugué (ALC) dans le lait. Ceci apporte une valeur ajoutée au lait puisque les ALC sont bénéfiques à la santé du consommateur (Benchaar *et al.*, 2007, 2008).

En 2010, Santos *et al.* ont testé le mélange commercial Agolin®² Ruminant, composé majoritairement d'eugénol, de géranyl acétate et d'HE de coriandre. L'essai réalisé portait sur la complémentation de 310 vaches multipares, en début de lactation. Dans ce cas, aucun effet du produit n'a été constaté sur les performances des animaux. En effet, leur production laitière n'était pas augmentée et la composition du lait restait inchangée par rapport aux animaux non complémentés. Le même résultat a été rapporté en 2016 par (Vendramini *et al.*, 2016) lors d'un essai portant sur le mélange commercial Crina®³ Ruminants, composé de thymol, de gaïacol, d'eugénol, de vanilline, de salicyaldéhyde et de limonène.

Ces résultats contradictoires montrent que les essais *in vivo* des huiles essentielles sont complexes et que de nombreux facteurs influent sur leur absorption. Il semble évident que l'alimentation de base des animaux lors des essais joue un rôle important dans les résultats obtenus. D'autres facteurs extérieurs, tels que l'état de santé ou l'âge des animaux mais également leur lieu de vie, ajoutant également de la variabilité à l'étude des mélanges d'HE, il semble intéressant de développer des tests *in vitro* adaptés permettant de donner une base commune de comparaison.

4.1.3 Le cas particulier de la mammite

➤ Répercussions de la mammite bovine en France

La mammite est décrite comme une inflammation de la glande mammaire liée à un changement métabolique, physiologique, à un traumatisme ou à une contagion par un pathogène. Cette pathologie est préoccupante car c'est actuellement l'une des premières causes de mortalité chez les vaches laitières dans le Monde. En France, son impact économique est

¹Crina®, produit et commercialisé par le groupe DSM (Heerlen, Pays-bas). https://www.dsm.com/markets/anh/en_US/products/products-eubiotics/products-eubiotics-crina.html.

² Agolin® Ruminant, produit et commercialisé par le groupe Agolin SA (Bière, Switzerland) <http://www.agolin.com/products/product1.html>

³ Crina® Ruminant, produit et commercialisé par le groupe DSM (Heerlen, Pays-bas). https://www.dsm.com/markets/anh/en_US/products/products-eubiotics/products-eubiotics-crina.html.

estimé à 230€ par vache et par an, ce qui équivaut à une perte de 30€ par 1000 litres de lait produits. Sur ce coût global de 230€, 120€ sont liés à des frais directs dont 70% imputés à la baisse de production, 13% aux réformes des vaches atteintes, 11% au lait écarté et 5% aux frais vétérinaires. Les 110€ restants sont dus au temps de travail supplémentaire demandé à l'éleveur, mais également aux pénalités engendrées par la perte de qualité du lait (Bourrigan & Leclerc, 2013; Web-Agri, 2014). En raison des difficultés observées par les éleveurs à contrôler cette maladie, l'Etat Français a mis en place en 2013 le plan « Les mammites, j'anticipe ». Ce plan vise à enrichir les connaissances sur ces maladies et à mettre en place un accompagnement spécialisé pour les éleveurs de la filière laitière (Ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt, n.d.). Cette action est menée parallèlement aux plans Ecoantibio 1 et 2, visant eux à réduire l'exposition des animaux d'élevage aux antibiotiques afin de prévenir l'apparition de résistances bactériennes (Ministère de l'agriculture et de l'alimentation, 2017).

➤ Description de la pathologie et facteurs liés

La mammite est donc une pathologie touchant la glande mammaire et pouvant affecter un ou plusieurs quartiers des mamelles de la vache. C'est une affection douloureuse liée à une inflammation et pouvant dans certains cas engendrer un gonflement important du quartier. On considère que les mammites peuvent avoir une origine infectieuse, ou non infectieuse. Les mammites infectieuses sont liées à la présence de bactéries ou de virus, de mycoplasmes, de levures ou même d'algues dans la glande mammaire (Gruet, Maincent, Berthelot, & Kaltsatos, 2001). Les mammites non infectieuses sont plus généralement liées à un traumatisme ou à un dérèglement métabolique de l'animal. Il faut également prendre en compte que tous ces facteurs peuvent entrer en jeu en même temps. Au cours de ce projet, nous nous sommes particulièrement intéressés aux bactéries impliquées dans les mammites bovines, sans tenir compte des autres organismes ou virus.

Dans le cas des mammites infectieuses, deux cas de figures se présentent, à savoir les mammites d'origine environnementales et celles d'origine contagieuses.

- Les mammites environnementales sont liées à la présence d'un pathogène opportuniste qui pénètre la glande mammaire pour s'y multiplier pendant un laps de temps court. En effet, la bactérie n'étant pas adaptée à ce milieu, elle va rapidement être détruite par les réactions immunitaires mises en place par

l'animal. Ce type de mammite et généralement de courte durée et se résout de manière spontanée. Elle peut parfois passer inaperçue, causant alors des mammites dites sub-cliniques c'est-à-dire asymptomatiques. Les Entérobactéries et *Streptococcus uberis* sont généralement reliés aux mammites environnementales. (Bradley, 2002)

- Les mammites contagieuses ont pour origine la présence d'un pathogène adapté à son hôte. Ces bactéries ont alors la capacité de se soustraire au système immunitaire de la vache et de se multiplier fortement. On atteint alors une mammite post-clinique où les symptômes sont observables, notamment la hausse de la quantité de cellules somatiques dans le lait. Dans ce cas, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* et *agalactiae* font partie des bactéries les plus recensées. (Bradley, 2002)

La présence de Cellules Somatiques (CS) dans le lait est directement liée à la réponse inflammatoire et permet de mesurer le degré d'infection. En effet, lors d'une infection les cellules neutrophiles vont migrer du sang vers les tissus de la glande mammaire et engendrer une réponse pro-inflammatoire *via* des cytokines (TNF α , IL-1 β ...) ce qui va augmenter la phagocytose (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). En France, la quantité moyenne de CS s'est stabilisée autour de 300 000 CS/ml de lait (données de 2015) (Ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt, n.d.).

La maladie est considérée comme multifactorielle, car de nombreux paramètres peuvent intervenir dans l'apparition des mammites. Parmi ces paramètres, il faut tenir compte de l'hôte, du pathogène et de l'environnement qui influe, lui, à la fois sur l'hôte et sur le pathogène (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Si l'on considère la vache, sa nutrition, sa race, l'étape de la lactation dans laquelle elle se trouve, ainsi que la quantité de lait produit ont une influence importante. En effet, la période péripartum peut provoquer une baisse des défenses immunitaires, en raison d'une modification du profil hormonal et la présence d'un stress métabolique et physiologique (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Les différents facteurs ont été classés comme tel (McDougall, Parker, Heuer, & Compton, 2009) :

- Les facteurs prédisposant : l'âge de l'animal et son état immunitaire, les deux facteurs étant liés.
- Les facteurs permettant : le lieu de vie et la nutrition de l'animal

- Les facteurs précipitant : la présence d'agents infectieux dans l'environnement de l'animal
- Les facteurs renforçant : si l'animal est immunodéprimé ou surexposé aux pathogènes

Bien entendu, la présence de traumatisme ou de blessure sur les trayons peut également favoriser l'apparition d'une infection (McDougall *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'implication des biofilms bactériens dans les formes récurrentes de la maladie a été soulevée dernièrement. La bactérie opportuniste *S. aureus* est plus particulièrement étudiée de par sa capacité à former des biofilms, potentielle niche pour d'autres pathogènes (Fox, Zadoks, & Gaskins, 2005). Les exopolymères qui constituent le biofilm et sont sécrétés par les bactéries, les protègent notamment des agents du système immunitaire : ces sécrétions protègent par exemple *S. epidermidis* des macrophages, des opsonines produites ainsi que des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites pour dégrader les pathogènes (Melchior, Vaarkamp, & Fink-Gremmels, 2006).

➤ Prévention et traitements de la mammite bovine

Dans l'objectif de réduire l'utilisation des antibiotiques dans le cadre du traitement de la mammite bovine, plusieurs stratégies peuvent être mises en place (McDougall *et al.*, 2009). La vaccination des animaux contre les pathogènes environnementaux comme *S. uberis* et *E. coli* est possible et a montré son efficacité (McDougall *et al.*, 2009).

L'hygiène est l'un des premiers points à traiter dans le cadre de la prévention des mammites bovines. En effet, un défaut d'hygiène de la mamelle est directement lié à une augmentation du nombre de cellules somatiques dans le lait et du risque de mammite (McDougall *et al.*, 2009).

Des traitements préventifs mécaniques existent également, comme les bouchons externes ou internes. Les scellants externes consistent à recouvrir les trayons d'un polymère qui est disposé à l'inter-traite ou lors du tarissement afin d'empêcher les bactéries d'accéder au canal. On peut citer par exemple le Keno™*in Film*, une barrière basée sur de l'iode stabilisée

qui se place à l'inter-traite¹. Le produit Orbeseal®, commercialisé par les laboratoires Zoetis, consiste en un bouchon de kératine, qui va obstruer le canal mammaire et empêcher l'entrée de pathogènes dans la mamelle lors du tarissement². Ces produits présentent l'avantage, de ne pas nécessiter de délais d'attentes pour l'utilisation du lait ou de la viande de l'animal, contrairement aux antibiotiques.

Le complément alimentaire OmniGen-AF®³ est un mélange breveté qui vise à promouvoir le système immunitaire des bovins, leur permettant de lutter contre les mammites. D'après le fabricant, ce complément permet de diminuer le nombre de cellules somatiques dans le lait, de réduire le nombre de mammites de 13.6% et celui de métrites (infections utérines) de 22.6% (Vergonjeanne, 2015).

En terme d'hygiène de la mamelle, les désinfectants pré et post-traite apportent également une sécurité supplémentaire. La société Comptoir des plantes commercialise un produit de trempage filmogène à base d'huiles essentielles de romarin et de ravintsara⁴. Là encore, le produit permet le maintien d'un taux cellulaire bas chez les primipares et l'abaissement des taux cellulaires élevés liés à la présence de germes pathogènes. Dans ce cas également aucun délai d'attente n'est nécessaire pour l'utilisation du lait.

¹ Keno™din Film, scellant externe destiné à l'inter-traite et basé sur une formule d'iode stabilisé à 3000 ppm. Produit et commercialisé par CID LINES N.V., Ieper, Belgique. <http://www.cidlines.com/fr-FR/kenotmdin-film>

² Orbeseal, formule à injection intra-mammaire produit et commercialisé par le laboratoire Zoetis, Madison, Etats-Unis d'Amérique. <https://www.zoetis.fr/orbeseal/index.aspx>

³ OmniGen-AF est un complément alimentaire breveté destiné aux vaches laitières produit par Phibro Animal Health Corporation New Jersey, Etats-Unis d'Amérique. <http://www.theomnigendifference.com>

Composition : Plant protein products, active dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), dried *Trichoderma longibrachiatum* fermentation product, niacin, vitamin B-12 supplement, riboflavin-5-phosphate, d-calcium pantothenate, choline chloride, biotin, thiamine mononitrate, pyridoxine hydrochloride, menadione dimethylpyrimidinol bisulfite, folic acid, calcium aluminosilicate, sodium aluminosilicate, diatomaceous earth, calcium carbonate, rice hulls and mineral oil.

⁴ Bio trempage® est une solution végétale filmogène contenant des huiles essentielles naturelles dont *Rosmarinus officinalis* CT cineol, *Cinnamomum camphora* CT cineol. Produit et commercialisé par le Comptoir des plantes, Treignac, France. <http://comptoirdesplantes.com/produit-naturel-elevage/89-protection-trayons-naturels-bio.html>

4.2 Activité des huiles essentielles chez les porcs

Les cochons domestiques appartiennent à la famille des Suidés et sont des descendants des sangliers, appartenant à cette même famille. Ce sont des mammifères omnivores très prolifiques qui sont principalement élevés pour leur viande. En France, on estime la consommation de viande porcine à 34 kg/an/habitant (poids équivalent carcasse, PEC), ce qui correspond à l'équivalent de 23 millions de porcs (INAPORC, n.d.). Les enjeux de l'utilisation des HE dans le cadre des élevages porcins est logiquement l'optimisation de la prise de poids et de la conversion alimentaire mais également la prévention de l'apparition de maladies contagieuses. Une grande partie des travaux portent sur la complémentation du jeune animal en période de sevrage. Le sevrage est une période charnière pour ces types d'infections car la transition alimentaire s'accompagne d'une modification de la flore intestinale qui peut alors facilement être déséquilibrée (Frankič, Voljč, Salobir, & Rezar, 2009). En effet, c'est à cette période que les jeunes animaux sont les plus sujets aux infections par les microorganismes et plus particulièrement des souches de *E. coli* entérotoxiques. Les colibacillooses entraînent alors de fortes diarrhées qui ont une répercussion directe sur la santé globale de l'animale, sa prise de poids et parfois même sa survie (figure 8).

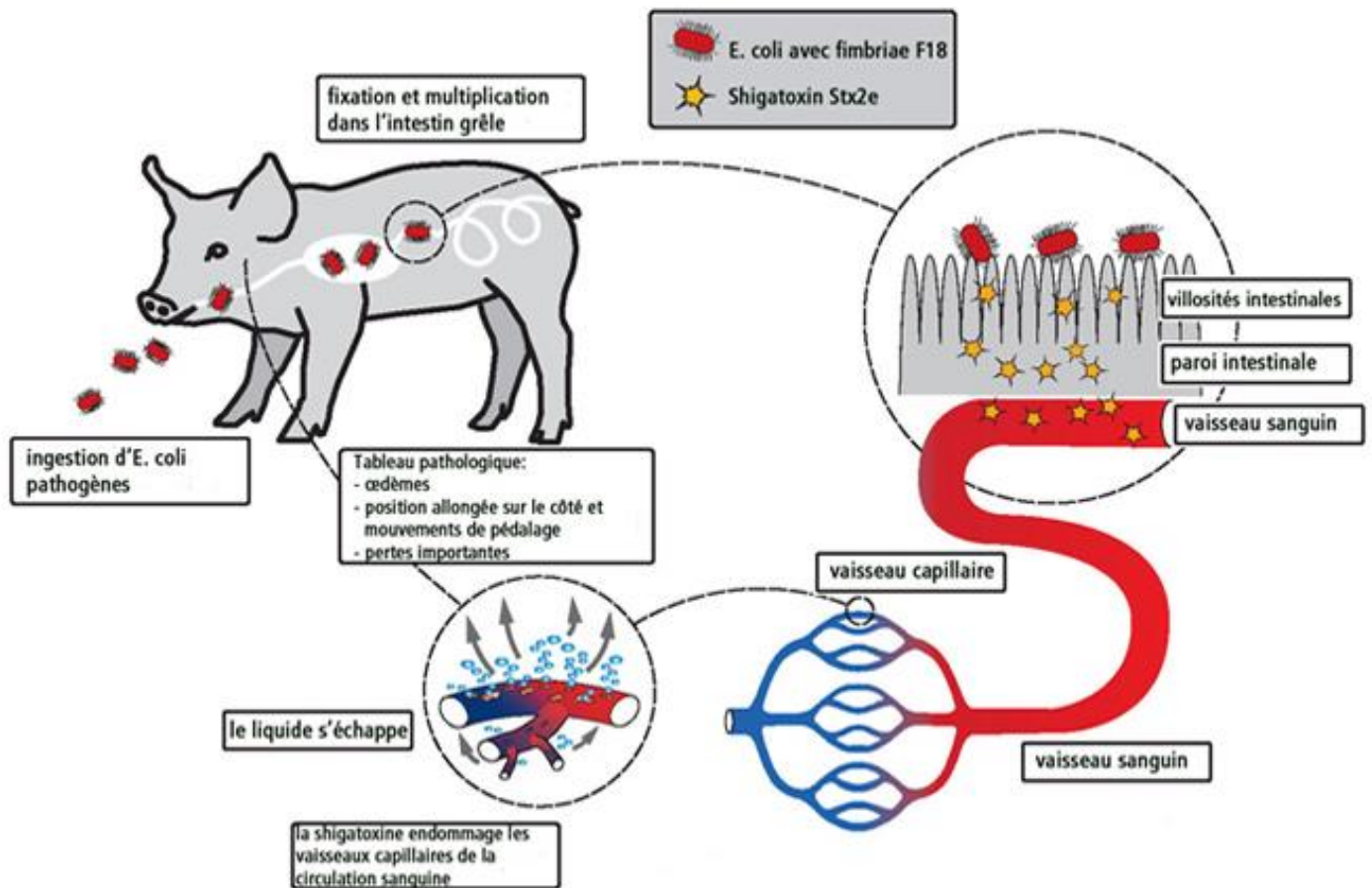


Figure 8: Processus de développement de la colibacillose et des différentes maladies associées chez le porcelet (Belot, n.d.).

4.2.1 Impact des huiles essentielles sur la flore digestive

En prévision de l'interdiction des APC en 2006, différents compléments alimentaires basés sur des extraits à activité antimicrobienne sont testés sur les jeunes animaux. Les travaux publiés en 2008 par Kroismayr *et al.* comparent les effets d'un mélange commercial d'HE d'origan, d'anis et de citron (Digestarom® P.E.P.¹) à ceux de l'avilamycine (antibiotique de référence) sur des porcelets sevrés. Dans les deux cas, des modifications équivalentes sont observées sur la composition de la flore intestinale et les produits de dégradation. En effet, la flore aérobie et anaérobie est réduite au niveau de l'iléon par les deux traitements. Les HE sont également actives au niveau du caecum alors que l'avilamycine n'est pas efficace à ce niveau

¹ Digestarom® PEP, produit et commercialisé par BIOMIN Holding GmbH (Getzersdorf, Autriche). Mélange d'huiles essentielles, d'herbes et d'arômes, disponible en formulation poudre, encapsulée ou liquide. <http://www.biomin.net/fr/produits/digestarom/>

du tube digestif. Globalement, l'inhibition se porte majoritairement sur les bactéries des genres *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Clostridium*. L'activité antibactérienne des traitements s'est traduite par une baisse de production d'acides gras volatils et plus particulièrement ceux couplés à l'acide acétique, ainsi que par une baisse de production d'ammoniaque. Enfin la production d'amines biogéniques est également réduite par les deux traitements. Tous ces composés peuvent avoir un effet délétère sur la digestion et impliquer un stress oxydatif au niveau de la paroi intestinale, il s'agit donc d'un bénéfice pour la santé des jeunes animaux. D'un point de vue physique, la complémentation de ces animaux avec les HE a particulièrement amélioré leur gain de poids de 5%, la prise alimentaire de 3% tout en réduisant le ratio alimentation / gain de poids de 1%, alors que les effets de l'avilamycine étaient moins prononcés (+1%, -1% et -2% respectivement). D'après la littérature, les effets de ce mélange d'HE sont portés par l'origan et sa molécule majoritaire, le carvacrol (Kroismayr *et al.*, 2008).

L'origan et le carvacrol font d'ailleurs l'objet de nombreux travaux (Henn, Bertol, & Moura, 2010; Stelter *et al.*, 2013) pour leur activité antibactérienne mais également immunostimulante. Une complémentation des porcelets par de l'HE d'origan à 0,003% permet notamment de réduire la durée des diarrhées post sevrage, effet qui est amplifié par l'ajout d'oxyde de zinc à 0,5%. Le zinc est également un agent préventif de la diarrhée. Le résultat de la complémentation à l'aide d'origan (0,003%) et d'oxyde de zinc (0,5%) est similaire à ceux obtenus lors d'une complémentation à l'aide d'un antibiotique, le batracine zinc (0,05%) et 0,5% d'oxyde de zinc.

4.2.2 Effet des huiles essentielles sur le système immunitaire des porcs

Le carvacrol, composé majoritaire de l'HE d'origan possède donc de fortes activités antibactériennes, ce qui permet d'optimiser la digestion des animaux et de réduire la fréquence de pathologies colibacillaires (Henn *et al.*, 2010; Stelter *et al.*, 2013). Le système immunitaire est également un point clé dans la prévention des maladies et différents vaccins ont été mis en

place chez les porcins. Les vaccins tels que Coliprotec F4/F18¹, Ecoporc Shiga² ou Porcilis Coliclos³ par exemple permettent de réduire la fréquence des maladies liées aux colibacilles ou aux clostridiiums (Gérard, 2017).

Une autre approche consiste à améliorer le statut immunitaire des animaux à l'aide d'additifs alimentaires. Cette démarche permet notamment d'améliorer la prise vaccinale, c'est-à-dire d'augmenter la réponse du système immunitaire aux antigènes spécifiques du pathogène visé. De récents travaux présentés par Li *et al.* (2012) ont montré l'efficacité d'un produit basé sur des HE encapsulées dont les composants majoritaires sont le thymol et le cinnamaldéhyde. Au cours de l'essai, 240 porcelets sevrés et âgés de 36 jours ont été complémentés sur une période de 35 jours. Les HE apportées par l'aliment ont permis d'augmenter le taux de transformation des lymphocytes et le taux de phagocytose par les leucocytes. Les leucocytes sont les cellules du système immunitaire, comprenant les lymphocytes, granulocytes et monocytes. Les monocytes sont notamment capables d'évoluer en macrophages, qui se trouvent en première ligne lors d'une infection par un pathogène. Les lymphocytes B sont responsables de l'immunité humorale c'est-à-dire la production d'anticorps. Les lymphocytes T sont quant à eux impliqués dans l'immunité à médiation cellulaire. Le niveau d'immunoglobulines (Ig) de type d'IgA et IgM, ainsi que la quantité de molécules du complément C3 et C4 sont également augmentées dans le sang des animaux. Les IgA sont présentes notamment au niveau des muqueuses et constituent une première ligne dans la protection de l'organisme, en évitant l'adhésion des pathogènes aux cellules de la couche superficielle. Les IgM sont, quant à elles, produites par les plasmocytes et interviennent lors de la première rencontre avec un antigène. Ces deux immunoglobulines, constitutives de l'immunité adaptative, sont donc importantes dans la prévention des pathologies. Les protéines du complément, dont font partie C3 et C4, appartiennent à l'immunité innée et permettent la stimulation de l'inflammation *via* le recrutement des macrophages et des lymphocytes B. Leur activation par les complexes immuns ou par des particules exogènes (lipopolysaccharides bactériens, membranes de levures) induit

¹ Coliprotec F4/F18 est un vaccin basé sur des bactéries *E. coli* vivantes, présentant les facteurs d'attachement F4 et F18. Ce vaccin est indiqué pour protéger les jeunes animaux contre la diarrhée post sevrage et la maladie de l'œdème. Ce produit est commercialisé par les laboratoires Prevtect Microbia (Munich, Allemagne). <http://www.prevtectmicrobia.com>

² Ecoporc Shiga est un vaccin contre la maladie de l'œdème ciblant les *E. coli* produisant la shigatoxine Stx2e. Produit et commercialisé par IDT Biologika GmbH (Dessau-Rosslau, Allemagne). <http://www.idt-animal-health.com/veterinarian/swine/products-swine/ecoporc-shiga/?L=0%27A>

³ Porcilis coliclos est un vaccin commercialisé par les laboratoire Merck (Madison, USA) <http://www.merck-animal-health.com/species/pigs/index.aspx>

en effet des cascades enzymatiques aboutissant à la formation du complexe d'attaque membranaire et la lyse des cellules cibles (Li *et al.*, 2012).

D'autres travaux *in vivo* menés par Ahmed *et al.* (2013) ont porté sur la comparaison de l'efficacité du compléments alimentaires Digestarom® PEP¹, contenant respectivement 0,2% de resvératrol et 0,0125% d'HE en mélange (HE d'origan, d'anis, d'écorce d'orange et de chicorée) (Ahmed *et al.*, 2013). La quantité d'IgG présente dans le sérum des porcelets est significativement augmentée lors d'ajout d'HE ou de resvératrol par rapport aux porcelets témoins (alimentation de base seule). L'augmentation obtenue avec le produit Digestarom® PEP¹³ n'est cependant pas significativement différente de celle observée lorsque l'avilamycine était apportée aux animaux. Le résultat obtenu avec le Digestarom® PEP¹³ reste inférieur à celui observé lors d'apport de resvératrol. En parallèle, la concentration sérique de TNF- α (Tumor Necrosis Factor), un facteur pro-inflammatoire, est réduite de manière significative par les trois types de complémentations.

Les IgG sont présentes dans le sérum et protègent l'organisme face aux pathogènes présents globalement en dehors du système vasculaire. Ce sont les Ig les plus fréquentes et leur activation apporte de ce fait une immunité durable. La voie d'activation des IgG et plus généralement des immunoglobulines n'est pas clairement élucidée, mais il est possible que certaines molécules majoritaires des HE - carvacrol, anéthol ou limonène dans ce cas - se fixent aux IgG circulantes *via* les récepteurs Fc et activent le système immunitaire (Nimmerjahn & Ravetch, 2010). Le TNF- α est une cytokine médiatrice de l'immunité intervenant particulièrement lors de la phase aigüe de la réponse inflammatoire. Cette glycoprotéine régule l'induction de nécrose ou d'apoptose dans les cellules infectées et permet également l'activation des macrophages. Néanmoins, la forte présence de TNF- α a été reliée à une diminution de la prise alimentaire ainsi qu'à un moins bon rendement de digestion (Spurlock, 1997).

¹ Digestarom® PEP, produit et commercialisé par BIOMIN Holding GmbH (Getzersdorf, Autriche). Mélange d'huiles essentielles, d'herbes et d'arômes, disponible en formulation poudre, encapsulée ou liquide. <http://www.biomin.net/fr/produits/digestarom/>

4.3 Activité des huiles essentielles chez les volailles

La volaille inclue les animaux appartenant aux familles des gallinacés et palmipèdes, élevés généralement pour leurs œufs et leur chair. En France, 964,9 millions de têtes ont été abattues et 16,1 milliards d'œufs ont été produits en 2015 (FranceAgriMer, 2016). Les études les plus fréquentes concernent l'utilisation des HE chez le poulet de chair. L'objectif d'une supplémentation en HE est d'optimiser les rendements en chair ou en œufs, en modulant la flore digestive des animaux ou leur immunité, mais également dans certains cas de modifier les qualités gustatives et le temps de conservation de la viande (Alleman *et al.*, 2013; Brenes & Roura, 2010; Gabriel *et al.*, 2013; Hong, Steiner, Aufy, & Lien, 2012; Khodambashi Emami, Samie, Rahmani, & Ruiz-Feria, 2012).

4.3.1 Effets observés sur le système digestif

Dans une étude *in vivo* menée sur des poulets de chair, Riyazi *et al.* (2015) ont démontré l'efficacité d'une complémentation à base d'HE de basilic. Les concentrations croissantes d'HE de basilic permettent d'abaisser la quantité d'*E. coli* dans l'iléon tout en promouvant la croissance des Lactobacilles. Par ailleurs, la complémentation permet également d'abaisser la concentration en ammoniac dans l'intestin des oiseaux, ce qui signifie que l'activité microbiologique globale est diminuée. L'ammoniac est une substance toxique et est délétère pour la santé des animaux (Hong *et al.*, 2012).

Les bactéries du genre *Clostridium* et plus particulièrement *Clostridium perfringens* de type A et C sont présentes dans le tube digestif des volailles et sont les principaux agents responsables de l'entérite nécrotique. Cette maladie est caractérisée par une baisse de l'appétit et de fortes diarrhées résultantes de lésions dans l'intestin grêle, dans les régions du jéjunum et de l'iléon. Elle est observée majoritairement chez les poulets de chair âgés de 2 à 6 semaines avec un pic d'infection à 25 jours. La mortalité est importante dans les groupes touchés. Dans des essais portants sur la réduction de la quantité de *C. perfringens* présente dans le tube digestif, Mitsch *et al.* (2004) ont testé deux mélanges Crina® Volaille. Les deux produits contiennent chacun du thymol, de l'eugénol, de la curcumine et de la pipérine, mais dans le second, la moitié du thymol est remplacé par du carvacrol. Les deux compléments sous forme de poudre ont été ensuite ajoutés dans l'aliment à hauteur de 100 ppm. Sur la totalité de l'essai de 30 jours, une baisse significative du nombre de prélèvements positifs à *C. perfringens* est

observée dans les groupes traités ainsi qu'une réduction de la concentration en bactéries dans les prélèvements positifs. Par ailleurs, l'inhibition de la croissance de *C. perfringens* est plus importante lors de l'utilisation d'un mélange composé de thymol, d'eugénol, de curcumine et de pipérine. Les HE ont donc un impact sur la présence de bactéries pathogènes dans le système digestif des animaux.

D'autres pathogènes comme les parasites intestinaux peuvent également perturber le bon développement des oiseaux et impacter le rendement de l'élevage. Les coccidioses provoquées chez la volaille par les protozoaires *Eimeria tenella*, *Eimeria maxima* et *Eimeria acervulina* impliquent d'importantes pertes financières. En effet le parasite détruit l'épithélium digestif, ce qui réduit la conversion des aliments en énergie et donc la prise de poids. Il peut également subsister dans l'environnement, ce qui provoque des infections persistantes dans les élevages. De plus, ces organismes ont développé des résistances à la plupart des vermifuges existants (Remmal, Achahbar, Bouddine, Chami, & Chami, 2011). *In vitro*, un criblage réalisé sur dix HE (*Oreganum compactum*, *Artemisia absinthium*, *Rosmarinus officinalis*, *Syzygium aromaticum*, *Melaleuca alternifolia*, *Citrus sinensis*, *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita*, *Listea cubeba*, *Cinnamomum zeylanicum*) a permis de mettre en évidence leur activité vermifuge. Les HE les plus efficaces sur les oocystes - c'est-à-dire la spore persistante d'*Eimeria* - étaient l'absinthe, le tea tree, le thym et le girofle, avec des CL₅₀ de 277 µg/ml ; 297 µg/ml ; 315 µg/ml et 543 µg/ml respectivement (Remmal *et al.*, 2011). Ces résultats ont été confirmés en 2012 par l'étude menée par Kostadinovic *et al.* (2016), dans laquelle l'application d'une dose de 3 mg/kg d'HE d'absinthe permet de réduire le nombre d'oocystes excrétés par gramme de fèces de 5091 au 6ème jour à 16 au 9ème jour post infection. La quantité totale d'oocystes excrétés par gramme de fèces sur les jours 6 à 9 post infection est également réduite, passant de 31 000 pour les sujets non traités à 9 125 pour les sujets traités.

4.3.2 Effets sur le système immunitaire des volailles

L'effet des HE sur le système immunitaire a été démontré grâce à différents marqueurs. En 2010, Awaad *et al.* se sont appuyés sur des marqueurs sériques, cellulaires et histologiques pour démontrer l'activité immunomodulatrice des HE de menthe et d'eucalyptus à une dose de 0,25 ml/L d'eau de boisson. Après vaccination des animaux contre les maladies de Newcastle et de la grippe aviaire, un titrage plus important d'anticorps spécifiques à chaque virus est observé lorsqu'un traitement d'HE est administré. L'activité phagocytaire des macrophages

issus des animaux traités est également significativement supérieure à celle des animaux non traités. Parallèlement, une activation des organes spécifiques de l'immunité comme la bourse de Fabricius ou le thymus, ou encore la différenciation des lymphoblastes est observée chez les animaux traités. Ces résultats sont en accord avec ceux de Basmacıoğlu Malayoğlu *et al.* (2010), qui ont également mis en évidence une augmentation du titre d'anticorps spécifiques à la maladie de Newcastle lors d'un traitement à l'HE d'origan.

4.3.3 Effets sur les performances zootechniques

Dans tous les cas, l'objectif des traitements administrés aux poulets de chair reste l'amélioration du rendement aliment ingéré / viande produite, ainsi qu'une meilleure qualité de la viande. Dans un premier temps, les HE d'ail, d'oignon, de menthe ou de cannelle (entre autres) agissent comme des substances apéritives et permettent de stimuler la sécrétion des différents sucs digestifs (salive, sucs gastriques, biliaires et salivaires) ce qui améliore le rendement de la digestion enzymatique. Une stimulation de la motricité intestinale est également observée, l'ensemble ayant pour effet d'augmenter la digestibilité des aliments (Brenes & Roura, 2010; Gabriel *et al.*, 2013). L'effet anti-inflammatoire des HE sur le système digestif permet également de réduire le coût métabolique imputé au renouvellement cellulaire (Gabriel *et al.*, 2013).

Quant aux études portant sur les caractéristiques de la viande après traitement aux HE, elles ne font généralement pas ressortir d'effets positifs majeurs, que ce soit sur la quantité de viande obtenue ou sa qualité gustative (Bento & Ouwehand, 2013). Des travaux présentés en 2011 par Yesilbag *et al.* ont tout de même pu mettre en évidence un effet positif de l'HE de romarin sur la quantité de viande présente sur les carcasses des animaux alors que celle-ci était moins appréciée par le panel de goûteurs. D'après Hong *et al.* (2012), le complément Biomin® permet également d'obtenir une viande plus tendre au niveau de la poitrine et plus juteuse au niveau des cuisses de la volaille.

5 Bibliographie de la partie introductive

A

Adorjan, B., & Buchbauer, G. (2010). Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(6), 407–426.

Agreste. (2017). *Agreste Synthèse - Porcins N°2017/303*.

Ahmed, S. T., Hossain, M. E., Kim, G. M., Hwang, J. A., Ji, H., & Yang, C. J. (2013). Effects of Resveratrol and Essential Oils on Growth Performance, Immunity, Digestibility and Fecal Microbial Shedding in Challenged Piglets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(5), 683–690.

Alinkina, E. S., Misharina, T. a., & Fatkullina, L. D. (2012). Antiradical properties of oregano, thyme, and savory essential oils. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49(1), 73–78.

Alleman, F., Gabriel, I., Dufourcq, V., Perrin, F., & Gabarrou, J. (2013). Utilisation des huiles essentielles en alimentation des volailles. 1. Performances de croissance et réglementation. *INRA Prod. Anim*, 26(1), 3–11.

ANSES. (2012). *Hiérarchisation de 103 maladies animales présentes dans les filières ruminants, équidés, porcs, volaille et lapins en France métropolitaine*.

Astani, A., Reichling, J., & Schnitzler, P. (2011). Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.

Awaad, M. H. H., Abdel-Alim, G. A., Sayed, K. S. S., Kawkab, Ahmed, A., Nada, A. A., ... Alkhalaf, A. N. (2010). Immunostimulant effects of essential oils of peppermint and eucalyptus in chickens. *Pakistan Veterinary Journal*, 30(2), 61–66.

B

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils--a review. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(2), 446–75.

Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (2010). *Handbook of Essential Oils Science, Technology,*

- and Applications. In *CRC Press* (p. 5).
- Basmacıoğlu Malayoğlu, H., Baysal, S., Misirlioğlu, Z., Polat, M., Yilmaz, H., & Turan, N. (2010). Effects of oregano essential oil with or without feed enzymes on growth performance, digestive enzyme, nutrient digestibility, lipid metabolism and immune response of broilers fed on wheat-soybean meal diets. *British Poultry Science*, *51*(1), 67–80.
- Becerril, R., Gómez-Lus, R., Goñi, P., López, P., & Nerín, C. (2007). Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *388*(5–6), 1003–1011.
- Belot, O. (Meliofeed S. (n.d.). *E. coli* et maladie de l'oedème: comment les éviter? Retrieved from <http://www.melior.ch/fr/articles-techniques.992/nouveau.25/e-coli-et-maladie-de-loedeme-comment-les-eviter.1096.html>
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. a., & Beauchemin, K. a. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, *145*(1–4), 209–228.
- Benchaar, C., & Greathead, H. (2011). Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, *166–167*, 338–355.
- Benchaar, C., Petit, H. V., Berthiaume, R., Ouellet, D. R., Chiquette, J., & Chouinard, P. Y. (2007). Effects of Essential Oils on Digestion, Ruminal Fermentation, Rumen Microbial Populations, Milk Production, and Milk Composition in Dairy Cows Fed Alfalfa Silage or Corn Silage. *Journal of Dairy Science*, *90*(2), 886–897.
- Benencia, F., & Courrèges, M. C. (2000). *In vitro* and *in vivo* activity of eugenol on human herpesvirus. *Phytotherapy Research : PTR*, *14*(7), 495–500.
- Bento, M., & Ouwehand, A. (2013). Essential oils and their use in animal feeds for monogastric animals—Effects on feed quality, gut microbiota, growth performance and food safety: a review. *Veterinarni Medicina*, *2013*(9), 449–458.
- Biotope des montagnes. (n.d.). Nos méthodes de fabrication. Retrieved November 7, 2017, from

<http://www.biotopedesmontagnes.fr/>

Boulho, R. (2017). *Application de procédés éco-responsables pour l'extraction de molécules de la macroalgue solieria chordalis, caractérisation chimiques et étude d'activités biologiques.*

Boulho, R., Marty, C., Freile-Pelegri, Y., Robledo, D., Bourgougnon, N., & Bedoux, G. (2017). Antiherpetic (HSV-1) activity of carrageenans from the red seaweed *Solieria chordalis* (Rhodophyta, Gigartinales) extracted by microwave-assisted extraction (MAE). *Journal of Applied Phycology*, 1–10.

Bourrigan, X. (institut de l'Élevage), & Leclerc, M. C. (institut de l'Élevage). (2013). Mammites cliniques en élevage bovin lait : deux éleveurs témoignent. Retrieved February 10, 2018, from <http://idele.fr/rss/publication/idelesolr/recommends/mammites-cliniques-en-elevage-bovin-lait-deux-eleveurs-temoignent.html>

Bradley, A. J. (2002). Bovine mastitis: An evolving disease. *Veterinary Journal*, 164(2), 116–128.

Brenes, A., & Roura, E. (2010). Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*, 158, 1–14.

Burt, S. A. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–53.

Burt, S. A., van der Zee, R., Koets, A. P., de Graaff, A. M., van Knapen, F., Gaastra, W., ... Veldhuizen, E. J. a. (2007). Carvacrol Induces Heat Shock Protein 60 and Inhibits Synthesis of Flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4484–4490.

C

Carson, C. F., Hammer, K. a, Riley, T. V, Carson, C. F., Hammer, K. a, & Riley, T. V. (2006). *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil : a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil : a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 50–62.

Communauté Professionnelle Porcine. (2015). Infections par *Escherichia coli* chez le porc. Retrieved February 4, 2018, from <https://www.3trois3.com/articles/infections-par->

escherichia-coli-chez-le-porc-2-de-2_10637/

Connehaye, E. (2016). Aux sources de l'Inra. Retrieved from <http://institut.inra.fr/Reperes/Jalons-historiques/1946-1963/Tous-les-magazines/Creation-de-l-Inra>

Corpet, D. E. (2000). Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques. *Revue Méd.Vet*, 151(2), 99–104.

D

Daniel, A. N., Sartoretto, S. M., Schmidt, G., Caparroz-Assef, S. M., Bersani-Amado, C. A., & Cuman, R. K. N. (2009). Anti-inflammatory and antinociceptive activities A of eugenol essential oil in experimental animal models. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(1b), 212–217.

De Billerbeck, V. G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytotherapie*, 5(5), 249–253.

de Chalvet de Rochemonteix, A. (2009). *Les biofilms et la peau*. Ecole nationale veterinaire d'Alfort.

Di Pasqua, R., Mamone, G., Ferranti, P., Ercolini, D., & Mauriello, G. (2010). Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *PROTEOMICS*, 10(5), NA-NA.

Domadia, P., Swarup, S., Bhunia, A., Sivaraman, J., & Dasgupta, D. (2007). Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochemical Pharmacology*, 74(6), 831–840.

E

EFSA. (n.d.). Aliments pour animaux. Retrieved February 3, 2018, from <https://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/feed>

F

Faleiro, M. L. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. In A. Mendez-Vilas (Ed.), *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* (Vol. 3, pp. 1143–1156). Badajoz: Formatex Research Center.

- FAO. (n.d.). FAOSTAT. Retrieved February 3, 2018, from <http://www.fao.org/faostat/en/>
- FAO. (2011). *Impact of animal nutrition on animal welfare*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i3148e.pdf>
- Ferran, A. (n.d.). *Digestion microbienne chez les ruminants*. Retrieved from http://physiologie.envt.fr/spip/IMG/pdf/Digestion_microbienne_chez_les_ruminants.pdf
- Filloux, A., & Vallet, I. (2003). Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *M/S: Médecine Sciences*, 19(1), 77–83.
- Flores, F. C., de Lima, J. A., Ribeiro, R. F., Alves, S. H., Rolim, C. M. B., Beck, R. C. R., & da Silva, C. B. (2013). Antifungal Activity of Nanocapsule Suspensions Containing Tea Tree Oil on the Growth of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia*, 175(3–4), 281–286.
- Fox, L. K., Zadoks, R. N., & Gaskins, C. T. (2005). Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Veterinary Microbiology*, 107(3–4), 295–9.
- FranceAgriMer. (2016). Données et bilans : Les produits carnés, avicoles et laitiers Filières avicoles. Retrieved from http://www.franceagrimer.fr/content/download/46914/448727/file/STA-VIA-Données_statistiques_Volailles_2015.pdf
- Frankič, T., Voljč, M., Salobir, J., & Rezar, V. (2009). Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta Agriculturae Slovenica*, 95–102.
- Franz, C., Baser, K., & Windisch, W. (2010). Essential oils and aromatic plants in animal feeding—a European perspective. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25, 327–340.
- G**
- Gabriel, I., Alleman, F., & Dufourcq, V. (2013). Utilisation des huiles essentielles en alimentation des volailles. 2. Hypothèses sur les modes d'action impliqués dans les effets observés. *INRA Prod. Anim*, 26(1), 13–24. /1/file/Prod_Anim__2013_26_1_02.pdf
- Gaigné, C., & Letort, E. (2017). Co-localisation des différentes productions animales en Europe : l'exception française ? *INRA Production Animale*, 30(3), 219–228.
- Gérard, C. (2017). La vaccination Coliprotec F4/F18 a réglé le problème de colibacillose en

post-sevrage. *Réussir Porc*, 248, 34–37.

GraphAgri. (2017). *Production animale 2017*. Retrieved from <http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Gaf2017p145-163.pdf>

Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X., & Kaltsatos, V. (2001). Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 50(0169–409X), 245–259.

H

Henn, J., Bertol, T., & Moura, N. (2010). Oregano essential oil as food additive for piglets: antimicrobial and antioxidant potential. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 1761–1767.

Hong, J.-C., Steiner, T., Aufy, A., & Lien, T.-F. (2012). Effects of supplemental essential oil on growth performance, lipid metabolites and immunity, intestinal characteristics, microbiota and carcass traits in broilers. *Livestock Science*, 144(3), 253–262.

I

INAPORC. (n.d.). La filière porc en chiffres. Retrieved from <http://www.leporc.com/economie/consommation.html>

INRA. (2013). Jalons historiques. Retrieved from <http://institut.inra.fr/Reperes/Jalons-historiques>

Institut Pasteur. (2013). Les candidoses. Retrieved from <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/candidoses>

J

Jiang, X. R., Awati, a, Agazzi, a, Vitari, F., Ferrari, a, Bento, H., ... Bontempo, V. (2014). Effects of a blend of essential oils and an enzyme combination on nutrient digestibility, ileum histology and expression of inflammatory mediators in weaned piglets. *Animal : An International Journal of Animal Bioscience*, 1–10.

K

Kavanaugh, N. L., & Ribbeck, K. (2012). Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas spp.* And *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental*

Microbiology, 78(11), 4057–4061.

Khodambashi Emami, N., Samie, A., Rahmani, H. R., & Ruiz-Feria, C. A. (2012). The effect of peppermint essential oil and fructooligosaccharides, as alternatives to virginiamycin, on growth performance, digestibility, gut morphology and immune response of male broilers. *Animal Feed Science and Technology*, 175(1–2), 57–64.

Kim, Y.-G., Lee, J.-H. J., Kim, S.-I., Baek, K.-H., & Lee, J.-H. J. (2015). Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *International Journal of Food Microbiology*, 195, 30–39.

Knowles, J. R., Roller, S., Murray, D. B., & Naidu, A. S. (2005). Antimicrobial Action of Carvacrol at Different Stages of Dual-Species Bio lm Development by. *Society*, 71(2), 797–803.

Kostadinovic, L., Levic, J., Galonja-Coghill, T., & Ruzicic, L. (2012). Anticoccidian effects of the *Artemisia absinthium* L. extracts in broiler chickens. *Archiva Zootechnica*, 152, 69–77.

Kroismayr, A., Schedle, K., & Sehm, J. (2008). Effects of antimicrobial feed additives on gut microbiology and blood parameters of weaned piglets. *Die Bodenkultur*.

L

Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research : PTR*, 18(6), 435–48.

Landa, P., Kokoska, L., Pribylova, M., Vanek, T., & Marsik, P. (2009). In vitro anti-inflammatory activity of carvacrol: Inhibitory effect on COX-2 catalyzed prostaglandin E2 biosynthesis. *Archives of Pharmacal Research*, 32(1), 75–78.

Lang, M., Rodrigues, S., Boulho, R., Duteil, E., Bazire, A., & Bedoux, G. (2016). An Essential Oil Blend Prevents *Pseudomonas aeruginosa* PA01 from Forming Biofilms. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 7(2).

Lemoine, T., Calvar, C., & Dubois, A. (2016). *Les produits alternatifs en production porcine: état des lieux*.

Li, S. Y., Ru, Y. J., Liu, M., Xu, B., Péron, A., & Shi, X. G. (2012). The effect of essential oils

on performance, immunity and gut microbial population in weaner pigs. *Livestock Science*, 145(1–3), 119–123.

Liapi, C., Anifantis, G., Chinou, I., Kourounakis, A. P., Theodosopoulos, S., & Galanopoulou, P. (2007). Antinociceptive Properties of 1,8-Cineole and α -Pinene, from the Essential Oil of *Eucalyptus camaldulensis* Leaves, in Rodents.

M

Martin, V. (2010). *Les processus inflammatoires chez les oiseaux: physiopathologie et implications cliniques en aviculture*.

McDougall, S., Parker, K. I., Heuer, C., & Compton, C. W. R. (2009). A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. *Veterinary Microbiology*, 134(1–2), 177–185.

Melchior, M. B., Vaarkamp, H., & Fink-Gremmels, J. (2006). Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 171(3), 398–407.

Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252–87. <https://doi.org/10.3390/molecules15129252>

Mimica-Dukic, N., Bugarin, D. D., Grbovic, S., Mitic-Culafic, D., Vukovic-Gacic, B., Orcic, D., ... Couladis, M. (2010). Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(4), 2759–70.

Ministère de l'agriculture. (n.d.). Histoire de l'agriculture. Retrieved February 3, 2018, from http://agriculture.gouv.fr/histoire/2_histoire/index_histoire_agriculture.htm

Ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt. (n.d.). Le plan mammites - Les mammites, j'anticipe! Retrieved February 4, 2018, from <https://les-mammites-j-anticipe.com/le-plan-mammites/>

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt. (2017). *Ecoantibio : réduire l'utilisation des antibiotiques vétérinaires*.

Ministère de l'agriculture et de l'alimentation. (2017). *Plan EcoAntibio 2*.

Mitsch, P., Zitterl-Eglseer, K., Kohler, B., Gabler, C., Losa, R., & Zimpernik, I. (2004). The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of

Clostridium perfringens in the intestines of broiler chickens. *Poultry Science*, 83(4), 669–675.

Murbach Teles Andrade, B. F., Nunes Barbosa, L., da Silva Probst, I., & Fernandes Júnior, A. (2014). Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 26(1), 34–40.

N

Nagy, J. G., & Tengerdy, R. P. (1968). Antibacterial action of essential oils of *Artemisia* as an ecological factor. II. Antibacterial action of the volatile oils of *Artemisia tridentata* (big sagebrush) on bacteria from the rumen of mule deer. *Applied Microbiology*, 16(3), 441–4.

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–74.

Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2010). Antibody-mediated modulation of immune responses. *Immunological Reviews*, 236(1), 265–275.

O

Oh, H. K., Sakai, T., Jones, M. B., & Longhurst, W. M. (1967). Effect of various essential oils isolated from Douglas fir needles upon sheep and deer rumen microbial activity. *Applied Microbiology*, 15(4), 777–84.

Ooi, L. S. M., Li, Y., Kam, S.-L., Wang, H., Wong, E. Y. L., & Ooi, V. E. C. (2006). Antimicrobial Activities of Cinnamon Oil and Cinnamaldehyde from the Chinese Medicinal Herb *Cinnamomum cassia* Blume. *The American Journal of Chinese Medicine*, 34(3), 511–522.

Oussalah, M., Caillet, S., & Lacroix, M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69(5), 1046–55.

Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J. J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J. E., Bravo-Patiño, A., & Baizabal-Aguirre, V. M. (2007). Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection*, 54(4), 399–409.

P

Parlement Européen et Conseil de l'Union Européenne. (2003). *Règlement (CE) n° 1831 relatif aux additifs destinés à l'alimentation des animaux*. (Vol. 4).

Phocas, F., Bobe, J., Bodin, L., Charley, B., Dourmad, J. Y., Friggens, N. C., ... Schelcher, F. (2014). Des animaux plus robustes: Un enjeu majeur pour le développement durable des productions animales nécessitant l'essor du phénotypage fin et à haut débit. *Productions Animales*, 27(3), 181–194.

R

Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops & Products*, 62, 250–264.

Remmal, A., Achahbar, S., Bouddine, L., Chami, N., & Chami, F. (2011). *In vitro* destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. *Veterinary Parasitology*, 182(2–4), 121–6.

Riyazi, S. R., Ebrahimnezhad, Y., Hosseini, S. A., Meimandipour, A., & Ghorbani, A. (2015). The effects of the antibiotic avilamycin, the probiotic protexin, and basil essential oil supplements on ileal bacteria of broiler chickens. *Veterinary Science Development*, 2–12.

Rochfort, S., Parker, A. J., & Dunshea, F. R. (2008). Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*, 69(2), 299–322.

Ryschawy, J., Tichit, M., Bertrand, S., Allaire, G., Plantureux, S., Aznar, O., ... Disenhaus, C. (2015). Comment évaluer les services rendus par l'élevage? Une première approche méthodologique sur le cas de la France. *INRA Productions Animales*, 28(1), 23–38.

S

Sandasi, M., Leonard, C. M., Van Vuuren, S. F., & Viljoen, A. M. (2011). Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms *in vitro*. *South African Journal of Botany*, 77(1), 80–85.

Sandasi, M., Leonard, C. M., & Viljoen, a. M. (2008). The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*, 19(11), 1070–1075.

Sanders, P. (2005). L'antibiorésistance en médecine vétérinaire: enjeux de santé publique et de santé animale. *Bulletin de L'académie Vétérinaire de France*, 158(2).

- Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabih, F., & Sangwan, R. S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, 34(1), 3–21.
- Santos, M. B., Robinson, P. H., Williams, P., & Losa, R. (2010). Effects of addition of an essential oil complex to the diet of lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance. *Animal Feed Science and Technology*, 157(1–2), 64–71.
- Schären, M., Drong, C., Kiri, K., Riede, S., Gardener, M., Meyer, U., ... Dänicke, S. (2017). Differential effects of monensin and a blend of essential oils on rumen microbiota composition of transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(4).
- Schnitzler, P., Koch, C., & Reichling, J. (2007). Susceptibility of drug-resistant clinical herpes simplex virus type 1 strains to essential oils of ginger, thyme, hyssop, and sandalwood. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(5), 1859–1862.
- Schuhmacher A, Reichling J, S. P. (2003). Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 *in vitro*. *Phytomedicine.*, 10(6–7), 504–10.
- Silva, J., Abebe, W., Sousa, S. M., Duarte, V. G., Machado, M. I. L., & Matos, F. J. A. (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(2–3), 277–283.
- Société Française d'Étude et de Traitement de la Douleur(SFETD). (n.d.). Définition de la douleur. Retrieved from <http://www.sfetd-douleur.org/definition>
- Spurlock, M. E. (1997). Regulation of Metabolism and Growth During Immune Challenge: An Overview of Cytokine Function 1. *J. Anim. Sci*, 75, 1773–1783.
- Stelter, K., Frahm, J., Paulsen, J., Berk, A., Kleinwächter, M., Selmar, D., & Dänicke, S. (2013). Effects of oregano on performance and immunomodulating factors in weaned piglets. *Archives of Animal Nutrition*, 67(6), 461–76.
- Swann, M., Baxter, K., & Field, H. (1969). *Report of the Joint Committee on the use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine*. London.
- Szczepanski, S., & Lipski, A. (2014). Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. *Food Control*, 36(1), 224–229.

T

- Takaki, I., Vendruscolo, A., Sartoretto, S. M., Diniz, S. P., & Cuman, R. K. N. (2008). L . Essential Oil in Experimental Animal Models, *11*(4), 741–746.
- Thacker, P. A. (2013). Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *4*(1).
- The poultry site. (n.d.). Alternatives to Antibiotic Growth Promoters in Poultry and Pigs - The Poultry Site. Retrieved February 3, 2018, from <http://www.thepoultrysite.com/articles/3553/alternatives-to-antibiotic-growth-promoters-in-poultry-and-pigs/>
- Tolker-Nielsen, T., & Sternberg, C. (2011). Growing and Analyzing Biofilms in Flow Chambers. In *Current Protocols in Microbiology* (p. 1B.2.1-1B.2.17). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Tsai, M.-L., Lin, C.-C., Lin, W.-C., & Yang, C.-H. (2011). Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils from Five Selected Herbs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *75*(10), 1977–1983.
- Tung, Y.-T., Chua, M.-T., Wang, S.-Y., & Chang, S.-T. (2008). *Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (Cinnamomum osmophloeum) twigs. Bioresource Technology* (Vol. 99).
- Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of Essential Oils: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *12*(1), 40–53.
- Turner, G. W., Gershenzon, J., & Croteau, R. B. (2000). Development of Peltate Glandular Trichomes of Peppermint. *Plant Physiology*, *124*(2), 665–679.

V

- Vendramini, T. H. A., Takiya, C. S., Silva, T. H., Zanferari, F., Rentas, M. F., Bertoni, J. C., ... Rennó, F. P. (2016). Effects of a blend of essentials oils, chitosan or monensin on nutrient intake and digestibility of lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*.
- Vergonjeanne, R. (2015). Sanders distributeur exclusif d'OmniGen-AF. Retrieved February 11, 2018, from <http://www.web-agri.fr/conduite-elevage/alimentation/article/sanders->

distribue-le-complement-alimentaire-americaain-omnigen-af-1172-107576.html

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., & Perez-Alvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils, *19*, 1130–1138.

W

Wallace, R. J. (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society*, *63*(4), 621–629.

Web-Agri. (2014). Mammites - L'impact économique atteint 230€/vache/an. Retrieved from <http://www.web-agri.fr/conduite-elevage/sante-animale/article/l-impact-economique-atteint-230-vache-an-1184-97330.html>

Wegener, H., Aarestrup, F., Jensen, L. B., Hammerum, A., & 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*(3), 329–335.

Y

Yesilbag, D., Eren, M., Agel, H., Kovanlikaya, A., & Balci, F. (2011). Effects of dietary rosemary, rosemary volatile oil and vitamin E on broiler performance, meat quality and serum SOD activity. *British Poultry Science*, *52*(4), 472–482.

Z

Zoetis Fr. (n.d.-a). Les diarrhées néonatales. Retrieved February 4, 2018, from <https://www.zoetis.fr/pathologies/bovins/diarrhees-neonatales.aspx>

Zoetis Fr. (n.d.-b). Les mammites. Retrieved February 4, 2018, from <https://www.zoetis.fr/pathologies/bovins/mammites.aspx>

Zore, G. B., Thakre, A. D., Jadhav, S., Karuppayil, S. M., & Candida, A.-. (2011). Phytomedicine Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *European Journal of Integrative Medicine*, *18*(13), 1181–1190.



Objectifs de l'étude

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM) en collaboration avec l'entreprise BioArmor S.A située à Plaintel, dans les Côtes d'Armor. Le projet EVHELFCAP (EVALUATION des Huiles Essentielles en Complémentation Animale Préventive) sur lequel se base cette collaboration a été financé par la région Bretagne. Ce projet s'inscrit dans la recherche d'alternatives naturelles promue par les plans EcoAntibio 1 et 2 pour la prévention de pathologies des animaux d'élevage. Les produits pour les élevages bovins, porcins et volaillers, cibles des produits de la marque BioArmor, sont principalement visés dans cette étude.

Une grande diversité de microorganismes est à l'origine de pathologies animales. Parmi les stratégies de prévention, l'introduction de compléments alimentaires dans la ration quotidienne permet d'associer différents additifs utiles au bien-être animal, à la santé et à une bonne croissance. Au cours de cette étude, les activités biochimiques et biologiques d'huiles essentielles (HE) et de mélanges d'huiles essentielles sont recherchées à l'aide de tests *in vitro* et de méthodologies innovantes associant la microscopie et l'analyse à haut débit d'images. Plusieurs cibles ont été retenues : lutte contre les microorganismes pathogènes, réduction des espèces chimiques nocives comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (RNS), actions anti-inflammatoires, modulation du système immunitaire, assainissement de l'environnement de l'animal. Les HE préalablement évaluées au cours d'un premier projet, EVHELSENE (EVALUATION des Huiles Essentielles en Santé ANIMALE), rassemblant les deux partenaires ont été sélectionnées. L'intérêt de la réalisation de mélanges tient à cumuler les activités des HE et à élargir le spectre des activités de ceux-ci.

Le premier objectif de l'étude est la recherche de mélanges actifs d'HE par la mesure des activités chimiques et biochimiques des HE constitutives.

Le deuxième objectif est la détermination de mélanges actifs pour prévenir le développement des pathogènes et plus particulièrement la formation de biofilms bactériens qui peuvent conduire à de graves pathologies animales : pathologies respiratoires ou digestives et mammites.

Le troisième objectif est la détermination de la capacité à moduler la réponse inflammatoire de mélanges d'HE et de composés purs les constituant par criblage à haut débit associé à la microscopie à épifluorescence.

Les différents tests retenus, sont présentés dans la figure 1. Les mélanges sont donc sélectionnés en entonnoir par les différentes méthodes, de la plus générale à la plus spécifique à chaque sphère.

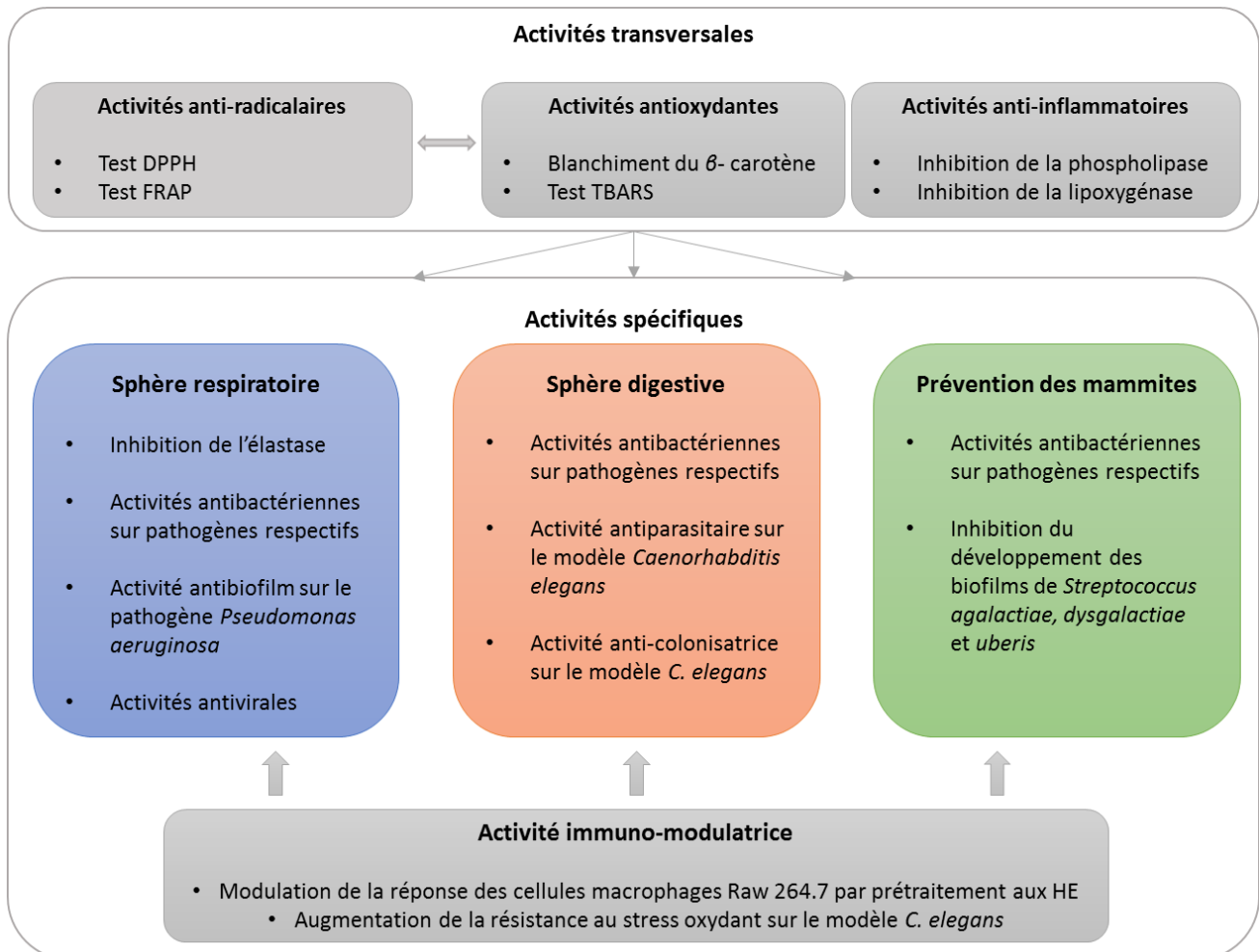


Figure 1 : Schéma résumé des méthodes appliquées à chaque sphère d'étude.

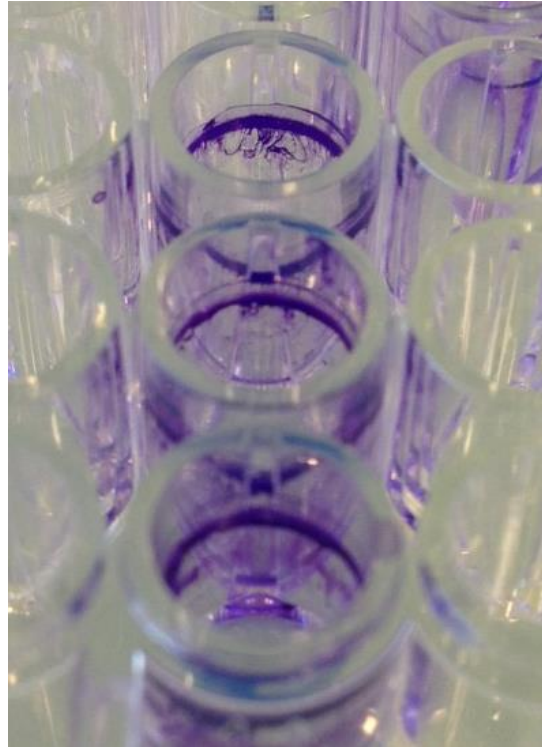
Globalement, les méthodes sélectionnées sont rapides et font appel à des marqueurs également mesurables *in vivo*. Par exemple :

- le test antioxydant TBARS (Thiobarbituric reactive species) met en évidence la capacité des HE à interagir avec les acides gras pour limiter la formation d'espèces réactives tel que le malondialdéhyde lors de l'oxydation. Le malondialdéhyde issu de la dégradation des lipides membranaires est également mesurable *in vivo* par prise de sang sur les animaux.

- les tests antibactériens font appel à des pathogènes isolés d'animaux malades. Dans le cadre des maladies digestives par exemple, la présence de bactéries comme les clostridiiums ou les salmonelles est également mesurable en certains points du système digestif après autopsie.
- dans le cadre de la recherche d'activités immuno-modulatrices, la quantité de macrophages, la sécrétion de NO ou d'interleukines 1 β ou 6 ciblés dans cette étude, est également quantifiable chez l'animal après une prise de sang.

En effet, à l'issue des tests *in vitro* permettant de sélectionner les mélanges candidats les plus efficaces, ceux-ci seront évalués *in vivo* par l'entreprise BioArmor S.A.

Enfin, ce travail de thèse a pour dernier objectif la validation d'un ensemble de tests (représentant une approche méthodologique globale), selon laquelle de nouveaux mélanges pourront être testés afin d'objectiver leurs activités en amont des essais *in vivo*. En effet la comparaison des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*, pourront mettre en évidence des tendances, permettant de sélectionner les méthodes d'analyses les plus révélatrices. L'objectif est d'obtenir une réponse globale en appliquant un nombre limité de tests *in vitro*, afin de restreindre le temps et le coût de développement.



Matériels et méthodes

Liste des figures

Figure 1 : Représentation de la réaction de réduction du DPPH [*] en DPPH-H. (Illustration tirée du site Chimactiv - Agroparistech n.d.)	72
Figure 2 : Courbe d'inhibition du DPPH [*] par le BHA (A) et détermination de la CI ₅₀ par régression linéaire sur la gamme resserrée (B).	73
Figure 3 : Représentation de la réaction de réduction du complexe TPTZ-Fe ³⁺ en TPTZ-Fe ²⁺ prenant place au cours du test FRAP (Pérez-Cruz <i>et al.</i> 2017).....	74
Figure 4 : Droite d'étalonnage du test FRAP réalisée à partir d'une solution de concentration en Fe(II) connue.	75
Figure 5 : Dégradation du β -carotène par les peroxydes d'acide linoléique, provoquant sa décoloration (Ege University 2018).	75
Figure 6 : Formation du chromophore rose par réaction entre l'acide thiobarbiturique et le malondialdéhyde au cours du test TBARS.	77
Figure 7 : Rôle des enzymes impliquées dans la réponse inflammatoire.....	78
Figure 8 : Schéma représentatif du mécanisme mis en jeu par le test d'inhibition de la sPLA2 (illustration fournie par Cayman chemical).	79
Figure 9 : Oxydation de l'acide linoléique par la 15-lipoxygénase (Christie 2018).....	81
Figure 10 : Transformation du N-méthoxysuccinyl-ala-ala-pro-val-p-nitroanilide en p-nitroaniline par l'élastase au cours du test d'inhibition enzymatique.	83
Figure 11 : Réaction de métabolisation du MTT en formazan par les bactéries métaboliquement actives.	87
Figure 12 : Schéma observé pour la préparation des gammes d'huile essentielle dans le cadre de la détermination des CMI et CMB.	88
Figure 13 : Procédé d'évaluation de l'effet du mélange Abf1 sur l'adhésion de <i>P. aeruginosa</i> sur lames de verre.....	91
Figure 14 : Procédé d'évaluation de l'effet du mélange Abf1 sur le biofilm de <i>P. aeruginosa</i> sur lames de verre.....	92
Figure 15 : Schématisation du système de cellules à flux (flow cells) (Weiss Nielsen <i>et al.</i> 2011).....	93
Figure 16 : Méthode d'encollage des lames de verre sur la cellule à flux (Weiss Nielsen <i>et al.</i> 2011).....	93

Figure 17 : Cycles de température observés par le thermocycleur au cours de l'étape de qRT-PCR	99
Figure 18 : Organisation de la microplaque observée pour la réalisation du titrage de VHS-1.	104
Figure 19 : Observation de <i>Caenorhabditis elegans</i> réalisée en microscopie à épifluorescence après marquage des noyaux au DAPI.	107
Figure 20 : Cycle de développement du nématode <i>Caenorhabditis elegans</i> (Wormbase). ...	107
Figure 21 : Schéma du plan de plaque utilisé pour l'évaluation de la cytotoxicité des HE sur les cellules RAW 264.7	107
Figure 22 : Schéma du principe de marquage par la sonde pHrodo ("pHrodo Red E. Coli BioParticles Conjugate for Phagocytosis - Thermo Fisher Scientific" 2018).....	107

Liste des tableaux

Tableau 1 : Plantes et parties de plantes utilisées pour la production des huiles essentielles étudiées.....	67
Tableau 2 : Composition des huiles essentielles déterminée par chromatographie en phase gazeuse et exprimée en pourcents (%).	68
Tableau 3 : Composition des mélanges d'huiles essentielles utilisés au cours du projet EVHELCAP.	70
Tableau 4 : Diagramme représentant la composition des mélanges d'huiles essentielles utilisés au cours du projet EVHELCAP.	71
Tableau 5 : Liste des bactéries étudiées au cours du projet EVHELCAP.....	86
Tableau 6 : Séquences et température d'hybridation des amorces utilisées au cours de l'étape de qRT-PCR.	99
Tableau 7 : Exemple de calcul du facteur d utilisé pour le calcul du titre infectieux de VHS-1 selon la méthode des dilutions limites.....	106

1 Huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) utilisées au cours de ces travaux ont été fournies par les laboratoires Herbarom, situés à Aouste-sur-Sye en France. Les noms vernaculaires et scientifiques des plantes, ainsi que les parties de plantes utilisées pour la production des huiles essentielles sont présentés dans le Tableau 1. Les noms vernaculaires des plantes d'origine seront préférentiellement utilisés pour évoquer les HE par la suite.

Ces HE ont été obtenues par hydrodistillation ou par expression des péricarpes dans le cas de l'HE de citron. Leur composition¹, décrite dans le Tableau 2, est obtenue par chromatographie en phase gazeuse et renseignée par les laboratoires Herbarom dans le cadre de bulletins d'analyses. Ces HE sont sélectionnées pour leur présence sur la liste positive des HE utilisables en complémentation animale, en tenant compte des résultats obtenus au cours du projet EVHEL SAN.

Ces huiles essentielles satisfont plusieurs critères :

- Productions abondantes et approvisionnement sécurisé
- Qualité des extraits et reproductibilité
- Coût maîtrisé
- Activités biologiques documentées
- Évaluation des activités ciblées dans le cadre d'un pré-projet intitulé EVHEL SANE

¹ Seuls les composés représentant plus de 2% d'au moins une huile essentielle sont représentés dans le Tableau 2.

Tableau 1 : Plantes et parties de plantes utilisées pour la production des huiles essentielles étudiées

Nom vernaculaire	Nom scientifique	Partie de plante utilisée
Ail	<i>Allium sativum</i> L., 1753	Gousses
Cannelle	<i>Cinnamomum cassia</i> J. Presl, 1825	Feuilles et rameaux
Citron	<i>Citrus ×limon</i> (L.) Burm. f., 1768	Péricarpes
Eucalyptus	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill., 1800	Feuilles et tiges
Girofle	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L. M. Perry, 1939	Feuilles
Menthe poivrée	<i>Mentha ×piperita</i> L., 1753	Sommités fleuries
Niaouli	<i>Melaleuca quinquenervia</i> (Cav.) S. T. Blake, 1958	Feuilles
Origan	<i>Origanum vulgare</i> L., 1753	Plantes entières
Sarriette	<i>Satureja hortensis</i> L., 1753	Sommités fleuries
Tea tree	<i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden & Betche (en)) Cheel, 1924	Feuilles et tiges
Thym rouge	<i>Thymus zygis</i> L., 1753	Sommités fleuries

Tableau 2 : Composition des huiles essentielles déterminée par chromatographie en phase gazeuse et exprimée en pourcents (%).

	Eucalyptol	Carvacrol	d-Limonene	Eugenol	Cinnamaldehyde	γ -Terpinene	Diallyl disulfure	Thymol	4-Terpinenol	p-Cymene	Menthol	β -caryophyllene	(DL)-Menthone	β -Pinene	α -Pinene	α -Terpinene	α -Terpineol	Diallyl trisulfure	Linalool	o-Methoxycinnamaldehyde	Diallyl sulfure	Propene	Methyl acetate	Myrcene	(+/-)-Isomenthone	Viridiflorol	Terpinolene	(D)-Neomenthol	Citral	Cinnamyl acetate	Menthofuran	Diallyl tetrasulfure	
Ail						53,5											9,4			6,9	6,8											2,1	
Cannelle					80,0															8,0										2,5			
Citron			64,5			9,8				0,6				13,5	2,3	0,2	0,2										0,4		2,6				
Eucalyptus	83,2		4,8			4,6				2,6				1,4	1,2	0,3											0,2						
Girofle				80,5								15,2																					
Menthe poivrée			3,2								32,5	3,8	26,3	1,6	1,0								5,0		4,1			3,2			2,4		
Niaouli	60,6		7,4			1,7				1,2		1,1		2,1	8,4		5,1		0,2						0,7	3,2							
Origan	1,4	70,7	1,7			5,0		2,1		3,7		3,6		1,2		0,6	0,8		3,0														
Sarriette		47,4				27,4		1,6		11,6		1,6				2,1			1,0					2,0									
Tea tree	2,1		1,9			22,7			41,5	1,7				0,4	2,7	10,3	4,6									0,6	3,2						
Thym rouge		3,4	0,5			6,1		48,3		19,7		1,6			1,2	1,5			5,0					1,5									

2 Mélanges d'huiles essentielles

Au cours de ce projet, quinze mélanges ont été étudiés pour leurs différentes activités biologiques. Les formules ont été réalisées d'après les résultats obtenus au cours du projet EVHELSEANE, les connaissances empiriques et les données de la bibliographie concernant leurs activités connues. Les mélanges sont construits de manière à contenir au moins une HE fortement anti-radicalaire et/ou antibactérienne (girofle, origan, thym, sarriette), une HE connue pour son appétence par BioArmor SA (citron ou menthe) et une HE qui dirige le mélange vers une sphère (par exemple la cannelle vers la sphère digestive, l'eucalyptus vers la sphère respiratoire ou le tea tree, potentiellement antiviral, pour la mammite (Fernandez & Chemat, 2012)).

Les mélanges, dont les compositions sont présentées dans le Tableau 3, sont constitués de trois ou quatre HE. Les HE sont présentes en proportions égales, sauf indications contraires (mélanges Dig3 et Dig4). Par la suite, chaque mélange sera cité par son code respectif, indiquant sa sphère d'action (par exemple « Dig » pour la sphère digestive) et le numéro du mélange.

La sphère immunitaire étant imbriquée dans les autres sphères, aucun mélange spécifique n'a été développé. Les mélanges prometteurs observés dans les autres sphères ont été sélectionnés et évalués pour leurs activités immuno-modulatrices. Par ailleurs, le mélange antibiofilm Abf1, développé au cours du projet EVHELSEANE, a également été conservé afin d'évaluer son activité sur le modèle de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* PA01.

Après réalisation, les mélanges sont conservés dans des flacons étanches, à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Tableau 3 : Composition des mélanges d'huiles essentielles utilisés au cours du projet EVHELCAP.

Sphère d'activité	Code	HE1	HE2	HE3	HE4
Respiratoire	Resp1	Citron	Girofle	Origan	Thym
	Resp2	Citron	Girofle	Origan	Eucalyptus
	Resp3	Niaouli	Girofle	Eucalyptus	Thym
	Resp4	Cannelle	Menthe	Eucalyptus	
	Resp5	Girofle	Thym	Eucalyptus	
Digestive	Dig1	Citron	Cannelle	Girofle	Origan
	Dig2	Citron	Menthe	Girofle	Origan
	Dig3	Origan (5/7 ^e)	Cannelle (1/7 ^e)	Girofle (1/7 ^e)	
	Dig4	Origan (3/6 ^e)	Cannelle (1/6 ^e)	Girofle (1/6 ^e)	Citron (1/6 ^e)
Mammite	Mam1	Cannelle	Tea tree	Origan	
	Mam2	Cannelle	Tea tree	Citron	Sarriette
	Mam3	Cannelle	Tea tree	Citron	Girofle
	Mam4	Thym	Tea tree	Origan	
	Mam5	Cannelle	Tea tree	Origan	Girofle
Antibiofilm	Abf1	Cannelle	Ail	Menthe	

Les mélanges appartenant à une même sphère sont construits de manière à avoir une ou plusieurs HE communes. L'objectif est de pouvoir observer l'effet de la modification d'une HE sur l'activité du mélange, afin de prévoir d'éventuels synergies ou antagonismes. Le Tableau 4 permet de rendre compte de la composition commune et des divergences entre mélanges, de manière visuelle.

Tableau 4 : Diagramme représentant la composition des mélanges d'huiles essentielles utilisés au cours du projet EVHELCAP.

	Ail	Cannelle	Citron	Eucalyptus	Girofle	Menthe poivrée	Niaouli	Origan	Sarriette	Tea tree	Thym rouge
Resp1											
Resp2											
Resp3											
Resp4											
Resp5											
Dig1											
Dig2											
Dig3											
Dig4											
Mam1											
Mam2											
Mam3											
Mam4											
Mam5											
Abf1											

3 Mesure de l'activité anti-radicalaire et antioxydante des huiles essentielles et des mélanges

Les radicaux libres sont des entités chimiques présentant un électron non apparié, dont la présence en excès dans l'organisme est généralement liée à une pathologie. Cet excès est susceptible d'engendrer des réactions d'oxydations délétères. Une molécule à activité anti-radicalaire va donc traiter la cause, alors qu'une molécule antioxydante prévient l'apparition des effets délétères. Pour observer une réponse globale, plusieurs mesures sont donc à effectuer. Les essais proposés ici reposent soit sur une réduction de radicaux libres présents en solution (effet anti-radicalaire), soit sur l'inhibition de la peroxydation d'acides gras (effet antioxydant).

3.1 Essais liés à la réduction de radicaux libres

Les deux méthodes présentées ci-dessous font appel à deux mécanismes distincts. La méthode d'inhibition du DPPH[•] repose sur un transfert d'hydrogène, alors que la méthode « Ferric Reducing Antioxydant Power » (FRAP) repose sur le transfert d'électrons.

3.1.1 Capacité de capture des radicaux libres du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

La méthode DPPH^{*} est généralement la plus utilisée pour décrire les activités anti-radicalaires des HE. Le test effectué en microplaque a été adapté à partir du protocole présenté par Bedoux *et al.* (2011). Simple de mise en œuvre, peu couteuse et très sensible, la méthode repose sur la capacité d'un échantillon à réduire les radicaux du 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH^{*}). Sous sa forme radicalaire, le DPPH^{*} présente une couleur violette avec un maximum d'absorption de 517 nm. En présence d'anti-radicalaires, le DPPH^{*} est réduit en DPPH-H et sa couleur vire au jaune de manière dose dépendante comme illustré dans la Figure 1. La baisse d'absorbance à la longueur d'onde de 517nm peut donc être suivie par spectrophotométrie.

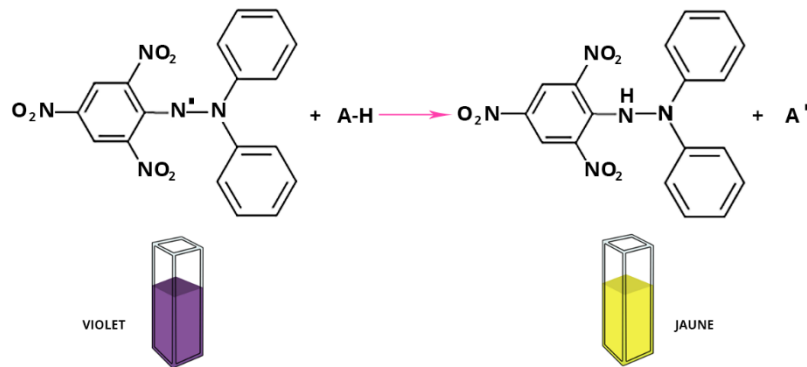


Figure 1 : Représentation de la réaction de réduction du DPPH^{*} en DPPH-H. (Illustration tirée du site Chimactiv - Agroparistech n.d.)

Pour cette mesure, les HE ou les mélanges sont solubilisés dans du méthanol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis d'Amérique) et dilués à des concentrations permettant d'encadrer la concentration entraînant une inhibition du DPPH^{*} de 50% (CI₅₀). Pour cela une première gamme de concentrations large est réalisée. Une seconde gamme resserrée autour de la CI₅₀ est ensuite testée pour chaque HE ou mélange. L'analyse est validée par utilisation d'une gamme d'hydroxyanisole butylé (BHA, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis d'Amérique), un antioxydant de référence testé à des concentrations finales de 1 à 12,5 µg/ml.

Concrètement, 100 µL de chaque dilution d'échantillon sont déposés dans les puits d'une microplaques 96 puits (Greiner Bio-one, Kremsmunster, Autriche). Cette étape est réalisée sur de la glace afin de prévenir l'évaporation du méthanol au cours de la préparation. A t=0 min, 100 µL d'une solution de DPPH^{*} (Sigma Aldrich, St Louis, MO, États-Unis d'Amérique) à 0,25 mM dans du méthanol sont ajoutés dans chaque puits. La microplaque est

alors incubée pendant 30 min à 40°C et à l'obscurité, afin d'accélérer la réaction. Un témoin négatif ne contenant que 100 µl de méthanol et 100 µl de la solution de DPPH[•] est également réalisé. Le blanc est effectué sur un puit contenant 200 µL de méthanol. À l'issue des 30 min. d'incubation, l'absorbance est mesurée pour tous les puits à 517 nm. L'expérience est réalisée en trois réplicas indépendants.

Après soustraction de la valeur du blanc, le pourcentage d'inhibition est calculé par l'équation :

$$I(\%) = \frac{A_{\text{témoin}} - A_{\text{essais}}}{A_{\text{témoin}}} \times 100$$

Où $A_{\text{témoin}}$ est la valeur d'absorbance corrigée obtenue pour le témoin négatif et A_{essais} la valeur d'absorbance corrigée obtenue pour les différentes concentrations d'échantillon.

La droite $I(\%) = f(\text{concentration de l'échantillon})$ est alors tracée pour chaque échantillon, permettant de calculer la CI_{50} par régression linéaire. La Figure 2 représente la courbe d'inhibition obtenue pour la gamme de BHA, seule la partie linéaire étant utilisée pour le calcul de la CI_{50} . Par calcul, on obtient une CI_{50} de 3,68 µg/ml.

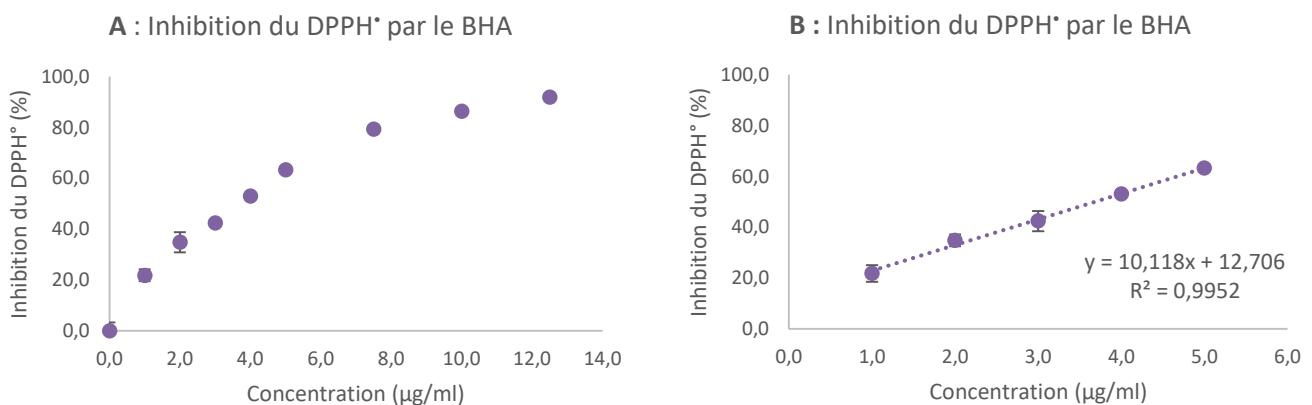


Figure 2 : Courbe d'inhibition du DPPH[•] par le BHA (A) et détermination de la CI_{50} par régression linéaire sur la gamme resserrée (B).

3.1.2 Méthode « Ferric Reducing Antioxydant Power » (FRAP)

Le test FRAP repose sur le transfert d'électrons entre un antioxydant et le Fe^{3+} , permettant sa réduction en Fe^{2+} . Le 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) est utilisé ici comme révélateur. En effet en conditions acides, le complexe TPTZ- Fe^{2+} développe une coloration

bleue intense ayant un maximum d'absorption à 593 nm. La réduction dose dépendante du Fe^{3+} en Fe^{2+} par les antioxydants, présentée en Figure 3, peut donc être suivie par spectrophotométrie.

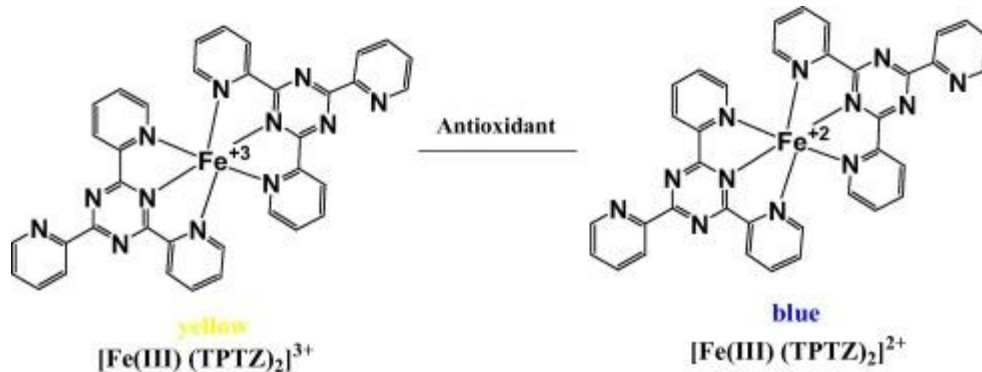


Figure 3 : Représentation de la réaction de réduction du complexe TPTZ-Fe^{3+} en TPTZ-Fe^{2+} prenant place au cours du test FRAP (Pérez-Cruz et al., 2017).

Pour cette technique adaptée en microplaque (Shahwar, Raza, Bukhari, & Bukhari, 2012), un réactif FRAP est réalisé à partir de tampon acétate à 300 mM et pH 3,6, d'une solution de TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine, Sigma Aldrich) à 10 mM dans de l'HCl à 40 mM (Thermo Fisher Scientific) et d'une solution de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ à 20 mM (Sigma Aldrich). Ces différentes solutions sont respectivement mélangées extemporanément dans les proportions 10 : 1 : 1. Les HE sont diluées dans du DMSO (Thermo Fisher Scientific) à des concentrations de 1,0 et 0,1 mg/ml. Une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich) à des concentrations de 0 à 200 μM en Fe(II) . Pour le témoin positif, une gamme d'acide ascorbique (Thermo Fisher Scientific) est réalisée dans le DMSO et testée à des concentrations finales de 0 à 25 $\mu\text{g/ml}$. Un blanc ne contenant que du DMSO est également réalisé. Les échantillons dilués sont déposés dans les puits d'une microplaque à hauteur de 50 μl , puis 150 μl du réactif FRAP sont ajoutés à $t=0$ min. Après 15 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est lue à une longueur d'onde de 593 nm.

Les résultats exprimés en équivalent Fe(II) obtenus pour chaque échantillon sont ensuite calculés à partir de la droite étalon présentée en Figure 4, d'équation Absorbance = f (Concentration en Fe(II)). À nouveau, l'expérience est réalisée en trois réplicas indépendants.

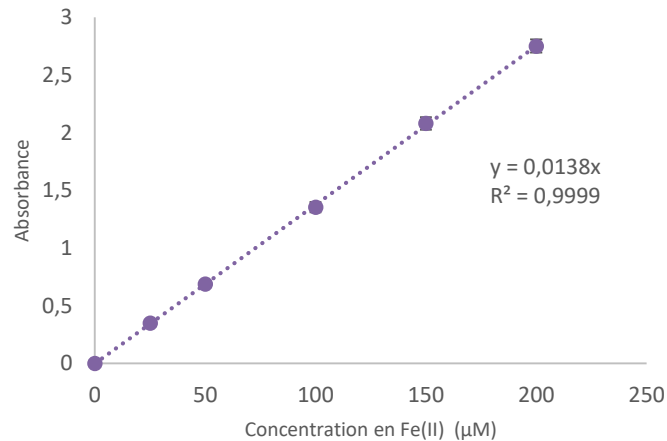


Figure 4 : Droite d'étalonnage du test FRAP réalisée à partir d'une solution de concentration en Fe(II) connue.

3.2 Essais liés à la peroxydation des acides gras

Par rapport aux deux méthodes précédentes les essais liés à la peroxydation des acides gras utilisent des substrats naturellement présents dans les organismes. Par ailleurs, la réaction d'oxydation des acides gras prend également place dans les organismes, notamment lors de la réaction inflammatoire.

3.2.1 Méthode d'inhibition de blanchiment du β -carotène

Cette méthode fait appel à la capacité des HE à capturer les radicaux formés lors de la peroxydation de l'acide linoléique présent en solution. Ces radicaux, produits lors du chauffage des émulsions, viennent normalement attaquer le β -carotène en solution comme l'illustre la Figure 5, provoquant la perte de sa double liaison et donc de sa coloration orange.

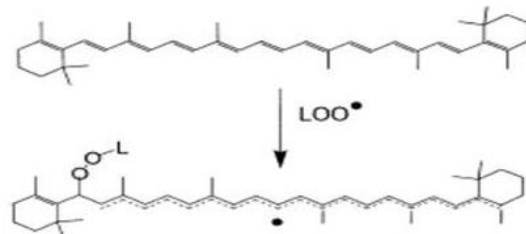


Figure 5 : Dégradation du β -carotène par les peroxydes d'acide linoléique, provoquant sa décoloration (Ege University, n.d.).

La présence d'un antioxydant va permettre la capture des radicaux et donc limiter le blanchiment du β -carotène. Le β -carotène ayant un maximum d'absorption à 470 nm, la

réaction de blanchiment peut être suivie par spectrophotométrie. Le protocole utilisé ici est adapté des travaux de Zaouali *et al.* (2010).

Concrètement pour ce test, deux émulsions A et B ont été utilisées. L'émulsion A est réalisée à partir de 200 µl d'une solution de β -carotène à 1 mg/ml dans du chloroforme, 20 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween80 (Sigma Aldrich). Après évaporation du chloroforme, 50 ml d'eau distillée préalablement aérée sous bulleur d'oxygène sont ajoutés. L'émulsion est ensuite formée par un traitement aux ultrasons pendant une minute. L'émulsion B, qui permet de constituer le blanc, est formée de la même manière mais ne contient pas de β -carotène (l'étape d'évaporation du chloroforme n'est donc pas réalisée). Les solutions d'HE, de mélanges d'HE et de BHA sont réalisées dans de l'éthanol aux concentrations de 10, 1 et 0,1 mg/ml.

À t=0 min, dans des tubes en verre, 200 µl de chaque solution à tester sont mis en contact avec 3,8 ml d'émulsion A. Le blanc est constitué de 200 µl d'éthanol et de 3,8 ml d'émulsion B. L'ensemble des tubes est fortement vortexé et une première mesure d'absorbance à 470 nm est réalisée immédiatement. Les tubes sont alors placés au bain-marie à 50°C pendant 60 min, avant de réaliser une seconde lecture d'absorbance à 470 nm. Pour chaque concentration d'échantillon, trois répliques indépendants sont réalisés.

Le pourcentage d'inhibition du blanchiment est calculé pour chaque échantillon à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_a(60) - A_c(60)}{A_c(0) - A_c(60)} \times 100$$

Où $A_a(60)$ est l'absorbance obtenue avec l'antioxydant à t=60 min, $A_c(60)$ l'absorbance du témoin négatif à t=60min, and $A_c(0)$ l'absorbance du témoin négatif à t=0 min.

3.2.2 Par la méthode « Thiobarbituric acid reactive species » (TBARS)

Cette méthode permet le dosage du malondialdéhyde (MDA), un produit secondaire de la peroxydation des lipides, dont la formation peut être inhibée en présence d'antioxydant. Ce composé a la capacité de produire en conditions acides un adduit de couleur rose avec l'acide thiobarbiturique (Figure 6). Ce chromophore ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 532 nm, la réaction peut être suivie par spectrophotométrie.

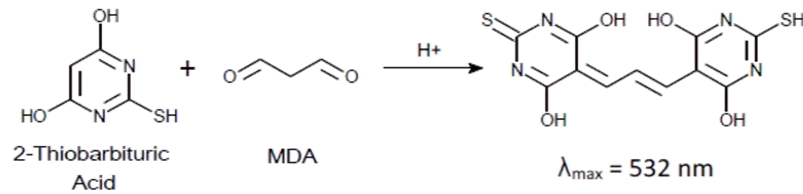


Figure 6 : Formation du chromophore rose par réaction entre l'acide thiobarbiturique et le malondialdéhyde au cours du test TBARS.

Cette méthode est intéressante du fait qu'elle utilise une source d'acides gras naturelle, le jaune d'œuf et qu'elle dose les MDA qui sont également des marqueurs biologiques du statut oxydatif des animaux. Elle reste toutefois peu spécifique car d'autres produits de dégradations comme les acides aminés (Miguel, 2010), mais également l'HE de cannelle, sont capables de réagir avec l'acide thiobarbiturique. Pour cette raison, les mesures effectuées ici ont été limitées aux mélanges ne contenant pas d'HE de cannelle. Le protocole utilisé ici a été adapté des travaux de Kulisic *et al.* (2004).

Le jaune d'œuf utilisé comme source de lipides pour cet essai est dilué à une concentration de 10% (m/v) dans de l'eau distillée. Pour chaque échantillon, trois solutions de concentrations 5, 20 et 50 mg/ml sont réalisées dans le méthanol et le BHA est utilisé comme témoin positif. Un blanc constitué uniquement de méthanol est également réalisé en parallèle.

Dans des tubes en verre, 500 μl de la solution de lipides sont mélangés à 100 μl des solutions d'antioxydant à tester. Le mélange est alors vortexé puis complété à 1ml avec de l'eau distillée. Pour initier la formation de radicaux libres, 50 μl d'une solution de 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP, Sigma Aldrich) à 0,07 M dans de l'eau sont ajoutés. Les tubes sont complétés avec 1,5 ml d'une solution d'acide acétique à 20% (v/v, Sigma Aldrich) et 1,5 ml d'une solution d'acide thiobarbiturique réalisée à 0,8% (m/v, Sigma Aldrich) dans de l'eau distillée contenant 1,1% de sodium dodecyl sulfate (SDS, Thermo Fisher Scientific). Les tubes sont placés pendant 60 min dans un bain-marie à 95°C. Après incubation et refroidissement des tubes, 5 ml de butan-1-ol (Thermo Fisher Scientific) sont ajoutés aux mélanges. Les tubes sont à nouveau vortexés fortement avant de subir une centrifugation de 10 min à 1200g. La lecture d'absorbance est ensuite réalisée sur le surnageant, à une longueur d'onde de 532 nm.

Chaque dilution est analysée en trois répliques indépendants. L'activité inhibitrice, exprimée en pourcent est calculée grâce à la formule suivante

$$AI\% = \frac{1 - A_a}{A_c} \times 100$$

où A_a est l'absorbance obtenue avec l'antioxydant et A_c l'absorbance obtenue pour le tube contrôle ne contenant que du méthanol.

4 Mesure d'inhibition des activités enzymatiques par les huiles essentielles et les mélanges

4.1 Inhibition des enzymes impliquées dans la réponse inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire d'un échantillon peut être évaluée *in vitro* par la capacité à inhiber les enzymes impliquées dans la réponse inflammatoire. Trois enzymes impliquées dans la dégradation des acides gras en médiateurs de l'inflammation sont majoritairement étudiées et présentées dans la Figure 7. En effet la phospholipase A2 (PLA2) est capable en réponse à différents stimulus inflammatoires, de dégrader les phospholipides membranaires en acide arachidonique. Cet acide arachidonique est ensuite potentiellement dégradé en

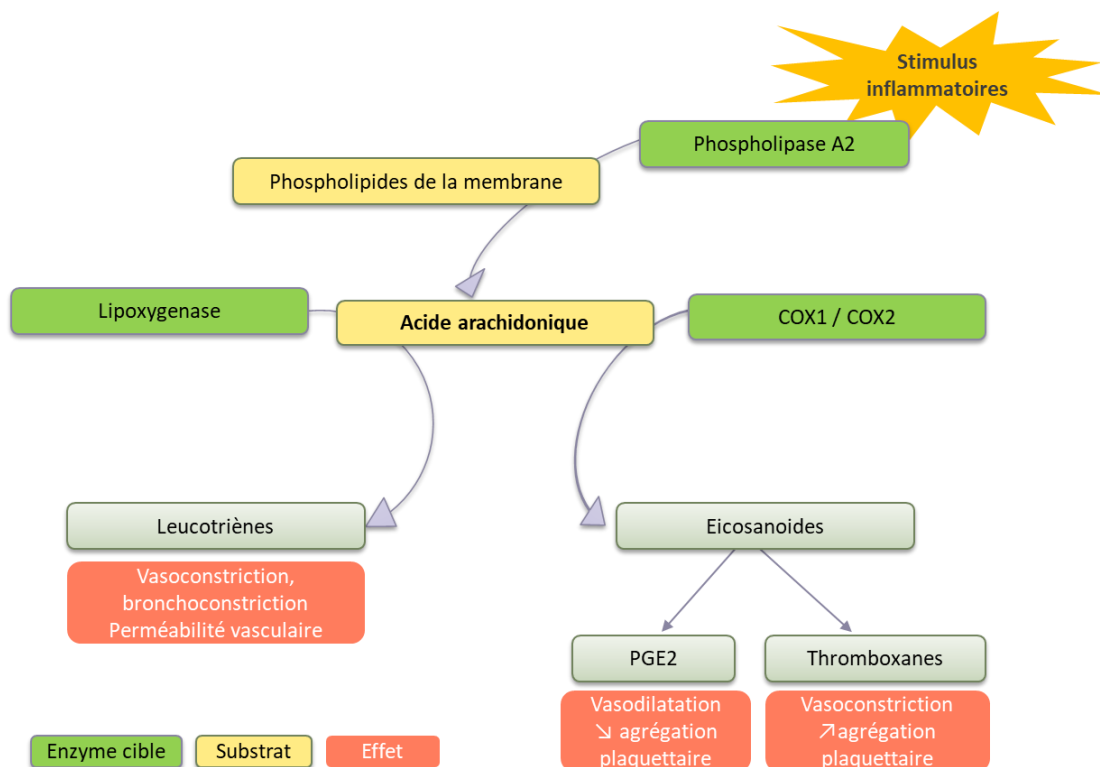


Figure 7 : Rôle des enzymes impliquées dans la réponse inflammatoire.

leucotriènes et eicosanoïdes servant de messagers, par la lipoxygénase (LOX) et les cyclooxygénases (COX) 1 et 2 (Miguel, 2010).

Pour ces travaux, la PLA₂, présente en amont de la chaîne réactionnelle et la LOX ont été sélectionnées. Ces deux enzymes ont été choisies car elles fonctionnent selon des mécanismes distincts, la première réalisant une hydrolyse des acides gras et la seconde réalisant une oxydation.

4.1.1 Mesure d'inhibition de la phospholipase A₂

La phospholipase A₂ est une enzyme capable d'hydrolyser les phospholipides sur leur position *sn*-2, générant un acide gras et un lysophospholipide. La PLA₂ sécrétrice (sPLA₂) de type V utilisée ici, est impliquée dans la production d'eicosanoïdes par les cellules inflammatoires tels que les macrophages ou les mastocytes.

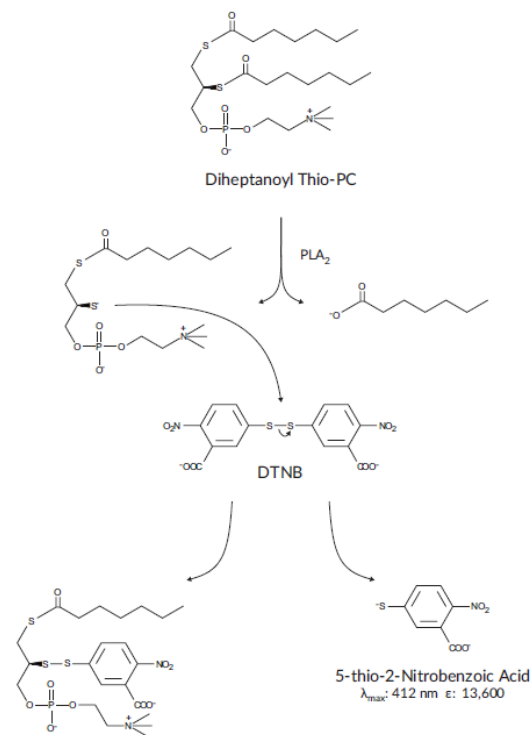


Figure 8 : Schéma représentatif du mécanisme mis en jeu par le test d'inhibition de la sPLA₂ (illustration fournie par Cayman chemical).

L'inhibition de l'activité de la sPLA₂ est étudiée ici grâce à un kit commercialisé par Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, États-Unis d'Amérique). La mesure repose sur le fait que

la sPLA2 est capable d'utiliser la phosphatidylcholine (PC) comme substrat. L'analogue 1,2-dithio de la diheptanoyl phosphatidylcholine est utilisé ici, comme l'illustre la Figure 8. Lors de son hydrolyse en position *sn*-2 par la sPLA2, des fonctions thiols sont libérées et détectées de manière dose dépendante par le 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). L'acide 5-thio-2-nitrobenzoic ainsi produit possède un maximum d'absorption à la longueur d'onde de 412 nm, ce qui permet de suivre la réaction par spectrophotométrie.

Pour cette manipulation, seuls les mélanges les plus intéressants ont été évalués, ainsi que les HE les composant. Dans un premier temps, les différentes solutions procurées par le fabricant sont reconstituées et conservées sur glace :

- Tampon de travail : tampon Tris-HCl à 25 mM et à pH 7.5, contenant 10 mM de CaCl, 100 mM de KCl, 0,3 mM de Triton X-100
- Solution de substrat : 1.66 mM de Diheptanoyl Thio-PC dilué dans le tampon de travail
- Solution d'inhibiteur : Thioéthéramide-PC à 2,3 mM dans l'éthanol
- Solution de DTNB à 10 mM, réalisée dans un tampon Tris-HCl à 0,4 M et de pH 8,0
- Solution enzymatique de composition inconnue

Les mélanges et HE sont testés aux concentrations finales de 100 et 10 µg/ml. Pour cela, des solutions mères sont réalisées dans l'éthanol, un solvant indiqué comme n'impliquant pas d'inhibition de l'enzyme par le fabricant.

Dans un premier temps, 200 µl de solution de substrat sont déposés dans l'ensemble des puits. Les échantillons à tester sont ensuite ajoutés à hauteur de 10 µl. Pour le témoin négatif correspondant aux 100% d'activité de l'enzyme, 10 µl d'éthanol purs sont ajoutés à la place de l'échantillon. Un témoin positif est également réalisé avec 10 µl de la solution de Thioéthéramide-PC. La solution d'enzyme est ensuite ajoutée dans l'ensemble des puits à hauteur de 10 µl. Un blanc est réalisé en parallèle en mélangeant 200 µl de substrat, 10 µl d'éthanol et 10 µl de tampon de travail. La réaction est initialisée à $t = 0$ min par l'ajout de 10 µl de la solution de DTNB.

L'absorbance est mesurée toutes les minutes pendant 15 min, alors que la plaque est incubée à 25°C. Les droites d'équation Absorbance = f (temps) sont tracées pour chaque échantillon. Les pentes obtenues sont comparées à celle de la droite correspondant à l'activité

maximale de l'enzyme, ce qui permet de déterminer le pourcentage d'inhibition obtenu. Trois réplicas sont réalisés pour chaque échantillon.

$$I(\%) = \frac{A_{\text{témoin}} - A_{\text{essais}}}{A_{\text{témoin}}} \times 100$$

Où $A_{\text{témoin}}$ est la pente obtenue pour le témoin négatif et A_{essais} est obtenue pour les différents échantillons.

4.1.2 Mesure d'inhibition de la 15-lipoxygénase

La lipoxygénase est une enzyme catalysant l'oxydation de l'acide arachidonique en leucotriènes, des messagers de la réponse inflammatoire. La mesure d'inhibition enzymatique réalisée ici repose sur la capacité de la 15-lipoxygénase extraite du soja (Sigma Aldrich) à utiliser l'acide linoléique comme substrat et à le transformer en hydroperoxyde, comme présenté dans la Figure 9. Ces composés absorbent à une longueur d'onde de 234 nm, ce qui permet de réaliser un suivi de l'activité enzymatique par spectrophotométrie.

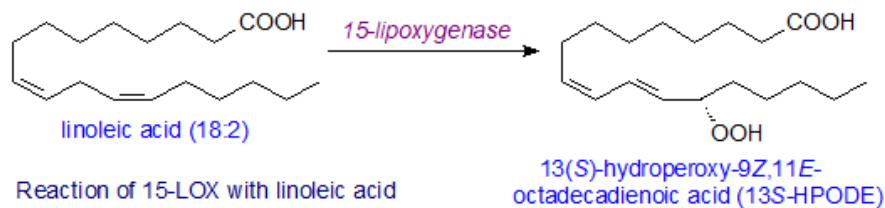


Figure 9 : Oxydation de l'acide linoléique par la 15-lipoxygénase (Christie, 2018).

Pour cette mesure les HE et mélanges sont dilués dans des gammes de concentrations permettant d'encadrer la CI_{50} . Pour se faire, cinq points de gamme sont utilisés par échantillon et les HE et mélanges sont solubilisés dans le méthanol, un solvant n'inhibant pas l'activité de la 15-lipoxygénase. La réaction est réalisée dans une microplaque en quartz (Thermo Fisher Scientific), n'absorbant pas dans les UV. Dans un premier temps, une solution d'enzyme à 280 U/ml est préparée dans un tampon borate à 0,2 M et pH 9 (Thermo Fisher Scientific) et 180 μ l de cette solution sont déposés dans l'ensemble des puits. La microplaque est conservée sur la glace pour limiter la dégradation de l'enzyme pendant la préparation.

Les échantillons convenablement dilués sont ajoutés dans les puits à hauteur de 10 μ l. Un témoin négatif correspondant au 100% d'activité de l'enzyme est préparé en utilisant 10 μ l de méthanol à la place de l'inhibiteur. Un témoin positif est également réalisé en ajoutant 10 μ l d'un inhibiteur connu, l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA, Sigma Aldrich), testé aux

concentrations finales de 50 à 500 µM. En parallèle, un blanc constitué de 180 µl de tampon borate et 10 µl d'éthanol est réalisé.

Une fois l'ensemble des échantillons déposé, la microplaque est conservée 5 min à température ambiante pour permettre le contact entre enzymes et inhibiteurs. A t = 0 min, 10 µl d'une solution d'acide linoléique à 1mM (Sigma Aldrich) réalisée dans de l'eau distillée à 10% d'éthanol, sont ajoutés dans l'ensemble des puits.

Une première lecture d'absorbance à 234 nm est réalisée immédiatement après ajout du substrat (t = 0 min). Après 10 min d'incubation à 25°C, une seconde lecture d'absorbance est réalisée. Pour chaque échantillon, la différence entre les absorbances à t = 10 min et à t = 0 min est réalisée afin d'obtenir une différence d'absorbance (ΔAbs), correspondant à la production d'oxydes d'acides gras. L'inhibition de l'activité enzymatique est ensuite calculée pour chaque concentration d'inhibiteur grâce à l'équation suivante :

$$I(\%) = \left(\frac{\Delta\text{Abs}_{\text{témoin } 100\%} - \Delta\text{Abs}_{\text{essais}}}{\Delta\text{Abs}_{\text{témoin } 100\%}} \right) \times 100$$

où $\Delta\text{Abs}_{\text{témoin } 100\%}$ est le ΔAbs obtenus pour l'enzyme en présence de MeOH et $\Delta\text{Abs}_{\text{essais}}$ le ΔAbs obtenus pour l'enzyme en présence d'inhibiteur. La CI_{50} de chaque inhibiteur est alors calculée à partir de la droite d'équation $I(\%) = f(\text{Concentration})$. Par ailleurs pour cette mesure, trois réplicas indépendants ont été effectués.

4.2 Evaluation de l'inhibition de l'élastase par les huiles essentielles et les mélanges

L'élastase est une protéase naturellement produite par l'organisme au niveau du pancréas et sécrétée par les cellules neutrophiles en cas d'infection bactérienne. Son rôle est alors de dégrader l'élastine présente dans la paroi externe des bactéries afin de les détruire. Présente en excès, l'élastase, dont l'action est aspécifique peut également provoquer des détériorations protéolytiques au niveau des tissus de l'hôte, mais également cliver certaines immunoglobulines et protéines du complément. Cela résulte en une diminution de la capacité des neutrophiles à réaliser la phagocytose.

L'élastase a donc également un rôle dans l'immunité des animaux et dans l'apparition de certaines pathologies dont l'emphysème. La mesure d'inhibition de l'élastase repose sur la capacité de l'enzyme à transformer son substrat, le N-methoxysuccinyl-ala-ala-pro-val-p-

nitroanilide, en p-nitroaniline, comme l'illustre la Figure 10. Ce composé ayant un maximum d'absorption à 410 nm, la réaction enzymatique peut être suivie par spectrophotométrie. Le protocole utilisé ici a été adapté de travaux antérieurs (Mori, Ikeda, Kato, Minamino, & Watabe, 2002).

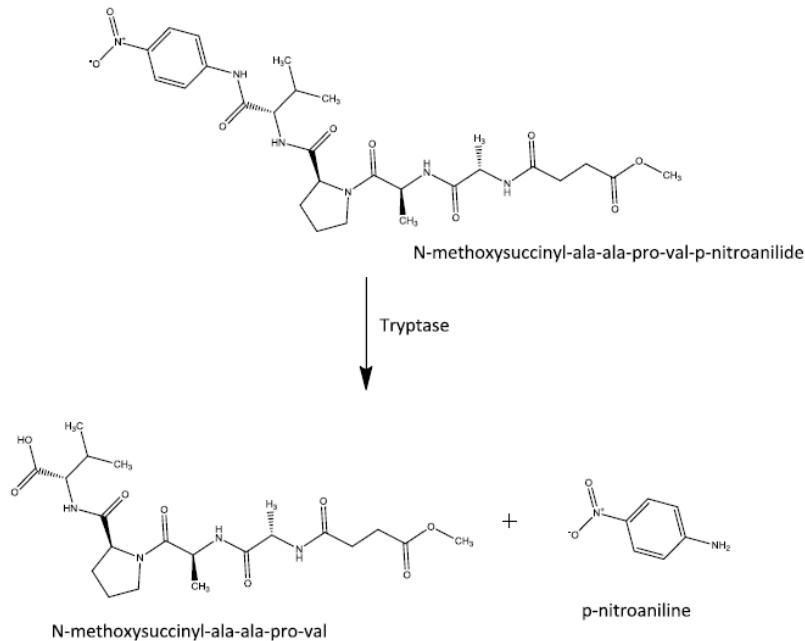


Figure 10 : Transformation du N-methoxysuccinyl-ala-ala-pro-val-p-nitroanilide en p-nitroaniline par l'élastase au cours du test d'inhibition enzymatique.

Pour évaluer leur activité inhibitrice, les HE et mélanges sont dilués dans du tampon phosphate à 0,67 M et pH 6,7 contenant 10% (v/v) de diméthylsulfoxyde (DMSO, Thermo Fisher Scientific). Les concentrations finales testées sont de 0,5 et 1,0 mg/ml. Dans une microplaque, 20 µl des échantillons à tester sont déposés et complétés à 100 µl avec le tampon de travail (0,1 M Tris-base, 0,5 M NaCl, pH 8, Thermo Fisher Scientific). Un témoin négatif correspondant au 100% d'activité de l'enzyme est réalisé en remplaçant l'inhibiteur par 20 µl de la solution de DMSO à 10%. Comme témoin positif, un inhibiteur connu de l'élastase, l'ovomucoïde type II-O issu du blanc d'œuf (Sigma Aldrich), est utilisé dans une gamme de concentrations finales de 100 à 500 µg/ml (dilution dans le tampon de travail). Dans chaque puits, 50 µl d'une solution d'élastase à 0,4 U/ml (Sigma Aldrich) sont ensuite ajoutés. Un blanc constitué de 20 µl de la solution tampon à 10% de DMSO et 130 µl de tampon de travail est réalisé en parallèle.

À $t = 0$ min, 50 μ l de la solution de substrat contenant 0,68 mM de N-méthoxysuccinyl-ala-ala-pro-val-p-nitroanilide (Sigma Aldrich) sont ajoutés dans les puits afin d'initier la réaction. Une première lecture d'absorbance à 410 nm est réalisée à $t = 0$ min. L'absorbance est lue une nouvelle fois après 20 min d'incubation à 25°C.

Le pourcentage d'inhibition (I%) pour chaque échantillon et chaque concentration est calculé avec l'équation suivante :

$$I(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{ech}}}{A_{\text{témoin}}}\right) \times 100$$

Où $A_{\text{témoin}}$ est l'absorbance obtenue avec le témoin 100% et A_{ech} l'absorbance obtenue avec les différents inhibiteurs. La mesure est réalisée en trois répliques indépendants.

5 Evaluation des activités antibactériennes

5.1 Bactéries utilisées au cours de cette étude et méthodes de culture

L'activité antibactérienne des HE et des mélanges a été évaluée sur 29 bactéries présentées dans le *Tableau 5*. Une majeure partie de ces bactéries – mises à part *Escherichia coli* CIP 54.117, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 CIP 104.116 et *Salmonella enterica* sv Enterica CIP 82.97– ont été fournies par le laboratoire Laboceva situé à Ploufragan (Côtes d'Armor, France). Ces bactéries ont été isolées à partir de prélèvements réalisés sur des animaux malades. Les organes de prélèvement et les espèces animales concernées sont également précisés dans le *Tableau 5*.

Pour la culture des bactéries, les milieux liquides Brain Heart Infusion (BHI, Conda, Madrid, Espagne) et Luria Berthani (LB) sont utilisés.

- Le milieu BHI est un milieu de culture commercial riche, de composition suivante : 5g/l d'extrait de cœur de bœuf (infusion réalisée à partir 250g), 12,5 g/l d'extrait de cerveau de veau (infusion réalisée à partir de 200g), 2,5 g/l d'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4), 2g/l de D(+)-glucose, 10g/l de peptone et 5g/l de chlorure de sodium (NaCl).

- Le milieu LB est un milieu de culture classique de composition suivante : 10g/l de NaCl (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, France), 10g/l de peptone (Thermo Fisher Scientific) et 5 g/l d'extrait de levure (Conda).

Les deux milieux ont été déclinés dans leur forme liquide ou solide, par ajout d'agar de qualité bactériologique (Conda) à une concentration finale de 15g/l. Après préparation, les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage (121 °C pendant 30 min). Les milieux respectivement utilisés pour chaque bactérie sont présentés dans le *Tableau 5*.

La conservation à long terme des bactéries a été réalisée à -80°C sous forme de stock glycérol à 20%. Pour cela, après un isolement sur gélose, une colonie est resuspendue dans 800 µl du milieu de culture adéquat, auxquels sont ajoutés 200 µl de glycérol stérile (Thermo Fisher Scientific). Après homogénéisation, les solutions stocks sont congelées à -80°C pour conservation. L'intégrité des solutions stock a régulièrement été contrôlée par étalement sur gélose.

Pour la préparation des essais présentés par la suite, une pré-culture est réalisée la veille. Pour cela, 10 ml du milieu liquide adéquat sontensemencés à partir d'une aliquote de la solution stock, prélevée à l'aide d'une anse, en condition stérile. La suspension est incubée pendant une nuit à 37 °C sous une agitation orbitale de 90 RPM.

Tableau 5 : Liste des bactéries étudiées au cours du projet EVHELCAP

	Nom		Milieu	Espèce	Prélèvement	Pathologie	
Respiratoire	G+	<i>Streptococcus suis</i>	1	BHI	Porcin	Cœur	Septicémie
			2	BHI	Porcin	Cœur	Septicémie
	G-	<i>Pasteurella multocida</i>	1	BHI	Porcin	Écouvillon nasal	Respiratoire
			2	BHI	Bovin	Écouvillon nasal	Respiratoire
			3	BHI	Lapin	Écouvillon nasal	Respiratoire
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1		LB	CIP 104.116		
	Digestif	G+	<i>Clostridium perfringens</i>	1	BHI	Caprin	Rein
2				BHI	Bovin	Fèces	Digestive
3				BHI	Porcin	Contenu digestif	Digestive
G-		<i>Escherichia coli</i> K88	1	BHI	Porcin	Écouvillon	Digestive
			2	BHI	Porcin	Contenu digestif	Digestive
		<i>Escherichia. coli</i> N.T.	1	BHI	Porcin	Contenu digestif	Digestive
			2	BHI	Ovin	Fèces	Digestive
			3	BHI	Bovin	Fèces	Digestive
			<i>Salmonella enterica</i> sv Enterica		LB	CIP 82.97	
<i>Salmonella enterica</i> sv Typhimurium		1	BHI	Volaille	Chiffon	Environnement	
		2	BHI	Bovin	Fèces	Digestive	
		3	BHI	Porcin	Contenu digestif	Digestive	
Mammites		G+	<i>Streptococcus uberis</i>		BHI	Bovin	Lait
	<i>Streptococcus agalactiae</i>		1	BHI	Porcin	Sang / cœur	Septicémie
			2	BHI	Bovin	Lait	Mammite
			3	BHI	Bovin	Lait	Mammite
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>		1	BHI	Bovin	Lait	Mammite
			2	BHI	Bovin	Lait	Mammite
			3	BHI	Bovin	Lait	Mammite
	<i>Staphylococcus aureus</i>		1	BHI	Équin	Écouvillon	Cutané
			2	BHI	Bovin	Lait	Mammite
			3	BHI	Porcin	Nœud lymphatique	Cutané
G-	<i>Escherichia coli</i>		LB	CIP 54.117			

G+ = Gram positif ; G- = Gram négatif ; N.T. = Non Typable

5.2 Mise en évidence des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des mélanges et huiles essentielles

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) des mélanges et HE ont été déterminées sur les souches appartenant aux différentes sphères correspondantes, par une méthode adaptée de Ballester-Costa *et al.* (2013). La croissance bactérienne est généralement suivie par turbidimétrie (mesure d'absorbance à 600 nm). L'émulsion entre huiles essentielles et milieu de culture liquide provoquant également un trouble, une autre méthode de détection a dû être utilisée. Pour cela, le MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Aldrich) est utilisé comme marqueur de l'activité métabolique des bactéries. En effet, en présence de cellules vivantes et métaboliquement actives, le MTT est métabolisé en Formazan de couleur violette, comme indiqué dans la Figure 11.

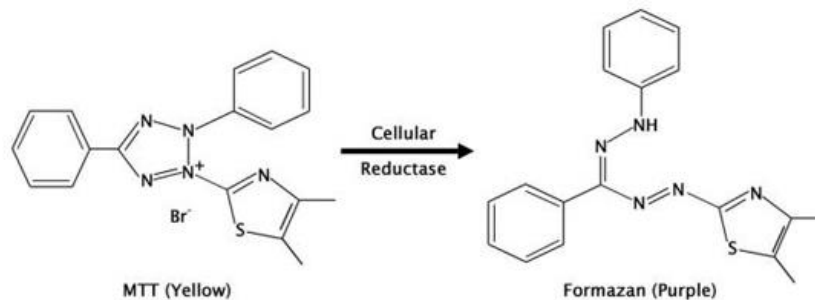


Figure 11 : Réaction de métabolisation du MTT en formazan par les bactéries métaboliquement actives.

Pour cette mesure, des gammes de 5 à 0,05 mg/ml (concentrations finales) sont réalisées pour les mélanges et les HE entrant dans leur composition. Pour cela trois solutions mères à 10, 1 et 0,1 mg/ml sont effectuées par dilution dans le milieu adapté à chaque bactérie. La solubilisation des HE dans le milieu liquide est rendue possible par ajout de Simulsol® (Seppic SA, Puteaux, France) dans les solutions mères à hauteur de 1%, 0,1% et 0,01% (v/v) respectivement. Les dilutions en cascade au ½ sont ensuite réalisées directement dans la microplaque afin d'obtenir un volume final de 100µl dans chaque puits, comme indiqué dans la Figure 12.

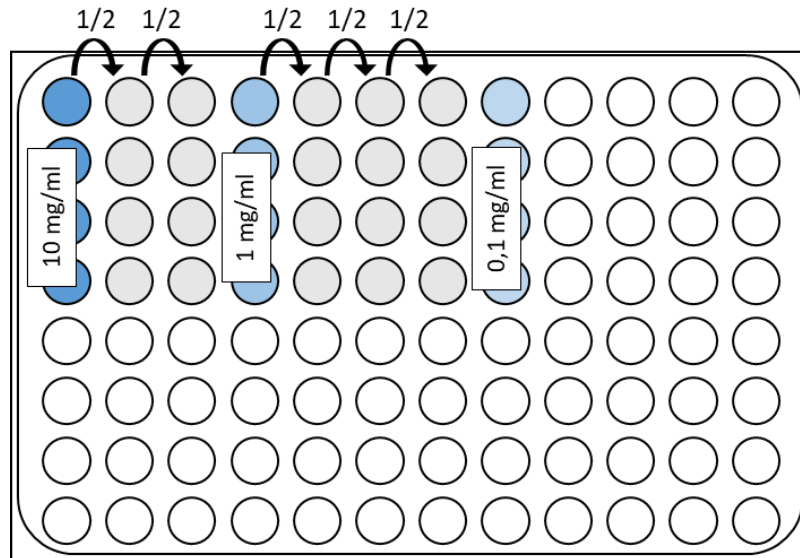


Figure 12 : Schéma observé pour la préparation des gammes d'huile essentielle dans le cadre de la détermination des CMI et CMB.

Une fois les dilutions réalisées, les puits sont complétés avec 95 μL de milieu de culture et inoculés avec 5 μl de suspension bactérienne, préalablement ajustée à une absorbance de 0,5 à 600nm. Un témoin positif est réalisé en inoculant de la même manière 195 μl de milieu de culture pur. Un témoin négatif permettant d'assurer l'absence de contamination est également réalisé grâce à 200 μl de milieu de culture non inoculé. Enfin, un des quatre réplicas de gamme réalisé est gardé stérile pour confirmer l'absence de faux positifs dans la transformation du MTT en formazan.

Les plaques sont ensuite incubées 24h à 37 °C sans agitation, puis révélées en ajoutant dans chaque puits 25 μl d'une solution de MTT à 0,8 mg/ml réalisée dans le DMSO (Thermo Fisher Scientific). Après une heure de contact, la formation du formazan violet est observée. Une aliquote des puits ne présentant pas de coloration, signifiant l'absence de bactéries métaboliquement actives, est alors étalée sur gélose.

Après 24h d'incubation des géloses à 37°C, les concentrations inhibitrices (croissance bactérienne après étalement) et bactéricides (absence de croissance après étalement) de chaque HE et mélange sont déterminées. La CMI est considérée comme la concentration la plus faible permettant la reprise de croissance après étalement sur gélose. De même, la CMB est considérée comme la concentration la plus faible empêchant la reprise de croissance après étalement sur gélose.

6 Évaluation de l'activité antibiofilm du mélange Abf1

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* PA01 est utilisé ici comme modèle pour la formation de biofilm. En effet, cette bactérie responsable entre autre d'infections nosocomiales à la capacité de former un biofilm important qui la rend plus difficile à éradiquer. Différentes méthodes sont utilisées pour établir l'activité du mélange Abf1 en conditions statiques et dynamiques.

6.1 Formation du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 en conditions statiques et dynamiques

6.1.1 Mesure de l'inhibition du biofilm de *P. aeruginosa* PA01 par la méthode du cristal violet

L'activité du mélange Abf1 est mesurée sur le biofilm de *P. aeruginosa* PA01 après coloration au cristal violet (Husain *et al.*, 2015). Le développement des biofilms est réalisé en microplaque 96 puits à fond plat (Greiner Bio-One), de la manière suivante : après 24h de croissance à 37°C dans un milieu LB, les bactéries sont centrifugées 10 min à 2264g. Le culot est ensuite repris dans du Sérum Physiologique Stérile (SPS ; NaCl 0,9%, Carlo Erba) afin d'obtenir une suspension à 0,1 unité d'absorbance à 600 nm. L'utilisation de SPS permet d'optimiser l'adhésion des cellules aux parois de la microplaque. 200µl de cette suspension sont alors déposés dans les puits utilisés pour le développement du biofilm (échantillons et témoin négatif). Un blanc ne contenant que 200µl de SPS est également réalisé. Les microplaques sont ensuite incubées à 37°C pendant 3h sans agitation pour permettre l'adhésion des bactéries.

Après adhésion, les puits sont vidés et rincés deux fois au SPS pour retirer les bactéries non adhérentes. Le mélange Abf1 solubilisé dans du milieu LB dans des concentrations de 5 à 0,05 mg/ml selon la même procédure que pour la mesure de CMI / CMB (cf §5.2) est ajouté dans les puits préparés plus haut. Un témoin négatif est également réalisé à l'aide de milieu LB + Simulsol® (Seppic SA) à 0,5%. Les puits correspondant aux blancs sont complétés avec 200 µl de milieu LB + Simulsol® à 0,5%. Afin de permettre au biofilm de se développer, les microplaques sont à nouveau incubées à 37°C, pendant 24h.

Après maturation du biofilm, le contenu des microplaques est retiré par retournement et un double rinçage au SPS est effectué. Les biofilms adhérents sur les parois sont colorés par 200µL de cristal violet (1% dans de l'eau distillée, Reactif R.A.L., Martillac, France) pendant 15 minutes. Les plaques sont ensuite rincées jusqu'à décoloration complète du blanc : cela

permet de confirmer que le cristal violet restant n'est dû qu'à la présence de bactéries et non à une coloration résiduelle du support.

Le cristal violet contenu dans les bactéries du biofilm est finalement solubilisé à l'aide de 200µl d'éthanol à 70%. L'absorbance des puits est mesurée à 600 nm et le pourcentage d'inhibition (I%) est calculé de la manière suivante :

$$I(\%) = \frac{A_{\text{témoin}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{témoin}}} \times 100$$

Où $A_{\text{témoin}}$ est l'absorbance obtenue pour le témoin négatif et $A_{\text{échantillon}}$ l'absorbance obtenue avec les différentes concentrations en mélange Abf1. Trois réplicas sont réalisés par analyse.

6.1.2 Mesure d'inhibition de la formation du biofilm de *P. aeruginosa* sur lame de verre

Afin de préparer la manipulation de formation de biofilm en cellules à flux, l'activité du mélange Abf1 a été observée sur des lames de verre, en conditions statiques. Cette étape a également permis de valider la formation de biofilm par *P. aeruginosa* PA01 et l'activité du mélange Abf1 sur un autre support de culture, le verre.

6.1.2.1 Evaluation de l'activité du mélange Abf1 sur l'adhésion des bactéries

L'utilisation de ce support permet d'évaluer l'effet du mélange sur l'adhésion des bactéries, une étape clé dans la formation du biofilm. À nouveau, l'adhésion des bactéries est réalisée dans du SPS et trois conditions sont évaluées : SPS pure, SPS contenant 0,1% (v/v) de Simulsol® (Seppic SA) et SPS contenant 0,1% (v/v) de Simulsol® et 1 mg/ml du mélange Abf1. Comme précédemment, ces solutions sont inoculées à l'aide d'une pré-culture bactérienne préalablement centrifugée et ajustée à une absorbance de 0,1 à 600 nm.

L'étape d'adhésion est réalisée dans des fioles, comme indiqué dans la figure 13. Les montages, comprenant une fiole dans laquelle des lames de verre (VWR, Radnor, PA, Etats-unis d'amerique) sont suspendues à l'aide de fil de pêche et de trombones, sont stérilisés pendant 20 min à 121°C.

Après refroidissement des montages, les solutions de SPS inoculées sont ajoutées à hauteur de 100 ml par fioles, ce volume permettant d'immerger totalement les lames de verre. L'immersion est poursuivie pendant 2h à température ambiante, après quoi les cellules non adhérentes sont retirées des lames par un rinçage doux au SPS.

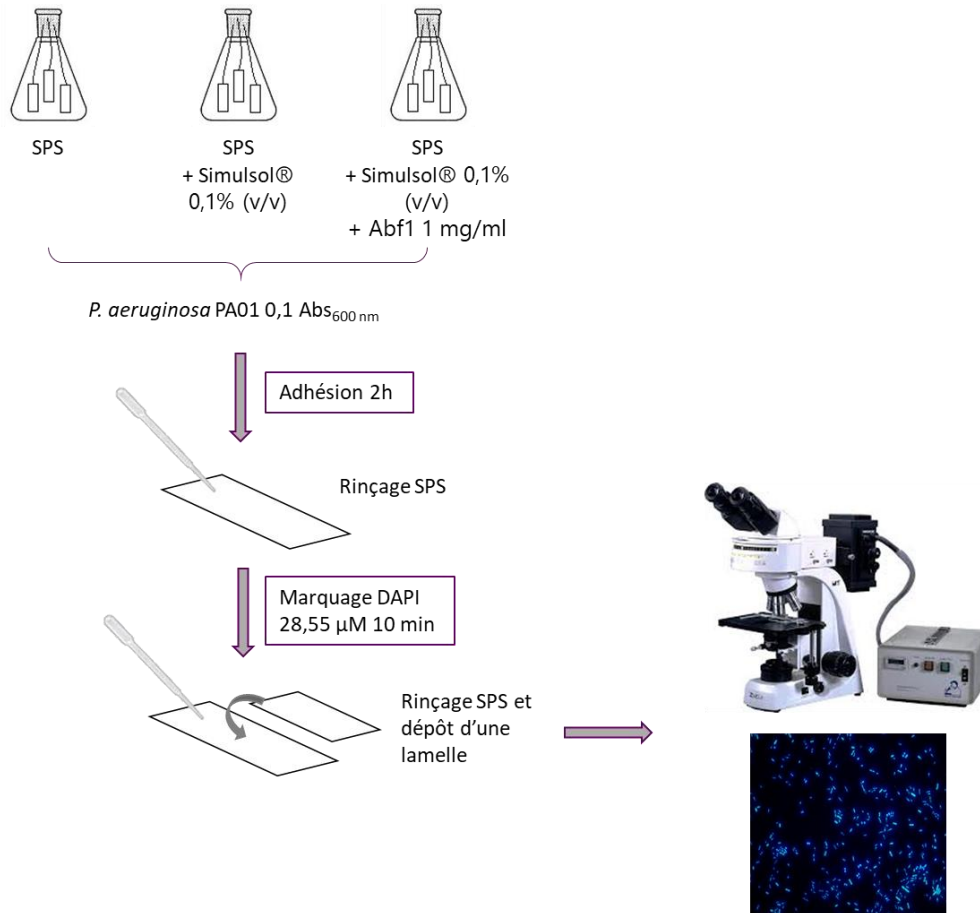


Figure 13 : Procédé d'évaluation de l'effet du mélange Abf1 sur l'adhésion de P. aeruginosa sur lames de verre.

6.1.2.2 Évaluation de l'activité du mélange Abf1 sur le développement de biofilm

Le développement de biofilm bactérien a également été réalisé sur lames de verre, selon la procédure décrite dans la figure 14. Pour cela, une adhésion de 2h a d'abord été réalisée dans du SPS, comme expliqué dans le paragraphe §6.1.2.1. Les lames ont ensuite été rincées et déposées individuellement dans des tubes Falcon® stériles (Corning Life Sciences, Corning, NY, États-Unis d'Amérique) contenant 40 ml de milieu LB, 40 ml de milieu LB + 0,1% (v/v) de Simulsol® ou 40 ml de milieu LB + 0,1% (v/v) de Simulsol® + 1 mg/ml d'Abf1. Les tubes sont incubés 24h à 37°C afin de permettre la maturation du biofilm. Pour chaque condition testée, trois essais indépendants sont réalisés.

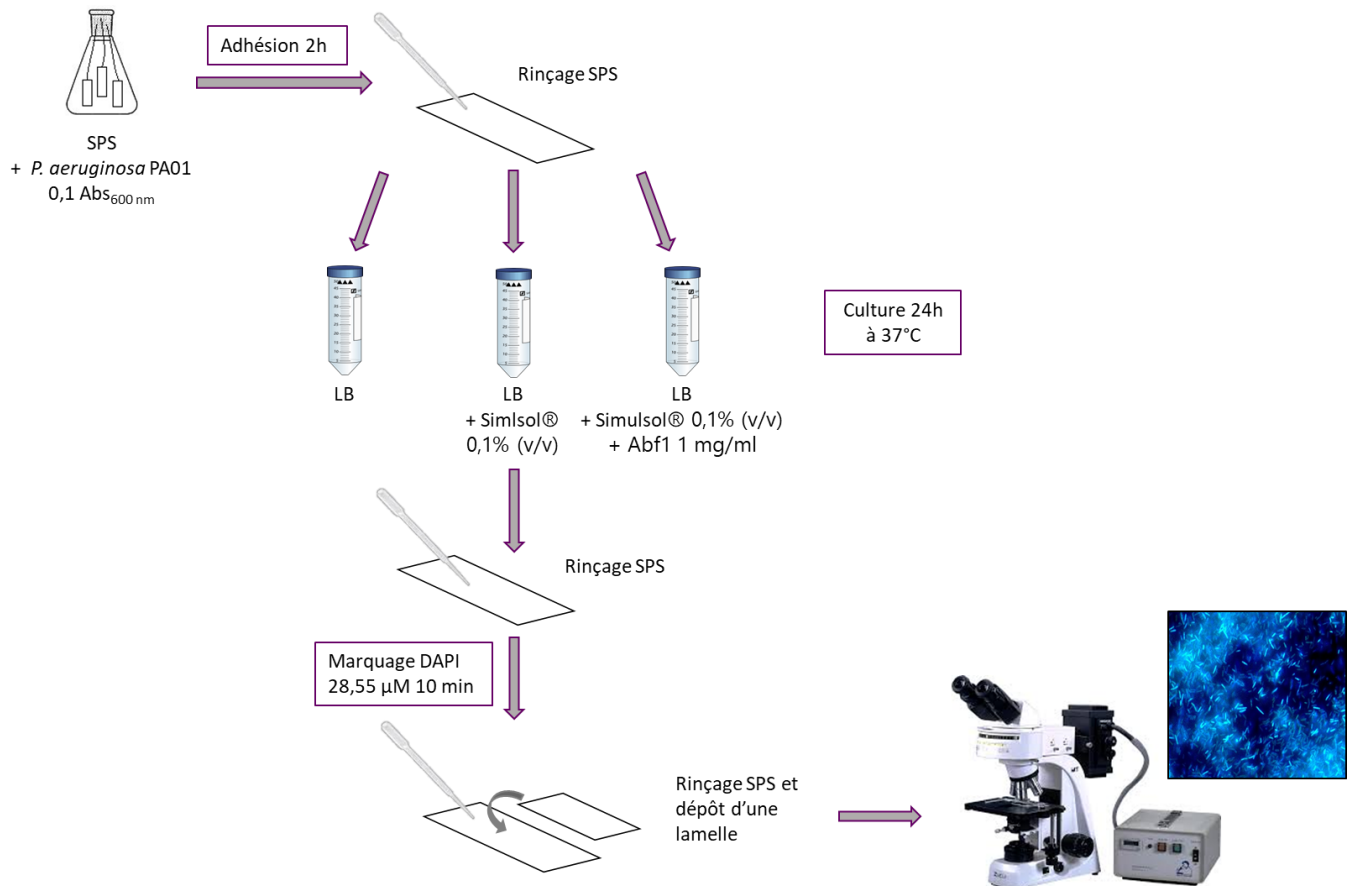


Figure 14 : Procédé d'évaluation de l'effet du mélange Abf1 sur le biofilm de *P. aeruginosa* sur lames de verre.

6.1.2.3 Observation au microscope à épifluorescence

À l'issue des étapes d'adhésion et de formation du biofilm, les bactéries sont marquées par une immersion de 10 min dans une solution de DAPI (28,55 μM dans SPS, Sigma Aldrich). L'excès de marqueur est retiré par lavage doux au SPS, avant dépôt d'une lamelle. Les bactéries sont ensuite observées au microscope à épifluorescence (Olympus microsystems, Hamburg, Germany), alimenté par la source X-cite 120q led fluorescence illuminator (Lumen dynamics), en utilisant le grossissement x 100 à immersion à huile.

Trois images sont réalisées par lame et traitées avec le logiciel ImageJ (National Institutes of Health, USA), afin de déterminer la surface recouverte par les bactéries sur chaque lame.

6.1.3 Mesure de l'inhibition du biofilm de *P. aeruginosa* PA01 en cellules à flux

6.1.3.1 Préparation du montage

Le biofilm de *P. aeruginosa* PA01 est formé dans un système de chambre à flux permettant de mettre en place des conditions dynamiques, d'après le protocole proposé par Weiss Nielsen *et al.* (2011). Cette méthode, présentée dans la Figure 15, consiste en une cellule à flux composée de trois canaux (1 x 40 x 44 mm ; Biocentrum, DTU, Danemark), clos par une lamelle de verre à usage unique (24 x 50 mm ; Knittel glass, Braunschweig, Allemagne). La lamelle en verre est collée à l'aide de colle silicone neutre (Clear super silicone sealant, 3M, St Paul, États-Unis) comme indiqué dans la figure 16. Un flux constant de 2,5 ml/h est créé par une pompe péristaltique (Watson Marlow 205U, Falmouth, Royaume-Uni), montée en amont de la cellule à flux. Des pièges à bulles (Biocentrum) sont disposés entre les deux éléments pour éviter la formation de bulles, dommageables pour le biofilm. L'ensemble des éléments sont connectés par des tubes en silicones.

Avant utilisation, le montage est stérilisé par une mise en eau de javel à 0,5% pendant 30 min. L'eau de javel est ensuite retirée et remplacée par du SPS circulant pendant une nuit, afin de retirer toute trace de javel dans les composants du montage.

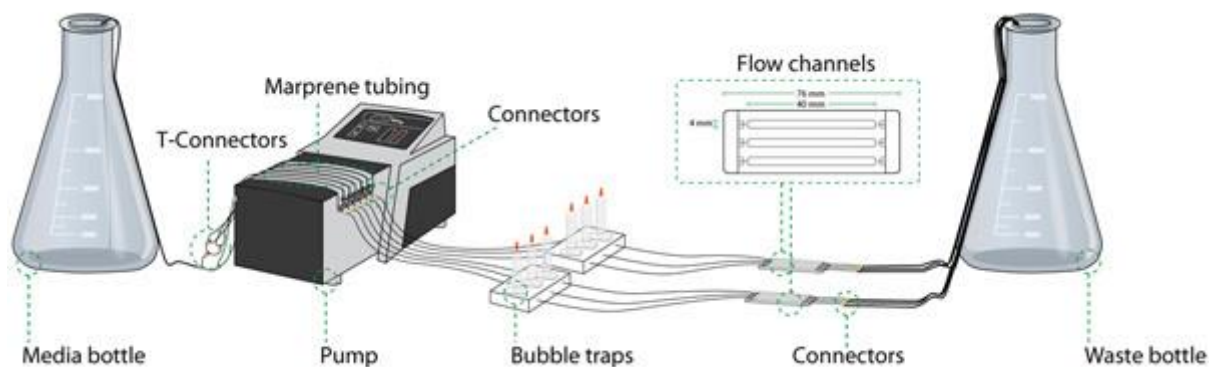


Figure 15 : Schématisation du système de cellules à flux (flow cells) (Weiss Nielsen *et al.*, 2011)

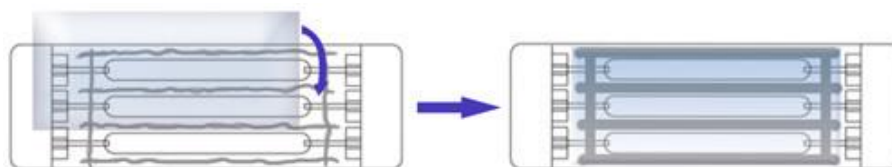


Figure 16 : Méthode d'encollage des lames de verre sur la cellule à flux (Weiss Nielsen *et al.*, 2011)

6.1.3.2 Effet d'Abf1 sur l'adhésion bactérienne

L'étape d'adhésion est à nouveau réalisée dans du SPS. La bouteille de SPS est connectée stérilement au système, afin de le remplir. L'absence de bulle dans le montage est contrôlée avant d'arrêter le flux et de fermer les clamps présents en amont de la cellule à flux.

En parallèle, les suspensions bactériennes à 0,1 d'absorbance à 600 nm sont préparées à partir d'une pré-culture de *P. aeruginosa*, dans les conditions suivantes :

- SPS pur
- SPS contenant 0,1% ou 1% de Simulsol®,
- SPS contenant 0,1% de Simulsol et 1 mg/ml d'Abf1 ou 1% de Simulsol® et 10mg/ml d'Abf1.

Les suspensions bactériennes sont ensuite injectées dans leur canal respectif à l'aide d'une seringue stérile, à hauteur de 300 µl par canal. Les clamps présents en aval de la cellule à flux sont fermés à leur tour. Les perforations des tubes provoquées par l'injection sont immédiatement rebouchées par un dépôt de colle silicone (Clear super silicone sealant, 3M). La cellule à flux est également retournée afin de faciliter l'adhésion des bactéries sur la lame de verre. À l'issue des 2h d'adhésions, les clamps sont rouverts et le flux est relancé afin d'éliminer les bactéries non adhérentes avant observation.

6.1.3.3 Effet d'Abf1 sur la formation de biofilm

La formation de biofilm est réalisée dans les cellules à flux afin d'observer l'effet du mélange dans des conditions dynamiques. Pour cela, l'étape d'adhésion est réalisée selon la procédure décrite dans le paragraphe §6.1.3.2, en utilisant du SPS pur pour l'ensemble des canaux. Après 2h d'adhésion, les bouteilles correspondant à chaque condition testée, à savoir :

- milieu LB pur
- milieu LB à 0.1% ou 1% de Simulsol®
- milieu LB additionné de 0.1% de Simulsol® et 1 mg/ml d'Abf1 ou 1% de Simulsol® et 10mg/ml d'Abf1

sont raccordées stérilement à leur canal respectif. Le flux est alors lancé à 2,5 ml/h et les cellules à flux sont incubées 24 h à 37°C pour permettre la maturation du biofilm.

6.1.3.4 Observations au microscope confocal à balayage laser.

Les bactéries sont marquées puis observées à l'issue des étapes d'adhésion et de maturation des biofilms. Pour cela, le flux est stoppé et les clamps en amont de la cellule à flux fermés. Les bactéries sont alors marquées par une solution de Syto 9 green à 5 μ M pour les adhésions et une solution de Syto 9 à 5 μ M et 0,3 μ M d'Iodure de Propidium (IP) pour les biofilms (Live / Dead BacLight Bacterial viability kit ; Invitrogen, Carlsbad, CA., Etats-Unis). Le marqueur Syto 9 (λ excitation = 485-486 nm et λ émission = 498-501 nm) est un intercalant des acides nucléiques permettant de visualiser l'ensemble des cellules présentes. L'IP (λ excitation = 543 nm et λ émission = 565 nm) est spécifique des bactéries mortes ou dont l'intégrité est compromise, car il ne peut traverser les membranes que lorsque celles-ci sont endommagées. Les solutions sont injectées délicatement aux entrées des canaux, à hauteur de 300 μ l. Les clamps en aval des cellules à flux sont fermés à leur tour afin d'éviter la propagation des marqueurs.

Après 10 minutes, les clamps sont rouverts et le flux relancé afin de retirer l'excès de fluorochrome. Les bactéries adhérees et les biofilms sont observés au Microscope Confocal à Balayage Laser (MCBL, Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne) avec un objectif à immersion à l'huile de grossissement x63. Des prises de vues sont également réalisées dans les différentes couches du biofilm afin de permettre une reconstitution tridimensionnelle.

Les conditions sont testées indépendamment à trois reprises. Trois images par canaux sont réalisées. Les prises de vue obtenues à l'issue de l'étape d'adhésion sont analysées par le logiciel ImageJ (National Institutes of Health, USA) afin de déterminer le pourcentage de recouvrement de la lame. Les fichiers d'images obtenus à l'issue de la formation des biofilms sont analysés par le programme COMSTAT® (Givskov *et al.*, 2000) afin de déterminer leurs épaisseurs moyennes, minimales et maximales et les biovolumes bactériens pour chaque condition.

6.2 Inhibition du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 par les HE d'ail, de menthe et de cannelle et de leurs composants principaux

L'activité antibiofilm du mélange Abf1 en conditions statiques et dynamiques a été préalablement établie. Il est dès lors nécessaire de poursuivre les recherches afin de comprendre l'origine de cette activité. Pour cela, les huiles essentielles composant le mélange, à savoir les

HE d'ail, de cannelle et de menthe poivrée, sont étudiées seules, en conditions statiques. Les composés majoritaires de l'HE d'ail, de cannelle, et de menthe (diallyl disulfide, cinnamaldehyde et menthol respectivement) sont également étudiés. Les effets des différents échantillons sur le biofilm de *P. aeruginosa* ainsi que sur l'expression de gènes liés sont observés. Une étude préliminaire est réalisée en microplaque 96 puits, par coloration au cristal violet, comme indiqué dans le paragraphe 6.1.1.

6.2.1 Réalisation de l'analyse en microplaque a fond de verre

Des microplaques 24 puits avec un fond en verre (Greiner Bio-One) sont utilisées, avec un volume final de 2mL par puits. Une suspension de *P. aeruginosa* PA01 ajustée à une absorbance de 0,1 à 600 nm dans le milieu LB est réalisée à partir d'une pré-culture et distribuée dans les puits à hauteur de 1ml. Les dilutions des échantillons sont préparées dans du milieu LB contenant une concentration de Simulsol® équivalente à celle des HE. Elles sont également ajoutées à hauteur de 1ml. Un témoin négatif sans inhibiteur est réalisé en ajoutant 1ml de milieu LB à la suspension bactérienne. La microplaque est ensuite incubée pendant 16 h à 37°C pour permettre le développement du biofilm.

6.2.2 Observations au microscope confocal à balayage laser

Après incubation, le fluorochrome Syto61 (Invitrogen) est ajouté dans chaque puits à une concentration finale de 5µM, afin d'observer la maturation du biofilm par MCBL. Cet intercalant d'ADN proche du Syto9 permet d'observer la totalité des bactéries (λ excitation = 628 nm et λ émission = 645 nm).

Les biofilms sont observés au MCBL (Carl Zeiss) avec un objectif à immersion à huile de grossissement x63. Des prises de vues sont réalisées dans les différentes couches des biofilms afin de permettre une reconstitution tridimensionnelle. À nouveau, les épaisseurs moyennes, minimales et maximales ainsi que les biovolumes bactériens sont déterminés pour chaque condition testée à l'aide du programme COMSTAT2® (Givskov *et al.*, 2000; <http://www.comstat.dk/>, 2015; Vorregaard & Lyngby, 2008).

6.2.3 Evaluation des effets des traitements sur l'expression des gènes liés au quorum sensing

Afin de comprendre le mécanisme de l'activité antibiofilm, l'expression de gènes impliqués dans la formation de biofilm a été suivie. Cette étape fait suite à la culture en microplaque à fond de verre présentée en §6.2.1. L'analyse est réalisée sur les bactéries planctoniques présentes dans le surnageant et sur les bactéries incluse dans le biofilm.

6.2.3.1 *Extraction d'ARN*

L'extraction d'ARN par le kit MasterPure™ RNA Purification (Epicentre, Madison, WI, États-Unis d'Amérique) est effectuée à la fois sur les cellules planctoniques et sur les cellules au sein du biofilm. Les cellules sont lysées par digestion enzymatique afin de libérer les acides nucléiques. Cette manipulation est réalisée grâce à un tampon de lyse contenant une protéinase K, permettant de dégrader les protéines. Les 2ml de surnageant présents dans les microplaques et contenant les cellules planctoniques sont récupérés et centrifugés à 10 000 g. Le surnageant est éliminé et les cellules contenues dans le culot sont traitées avec 300µl de solution de lyse. Les puits vidés sont également traités avec 300 µl de solution de lyse afin de récupérer les cellules incluses dans le biofilm et leur contenu. Les échantillons à lyser sont incubés 15 minutes à 65°C pour optimiser l'activité des enzymes, puis placés dans la glace avant les étapes de purification de l'ARN suivantes.

Une première étape de purification est réalisée par l'ajout de 175µl de solution de précipitation des protéines (MPC) suivi d'une centrifugation à 10 000g. Les protéines précipitées sont alors présentes dans le culot et les acides nucléiques sont récupérés dans le surnageant. Un ajout de 500 µl d'isopropanol permet alors la précipitation des acides nucléiques, récupérés dans le culot après une nouvelle centrifugation.

Une solution contenant 200µl de tampon DNase et 1µl de DNase I est ensuite ajoutée pour resuspendre le culot. L'ADN présent en solution est dégradé au cours d'une incubation de 10 min à 37°C.

Afin de récupérer seulement l'ARN et éliminer les protéines résiduelles dont la DNase, 200 µl de solution de lyse ainsi que 200 µl de réactif pour la précipitation des protéines sont ajoutés une nouvelle fois. Les débris sont éliminés par centrifugation à 10 000 g.

Après un dernier ajout de 500µl d'isopropanol au surnageant, l'ARN est récupéré par une nouvelle centrifugation de 10 minutes à 10 000g. Enfin, deux lavages à l'éthanol sont effectués avant de resuspendre l'ARN dans du tampon. La qualité des extraits d'ARN est vérifiée sur gel d'électrophorèse (agarose 0,8%). Les acides nucléiques sont quantifiés à l'aide d'un nanodrop (Nanophotometer® Implen, Munich, Allemagne) et conservés à -20°C.

6.2.3.2 Synthèse d'ADN complémentaires

Afin de pouvoir réaliser la PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR), les ARN extraits sont convertis en ADN complémentaires (ADNc) *via* le kit « High capacity cDNA archive » (Applied Biosystems, Foster City, CA, États-Unis d'Amérique). Les solutions d'ARN obtenues en §6.2.3.1 sont d'abord diluées afin d'obtenir une concentration de 50 ng/µL.

Le milieu réactionnel contenant 2µL de RT Buffer, 0,8µL de dNTP 25X, 2µL de Random primer 10X, 1µL de Reverse transcriptase et 4,2µL d'H₂O (nuclease free) est préparé en parallèle.

Afin de démarrer la réaction de synthèse, 10µL de la solution d'ARN à 50 ng/µL sont mélangés au milieu réactionnel. Le tube est placé dans le thermocycleur, 10 minutes à 25°C, puis 120 minutes à 37°C. Les ADNc obtenus sont conservés à -20°C.

6.2.3.3 Amplification en chaine par polymérase (PCR) quantitative

La PCR quantitative permet de déterminer la quantité initiale d'ADN présent dans l'échantillon. Grâce à un marqueur fluorescent qui se fixe au double brin d'ADN, la quantité d'ADN est mesurée à chaque cycle d'amplification. En comparaison à la PCR classique, la quantité d'ADN est observée tout au long de la réaction. Les sondes s'activent uniquement lorsqu'elles s'hybrident à l'ADN. L'appareil va alors établir un seuil de fluorescence. Quand la quantité d'ADN dépasse ce seuil, le cycle seuil « Ct » est obtenu. Cette valeur est à la base des calculs permettant de quantifier l'ADN.

Afin d'observer l'influence des HE sur la régulation de la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* PA01, trois gènes ont été ciblés (un pour chaque voie de régulation du biofilm) : *wspF* pour la voie du c-di-GMP, *rsmY* pour la voie des petits ARN et enfin *lasI* pour la voie du quorum sensing. Un gène domestique, le 16s, a également été utilisé comme contrôle endogène.

En effet le niveau de transcription de ce gène n'est pas censé varier en fonction des conditions de culture (ici présence ou absence d'HEs). Les propriétés des amorces (séquence, température d'hybridation) utilisées pour cibler ces gènes sont présentées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Séquences et température d'hybridation des amorces utilisées au cours de l'étape de qRT-PCR.

qPCR Amorce	Séquence	Tm
16s Fad1	5' CAGGATTAGATACCCTGGTAG 3'	62°C
16s Fad2	5' GACTTAACCCAACATCTCACG 3'	62°C
wspF1	5' GAGGCAACTCGTCGGATCAT 3'	62°C
wspF2	5' ACAATCACGATCGCGCA 3'	54°C
lasI1	5' TTCGCCATCAACTCTGGACA 3'	60°C
lasI2	5' CGTATAGTCGGAAAAGCCCA 3'	62°C
rsmY11	5' GCGCCAAAGACAATACGGAA 3'	60°C
rsmY21	5' ATCCGTGCTACGCCACCAT 3'	60°C

La première étape de la qRT-PCR consiste en la réalisation d'une gamme de dilution de l'ADNc de 1ng à 0,001ng. En parallèle, un mix contenant 3,75µM de chaque amorce est réalisé dans de l'eau ultrapure. Dans les puits d'une microplaque, 8µL d'ADNc sont déposés ainsi que 2µL du mix d'amorce (375 Nm) et 10µL de la sonde fluorescente Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems). Trois répliques de chaque concentration d'ADNc étant effectués, il y a donc 12 puits par condition. La microplaque est ensuite insérée dans le thermocycleur dont le programme est illustré en figure 17

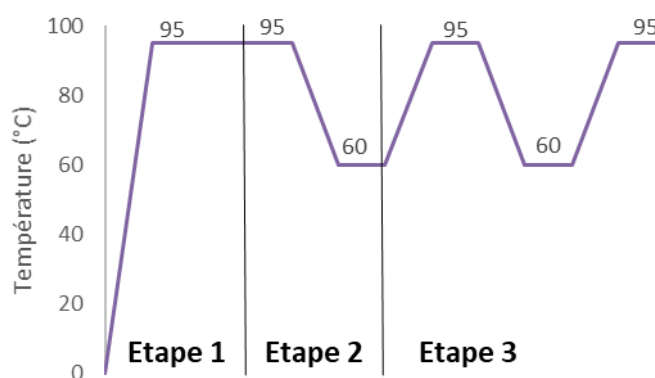


Figure 17 : Cycles de température observés par le thermocycleur au cours de l'étape de qRT-PCR

La première étape consiste en l'activation des enzymes. La deuxième étape, permet quant à elle de dénaturer les brins d'ADN grâce à une température de 95°C. La diminution de la température à 60°C va ensuite entraîner l'hybridation des amorces et permettre l'élongation

du brin d'ADN. Cette étape d'amplification est réalisée 40 fois. La dernière étape permet d'obtenir la courbe de dissociation. Elle débute par une étape de dénaturation à 95°C, puis la température diminue jusqu'à la température d'hybridation (60°C). Ensuite, la température est augmentée degré par degré et la fluorescence est détectée. La courbe de dissociation ressemble à un chromatogramme. Si sur cette courbe de dissociation, un seul « pic » apparaît cela indique qu'il y a qu'un seul produit amplifié par la PCR.

Pour vérifier l'efficacité de la réaction, la distance entre les courbes d'amplification de deux concentrations successives doit être égale à 3,33 (valable pour des dilutions de 10 en 10 dans la gamme). Pour l'analyse des résultats, dans un premier temps il faut normaliser la valeur du cycle seuil du gène d'intérêt avec celui du contrôle endogène. La seconde étape consiste à normaliser avec le témoin. Ensuite, il est possible de calculer le niveau d'expression du gène en utilisant les équations suivantes :

$$\mathbf{a.} \Delta Ct = Ct_{\text{gène}} - Ct_{16s} \quad \mathbf{b.} \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{HE} - \Delta Ct_{\text{témoin}} \quad \mathbf{c.} 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Où a : Normalisation avec le contrôle endogène. b : Normalisation avec la condition témoin. Et c : Calcul du niveau d'expression du gène.

7 Evaluation de l'activité antivirale des mélanges et des HE sur le modèle Herpès Simplex Virus de type 1 (VHS-1)

7.1 Culture des cellules VERO

La lignée cellulaire VERO est utilisée pour la recherche d'activités anti-herpétiques. Cette lignée cellulaire a été établie en 1962 par Yasumara et Kawakita (Ammerman, Beier-Sexton, & Azad, 2008). Issue de cellules fibroblastiques de rein de singe vert (*Cercopithecus aethiops*), cette lignée est adhérente et garantie stérile. Elle est sélectionnée pour son fort taux de croissance (1 pour 20 en 7 jours lors d'un ensemencement de départ de 3×10^5 cellules/ml) et sa sensibilité à de nombreux virus dont Herpes Virus Simplex de type 1 (VHS-1).

7.1.1 Milieu de culture

Les cellules VERO sont cultivées dans le milieu « Minimal Essential Medium » (MEM) » contenant des sels de Earle, (Dominique Dutcher, Brumath, France). Ce milieu a été complété avant utilisation avec :

- 8% de Sérum de Veau Foetal (SVF, Eurobio, Courtaboeuf, France) préalablement inactivé par traitement thermique de 40 min à 56°C et filtré sur membrane 0,22 µm.
- 1% de glutamine (200 mM ; Eurobio), nécessaire pour l'obtention d'une culture satisfaisante de cellules de mammifères.
- 1% d'une solution d'antibiotiques et antifongiques : pénicilline (10 000 d'unités/ml), streptomycine (10 mg/ml) et colimycine (10 000 d'unités /ml) (Sigma Aldrich)

Les solutions d'antibiotiques sont préalablement préparées dans 200 ml de solution phosphatée stérile (NaCl 8,0 g/l ; KCl 0,2 g/l ; Na₂HPO₄ 2,9 g/l ; KH₂PO₄ 0,2 g/l dans de l'eau distillée) et réparties en aliquots de 5 ml, conservés ensuite à -20°C. Le milieu de culture sera par la suite appelé MEM complétement.

7.1.2 Maintien des cellules VERO

Les cellules VERO sont maintenues dans des flasques de culture cellulaires de 75 cm² contenant un volume final de 30 ml de milieu MEM complétement. Elles sont incubées à 37°C sous une atmosphère enrichie à 5% de CO₂ et saturée en vapeur d'eau. La présence de CO₂ permet de tamponner le pH du milieu à 7,4 grâce à l'équilibre chimique induit par la présence de HCO₃⁻ dans le milieu MEM. Les changements de pH peuvent notamment être suivis grâce à la présence de rouge de phénol dans le milieu de culture, un indicateur coloré. La présence de vapeur d'eau permet, elle, de limiter l'évaporation du milieu et donc de conserver son osmolarité. Lors de leur développement, les cellules forment un tapis monocouche adhérent. Lorsque la confluence des cellules est observée, après 3 à 4 jours de culture, les cellules subissent un « passage ».

Pour multiplier les cellules, le milieu de culture usagé est retiré de la flasque et le tapis cellulaire est lavé à deux reprises avec la solution phosphatée. En effet, le milieu MEM complétement contient des inhibiteurs des trypsines qui doivent être retirés. La trypsine (Trypsine 0,5 g/l et EDTA 0,2 g/l ; Eurobio) est ensuite déversée sur le tapis cellulaire à hauteur de 2 ml et laissée en contact pendant 1 minute à température ambiante. L'excès de trypsine est retiré avant d'incuber la flasque durant quelques minutes à 37°C, jusqu'à ce qu'un léger décollement des cellules soit observé. Les cellules sont alors mises en suspension dans 6 ml de milieu MEM complétement à l'aide d'un râteau à cellules, puis individualisées par aspiration et

refoulement dans une seringue stérile avec aiguille. Les 6 ml de suspensions cellulaires sont ensuite dispatchés dans 3 nouvelles flasques de 75 cm², à raison de 2 ml par flasque. La quantité de milieu MEM complémenté est ajusté à 30 ml. Les cellules subissent en moyenne une vingtaine de passages sans qu'aucun effet de vieillissement soit observé.

7.1.3 Conservation des cellules VERO

La culture des cellules VERO est démarrée à partir de stocks cellulaires conservés sous forme de cryotubes, dans l'azote liquide. Pour la réalisation de ces stocks, une culture de cellules VERO en croissance exponentielle (soit après 25 à 30 h) et à moins de dix repiquages est utilisée.

Les cellules adhérentes sont dissociées par trypsination et reprises dans un volume de 4 ml de SVF (Eurobio) pur. La suspension obtenue est alors distribuée dans les cryotubes à raison de 1ml par tube. Les tubes sont ensuite complétés par 1 ml d'une solution de MEM contenant 20% de DMSO, utilisé comme cryoprotecteur. La concentration en cellules dans les cryotubes est de $3 \cdot 10^6$ cellules/ml. Ces cryotubes sont ensuite congelés de manière graduelle en les plaçant 1h à -20°C puis 24h à -80 °C avant de finir à -196 °C dans l'azote liquide. Ce traitement permet de ne pas détruire les membranes cellulaires.

7.1.4 Démarrage d'une nouvelle culture

La nouvelle culture est démarrée à partir des cellules stock. Pour cela le contenu des cryotubes est partiellement décongelé au bain-marie, à 37°C. La décongélation rapide mais partielle permet d'éviter le contact entre les cellules et le DMSO, potentiellement toxique. Les 2 ml sont ensuite ajoutés à 30 ml de milieu MEM complémenté afin de diluer le DMSO. Les cellules sont récupérées par une centrifugation de 10 min à 500 g et à 4°C. Le culot cellulaire est repris dans 6 ml de milieu MEM complémenté et cette suspension est introduite dans une flasque de 25 cm². Les cellules sont alors incubées à 37°C, sous 5% de CO₂. Le milieu est renouvelé après 24h de culture. Après 3 jours, les cellules arrivées à confluence subissent un premier passage, après trypsination et remise en culture dans une flasque de 75 cm² contenant un volume final de 30 ml de milieu MEM complémenté.

7.2 Le virus Herpès simplex de type 1

Le virus de l'herpès (VHS-1) est utilisé en tant que modèle de virus cytolytique. Les souches sauvages 17 et KOS de VHS-1 ont été fournies par le Laboratoire de « Dynamique, épidémiologie et traitement des infections virales » de la Pitié Salpêtrière, situé à Paris.

7.2.1 Préparation du stock viral

Les solutions stock de virus sont réalisées à partir de cellules VERO arrivées à confluence. Le milieu de culture est retiré de la flasque et le tapis est infecté avec 5ml d'une suspension virale, préparée dans du MEM complémenté à partir de 500 µl de solution stock. Après 2 h d'incubation à 37°C sous 5% CO₂, la suspension virale est retirée et remplacée par 30 ml de milieu MEM complémenté. Après 3 jours d'incubation, correspondant à 3 à 4 cycles de réplication du virus, les cellules infectées sont éclatées par deux cycles successifs de congélation – décongélation à -20°C. La suspension obtenue est alors clarifiée par centrifugation à 10 000 g et à 4°C, afin de concentrer les virions dans le surnageant. La solution stock ainsi obtenue est répartie dans des cryotubes à hauteur de 1 ml / tube et conservée à -80°C.

7.2.2 Détermination du titre infectieux des solutions stocks

Les titres infectieux sont déterminés pour chaque lot de solution stock produits. Le titrage viral consiste en un dénombrement des particules virales capables d'infecter des cellules permissives, présentes dans une unité de volume. Pour cela la méthode des dilutions limites décrites par Reed and Muench (1938) a été utilisée et combinée à la mesure de viabilité cellulaire par coloration au rouge neutre.

L'évaluation a été réalisée en microplaque 96 puits d'après le schéma présenté dans la Figure 18. Une suspension cellulaire dont la concentration est établie à 350 000 cellules/ ml lors d'une étape de comptage sur cellule de Malassez est réalisée dans du milieu MEM complétement. La suspension cellulaire est distribuée dans l'ensemble des puits de la microplaque à hauteur de 100 µl par puits afin d'obtenir une quantité finale de 35 000 cellules/puits. Les puits des colonnes 1 à 10 sont complétés avec 50 µl de MEM complétement, tandis que les témoins cellulaires (colonnes 11 et 12) sont complétés avec 100 µl de MEM complétement. La suspension virale stock est diluée en cascade au 1/10^e afin d'obtenir des concentrations de l'ordre de 10⁻¹ à 10⁻⁸. Les suspensions diluées obtenues sont alors distribuées dans les puits correspondant à hauteur de 50 µl.

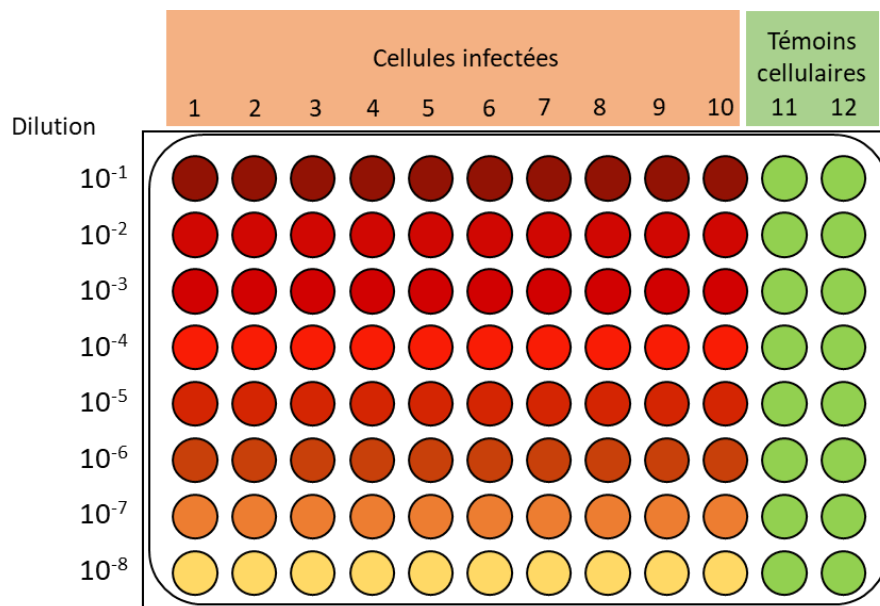


Figure 18 : Organisation de la microplaque observée pour la réalisation du titrage de VHS-1.

Les plaques sont ensuite incubées 72h à 37°C sous 5% de CO₂, afin de permettre la réalisation des cycles de multiplication du virus. L'effet du bourgeonnement du virus peut alors être observé sur les cellules VERO qui présentent une forme caractéristique : un gonflement des noyaux et des cellules peut être observé, celles-ci présentent une forme de chapelet qui s'oppose au tapis cellulaire confluent normalement observé. La dose infectieuse 50% (DI₅₀) est établie comme la dose infectieuse produisant un effet cytotytique total dans 50% des essais.

7.2.2.1 Titration virale selon la méthode des dilutions limites

Cette méthode mise en place par Reed and Muench (1938), permet de réaliser le calcul de la dose infectieuse à 50%. Comme le nombre d'essais est en pratique limité, Reed et Muench préconisent d'augmenter artificiellement le nombre d'essais par dilution en utilisant le procédé des totaux cumulatifs dont un exemple est présenté dans le tableau 7.

Si un effet positif est obtenu à une dilution, la réponse sera également positive pour les dilutions inférieures. Inversement, si un effet est négatif à une dilution, il sera semblable aux dilutions supérieures. Les pourcentages de mortalité sont calculés pour chaque dilution. Si le point 50% ne correspond pas exactement à l'une des dilutions, sa distance proportionnelle (d) à la dilution immédiatement inférieure est calculée selon la formule suivante

$$d = \frac{A - 50}{A - B}$$

où A est le pourcentage de mortalité à la dilution immédiatement supérieure et B le pourcentage de mortalité à la dilution immédiatement inférieure.

Le logarithme du titre infectieux est le logarithme de la dilution qui donne un pourcentage d'effet positif immédiatement supérieur à 50% avec la distance proportionnelle multipliée par le logarithme du facteur de dilution. À partir de la valeur du titre infectieux de la suspension virale, il est possible de déterminer la multiplicité d'infection MOI (Multiplicity Of Infection). Elle correspond à la dose infectieuse divisée par le nombre de cellules par mL et intervient dans l'évaluation de l'activité antivirale :

$$MOI = \frac{DI_{50}/ml}{C_{cellules}}$$

Où DI_{50} est la dose infectieuse 50% ramenée à 1 ml et $C_{cellules}$ la concentration en cellules VERO / ml.

Tableau 7 : Exemple de calcul du facteur d utilisé pour le calcul du titre infectieux de VHS-1 selon la méthode des dilutions limites.

Dilution	Nombre de puits contenant des cellules		Somme des puits contenant des cellules		Taux de mortalité	%	Position de d pour %>50%
	Mortes	Vivantes	Mortes	Vivantes			
10 ⁻¹	10	0	61	0	61/61	100	
10 ⁻²	10	0	51	0	51/51	100	
10 ⁻³	10	0	41	0	41/41	100	
10 ⁻⁴	10	0	31	0	31/31	100	
10 ⁻⁵	10	0	21	0	21/21	100	
10 ⁻⁶	9	1	11	1	11/12	92	d
10 ⁻⁷	2	8	2	9	2/11	18	
10 ⁻⁸	0	10	0	19	0/19	0	

Dans ce cas :

$$d = \frac{A - 50}{A - B}$$

$$= \frac{92 - 50}{92 - 18}$$

$$= 0,57$$

$$\text{Log DI}_{50} = \text{Log } 10^{(\text{dilution de } d)} + d$$

$$= \text{Log } 10^6 + 0,57$$

$$= 6,57$$

Pour 50 µl de suspension virale, le titre infectieux est de 10^{6,57}

Pour 1 ml de suspension virale, le titre infectieux est donc de 2 x 10^{7,57}

7.2.2.2 Mesure de viabilité cellulaire

Dans cette étude, le pourcentage de mortalité est évalué par une coloration au rouge neutre, d'après le protocole présenté par Hardouin *et al.* (2014). Ce colorant vital ne pénètre que les cellules métaboliquement actives. Le degré de coloration obtenu dans chaque puits après solubilisation sera donc proportionnel à la quantité de cellules vivantes présentes. La concentration de rouge neutre est évaluée par une mesure d'absorbance à 540 nm et permet d'exprimer un pourcentage de mortalité.

À l'issue des 72h de multiplication virale, 50 µl d'une solution de rouge neutre (0,15 g de rouge neutre (Thermo Fisher Scientific) dans 100 mL de sérum physiologique (pH 5,5)) sont ajoutés dans l'ensemble des puits. Les plaques sont à nouveau incubées pendant 45 min. Le surnageant est ensuite retiré par aspiration et les puits sont rincés avec 200 µl de PBS (Phosphate Buffered Saline) afin de retirer l'excédent de rouge neutre. Un tampon citrate-éthanol est alors ajouté à hauteur de 100 µl afin d'éclater les cellules et solubiliser le rouge neutre. Ce tampon est préparé à partir d'un volume d'éthanol absolu et d'un volume de tampon Sorensen (V/V ; solution A : 21 g d'acide citrique, 200 mL NaOH 1N qsp 1 L d'eau / solution B : HCl 0,1 N).

L'absorbance 540 nm est alors déterminée pour chaque puits et l'absorbance moyenne est calculée pour chaque série de dilutions. Le pourcentage de viabilité est déterminé pour chaque concentration de virus, par rapport à l'absorbance obtenue pour le témoin cellulaire correspondant au 100%.

7.3 Évaluation de l'activité cytotoxique des huiles essentielles et mélanges

Les concentrations toxiques des HE sur le modèle cellulaire doivent être déterminées avant d'évaluer leur activité antivirale (Hardouin *et al.*, 2014). La mesure est réalisée en microplaque, sur un tapis cellulaire de 24h. Pour cela, une suspension cellulaire à 350 000 cellules /ml de milieu MEM complémenté est réalisée et 100 µl sont déposés dans l'ensemble des puits. Le volume est ajusté à 200 µl avec du MEM complémenté. Les plaques sont incubées pendant 24h à 37°C et 5% CO₂, afin de permettre l'adhésion des cellules.

Les HE sont testées sur une gamme de concentration large, de 500 à 15 µg/ml. Elles sont solubilisées dans le milieu à l'aide d'éthanol, apporté à une concentration finale de 1% sur les cellules. La réalisation d'un témoin négatif permet de montrer que cette concentration en éthanol n'est pas toxique. Un témoin positif contenant 10% d'éthanol est également réalisé.

Après incubation, le milieu de culture est retiré par aspiration et remplacé par 200 µl des différentes solutions à tester. Un témoin cellulaire contenant 200 µl de milieu MEM complétement est également réalisé. Les plaques sont à nouveau incubées pour 48h afin d'évaluer la toxicité des HE.

Après observation microscopique, les cellules sont marquées par ajout de 20 µl d'une solution de MTT à 2,5 mg/ml. Après 1h, le surnageant est retiré par aspiration et le formazan métabolisé par les cellules actives est solubilisé par ajout de 100 µl de DMSO sur les cellules. Le contenu des puits est homogénéisé par aspiration/refoulement avant la lecture d'absorbance à 550 nm. Le pourcentage d'inhibition de la viabilité (I%) est alors calculé d'après la formule suivante :

$$I(\%) = \frac{A_{\text{témoin}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{témoin}}} \times 100$$

Où $A_{\text{témoin}}$ est l'absorbance obtenue pour le témoin négatif avec 1% d'éthanol et $A_{\text{échantillon}}$ l'absorbance obtenue avec les différentes concentrations en HE. La concentration impliquant 50% d'inhibition (CC_{50}) est déterminée pour chaque échantillon par régression linéaire.

7.4 Mise en évidence des activités anti-herpétique

Dans un premier temps, les HE sont ajoutées à des concentrations non cytotoxiques sur les cellules, en même temps que le virus. L'analyse est réalisée sur un tapis cellulaire préformé dans les conditions décrites précédemment (§7.3), selon un protocole adapté à partir des travaux présentés par Hardouin *et al.* (2014). Les HE et mélanges sont dilués dans du MEM complétement afin d'obtenir des concentrations finales maximales n'induisant pas de cytotoxicité. Les solutions obtenues sont alors ajoutées à hauteur de 100 µl par puits et le volume est ajusté à 150 µl par ajout de MEM complétement. Le Zovirax®, un anti-herpétique commercial est utilisé comme témoin positif et testé à des concentrations finales de 5 à 0,05 µg/ml. Une suspension virale de MOI = 0,001 est préparée à partir des solution stock et ajoutée à hauteur de 50 µl dans les puits. Les témoins cellulaires et virus sont également réalisés et sont constitués respectivement de 200 µl de MEM ou de 150 µl de MEM complétement et 50 µl de la suspension virale.

Les plaques sont ensuite incubées à 37°C et 5% de CO₂ et observées quotidiennement au microscope. Lorsque les effets cytolitiques sont observés, soit après 48h, la viabilité cellulaire est évaluée au MTT selon la méthode décrite plus haut (§7.3).

7.5 Recherche d'activité par mode d'action

L'étude de l'activité anti-herpétique est poursuivie afin de préciser le mécanisme d'action des HE. Pour cela, trois études supplémentaires sont nécessaires, au cours desquelles les HE sont apportées à différents moments du cycle de réplication du virus. Le protocole utilisé a été adapté des travaux de Hardouin *et al.* (2014), dans des conditions de prétraitement semblables à celles présentées par Navid *et al.* (2013).

7.5.1 Activité cytoprotectrice des huiles essentielles

La capacité des HE à inhiber l'adhésion du virus ainsi que son entrée dans la cellule cible est testée ici. L'analyse est réalisée sur un tapis cellulaire préformé dans les mêmes conditions que précédemment (§7.3). Les HE et mélanges sont dilués dans du MEM complétés afin d'obtenir des concentrations finales maximales n'induisant pas de cytotoxicité. Les solutions obtenues sont alors ajoutées à hauteur de 200 µl après aspiration du surnageant. Le pré-traitement des cellules est poursuivi pendant 1h à 37°C et 5% CO₂ avant de retirer le surnageant par aspiration. 150 µl de milieu MEM sont alors ajoutés aux puits préalablement vidés et les cellules sont infectées avec 50 µl de suspension virale à une MOI de 0,001. À nouveau des témoins positifs constitués de cellules non infectées et non traitées et des témoins négatifs constitué de cellules infectées mais non traitées sont réalisés.

Les cellules sont à nouveau incubées pendant 1h à 37°C et 5% CO₂ avant de retirer le virus non adhérent par aspiration. Les cellules sont ensuite remises en culture dans 200 µl de MEM et incubées à 37°C et 5% CO₂ pendant 48h avant de marquer les cellules au MTT afin de suivre la viabilité, comme expliqué plus haut (§7.3).

7.5.2 Activité virucide des huiles essentielles

La capacité des HE à dégrader le virus est évaluée ici. L'analyse est réalisée sur un tapis cellulaire préformé dans les mêmes conditions que précédemment (§7.3). Les HE et mélanges sont dilués dans du MEM complété afin d'obtenir des concentrations finales maximales

n'induisant pas de cytotoxicité. Les solutions obtenues sont alors ajoutées à hauteur de 100 µl dans une microplaque neuve et le volume est ajusté à 150 µl par ajout de MEM complétement. La suspension virale à une MOI de 0,001 est alors ajoutée dans les différents puits à hauteur de 50 µl. Un témoin positif constitué de 200 µl de MEM complétement est réalisé et un témoin négatif contenant 50 µl de virus dans 150 µl de MEM complétement est également effectué. Cette microplaque est incubée 1h à 37°C et 5% CO₂.

Les tapis cellulaires préalablement formés dans une deuxième microplaque sont ensuite infectés avec ces suspensions virales. Le contenu de la première microplaque est transvasé en miroir dans la seconde, après que celle-ci ait été vidée de son contenu. L'infection des cellules est alors poursuivie pendant 1h à 37°C et 5% CO₂.

Une fois l'étape d'adhésion effectuée le virus excédentaire est retiré par aspiration du surnageant. Les cellules sont ensuite remises en culture dans 200 µl de MEM et incubées à 37°C et 5% CO₂ pendant 48h avant de marquer les cellules au MTT afin de suivre la viabilité, comme expliqué plus haut (§7.3).

7.5.3 Inhibition de la réplication du virus par les huiles essentielles

Cette dernière analyse permet de montrer la capacité des HE à inhiber la réplication du virus après son entrée dans la cellule. L'analyse est réalisée sur un tapis cellulaire préformé dans les mêmes conditions que précédemment (§7.3). Après retrait du milieu de culture les cellules sont infectées par une suspension virale à une MOI de 0,001, ajoutée à hauteur de 50 µl. Le volume des puits est ajusté à 200 µl par ajout de MEM complétement. Un témoin positif constitué de 200 µl de MEM complétement est réalisé ainsi qu'un témoin négatif contenant 50 µl de virus et 150 µl de MEM. La microplaque est incubée 1h à 37°C et 5% CO₂ afin de permettre l'adhésion du virus sur les cellules.

Le surnageant contenant le virus non adhérent est ensuite retiré et remplacé par 200 µl des différentes solutions d'HE et de mélanges dont les concentrations maximales n'induisent pas de cytotoxicité. Les plaques sont à nouveau incubées 48h à 37°C et 5% CO₂ avant de marquer les cellules au MTT afin de suivre la viabilité, comme expliqué plus haut (§7.3).

7.6 Calcul de la viabilité cellulaire

Après révélation des cellules par une coloration au MTT, l'absorbance des différents puits est mesurée à 550 nm. Le pourcentage de protection (I%) apporté par les HE est donné par l'équation suivante :

$$I\% = \frac{(A_{\text{Essais}} - A_{\text{Témoin virus}})}{(A_{\text{Témoin cellule}} - A_{\text{Témoin virus}})} \times 100$$

Où A_{Essais} est l'absorbance obtenue après traitement par les différents échantillons, $A_{\text{Témoin virus}}$ l'absorbance obtenue pour les cellules infectées non traitées et $A_{\text{Témoin cellule}}$ l'absorbance obtenue pour les cellules non infectées.

8 Utilisation du modèle *Caenorhabditis elegans* pour l'évaluation de l'activité vermifuge

Caenorhabditis elegans est un nématode d'environ 1mm de long utilisé au laboratoire comme organisme modèle pour la recherche de nombreuses activités biologiques. Sa petite taille, sa transparence et la possibilité de le maintenir sur gélose en fait un organisme de recherche idéal. Appartenant à la famille des nématodes, il est utilisé ici comme un modèle d'étude pour les activités nématocides des mélanges digestifs.

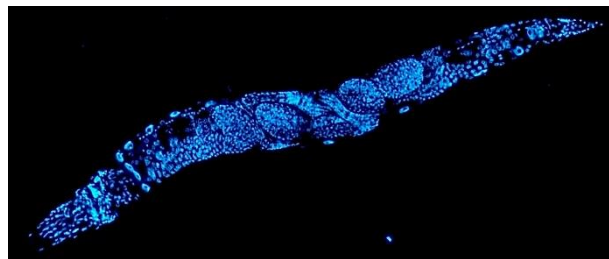


Figure 19 : Observation de *C. elegans* réalisée en microscopie à épifluorescence après marquage des noyaux au DAPI.

8.1 Culture des nématodes

Les nématodes *Caenorhabditis elegans* sont maintenus à 15°C sur le milieu gélosé « Nematode Growth Medium » (NGM) selon les méthodes décrites par Porta-de-la-Riva *et al.* (2012). Le milieu NGM de composition suivante : 3,0 g/L de NaCl, 2,5 g/L de peptone, 17,0

g/L d'agar, 1 mM CaCl₂, 1mM MgSO₄, 25mM KPO₄ et 5mg/L cholestérol ; est coulé en boîtes de pétri de Ø10 cm après stérilisation.

La bactérie *E. coli* OP50 sert de nourriture au nématode. La souche est cultivée en milieu LB à 37°C avant d'être déposée sur le milieu NGM. La bactérie étant auxotrophe à l'uracile, sa culture sur milieu NGM va provoquer une croissance limitée à un cercle de 2 à 3 cm de diamètre.

Chaque semaine, quelques vers sont transférés stérilement vers de nouvelles boîtes,ensemencées avec *E. coli* OP50. L'opération, réalisée stérilement sous une loupe binoculaire (Olympus Corporation, Tokyo, Japon) avec grossissement x20, est effectuée à l'aide d'un pic en platine préalablement stérilisé à la flamme.

8.2 Synchronisation

La synchronisation est effectuée d'après la méthode décrite par Porta-de-la-Riva *et al.* (2012), à partir de cultures de nématodes contenant un grand nombre d'adultes gravides. Les nématodes présents en surface de la gélose sont recueillis dans 5 ml de milieu liquide M9 (KH₂PO₄ 3 g/l, Na₂HPO₄ 6 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH₄Cl 1 g/l, pH 6). Les bactéries présentes dans la suspension sont éliminées par une série de 3 lavages, effectués après 1 min de centrifugation à 1500 rpm. Le culot contenant les vers est ensuite resuspendu dans 1ml de M9, auquel est ajouté 1ml de la solution de « bleaching » (1,00 ml d'hypochlorite de sodium à 4%, 1,25 ml d'hydroxyde de sodium 1M, et 2,75 ml d'eau distillée). Cette étape est poursuivie pour une durée maximale de 6 min et contrôlée sous la loupe pour observer la libération des œufs. La réaction est ensuite stoppée par ajout de 10 ml de M9 et 3 lavages sont immédiatement réalisés comme indiqué plus haut.

Les nématodes sont finalement repris dans un volume de 15 ml de M9 et incubés à 15°C sous agitation, pour permettre une bonne aération du milieu. Les larves bloquées au stades L1 en raison de l'absence de nourriture sont récupérées le lendemain, par centrifugation douce. Elles peuvent être maintenue au stade L1 pendant 1 semaine en milieu liquide M9 et en absence de nourriture, à 15°C. Pour obtenir des nématodes aux stades suivants, les larves L1 récupérées sont déposées sur des géloses NGMensemencées avec OP50 et incubées à 22°C (développement plus rapide) jusqu'à ce que le stade attendu soit atteint. Le cycle de développement observé par le nématode *C. elegans* est présenté dans la figure 20.

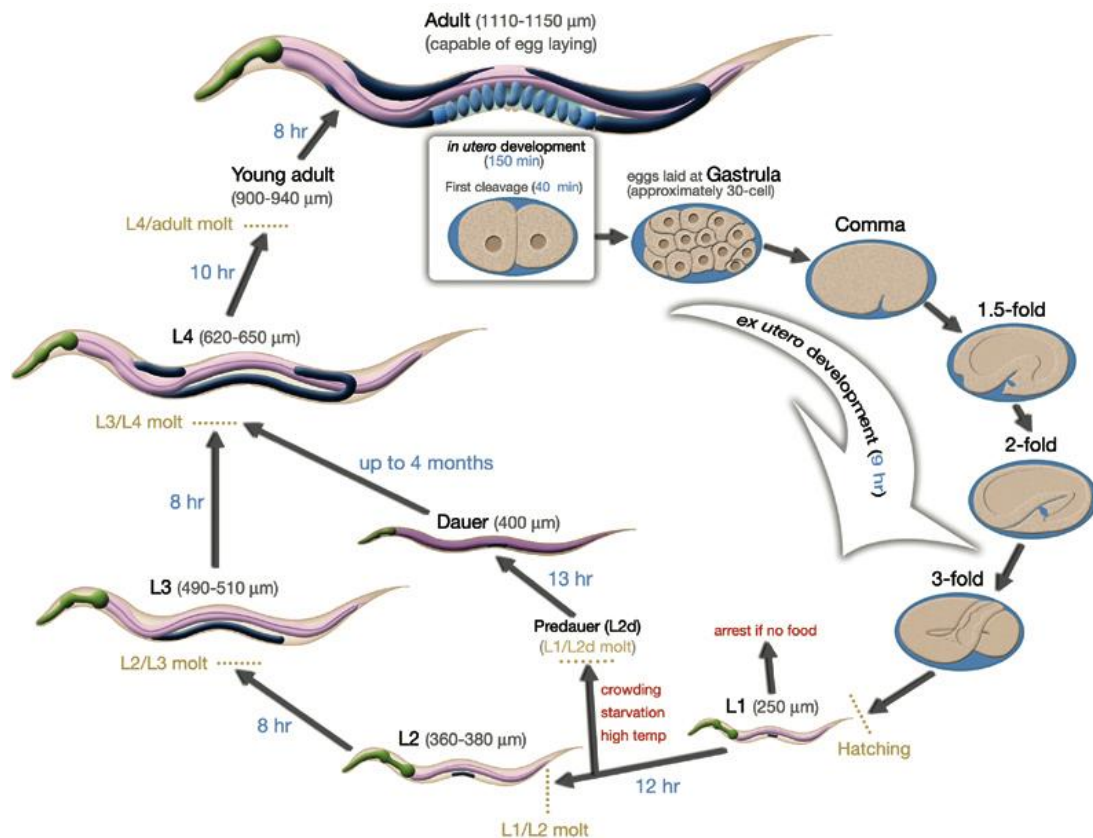


Figure 20 : Cycle de développement du nématode *Caenorhabditis elegans* (Wormbase).

8.3 Évaluation de l'activité nématicide

L'analyse de l'activité nématicide a été réalisée sur des vers au stade L1 grâce à un protocole adapté des travaux de Lei *et al.* (2010). À l'issue de l'éclosion des œufs après synchronisation, les vers sont récupérés dans 15 ml de M9 et dénombrés. Les mélanges sont dilués dans du M9 à l'aide d'une solution à 10% de Simulsol® stérile et testés dans une gamme de concentrations finales de 200 à 50 µg/ml (comme précédemment, le Simulsol® est ajouté dans un volume égal à celui des HE). 500 µl de ces solutions sont déposés dans les puits d'une plaque 24 puits. Un volume de la suspension de nématode est ensuite ajouté, afin d'obtenir environ 50 vers par puits. Le volume final de l'ensemble des puits est ensuite ajusté à 1 ml avec du M9. Deux témoins négatifs consistant en 1ml de M9 ou 1 ml de M9 contenant 0,02% de Simulsol® sont également réalisés.

Les plaques sont ensuite incubées 24h à 15°C puis les vers sont dénombrés en différenciant les vivants des morts. Un nématode est considéré comme mort s'il ne répond pas par un mouvement en cas d'agitation légère de la plaque et qu'aucun mouvement du pharynx

n'est observé. Le pourcentage de mortalité est ensuite calculé et comparé au témoin Simulsol®. La DL₅₀, considérée comme la concentration provoquant la mort de 50% des individus est ensuite calculée par régression linéaire.

9 Inhibition des biofilms de *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* et *Streptococcus uberis*

9.1 Formation des biofilms bactériens

Afin de permettre une analyse rapide, le développement de biofilm est réalisé dans des microplaques 96 puits (Greiner BioOne). Les mélanges ont été testés dans une gamme de concentrations (8 points) inférieures à leur CMI. Les dilutions en cascades sont réalisées en microplaque dans du BHI (Conda), à partir de solutions mères de concentrations égales à deux fois la CMI du mélange. La solubilisation des mélanges dans les solutions mères constituées de BHI est permise par l'ajout d'un volume équivalent en Simulsol® (Seppic SA). Le volume final de solution dans chaque puits est de 100 µl. Deux témoins sont également réalisés à partir de 100 µl de BHI pure et de 100 µl de BHI additionné de Simulsol® à la concentration maximale appliquée.

Pour chaque bactérie, une suspension d'absorbance 0,2 à 600nm est réalisée dans le BHI, à partir de pré-cultures. Cette suspension est répartie dans l'ensemble des puits à hauteur de 100 µl. Les microplaques sont incubées 24h à 37°C afin de permettre le développement des biofilms.

9.2 Révélation des biofilms par ajout de MTT

Après maturation du biofilm, la biomasse métaboliquement active est marquée par ajout de 20 µl d'une solution de MTT (Sigma Aldrich) à 2,5 mg/ml dans du BHI. Les plaques sont incubées 1h à 37°C pour permettre le développement du formazan. Le surnageant est ensuite retiré et les puits sont rincés délicatement au SPS pour retirer les bactéries planctoniques. Le formazan est ensuite solubilisé par ajout de 200 µl de DMSO (Thermo Fisher Scientific).

La concentration en formazan étant proportionnelle à la concentration en bactérie, celle-ci peut être déterminée par mesure d'absorbance à 550 nm. Le pourcentage d'inhibition des biofilms est alors calculé dans chaque condition par l'équation suivante :

$$I(\%) = \frac{A_{\text{témoin}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{témoin}}} \times 100$$

Où $A_{\text{témoin}}$ est l'absorbance obtenue pour le témoin négatif avec simulsol et $A_{\text{échantillon}}$ l'absorbance obtenue avec les différentes concentrations.

9.3 Observation du biofilm par microscopie confocale à balayage laser

À l'issue de la maturation des biofilms en microplaque noir (Greiner Bio One), 100 μ l de surnageant sont retirés et remplacés par une solution de Syto61 (λ excitation = 628 nm et λ émission = 645 nm, Invitrogen) à 5 μ M.

Les biofilms sont observés au Microscope Confocal à Balayage Laser (MCBL, Zeiss) avec un objectif à x20. Les prises de vues sont réalisées dans les différentes couches du biofilm afin d'en obtenir une représentation tridimensionnelle. Les épaisseurs moyennes, et maximales ainsi que les biovolumes bactériens sont déterminés pour chaque condition testée à l'aide du programme COMSTAT2® (Givskov *et al.*, 2000; <http://www.comstat.dk/>, 2015; Vorregaard & Lyngby, 2008).

10 Evaluation des activités immunomodulatrices sur le modèle cellulaire RAW

264.7

Les cellules RAW 264.7 appartiennent à une lignée de macrophages isolée de la souris (*Mus musculus*). Ce sont des cellules adhérentes capables de phagocytose et utilisées ici pour leur capacité à répondre à des stimuli inflammatoires tels que la présence de lipopolysaccharides (LPS). Les analyses suivantes ont été mises au point et réalisées en collaboration avec le laboratoire HCS-Pharma, situé à Rennes.

10.1 Méthode de culture des cellules RAW 264.7

Les cellules RAW 264.7 ont ici été maintenues dans des flasques de 75 cm², incubées à 37°C sous une atmosphère enrichie à 5% de CO₂. Le milieu utilisé pour leur culture est le Milieu Essentiel Minimum avec des sels de Earle (MEM, Dutcher) complété par 10% de sérum de Veau Foetal (SVF, Dutcher), 2mM de L-Glutamine (Dutcher) et par un mélange

d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine ; 100 UI/ml et 100 µg/ml respectivement) afin d'éviter l'apparition de contaminations. Ce milieu sera appelé MEM complémenté par la suite.

Les passages cellulaires sont réalisés lorsqu'une confluence de 80% est observée. Le milieu de culture usagé est alors retiré de la flasque et les cellules sont décollées par ajout d'1ml de trypsine, qui est laissée en contact des cellules pendant 3 à 5 min à 37°C. L'activité de la trypsine est alors stoppée par ajout de 9 ml de MEM complémenté et les cellules sont resuspendues par raclage à l'aide d'un râteau stérile.

Les cellules sont récoltées par une centrifugation de 5 min à 1000 RPM effectuée à 4°C. Cette opération permet d'éliminer la trypsine, potentiellement dommageable pour les cellules. Le surnageant est éliminé et les cellules sont resuspendues dans 10 ml de milieu MEM complémenté. Une nouvelle culture est alors réalisée à partir de cette suspension avec un ratio de 1 :6, dans un volume final de 15 ml de MEM complémenté. Pour les différentes étapes présentées ci-dessous, les cellules ont été utilisées à des passages inférieurs à 10.

Pour la préparation des différents essais, la suspension cellulaire obtenue après centrifugation est homogénéisée par aspiration et refoulement dans une seringue avec aiguille, afin de séparer les cellules et permettre leur comptage. Une aliquote de 50µl de la suspension cellulaire est alors reprise dans 900 µl de milieu auxquels sont ajoutés 50µl de bleu trypan à 0,5%. Le comptage des cellules vivantes (colorées en bleu) est alors réalisé en cellule de Nageotte et la suspension mère est diluée afin d'obtenir la concentration en cellules viables attendue dans chaque cas.

10.2 Évaluation de la cytotoxicité des mélanges, des huiles essentielles et des composés majoritaires

Les activités cytotoxiques des mélanges, des HE et de composés principaux (carvacrol et cinnamaldehyde (Sigma Aldrich)) ont été établies en microplaques 96 puits adaptées à la microscopie à épifluorescence (Greiner Bio-One). Afin d'éviter les effets de diffusion, chaque échantillon est testé indépendamment. Le plan de plaque utilisé est décrit dans la figure 21.

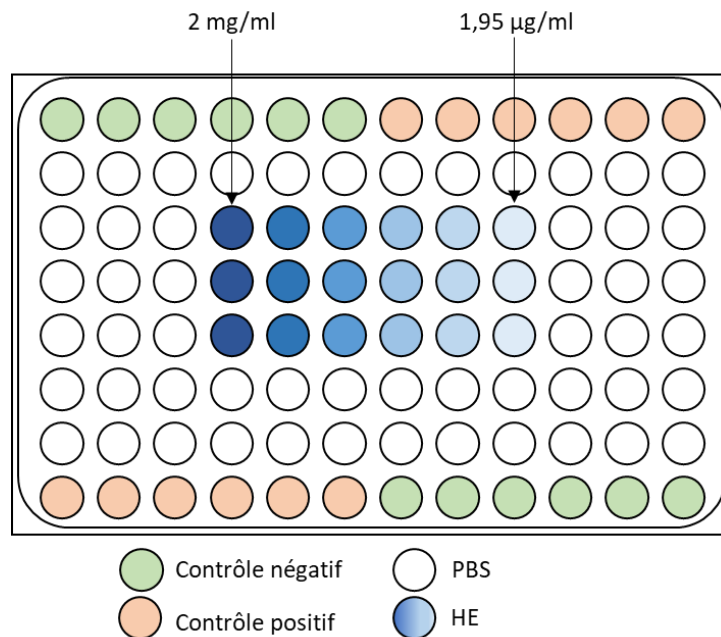


Figure 21 : Schéma du plan de plaque utilisé pour l'évaluation de la cytotoxicité des HE sur les cellules RAW 264.7

Une suspension de cellules RAW 264.7 est préparée comme décrit dans le paragraphe 10.1 et diluée à une concentration de 500 000 cellules/ml. Cette concentration permet d'obtenir une quantité finale de 50 000 cellules par puits lors d'un dépôt de 100 µl de suspension par puits. Une fois la suspension cellulaire déposée dans la microplaque, celle-ci est incubée à 37°C pendant 6h afin de laisser les cellules adhérer et se reconstituer après les effets de la trypsine.

Des microplaques contenant les différentes conditions testées sont préparées en parallèle. Les dilutions d'HE sont préparées dans la microplaque à des concentrations 2X de 4,00 mg/ml à 3,90 µg/ml ou de 2,00 mg/ml à 1,95 µg/ml. Pour se faire, une solution mère à 20 mg/ml est réalisée dans du milieu MEM complémenté, auquel est ajouté 3% de DMSO pour permettre la solubilisation des HE. Cette solution est alors respectivement diluée au 1/10^e ou au 1/5^e afin d'obtenir la première concentration testée de chaque gamme. Cette solution est alors

déposée dans la microplaque à hauteur de 200 µl. Des dilutions en cascade au ¼ sont ensuite réalisées directement dans la microplaque, avec un volume final de 240 µl. Les témoins positifs et négatifs, réalisés dans du milieu MEM complétement et constitués respectivement de méthyl methanesulfonate (MMS, Sigma Aldrich) à 5µM et de DMSO à 0,5% sont également effectués.

À l'issue des 6h d'incubation, 100 µl des solutions préparées sont ajoutés en miroir sur les cellules, afin d'obtenir un volume final de 200 µl. Les puits non utilisés sont remplis de 200 µl de PBS, afin de limiter l'évaporation. Les microplaques sont ensuite incubées 24h à 37°C sous atmosphère enrichie en 5% de CO₂.

La cytotoxicité est évaluée après 24h de contact, par la réalisation d'un double marquage : l'ensemble des cellules présentes sont marquées par le fluorochrome intercalant Hoechst 33342 (λ excitation = 361 nm et λ émission = 497 nm, Thermo Fisher Scientific) alors que les cellules en apoptose sont identifiées par l'iodure de propidium (IP, λ excitation = 535 nm et λ émission = 617 nm, Thermo Fisher Scientific). Pour le marquage, le milieu de culture est retiré par aspiration et les puits subissent un lavage au PBS. Les solutions commerciales des marqueurs sont diluées dans le PBS avec un ratio de 1 :1000 et ajoutées sur les cellules à hauteur de 100µl. Après 15 minutes de marquage, les cellules sont observées au microscope à épifluorescence (ImageXpress Micro XLS, Molecular Devices, San Jose, CA, États-Unis d'Amérique) et 4 images par puits sont réalisées. Ces essais sont réalisés en trois réplicas indépendants.

10.3 Conditions de prétraitement des macrophages

Les macrophages subissent un prétraitement de 24h avec les différents échantillons afin d'observer les effets des HE sur la phagocytose. L'option du prétraitement a été choisie afin de se rapprocher au maximum des conditions d'utilisation future des produits et d'observer un effet préventif plutôt que curatif.

À nouveau, une suspension de cellules RAW 264.7 est préparée et diluée à une concentration de 100 000 cellules/ml. Cette concentration permet d'obtenir 10 000 cellules/puits lorsqu'un dépôt de 100 µl est réalisé. La quantité de cellules par puits a été établie après optimisation et permet un accès optimal des cellules aux particules bactériennes. À nouveau, les microplaques adaptées à l'utilisation de la fluorescence (Greiner Bio One) sont incubées pendant 6h après dépôt des cellules.

Les dilutions d'échantillons sont préparées dans une seconde microplaque, à raison de 3 échantillons par plaque. Les résultats de cytotoxicité ont permis la sélection de concentrations non cytotoxiques pour chaque échantillon : les plus toxiques sont testés aux concentrations finales de 10, 1 et 0,1 µg/ml alors que les moins toxiques sont testés aux concentrations finales de 100, 10 et 1 µg/ml. Les solutions sont préparées dans du MEM complétés à des concentrations 2X et solubilisées avec 1% de DMSO. Elles sont déposées dans la microplaque à hauteur de 75 µl.

Les échantillons sont testés avec ou sans ajout de lipopolysaccharides (LPS, Thermo Fisher Scientific) à une concentration finale de 0,1 µg/ml. Une solution de LPS à 0,2 µg/ml est alors préparée dans du MEM complété et ajoutée à hauteur de 75 µl aux solutions d'HE concernées. Dans les autres puits (prétraitement sans LPS), 75 µl de MEM complété sont ajoutés aux solutions d'HE. Les témoins positifs et négatifs constitués respectivement de 0.1 µg/ml de LPS ou de MEM complété à 0,5% de DMSO sont également réalisés.

Après incubation des cellules pendant 6h, le surnageant est retiré par aspiration et 100 µl des différentes solutions de prétraitement préalablement préparées sont ajoutées en miroir sur les cellules. Les plaques sont une nouvelle fois incubées à 37°C et 5% de CO₂ pendant 24h.

10.4 Évaluation des activités immunomodulatrices

L'effet des différentes conditions de prétraitement sur la réponse des cellules RAW à un stimulus inflammatoire est observé. Pour cela, trois analyses successives sont effectuées sur les même cellules.

10.4.1 Effet des traitements sur la phagocytose

Dans un premier temps l'effet sur la capacité des cellules macrophages à effectuer la phagocytose est étudiée à l'aide du marqueur pHrodo® (Thermo Fisher Scientific). Ce produit consiste en des particules bactériennes, produites à partir de *Staphylococcus aureus*, couplées à la rhodamine et dont la fluorescence est dépendante du pH. La fluorescence est absente à l'extérieur de la cellule mais présente en cas d'intégration dans un phagosome de pH<6. Ainsi, ces particules permettent de détecter spécifiquement les activités de phagocytose ou d'endocytose et sont adaptées à l'imagerie en continue (Live Cell Imaging). Le principe de la méthode est schématisé dans la figure 22.

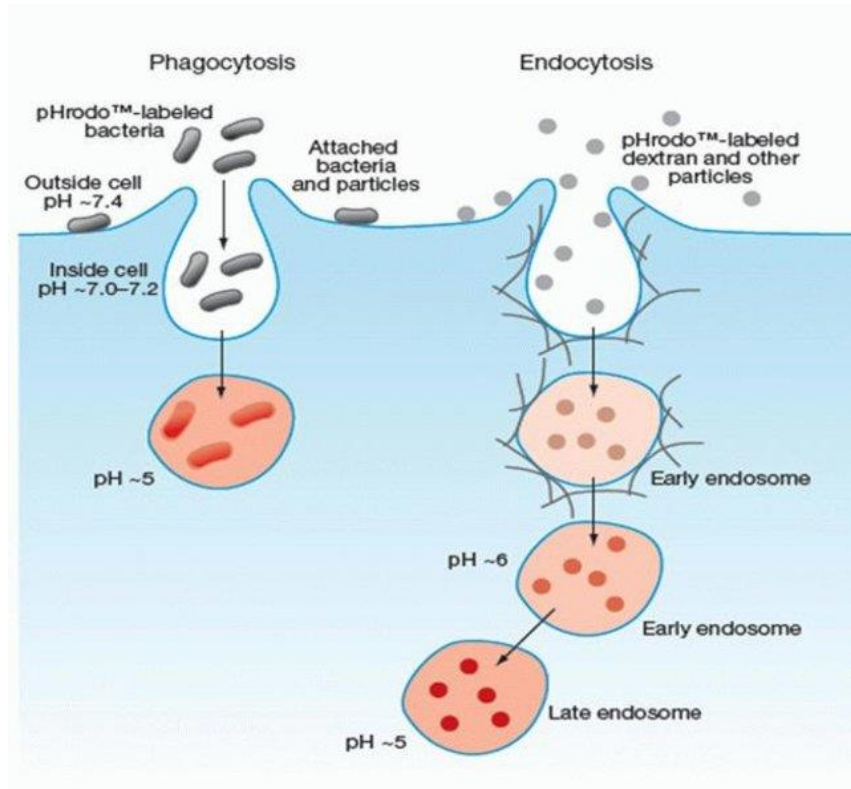


Figure 22 : Schéma du principe de marquage par la sonde pHrodo (“pHrodo Red *E. coli* BioParticles Conjugate for Phagocytosis - Thermo Fisher Scientific,” n.d.)

À l’issue du prétraitement le surnageant est retiré par aspiration et les cellules sont lavées avec 100 µl de PBS pour retirer les traces d’échantillons. Une solution de MEM complétement contenant les sondes pHrodo (λ excitation = 560 nm et λ émission = 585 nm) à 0,1 mg/ml et le marqueur Hoechst (λ excitation = 361 nm et λ émission = 497 nm) à une dilution de 1 :1000 est ajoutée sur les cellules à hauteur de 100 µl. Des images sont réalisées immédiatement puis toutes les heures pendant 2h, au microscope à épifluorescence (ImageXpress Micro XLS, Molecular Devices). Entre les étapes d’imagerie, les cellules sont incubées à 37°C sous 5% de CO₂.

10.4.2 Effet des traitements sur l’expression de l’iNOS

La production de Monoxyde d’azote (NO) est induite dans les macrophages lors de la réponse inflammatoire. Il intervient dans la dégradation des pathogènes mais joue également le rôle de messenger. La nitroxyde synthase (NOS) est une oxydase d’~130 kDa qui existe dans différents tissus, mais est présente sous une forme inductible dans les macrophages (iNOS). Son activité est notamment induite par les cytokines et les endotoxines comme le LPS.

Après l'étape de phagocytose, les surnageants sont récupérés et congelés. Les cellules sont lavées avec 100 µl de PBS afin de retirer les particules non phagocytées et fixées au formaldéhyde (Dominique Dutscher) pendant 10 minutes. Une fois la fixation terminée, le formaldéhyde est retiré et les cellules sont lavées deux fois au PBS avant de réaliser l'immunomarquage. L'anticorps primaire spécifique à l'iNOS de macrophages murins (ABR iNOS, Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific) est déposé sur les cellules après dilution de la solution commerciale à un ratio de 1 :250 dans du PBS. L'anticorps est laissé pendant 3h en contact des cellules avant rinçage. L'anticorps secondaire, spécifique aux anticorps de lapins et fluorescent est ensuite ajouté pendant 1h. Enfin, un dernier rinçage est réalisé pour retirer l'excédent d'anticorps secondaires et les cellules sont observées au microscope à épifluorescence (ImageXpress Micro XLS, Molecular Devices).

10.4.3 Effet des traitements sur la production d'IL-1 et IL-6

La production d'interleukine par les macrophages est évaluée à partir des surnageants de culture recueillis après l'étape de phagocytose. Les surnageants sont décongelés à température ambiante afin qu'ils atteignent une température de 20°C. La concentration en IL-1 β et IL-6 dans les surnageants est évaluée à l'aide de deux kits Elisa (Termo Fisher Scientific) spécifiques à chaque interleukine.

Les anticorps spécifiques aux différentes interleukines de souris sont déjà fixés au fond des plaques fournies dans le kit. Les échantillons sont ajoutés dans les puits à hauteur de 50µl par puits, en duplicata. Une gamme d'interleukine de 200 à 50 pg/ml est également réalisée et ajoutée dans les puits à hauteur de 50 µl. Les plaques sont incubées pendant 2h à température ambiante puis rincées 3 fois à l'aide du tampon de lavage fourni.

La solution d'anticorps biotinylé est ensuite ajoutée à hauteur de 50 µl et la plaque est à nouveau incubée 30 min à température ambiante puis rincée 3 fois. Une solution de Streptavidine- HRP est ajoutée dans les puits à hauteur de 100 µl. La Streptavidine va se fixer de manière irréversible sur la biotine. Elle est couplée à l'enzyme HRP, de l'anglais HorseRadish Peroxidase (peroxydase de raifort). À nouveau, la plaque est incubée 30 min à température ambiante puis les puits sont rincés trois fois. La solution de substrat contenant le TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) est ajoutée à hauteur de 100 µl par puits. La réaction enzymatique permettant le développement d'une couleur bleue, due à l'oxydation du TMB, est poursuivie pendant 30 min. Elle est stoppée par ajout de 100 µl d'une solution d'arrêt.

L'absorbance est lue à 450 nm et la concentration en interleukine est déterminée par rapport à une gamme étalon.

11 Analyses statistiques

Pour l'ensemble des analyses, au minimum trois réplicas indépendants ont été réalisés, ce qui permet de déterminer un écart-type standard. Le test de variance unidirectionnel (ANOVA), associé aux tests de Tukey ou de Dunnett, est appliqué afin de déterminer la significativité des différences observées dans chaque analyse. Pour ces tests, un indice de confiance de 95% a été utilisé. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT 2018.

12 Bibliographie de la partie matériels et méthodes

A

Ammerman, N. C., Beier-Sexton, M., & Azad, A. F. (2008). Growth and maintenance of Vero cell lines. *Current Protocols in Microbiology, Appendix 4*, Appendix 4E.

B

Ballester-Costa, C., Sendra, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. a., & Viuda-Martos, M. (2013). Chemical composition and in vitro antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. *Industrial Crops and Products*, 50, 304–311.

Bedoux, G., Ceapraz, H., Marty, C., Mainguy, C., Bedoux, M., Lejeune, A., & Bourgougnon, N. (2011). Essential oils of *Zingiber officinale* and *Angelica archangelica* plants. *Journal of EcoAgriTourism*, 7(2), 23–25.

C

Chimactiv - Agroparistech. (n.d.). Détermination de l'activité d'un antioxydant par le test DPPH°. <http://chimactiv.agroparistech.fr/aliments/antioxydant-dpph/principe>

Christie, W. W. (2018). Hydroxyeicosatetraenoic Acids and Related Mono-Oxygenated Oxylipins. Retrieved from <http://www.lipidhome.co.uk/lipids/fa-eic/eic-hete/index.htm>

E

Ege University. (n.d.). What are antioxidants. Retrieved February 25, 2018, from http://eng.ege.edu.tr/~otles/antioxidants/pages/antioxidants_that_are_naturally_found_in_foods.htm

F

Fernandez, X., & Chemat, F. (2012). *Les huiles essentielles; vertus et applications*. (Vuibert, Ed.).

G

Givskov, M., Hentzer, M., Ersbøll, B. K., Heydorn, A., Sternberg, C., Nielsen, A. T., & Molin, S. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. *Microbiology*, 146(10), 2395–2407.

H

Hardouin, K., Burlot, A. S., Umami, A., Tanniou, A., Stiger-Pouvreau, V., Widowati, I., ... Bourgougnon, N. (2014). Biochemical and antiviral activities of enzymatic hydrolysates from different invasive French seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 26(2), 1029–1042.

<http://www.comstat.dk/>. (2015). Comstat 2. Retrieved March 10, 2018, from <http://www.comstat.dk/>

Husain, F. M., Ahmad, I., Khan, M. S., Ahmad, E., Tahseen, Q., Khan, M. S., & Alshabib, N. A. (2015). Sub-MICs of *Mentha piperita* essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of Gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY), 1–12.

K

Kulusic, T., Radonic, a., Katalinic, V., & Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85(4), 633–640.

L

Lei, J., Leser, M., & Enan, E. (2010). Nematicidal activity of two monoterpenoids and SER-2 tyramine receptor of *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Pharmacology*, 79(7), 1062–1071.

M

Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252–87.

Mori, M., Ikeda, N., Kato, Y., Minamino, M., & Watabe, K. (2002). Inhibition of elastase activity by essential oils *in vitro*. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 1(4), 183–187.

N

Navid, M. H., Reichling, J., & Schnitzler, P. (2013). Antiherpetic activity of the traditionally used complex essential oil Olbas®. *Pharmazie*, 68(8), 702–705.

P

Pérez-Cruz, K., Moncada-Basualto, M., Morales-Valenzuela, J., Barriga-González, G., Navarrete-Encina, P., Núñez-Vergara, L., ... Olea-Azar, C. (2017). Synthesis and antioxidant study of new polyphenolic hybrid-coumarins. *Arabian Journal of Chemistry*.

pHrodo Red E. coli BioParticles Conjugate for Phagocytosis - Thermo Fisher Scientific. (n.d.). from <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P35361>

Porta-de-la-Riva, M., Fontrodona, L., Villanueva, A., & Cerón, J. (2012). Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (64), e4019.

R

Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method for estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27(3), 493–497.

S

Shahwar, D., Raza, M. A., Bukhari, S., & Bukhari, G. (2012). Ferric reducing antioxidant power of essential oils extracted from Eucalyptus and Curcuma species. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), S1633–S1636.

V

Vorregaard, M., & Lyngby, K. (2008). Comstat2 -a modern 3D image analysis environment for biofilms. Retrieved from www.imm.dtu.dk

W

Weiss Nielsen, M., Sternberg, C., Molin, S., & Regenber, B. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* biofilm in flow cells. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (47).

Z

Zaouali, Y., Bouzaine, T., & Boussaid, M. (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 48(11), 3144–52.



Chapitre 1

Prévention de pathologies de la sphère respiratoire

Liste des figures

Figure 1 : Schématisation des relations existantes entre inflammation et stress oxydant et méthodes de mesure d'activités des HE associées.	131
Figure 2: CI ₅₀ observées pour les huiles essentielles dans le cadre du test DPPH.....	136
Figure 3 : Activités anti-radicalaires des HE à 1mg/ml établies par le test FRAP..	138
Figure 4 : CI ₅₀ observées pour les mélanges dans le cadre du test DPPH..	139
Figure 5 : Pourcentage d'inhibition du blanchiment du β -carotène obtenu pour les mélanges d'HE et le BHA, testés à la concentration de 50 μ g/ml.....	141
Figure 6 : Pourcentage d'inhibition de la dégradation des acides gras obtenu pour les HE et l'antioxydant de référence, le BHA, testés à la concentration de 1,25mg/ml, dans le cadre du test TBARS..	143
Figure 7 : Pourcentage d'inhibition de la dégradation des acides gras obtenu pour les mélanges d'HE et l'antioxydant de référence, le BHA, testés à la concentration de 1,25mg/ml dans le cadre du test TBARS.....	144
Figure 8 : CI ₅₀ observées pour les HE dans le cadre de l'inhibition de la 15-lipoxygénase...	146
Figure 9 : CI ₅₀ observées pour les mélanges dans le cadre de l'inhibition de la 15-lipoxygénase.....	147
Figure 10 : Pourcentages d'inhibitions de l'élastase obtenus pour les HE testées à 0,5 et 1,0 mg/ml.	149
Figure 11 : Pourcentages d'inhibitions de l'élastase obtenus pour les mélanges respiratoires.	150

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition des mélanges étudiés dans le cadre de la sphère respiratoire.	134
Tableau 2 : Activités des HE relevées dans la bibliographie pour les tests antioxydants et anti-inflammatoires.	135
Tableau 3 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des huiles essentielles testées sur les bactéries impliquées dans les pathologies respiratoires, exprimées en mg/ml.	152
Tableau 4 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des mélanges testés sur les bactéries impliquées dans les pathologies respiratoires, exprimées en mg/ml.	155
Tableau 5 : CC ₅₀ en µg/ml obtenues pour les HE et les mélanges respiratoires sur les cellules VERO.	158

1 Introduction

Les animaux d'élevage sont régulièrement soumis à des affections respiratoires d'origines multifactorielles. Parmi les pathogènes les plus courants on retrouve les bactéries (*Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis*) les virus (Virus de la bronchite infectieuse, Virus respiratoire syncytiale bovin) mais également les champignons et les parasites. Ces organismes peuvent affecter les voies respiratoires basses (poumons) dans le cadre des pneumonies, mais également les voies hautes dans le cadre de bronchites, rhinites ou trachéites.

Ces pathologies résultent en l'apparition d'une inflammation, qui se traduit entre autre par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) potentiellement délétères et causant notamment l'oxydation des lipides (Miguel *et al.*, 2010; Yoshikawa & Naito, 2002). Ces oxydations entraînent par réactions en chaîne des préjudices aux membranes, aux cellules et aux tissus (Yoshikawa & Naito, 2002).

La phospholipase A2 (PLA2) est impliquée dans la dégradation des lipides membranaires en acide arachidonique en cas de stimulus inflammatoire. La 15-lipoxygénase (LOX) intervient ensuite en le dégradant en eicosanoïdes tels que les leucotriènes et les prostaglandines, des médiateurs de l'inflammation (De Cássia Da Silveira E Sá, Andrade, & De Sousa, 2013; Miguel, 2010). Limiter l'inflammation dans le cas de la sphère respiratoire permet d'une part de limiter l'obstruction des voies respiratoires et de réduire les effets délétères d'une inflammation prolongée, telle que la production de ROS.

Ainsi au cours de cette étude, des mélanges candidats pour la sphère respiratoire et les HE qui les composent ont été évalués pour leurs activités anti-radicalaires et antioxydantes. Les tests DPPH et FRAP ont été utilisés pour mettre en évidence la capacité des HE à échanger des protons ou des électrons afin de stabiliser des radicaux libres. Les tests β -carotène et TBARS ont, eux, été utilisés pour mettre en évidence les activités antioxydantes et plus particulièrement la capacité des HE à protéger les acides gras de l'oxydation (Miguel, 2010). Les mécanismes de ces différents tests sont expliqués dans la partie « Matériels et Méthodes » (§3.1 et 3.2). Les activités anti-inflammatoires des HE et de mélanges ont également été évaluées. Pour cela deux enzymes, la phospholipase A2 (PLA2) et la 15-lipoxygénase (15-LOX), ont été utilisées. Les relations existantes entre les aspects anti-radicalaires / antioxydants et anti-inflammatoires, permettant de justifier les choix de ces différents tests, sont évoquées dans la figure 1.

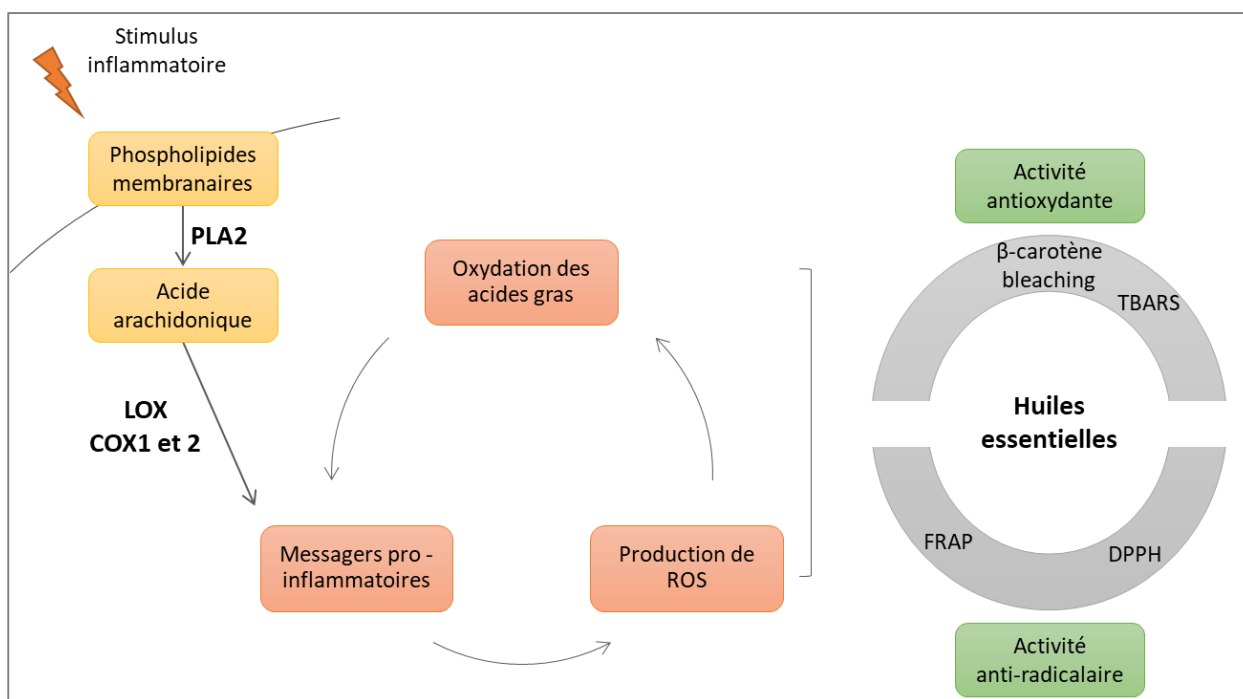


Figure 1 : Schématisation des relations existantes entre inflammation et stress oxydant et méthodes de mesure d'activités des HE associées.

L'élastase est une enzyme également impliquée dans le processus inflammatoire. Produite par le pancréas, cette enzyme est sécrétée par les cellules neutrophiles au niveau du site d'inflammation en vue de détruire le pathogène. Sur les bactéries, elle est supposée agir par deux mécanismes, le premier étant la génération de certains peptides bactériens, le second étant une action « antibiotique » directe. Il a notamment été démontré que la protéine OmpA (de l'anglais « Outer Membrane Protein A ») pouvait être dégradée par l'élastase, chez *E. coli*, provoquant la destruction de la bactérie (Belaouaj, 2002; Wang, 2002). Cependant, sa présence en grande quantité au niveau des bronches a été reliée à des dégradations des tissus observées notamment dans le cadre des bronchites obstructives chroniques (Ohbayashi, 2002). Par ailleurs, l'élastase est aussi synthétisée comme un facteur de virulence par certaines bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa*, qui est également étudiée dans ce chapitre. L'intérêt d'inhiber cette enzyme par un apport d'HE est donc double : il s'agit d'une part de limiter l'activité de l'élastase sécrétée pendant l'inflammation pouvant causer des dégradations tissulaires et d'autre part d'inhiber l'élastase bactérienne qui pourrait être produite en tant que facteur de virulence (Wretlind & Pavlovskis, n.d.).

Les activités antibactériennes des HE et des mélanges ont ensuite été évaluées sur des pathogènes impliqués dans des maladies respiratoires. *Pasteurella multocida*, dont trois

représentantes sont étudiées ici, provoque des maladies respiratoires notamment chez les jeunes veaux (Dabo, Taylor, & Confer, n.d.), chez les porcins dans le cadre de pneumonies débilitantes voire mortelles (Ross, 2006) ainsi que chez les volailles où elle se présente sous la forme d'un cholera aviaire (Mbuthia *et al.*, 2001). *Streptococcus suis* est également étudiée ici. L'infection par cette bactérie, fréquemment retrouvée dans le système respiratoire des porcins, a pour symptômes des pneumonies, des méningites, mais également des endocardites. Cette bactérie touche particulièrement les animaux âgés de 3 à 14 semaines (Ministère de l'agriculture et de la pêche, 2009) mais est peu représentée chez les volailles ou les bovins. Enfin, le dernier pathogène étudié ici est *Pseudomonas aeruginosa*. Cette bactérie opportuniste est capable de provoquer des pathologies variées et de causer des affections du système respiratoire des bovins, volailles et porcins. Ce pathogène est impliqué également dans les mammites bovines et peut provoquer des surinfections au niveau de plaies. Elle a été sélectionnée ici comme modèle de production de biofilm, un mode de vie au cours duquel les bactéries sont moins sensibles aux traitements antibiotiques ainsi qu'aux mécanismes de défense du système immunitaire (Clutterbuck *et al.*, 2007). Par ailleurs, cette bactérie présente des résistances naturelles aux antibiotiques, ce qui en fait un sujet d'étude pertinent pour la recherche de traitements alternatifs. L'effet des HE sur le biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* sera présenté dans le chapitre 2.

Les pathologies respiratoires sont liées à plusieurs types de microorganismes. Les virus sont impliqués dans différentes pathologies respiratoires telles que la maladie d'Aujeszky, impliquant également un herpes virus (Office Vétérinaire Fédéral, 2013) ou la bronchite infectieuse impliquant un coronavirus (Guérin & Boissieu, 2008). L'activité antivirale des HE et mélanges sera donc évaluée en utilisant le modèle viral Herpès Simplex de type 1.

2 Résultats et discussion

Un point sur les résultats EVHELISANE

Au cours de ce premier projet, les HE ont été évaluées pour leurs activités anti-radicales par les tests DPPH et FRAP ainsi que pour leurs activités antibactériennes sur 10 bactéries (Gram+ et Gram-). Cette dernière activité a été mesurée par la méthode des disques de diffusion (aromatogramme). Les résultats obtenus sont les suivants :

Anti-radicalaire : girofle > origan > sarriette > thym > tea tree > ail > cannelle > niaouli > citron > menthe > eucalyptus.

Antibactérien : cannelle > thym > sarriette > origan > girofle > ail > tea tree > menthe > niaouli > citron > eucalyptus

Ces résultats préliminaires ont constitué une base pour la construction des mélanges présentés ici. En effet, un mélange combine une HE fortement anti-radicalaire (girofle, origan, sarriette, thym), une HE fortement antibactérienne (cannelle, thym, sarriette, origan), une HE apportant un facteur appétant (citron, menthe) et une dernière HE permettant d'orienter le mélange vers une sphère (par exemple eucalyptus pour la sphère respiratoire, menthe pour la sphère digestive, etc...). Ce dernier caractère de sélection est basé sur les connaissances empiriques liées à l'utilisation conventionnelle des HE en aromathérapie.

Les mélanges utilisés dans cette sphère sont présentés dans le tableau 1. Pour leur construction, les connaissances liées à l'utilisation des HE en aromathérapie disponibles ont été utilisées. Les affections de la sphère respiratoire provoquant généralement un écoulement et une vasoconstriction nasale, l'HE d'eucalyptus a notamment été utilisée. Cette HE est retrouvée dans de nombreuses préparations de phytothérapie à visée décongestionnante (spray nasal décongestionnant PHYTOSUN Arômes®, Vicks VapoRub®). Les mélanges respiratoires ont comme premier objectif de rétablir les capacités respiratoires des animaux et d'éviter les arrêts d'alimentation.

Tableau 1 : Composition des mélanges étudiés dans le cadre de la sphère respiratoire. Les mélanges sont indiqués par leurs codes, « Resp » pour la sphère respiratoire suivi du numéro correspondant à chaque mélange.

	Ail	Cannelle	Citron	Eucalyptus	Girofle	Menthe poivrée	Niaouli	Origan	Thym rouge
Resp1			1/4		1/4			1/4	1/4
Resp2			1/4	1/4	1/4			1/4	
Resp3				1/4	1/4		1/4		1/4
Resp4		1/3		1/3		1/3			
Resp5				1/3	1/3				1/3
Abf1	1/3	1/3				1/3			

Les différents tests réalisés dans cette partie doivent permettre d'une part de valider la construction des mélanges, ne devant pas provoquer une perte d'activité et d'autre part de discriminer les mélanges entre eux. Le meilleur candidat sera défini et testé *in vivo* grâce à des modèles de pathologies respiratoires.

Tableau 2 : Activités des HE relevées dans la littérature pour les tests antioxydants et anti-inflammatoires.

	DPPH CI ₅₀ (µg/ml)	FRAP en TEAC* (mM Trolox/l à 5 mg/ml)	β-carotène CI ₅₀ (mg/ml)	TBARS (Inhibition % à 1 mg/ml)	Inhibition 15-Lipoxygénase
Ail	88,9	Romeilah <i>et al.</i> 2010	-	-	-
Cannelle	9308	Olszowy <i>et al.</i> 2016	0,47	Olszowy <i>et al.</i> 2016	71% à 5µg/ml Wei <i>et al.</i> 2010
Citron	6680	Olszowy <i>et al.</i> 2016	3,23	Olszowy <i>et al.</i> 2016	-17% Baratta, <i>et al.</i> 1998
Eucalyptus	-	-	-	31,0% (terpinene-4-ol) Ruberto <i>et al.</i> 2000	42% à 5µg/ml Wei <i>et al.</i> 2010
Girofle	0,08	Jirovetz <i>et al.</i> 2006	1,27	Viuda-Martos <i>et al.</i> 2010	0,12 Olszowy <i>et al.</i> 2016
Menthe	4450	Tsai <i>et al.</i> 2013	-	0,37 Tsai <i>et al.</i> 2013	22,2% (menthol) Ruberto <i>et al.</i> 2000
Niaouli	-	-	-	-	-
Origan	223	Alinkina <i>et al.</i> 2012	0,95	Viuda-Martos <i>et al.</i> 2010	2 Olszowy <i>et al.</i> 2016
Thym	245	Alinkina <i>et al.</i> 2012	0,33	Viuda-Martos <i>et al.</i> 2010	0,19 Olszowy <i>et al.</i> 2016
				54% Baratta, <i>et al.</i> 1998	-
				55,7% (thymol) Ruberto <i>et al.</i> 2000	44% à 5µg/ml Wei <i>et al.</i> 2010

*TEAC de l'anglais Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

2.1 Activités anti-radicalaires et antioxydantes

2.1.1 Évaluation de la capacité de piégeage des radicaux libres

Les activités anti-radicalaires des huiles essentielles ont été mises en évidence par le test de capture des radicaux libres DPPH et par le test FRAP (de l'anglais Ferric Reducing Antioxydant Power), dont les résultats sont présentés dans les figures 2 et 3.

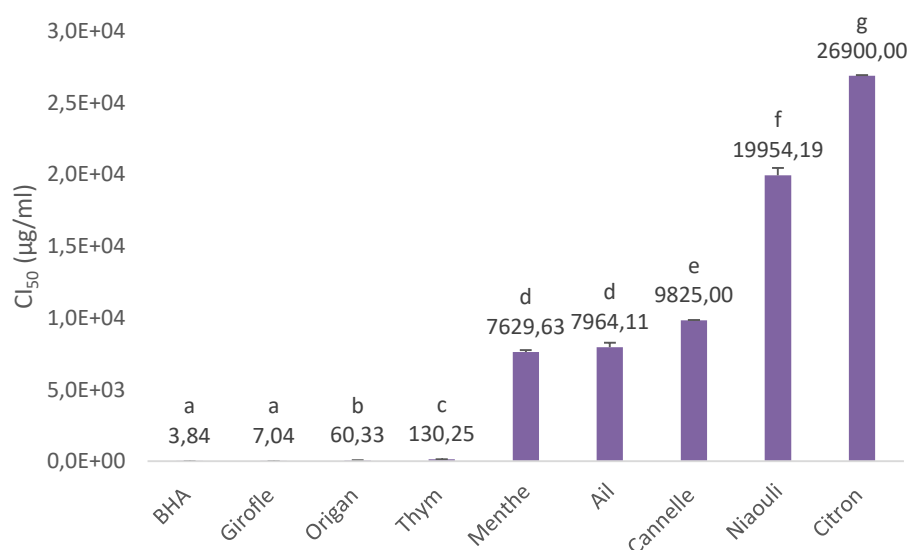


Figure 2: CI₅₀ observées pour les huiles essentielles dans le cadre du test DPPH. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

Les concentrations en HE permettant d'obtenir 50% d'inhibition des radicaux DPPH· (CI₅₀) (figure 2) sont comparées à l'hydroxyanisole butylé (BHA). Les HE testées présentent des CI₅₀ comprises entre $7,04 \pm 0,40$ µg/ml pour la girofle et $26,09 \pm 0,05$ mg/ml pour le citron. L'échelle d'activité obtenue avec la méthode DPPH est large, ce qui permet de discriminer les différentes HE. L'HE de girofle est très fortement anti-radicalaire et présente une CI₅₀ statistiquement équivalente à celle du BHA, qui est de $3,84 \pm 0,32$ µg/ml. Ce résultat est en accord avec les données bibliographiques présentées dans le tableau 2. L'HE de girofle est riche en eugénol, une molécule phénolique présentant un cycle avec des électrons délocalisés ainsi qu'une fonction hydroxyle apportant un fort encombrement stérique. L'encombrement stérique des hydroxyles a un effet positif sur leur capacité à échanger des électrons et donc à stabiliser

des radicaux libres (Mastelić *et al.*, 2008). Viennent ensuite les HE d'origan et de thym, qui présentent des CI_{50} respectives de $60,33 \pm 1,26 \mu\text{g/ml}$ et $130,25 \pm 0,66 \mu\text{g/ml}$. Là encore, les données sont en accord avec les informations recueillies à travers la bibliographie et présentées dans le tableau 2. Ces deux HE sont respectivement riches en carvacrol et thymol deux autres composés phénoliques. L'encombrement stérique de leurs fonctions hydroxyle a un effet moindre par rapport à celui de l'eugénol, ce qui se traduit également par une activité plus faible (Mastelić *et al.*, 2008). Le lien entre la richesse en composés phénoliques d'une HE et son pouvoir antioxydant a déjà été établi par Viuda-Martos *et al.* (2010) : l'HE de girofle, qui contenait une concentration importante en phénols d'après le test de Folin Ciocalteu ($898,89 \pm 3,37 \text{ mg/L GAE}$ (gallic acid equivalent)) présentait également l'activité anti-radicalaire la plus élevée avec une CI_{50} de $0,38 \text{ mg/ml}$. La même observation a été faite pour l'origan ($763,97 \pm 1,12 \text{ mg/L GAE}$ pour une CI_{50} de $3,90 \text{ mg/ml}$). En comparaison, l'HE de romarin, qui ne contenait que $225,08 \pm 6,73 \text{ mg/L GAE}$ de composés phénoliques, avait une CI_{50} de $17,00 \text{ mg/ml}$ dans le cadre du test DPPH.

Ce lien est conforté par la faible activité des HE de menthe, ail, cannelle, niaouli et citron, qui ont des CI_{50} de l'ordre du mg/ml et significativement supérieures à celle du BHA. Les HE de menthe et d'ail ont des activités statiquement équivalentes, présentant des CI_{50} respectives de $7,69 \pm 0,12 \text{ mg/ml}$ et $7,96 \pm 0,31 \text{ mg/ml}$. Le résultat obtenu ici pour l'ail n'est pas cohérent avec la CI_{50} de $88,9 \mu\text{g/ml}$ obtenue par Romeilah *et al.* (2010) et présentée dans le tableau 2. Cette différence d'un facteur 100 peut avoir différentes origines : la composition de l'HE d'ail qui contient notamment dans l'étude de 2010, 23,80% de Methyl-2-propenyl trisulfide, ainsi que les variations de protocole telles que la concentration en DPPH utilisée. La composition de ces HE reste pauvre en molécules phénoliques contrairement aux HE de girofle ou de thym évoquées plus haut. Le menthol, constituant majoritaire de l'HE de menthe est un terpène présentant également une fonction hydroxyle. Celui-ci n'étant pas associé à un noyau aromatique, sa capacité à échanger des électrons est plus faible. L'HE de cannelle, dont la CI_{50} est de $9,82 \pm 0,02 \text{ mg/ml}$ renferme du cinnamaldehyde. Ce phénylpropanoïde est le composé majoritaire et il contient un noyau phénylène et un système conjugué dont la capacité à fixer des radicaux est faible par rapport à un noyau phénolique. Les HE de niaouli et de citron développent les activités les plus faibles avec des CI_{50} respectives de $19,95 \pm 0,50 \text{ mg/ml}$ et $26,90 \pm 0,05 \text{ mg/ml}$. La CI_{50} de l'HE de citron est du même ordre de grandeur que celle obtenue par Olszowy *et al.* (2016) qui est de $6,68 \text{ mg/ml}$. Aucune donnée n'est disponible pour l'HE de niaouli, bien que sa richesse en 1,8 cinéol, un terpène, confirme sa faible activité. Enfin, la CI_{50}

de l'HE d'eucalyptus n'a pas pu être établie en raison de l'absence d'activité anti-radicalaire dans les conditions du test DPPH. Par ailleurs aucune donnée n'a été observée dans la bibliographie concernant l'étude de cette HE *via* le test DPPH.

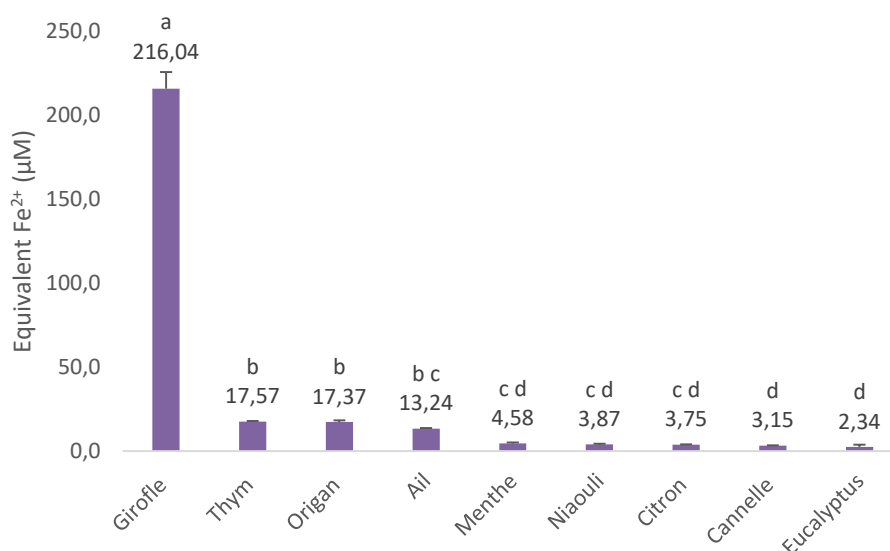


Figure 3 : Activités anti-radicalaires des HE à 1 mg/ml établies par le test FRAP. Les valeurs sont exprimées en équivalent Fe^{2+} (μM). Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

L'activité anti-radicalaire des HE a ensuite été établie par le test FRAP. Cette méthode permet de mesurer la capacité d'une molécule à réduire le complexe Fe^{3+} -TPTZ en Fe^{2+} . Les résultats, présentés dans la figure 3, montrent que l'ordre d'activité observé est égal entre DPPH et FRAP. L'HE de girofle est en effet à nouveau la plus active, permettant la formation de $216,04 \pm 9,87 \mu M$ eq Fe^{2+} . Les HE de thym ($17,57 \pm 0,30 \mu M$ eq Fe^{2+}) et d'origan ($17,37 \pm 0,81 \mu M$ eq Fe^{2+}) développent des activités statistiquement équivalentes à celle de l'HE d'ail ($13,24 \pm 0,38 \mu M$ eq Fe^{2+}). L'ordre d'activité dans lequel la girofle est plus active que le thym et l'origan est confirmé par les résultats de la bibliographie (Viuda-Martos *et al.* 2010) présentés dans le tableau 2. Enfin, les HE de menthe, de niaouli, de citron et d'eucalyptus présentent des activités équivalentes, comprises entre $4,58 \pm 0,56$ et $2,34 \pm 1,40 \mu M$ eq Fe^{2+} .

Les HE développent donc une activité anti-radicalaire plus faible d'après la méthode FRAP que d'après la méthode DPPH. Cette observation repose sur la différence des solvants utilisés entre les deux techniques. La différence entre les deux tests concernent la particule échangée, l'électron pour le FRAP, le radical pour le DPPH (Miguel, 2010).

Étant donné la faible possibilité de discrimination du test FRAP, nous avons décidé de ne pas l'appliquer aux mélanges. De plus, nous avons observé des différences d'activités pour une même HE lors d'essais successifs, ce qui laisse à supposer que ce test n'est pas reproductible dans le cadre d'une application aux HE, peut-être toujours en raison de la nature du solvant utilisé.

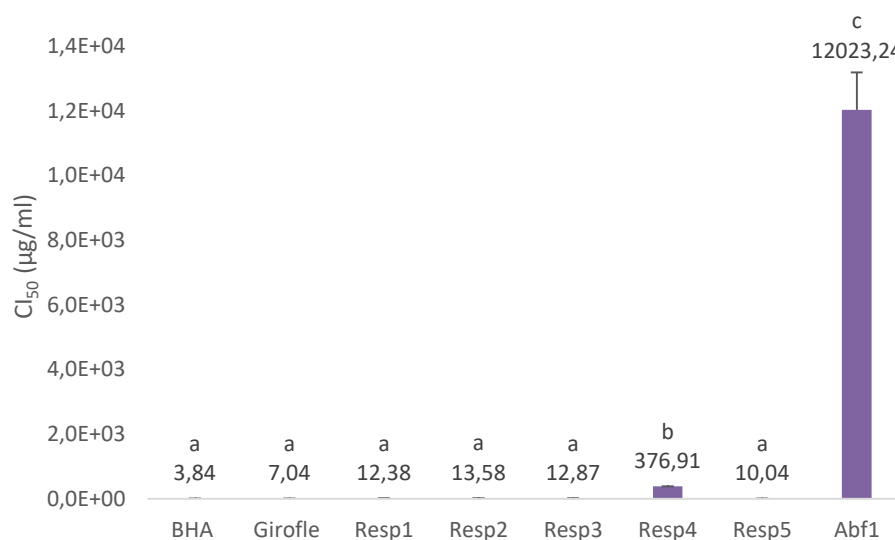


Figure 4 : CI₅₀ observées pour les mélanges dans le cadre du test DPPH. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

Les mélanges respiratoires ont donc été comparés pour leurs activités anti-radicalaires par le test DPPH. Les mélanges Resp1 (citron, girofle, origan, thym rouge), Resp2 (citron, girofle, origan, eucalyptus), Resp3 (girofle, thym rouge, eucalyptus, niaouli) et Resp5 (girofle, thym rouge, eucalyptus) présentent des CI₅₀ comprises entre $10,04 \pm 0,10$ µg/ml et $13,58 \pm 0,38$ µg/ml. Ces valeurs sont statistiquement équivalentes aux CI₅₀ du BHA et de l'HE de girofle, qui est de $7,04 \pm 0,40$ µg/ml. Les mélanges Resp4 (cannelle, eucalyptus et menthe) et Abf1 (ail, cannelle, menthe), présentent par contre des CI₅₀ significativement supérieures à celle du BHA, de $376,91 \pm 0,10$ µg/ml et $12,02 \pm 1,15$ mg/ml respectivement.

La forte activité des mélanges Resp1, 2, 3 et 5 peut être attribuée à la présence d'HE de girofle dans leur composition. Il n'y a donc pas d'effet significatif sur l'activité anti-radicalaire pouvant être lié à la dilution de cette HE dans les mélanges. En comparant les mélanges Resp1 (citron girofle origan thym) et Resp2 (citron girofle origan eucalyptus), on observe que le

remplacement du thym, dont la CI_{50} est de $130,25 \pm 0,66 \mu\text{g/ml}$ par l'HE d'eucalyptus, qui ne présente pas d'activité anti-radicalaire mesurable, n'affecte pas significativement la CI_{50} des mélanges. Ce résultat confirme que l'activité des mélanges tient principalement à la présence de girofle. La même observation peut être faite entre les mélanges Resp3 (girofle thym eucalyptus niaouli) et Resp5 (girofle thym eucalyptus) : l'ajout du niaouli faiblement actif et de ce fait la dilution supplémentaire de l'HE de girofle, n'a pas d'effet significatif sur l'activité du mélange. L'ajout d'HE de girofle dans les mélanges semble donc indispensable pour améliorer l'activité anti-radicalaire des mélanges.

Par ailleurs, l'activité plus faible des mélanges Resp4 (cannelle, eucalyptus, menthe) et Abf1 (ail, cannelle, menthe) peut être reliée à l'absence de girofle dans leur composition. Le mélange Resp4 reste toutefois intéressant à observer. En effet, ce mélange présente une CI_{50} de $376,91 \pm 0,10 \mu\text{g/ml}$ alors que les HE qui le composent, à savoir la cannelle, l'eucalyptus et la menthe présentent des CI_{50} nettement supérieures (CI_{50} cannelle = $9,82 \pm 0,02 \text{ mg/ml}$, CI_{50} menthe = $7,69 \pm 0,12 \text{ mg/ml}$, eucalyptus non actif). Il semblerait donc qu'une synergie prenne place entre ces différentes HE, bien qu'aucune donnée bibliographique ne soit disponible sur ce point. Par ailleurs, le mélange Abf1 constitué de cannelle, de menthe et d'ail ne présente pas les mêmes caractéristiques, avec une CI_{50} de $12,02 \pm 1,15 \text{ mg/ml}$. La synergie observée dans le Resp4 disparaît par le remplacement de l'eucalyptus par l'ail.

L'activité anti-radicalaire des HE est liée à leur composition et principalement à la richesse en molécules phénoliques. La présence d'un noyau phénolique permet effectivement un échange avec les radicaux libres présents en solutions. L'HE de girofle est la plus active d'après les méthodes DPPH et FRAP. Son activité est conservée lors de la formation des mélanges, les autres HE présentes n'ayant pas d'effet significatif sur leur activité. Ainsi les mélanges Resp1, 2, 3 et 5 présentent les meilleures activités anti-radicalaires d'après le test DPPH. Ces activités sont par ailleurs équivalentes à celle de l'antioxydant de synthèse utilisé comme référence, le BHA.

2.1.2 Évaluation par des méthodes faisant appel à l'oxydation d'acides gras

Les mélanges sont ensuite évalués pour leur capacité à protéger les lipides de l'oxydation. Les inhibitions (%) obtenues pour les mélanges et les huiles essentielles (HE) de

girofle et de cannelle, dans le cadre du test de blanchiment du β -carotène, sont présentées dans la figure 5. Les HE de girofle et de cannelle ont respectivement été sélectionnées pour représenter les valeurs critiques obtenues pour les HE seules, l'HE de girofle étant la plus active et l'HE de cannelle la moins active.

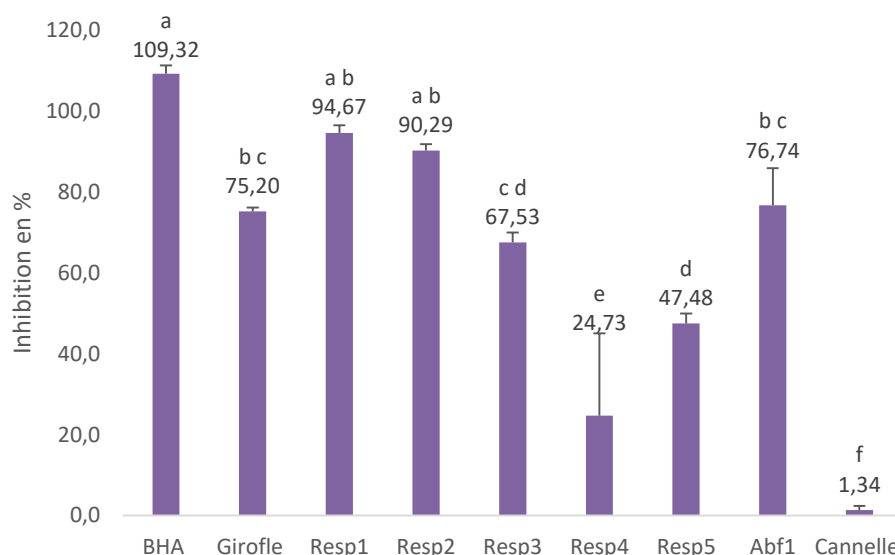


Figure 5 : Pourcentages d'inhibition du blanchiment du β -carotène obtenus pour les mélanges d'HE et le BHA, testés à la concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

Les mélanges Resp1 (citron girofle origan thym) et Resp2 (citron eucalyptus girofle origan), avec des inhibitions respectives de $94,67 \pm 1,87\%$ et $90,29 \pm 1,56\%$, présentent les meilleures activités antioxydantes. Ces inhibitions sont statistiquement équivalentes à celles obtenues avec l'antioxydant de référence, le BHA ($I\% = 109,32 \pm 2,01\%$), également testé à la concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$. Elles sont également équivalentes au pourcentage d'inhibition obtenu pour l'HE de girofle, qui est de $75,20 \pm 1,00\%$. Le résultat obtenu pour cette HE n'est pas en accord avec les résultats de la bibliographie obtenus par Olszowy *et al.* (2016). En effet dans leur essai, une concentration de 120 $\mu\text{g/ml}$ est nécessaire pour obtenir une inhibition de 50%. Encore une fois, les compositions variables des HE ainsi que les différences de protocoles peuvent influencer ces valeurs. Dans leurs travaux, une dose de 470 $\mu\text{g/ml}$ d'HE de cannelle permet par ailleurs d'inhiber de 50% le blanchiment du β -carotène. Cette dose est 10 fois plus élevée que celle utilisée dans nos travaux (50 $\mu\text{g/ml}$). Les deux mélanges Resp1 et Resp2 cumulent donc de bonnes activités anti-radicalaires et antioxydantes. Encore une fois, le remplacement de l'HE de thym par l'HE d'eucalyptus n'a pas d'effet significatif sur l'activité

du mélange Resp2 par rapport à celle du mélange Resp1. L'activité antioxydante de l'HE de girofle est donc également conservée lors de la formation de mélanges.

Les mélanges Resp3 (eucalyptus girofle niaouli thym) et Abf1 (ail, cannelle, menthe), présentant des inhibitions respectives de $67,53 \pm 2,47\%$ et $76,74 \pm 9,14\%$, développent également une activité antioxydante équivalente à l'HE de girofle. Ce résultat suggère donc une synergie entre les différents constituants du mélange Abf1, permettant au mélange de protéger les acides gras des processus oxydatifs. Par ailleurs, ce mélange présentait une faible activité anti-radicalaire avec une CI_{50} de $12,02 \pm 1,15$ mg/ml dans le cadre du test DPPH.

Les mélanges Resp4 (cannelle, eucalyptus et menthe) et Resp5 (eucalyptus girofle thym), présentent quant à eux des activités protectrices significativement inférieures à celle du BHA, avec des I% respectifs de $24,73 \pm 20,30\%$ et $47,48 \pm 2,52\%$. La faible activité du mélange Resp4 peut être imputée à l'absence de girofle dans sa composition. En revanche, dans le mélange Resp5 l'activité diminue, malgré la présence de girofle et de thym rouge. Statistiquement, la valeur d'inhibition obtenue pour le mélange Resp5, soit $47,48 \pm 2,52\%$, reste tout de même équivalente à l'inhibition obtenue pour le mélange Resp3. L'ajout de niaouli dans le mélange Resp3 par rapport à Resp5 n'a donc pas d'effet significatif sur l'activité antioxydante.

D'après cette méthode, les mélanges présentant la combinaison d'HE d'origan et de girofle permettent de mieux préserver les acides gras de l'oxydation. Les mélanges Resp1 et Resp2 présentent les activités antioxydantes les plus élevées, avec des inhibitions équivalentes à celle du BHA, ce qui est en adéquation avec les résultats obtenus dans le cadre du test DPPH. Ce test confirme également l'activité moyenne du mélange Resp4. Enfin, le mélange Abf1 présente ici une activité comparable à celle de l'HE de girofle, ce qui montre l'importance d'étudier différentes propriétés pour obtenir à une réponse globale dans le cadre des activités antioxydantes et anti-radicalaires.

Les huiles essentielles et mélanges ont enfin été soumis au test TBARS, faisant également appel à l'oxydation des lipides. Le jaune d'œuf est utilisé dans cette méthode comme source d'acides gras. Cette mesure peut être considérée comme plus proche de la réalité puisque les acides gras évalués sont variés, alors que seul l'acide linoléique est utilisé dans le test de

blanchiment du β -carotène. Les HE de girofle et de cannelle n'ont pas pu être testées à ces concentrations car elles présentaient une réaction avec l'acide thiobarbiturique. Le faux positif obtenu avec la cannelle a également été observé par Baratta *et al.* (1998). L'effet n'était plus observé lorsque l'HE de girofle était sous forme de mélanges, mais restait présent pour les mélanges contenant la cannelle. Les mélanges Resp4 et Abf1 n'ont donc pas pu être testés, en raison de la présence de cannelle. Les inhibitions observées pour les HE pures et le BHA testés à 1,25 mg/ml sont présentées dans la figure 6.

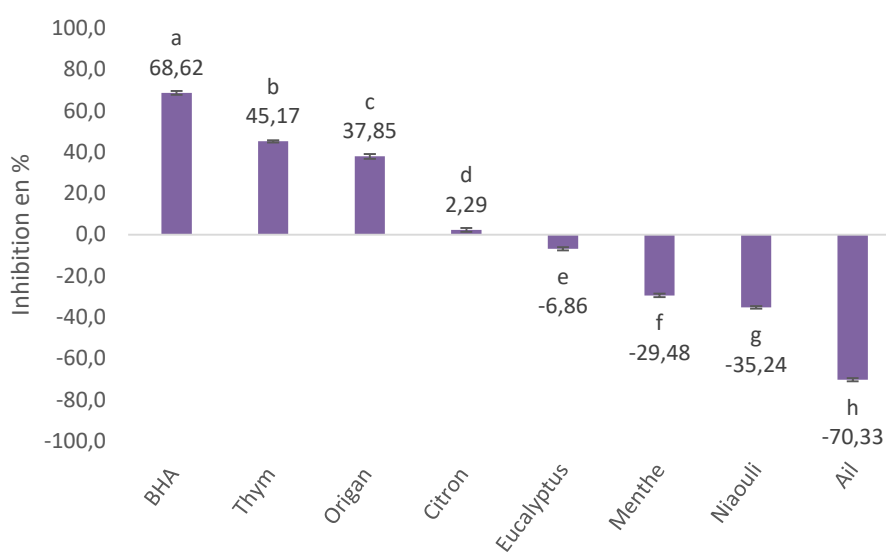


Figure 6 : Pourcentages d'inhibition de la dégradation des acides gras obtenus pour les HE et l'antioxydant de référence, le BHA, testés à la concentration de 1,25 mg/ml, dans le cadre du test TBARS. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

À nouveau les HE de thym et d'origan, riches en composés phénoliques, sont les plus antioxydantes, avec des pourcentages d'inhibition respectifs de $45,17 \pm 0,50\%$ et $37,85 \pm 1,20\%$. Ces valeurs sont en accord avec les résultats obtenus par Ruberto *et al.* (2000) pour le thymol, qui est le composé majoritaire de l'HE de thym ($55,7\%$ d'inhibition) et par Baratta, *et al.* (1998) concernant l'origan (54% d'inhibition). Ces résultats restent tout de même significativement inférieurs à l'inhibition obtenue par le BHA ($68,62\%$). L'eugénol à la concentration de 1 mg/ml (composé majoritaire de l'HE de girofle qui n'a pas pu être testée ici), présentait par ailleurs une inhibition de $81,2\%$ d'après les travaux de Ruberto *et al.* (2000). L'HE de citron présente une inhibition quasi nulle de $2,29 \pm 0,90\%$ ce qui est en adéquation

avec l'absence d'activité anti-radicalaire observée dans le cadre du test DPPH. Les HE d'eucalyptus, de menthe, de niaouli et d'ail présentent par contre dans ce test une activité pro-oxydante. L'activité pro-oxydante d'HE dans le cadre du test TBARS a déjà été observée par d'autres équipes. D'après Baratta *et al.* (1998), l'HE de citron présentait une inhibition inférieure à 5% à des concentrations de 100 et 250 µg/ml et des activités pro-oxydantes aux concentrations de 500, 750 et 1000 µg/ml uniquement en présence d'ABAP (2,2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride), ajouté comme inducteur de l'oxydation. L'HE de Lemongrass, riche en citral, présentait une activité pro-oxydante d'après cette méthode, en présence ou en absence d'ABAP (Baratta, Dorman, Deans, Figueiredo, *et al.*, 1998). L'ABAP est également utilisé dans notre méthode. L'ajout de cet inducteur ainsi que les conditions du test, où les produits sont chauffés à 95°C, pourrait donc conduire à cette activité pro-oxydante lorsque des HE riches en terpènes non phénoliques sont utilisées. Les produits de dégradation formés pourraient alors avoir un effet délétère sur les lipides, entraînant la formation de malondialdéhyde (MDA). Toutefois les résultats obtenus par cette méthode restent variables. Le terpinene-4-ol et le menthol, composés majoritaires respectifs des HE d'eucalyptus et de menthe, ne présentaient pas d'activité pro-oxydante lorsque testés seuls à la concentration maximal de 1 mg/ml (Ruberto & Baratta, 2000). La variabilité de la source de lipides, ici le jaune d'œuf, pourrait être l'un des facteurs de variabilité de cette méthode.

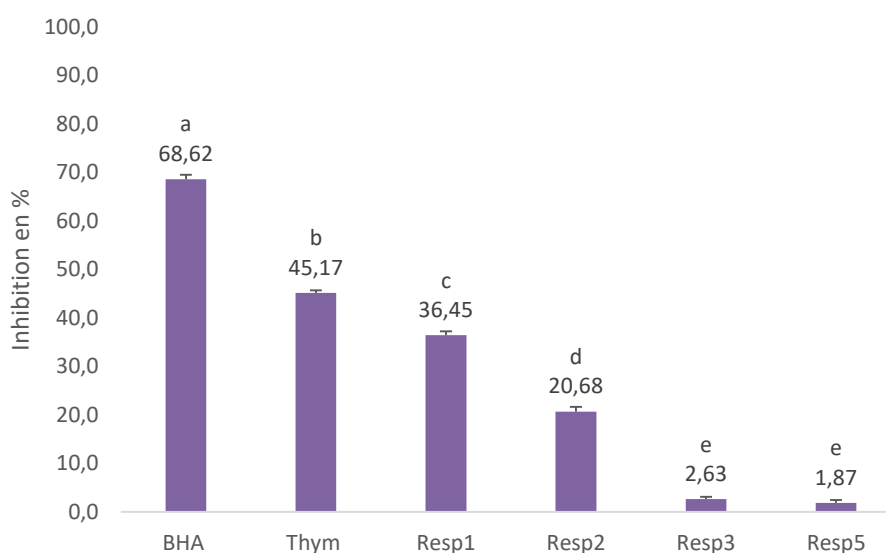


Figure 7 : Pourcentages d'inhibition de la dégradation des acides gras obtenus pour les mélanges d'HE et l'antioxydant de référence, le BHA, testés à la concentration de 1,25 mg/ml dans le cadre du test TBARS. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

Les activités antioxydantes des mélanges sont présentées dans la figure 7 et comparées au BHA et à l'HE de thym, qui présentait le pourcentage d'inhibition le plus important. Les mélanges respiratoires présentent des activités significativement inférieures à celle du BHA et de l'HE de thym à la concentration de 1,25 mg/ml, bien qu'aucun ne soit pro-oxydant. Le mélange Resp1 présente à nouveau la meilleure activité avec un pourcentage d'inhibition de $36,45 \pm 0,80\%$. Ce mélange, constitué de girofle, origan, thym et citron est également le plus riche de la série en molécules phénoliques. Le mélange Resp2 présente une inhibition significativement plus faible de $20,68 \pm 1,00\%$, qui peut être reliée à sa composition : l'HE de thym, qui présente la meilleure activité antioxydante est remplacée dans ce mélange par l'HE d'eucalyptus, caractérisée comme pro-oxydante. Enfin, les mélanges Resp3 et Resp5 ne présentent pas d'activité antioxydante d'après le test TBARS, inhibant la formation de MDA de seulement $2,63 \pm 0,50\%$ et $1,87 \pm 0,60\%$. Ces deux mélanges combinent les HE de girofle, de thym et d'eucalyptus. Leur activité est significativement inférieure à celle du mélange Resp2, combinant l'HE de girofle, d'origan et d'eucalyptus. L'association girofle et origan semble donc plus appropriée pour protéger les lipides de l'oxydation à forte température.

Le mélange Resp1 peut être retenu ici pour son activité inhibitrice sur l'oxydation des acides gras présents dans le jaune d'œuf (test TBARS). La formation de mélange permet d'absorber les activités pro-oxydantes des HE riches en terpènes telles que les HE d'eucalyptus, de menthe ou de niaouli. L'association de girofle et d'origan dans les mélanges Resp1 et Resp2 semble appropriée. Les résultats obtenus par le test TBARS permettent d'évaluer l'activité antioxydante sur une source complexe d'acides gras.

2.2 Inhibition des enzymes pro-inflammatoires

2.2.1 Inhibition de la phospholipase A2

La phospholipase A2 est une enzyme intervenant dans la dégradation des phospholipides de la membrane, par hydrolyse. L'activité des HE et des mélanges a été évaluée par un kit commercial (Cayman chemical). Aucun des échantillons testés ne présentait d'activité lors de ce test. Ces résultats sont cohérents avec l'absence de données dans la bibliographie concernant les activités des HE sur cette enzyme, bien que des activités soient reconnues sur les lipoxygénases (LOX) et cyclooxygénases (COX) (Miguel, 2010).

Cette absence d'activité peut être reliée au mécanisme de l'enzyme PLA2. En effet, cette protéine catalyse la dégradation des acides gras par hydrolyse alors que les LOX et COX réalisent une oxydation. La capacité antioxydante des HE tend donc à protéger le substrat face à l'action des enzymes, ce qui n'est pas le cas ici. Etant donné l'absence de résultat positif, ce test ne sera pas appliqué dans les chapitres suivants.

2.2.2 Inhibition de la 15-lipoxygénase

La capacité des HE et mélanges à inhiber l'activité de la 15-lipoxygénase (15-LOX) a été évaluée par un test *in vitro*. Les CI_{50} des HE constituant les mélanges sont présentées dans la figure 8 face au témoin positif, l'acide nordihydroguaiaretic (NDGA). Ce produit est un antioxydant inhibiteur des lipoxygénases. Il présente ici une CI_{50} de $80,87 \pm 12,02 \mu\text{g/ml}$, ce qui est élevé par rapport aux données retrouvées dans la bibliographie. D'après les données du fournisseur (Sigma Aldrich), le NDGA devrait présenter sur la 15-LOX une CI_{50} de $30 \mu\text{M}$ soit $9 \mu\text{g/ml}$. Cette valeur peut cependant évoluer en fonction du test effectué et notamment de la concentration en enzyme, puisqu'au cours de leurs travaux Wei and Shibamoto (2010) ont obtenu une inhibition de 56% avec une dose de NDGA de $0,5 \mu\text{g/ml}$. Leur mesure ayant été réalisée à l'aide d'un kit, la concentration initiale en enzyme n'est pas connue.

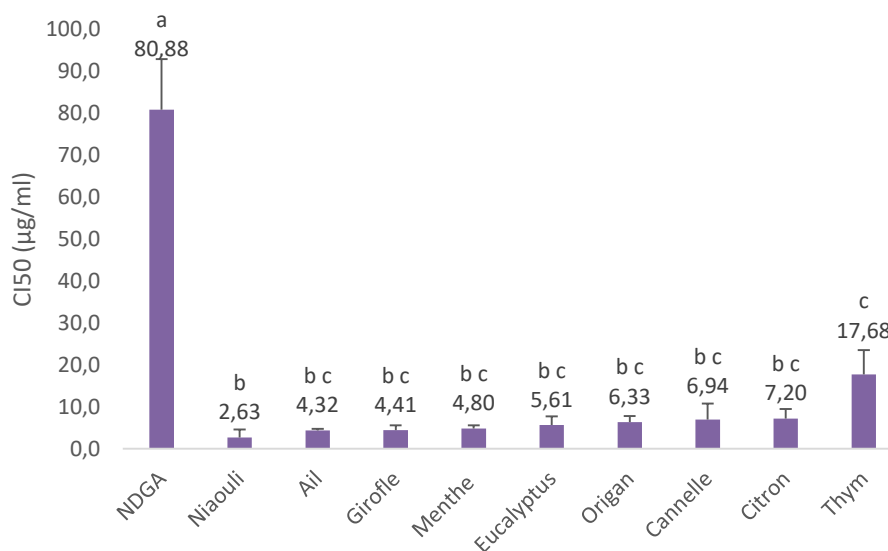


Figure 8 : CI_{50} observées pour les HE dans le cadre de l'inhibition de la 15-lipoxygénase. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

Les HE testées présentent toutes une activité inhibitrice sur la 15-LOX significativement supérieure à celle du NDGA. Les CI_{50} obtenues pour les HE sont comprises entre $2,63 \pm 1,95 \mu\text{g/ml}$ et $17,68 \pm 5,81 \mu\text{g/ml}$. L'HE de niaouli est la plus active avec une CI_{50} de $2,63 \pm 1,95 \mu\text{g/ml}$. Ce résultat est intéressant étant donné que l'activité des HE sur la 15-LOX repose sur un effet antioxydant. En effet, cette HE présentait de faibles activités anti-radicalaires et antioxydantes d'après les tests DPPH, FRAP et β -carotène, voire même une activité prooxydante dans le cadre du test TBARS. L'HE de thym, présente dans ce test l'activité la plus faible avec une CI_{50} de $17,68 \pm 5,81 \mu\text{g/ml}$, ce qui est également en opposition avec son caractère antioxydant, observé lors des tests précédents. Bien que toutes les HE soient actives, il ne semble pas possible de faire un lien direct entre les résultats obtenus pour les activités antioxydantes et anti-radicalaires et l'activité d'inhibition de la 15-LOX.

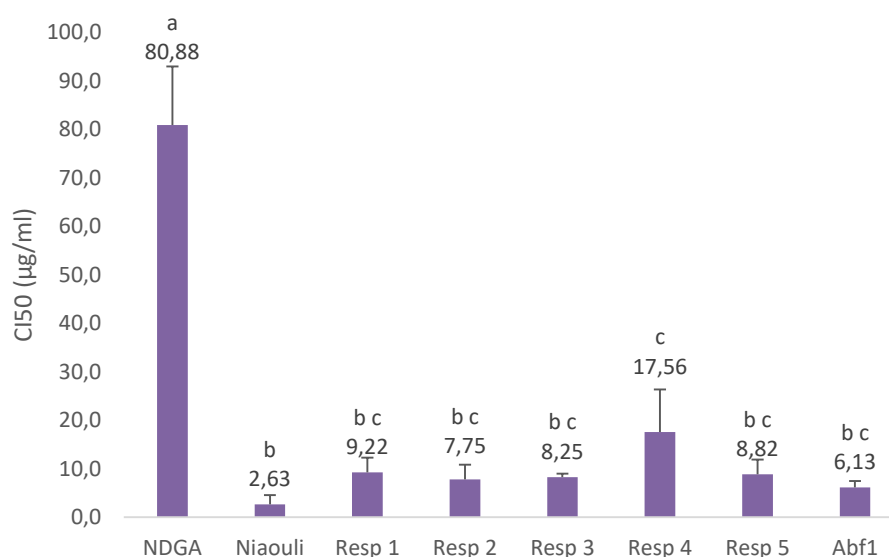


Figure 9 : CI_{50} observées pour les mélanges dans le cadre de l'inhibition de la 15-lipoxygénase. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

Les mélanges de la sphère respiratoire ont également été analysés et les activités obtenues sont présentées dans la figure 9. Ils sont comparés au NDGA et à l'HE de niaouli, qui présente l'activité la plus forte. À nouveau, l'ensemble des mélanges testés présente une activité inhibitrice sur la 15-LOX. Ces activités sont également significativement supérieures à celle de la molécule de référence, le NDGA. Les CI_{50} obtenues sont comprises entre $6,13 \pm 1,30 \mu\text{g/ml}$

(Abf1) et $17,56 \pm 8,79$ $\mu\text{g/ml}$ (Resp4). La composition des mélanges n'a pas d'effet significatif sur leur activité. Les mélanges Resp1, Resp2, Resp3, Resp5 et Abf1 présentent également une activité statistiquement équivalente à celle de l'HE de niaouli. Ces résultats montrent qu'il n'y a pas d'effets antagonistes entre les différentes HE

Les HE sont actives sur la lipoxygénase, une enzyme impliquée dans la médiation des processus inflammatoires par la dégradation des acides gras, mais ne sont pas actives sur la phospholipase. Ce résultat peut être imputé au caractère antioxydant des HE, observé plus tôt. L'activité de l'ensemble des mélanges de la sphère respiratoire est également observée sur la lipoxygénase, ce qui confirme qu'aucune perte d'activité n'est occasionnée lors de leur construction. Ce test n'est pas discriminant pour les HE ni pour les mélanges mais permet de confirmer la présence d'activité. En effet, l'absence de corrélation directe empêche de remplacer ce test par un test anti-radicalaire ou antioxydant. À ce stade les mélanges Resp1 et Resp2 restent les plus efficaces, cumulant des activités anti-radicalaires, antioxydantes et anti-inflammatoires.

2.3 Inhibition de l'élastase

L'élastase est une protéase impliquée dans la réponse inflammatoire et sécrétée par les cellules neutrophiles. L'augmentation de son activité est une réponse observée en cas d'infection. Une concentration sérique élevée est par ailleurs un marqueur d'une inflammation chronique (Baylac & Racine, 2004). Les activités des HE ont été évaluées *in vitro* par un test d'inhibition enzymatique et les résultats obtenus sont présentés dans la figure 10.

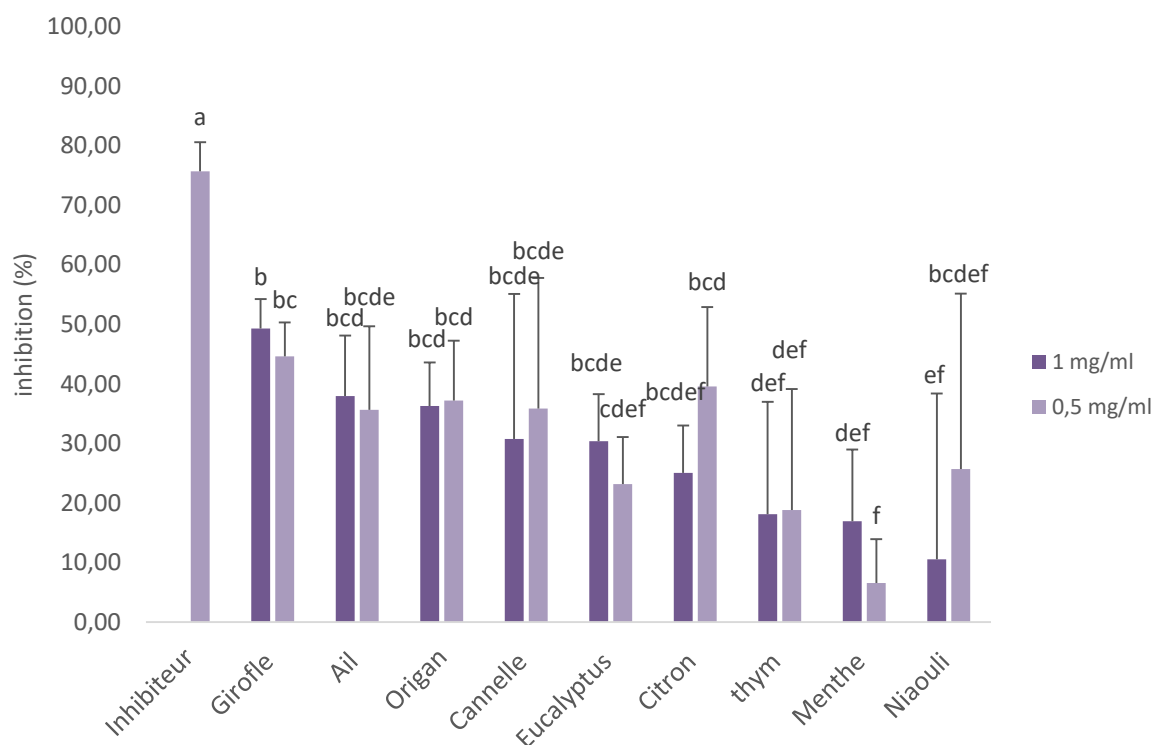


Figure 10 : Pourcentages d'inhibitions de l'élastase obtenus pour les HE testées à 0,5 et 1,0 mg/ml. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

Les inhibitions obtenues avec les HE sont comprises entre $49,32 \pm 4,92\%$ et $10,53 \pm 27,85\%$ à 1 mg/ml et entre $44,64 \pm 5,66\%$ et $6,54 \pm 7,39\%$ à 0,5 mg/ml. L'activité des HE sur la protéase n'est pas dépendante de la dose appliquée. Toutes les HE testées présentent des inhibitions inférieures à celle de l'inhibiteur de référence, le N-méthoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chlorométhyl ketone. Avec ce produit, l'inhibition obtenue est de $75,71 \pm 4,87\%$ à 0,5 mg/ml.

L'HE de girofle présente encore une fois l'activité la plus importante, avec une inhibition de $49,32 \pm 4,92\%$ à 1,0 mg/ml et de $44,64 \pm 5,66\%$ à 0,5 mg/ml. Les HE d'ail d'origan, de cannelle, d'eucalyptus et de citron, présentent des inhibitions statistiquement équivalentes aux inhibitions obtenues avec l'HE de girofle. Ces résultats ne sont pas en accord avec les données de la bibliographie, notamment pour l'HE de citron, également testée sur l'élastase de pancréas porcin par l'équipe de Mori *et al.* (2002). Lors de leurs essais, l'HE de citron présentait la meilleure activité, avec une CI_{50} de $45,3 \mu\text{g/ml}$. Le limonène, composé majoritaire n'était pas responsable de cette activité. L'HE de menthe présentait par contre dans

cet article une très faible activité, tout comme dans notre essai, où l'inhibition obtenue est de $16,96 \pm 12,05$ % à 1,0 mg/ml et de $6,54 \pm 7,39$ % à 0,5 mg/ml.

L'HE de thym présente ici une faible activité inhibitrice, de $18,14 \pm 18,85$ % à 1 mg/ml et de $18,80 \pm 20,36$ % à 0,5 mg/ml. Les écarts-types observés sont par ailleurs très importants. Le thymol, composé majoritaire de l'HE de thym, présente toutefois une activité sur la sécrétion de l'élastase par les cellules neutrophiles. Une concentration de 20 μ g/ml de thymol inhibait la sécrétion d'élastase de $33,25 \pm 3,73$ %. Ce résultat montre encore une fois qu'un seul test ne permet pas d'écarter une HE pour une activité donnée.

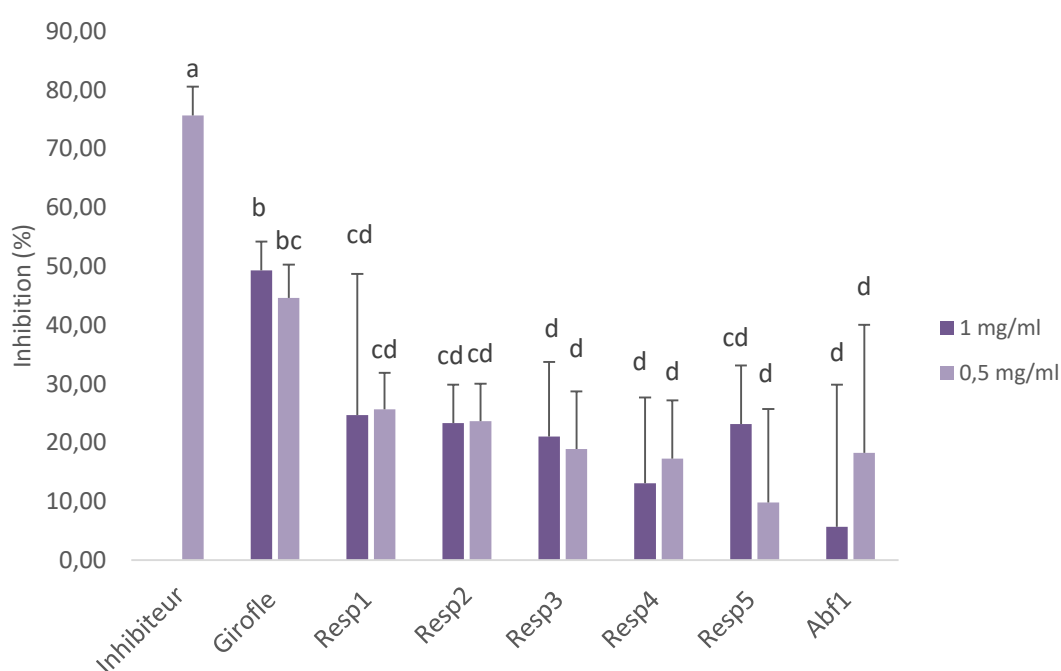


Figure 11 : Pourcentages d'inhibition de l'élastase obtenus pour les mélanges respiratoires. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

Les mélanges ont également été testés pour leurs activités inhibitrices sur l'élastase. Globalement, les mélanges présentent des inhibitions comprises entre $24,70 \pm 24,02$ % et $5,66 \pm 24,90$ % à 1 mg/ml et $25,68 \pm 6,19$ % et $9,78 \pm 15,93$ % à 0,5 mg/ml. Les écarts types observés pour cet essai sont également importants. Ce résultat peut être dû à la dispersion des HE dans le tampon de travail. Les mélanges Resp1 (citron girofle origan thym) et Resp2 (citron girofle origan eucalyptus) présentent des activités équivalentes à celle de l'HE de girofle à 0,5 mg/ml. Leurs activités respectives à cette même concentration sont de $25,68 \pm 6,19$ % et de $23,7 \pm 6,34$ %.

Encore une fois, le remplacement de l'HE de thym par celle d'eucalyptus n'influe pas sur l'activité des mélanges. Les mélanges Resp3, Resp4, Resp5 et Abf1 présentent des activités significativement inférieures à celle de l'inhibiteur de référence et à l'HE de girofle. Les écarts types importants observés pour ces mélanges ne permettent pas de conclure définitivement quant à leur activité.

Les HE et mélanges présentent globalement de faibles activités inhibitrices sur l'élastase. À nouveau, l'HE de girofle présente l'activité la plus importantes. Les mélanges Resp1 et Resp2, présentent les activités inhibitrices les plus importante. Ces mélanges cumulent donc jusqu'à présent de bonnes activités anti-radicalaires et inhibent la lipoxgénase et l'élastase, impliquées dans les réponses inflammatoires.

2.4 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB)

2.4.1 Activité des huiles essentielles

À l'issue des tests biochimiques, les HE sont évaluées *in vitro* pour leurs activités bactériostatiques et bactéricides, grâce à une méthode de microdilution. Les HE sont solubilisées à l'aide de simulsol® un émulsifiant ne présentant pas d'activité sur les bactéries. Les pathogènes utilisés ici ont été sélectionnés pour leur occurrence dans la sphère respiratoire. Les pasteurelles et les streptocoques utilisés ici ont été isolés d'animaux malades. Dans ce cas, plusieurs bactéries appartenant à la même souche ont été évaluées et sont signalées par un numéro indiquant leur origine. La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 est, elle, une bactérie issue des collections CIP. Ce pathogène impliqué dans la sphère respiratoire est également étudié ici en tant que modèle de la formation de biofilm.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB), exprimées en mg/ml et obtenues pour les HE de la sphère respiratoire sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des huiles essentielles testées sur les bactéries impliquées dans les pathologies respiratoires, exprimées en mg/ml. «-» indique que l'HE est directement bactéricide dans ces conditions. L'indication « >5,0 » signifie que l'HE ne présente pas d'activité aux concentrations testées.

		<i>Pasteurella multocida</i>			<i>Pseudomonas</i>	<i>Streptococcus suis</i>	
		1	2	3	<i>aeruginosa</i>	1	2
Ail	CMI	>5,0	>5,0	0,50	5,00	-	-
	CMB	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	1,25	5,00
Cannelle	CMI	0,50	-	-	-	0,25	-
	CMB	2,50	1,25	1,25	1,25	0,50	0,25
Citron	CMI	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	-	-
	CMB	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	1,25	5,00
Eucalyptus	CMI	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	-	>5,0
	CMB	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	2,50	>5,0
Girofle	CMI	-	-	-	>5,0	-	-
	CMB	5,00	0,50	1,25	>5,0	0,50	0,50
Menthe	CMI	>5,0	-	-	>5,0	-	2,50
	CMB	>5,0	2,50	2,50	>5,0	0,50	5,00
Niaouli	CMI	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	-	-
	CMB	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	5,00	5,00
Origan	CMI	0,25	-	-	>5,0	-	0,12
	CMB	0,50	0,50	0,50	>5,0	0,12	0,25
Thym	CMI	1,25	0,25	0,50	>5,0	-	-
	CMB	5,00	0,50	2,50	>5,0	0,25	0,50

Les HE seules sont globalement peu actives sur les bactéries Gram - (*P. multocida* et *P. aeruginosa*), avec des CMB comprises entre 0,50 mg/ml et 5,00 mg/ml. Cette observation est en accord avec les données de la bibliographie, la composition de la paroi des bactéries Gram - les rendant moins sensibles aux HE lipophiles (Dorman & Deans, 2000). Les HE de citron, eucalyptus et niaouli ne présentent pas d'activité sur ces bactéries. Ces HE ont pour composés majoritaires des terpènes, connus pour leur faibles activités antibactériennes (Dorman & Deans, 2000). L'HE d'ail n'est active que sur *P. multocida* 3, avec une CMI de 0,50 mg/ml. La CMB étant >5,00 mg/ml, elle n'a pas été déterminée. Cette HE présente également une activité bactériostatique sur *P. aeruginosa* à la concentration de 5,00 mg/ml. Ce résultat est en accord

avec l'activité observée par Casella *et al.* (2013). D'après leurs travaux, les effets de cette HE sur *P. aeruginosa* étaient essentiellement liés à la présence de diallyl disulfide (DADS) qui est également la molécule majoritaire dans notre HE. L'activité de cette molécule a pu être reliée à la présence d'un groupement $-\text{CH}_2=\text{CHCH}_2-$, sa disparition entraînant une perte d'activité (Casella *et al.*, 2013). L'HE de menthe est plus active avec une concentration directement bactéricide de 2,50 mg/ml sur *P. multocida* 2 et 3, mais ne parvient pas à affecter le développement de *P. aeruginosa* dans les concentrations testées. Ces résultats montrent l'intérêt d'utiliser plusieurs souches bactériennes représentantes d'une même espèce. En effet si uniquement *P. multocida* 1 avait été utilisée ici, les HE d'ail et de menthe aurait été évaluées comme non actives. Les HE de cannelle, girofle, origan et thym, sont quant à elles actives sur *P. multocida* 1, 2 et 3, avec des CMB comprises entre 0,50 et 5,00 mg/ml. L'origan est la plus active, avec des CMB de 0,50 mg/ml sur les trois pasteurelles. Cette activité est imputée à la présence de carvacrol, une molécule connue pour sa capacité à détériorer les parois bactériennes (Nazzaro, Fratianni, De Martino, Coppola, & De Feo, 2013). Le carvacrol et le thymol, composés majoritaires de l'HE de thym sont deux isomères, mais ils ne présentent pas la même activité. Cette différence peut être reliée à la position de la fonction hydroxyle sur le cycle phénolique (Nazzaro *et al.*, 2013). Ces résultats sont en accord avec les observations réalisées par Mayaud *et al.* (2008) : dans leur étude, les HE présentaient un ordre d'activité suivant : cannelle (CMI = 0,4 mg/ml) > origan (CMI = 2,0 mg/ml) > thym (CMI = 2,7 mg/ml) > girofle (CMI = 4,7 mg/ml) > eucalyptus (CMI = 12,5 mg/ml).

L'HE de cannelle est la seule à présenter une activité bactéricide sur *P. aeruginosa* dans les concentrations testées, présentant une CMB de 1,25 mg/ml. Ces résultats sont en accord avec les données de la bibliographie, qui relatent une capacité de l'HE de cannelle et de son composé majoritaire, le cinnamaldehyde à inhiber le développement de *P. aeruginosa in vitro*. L'activité du cinnamaldehyde a par ailleurs été reliée à sa capacité à inhiber la formation du filament Z de la bactérie, indispensable à sa division (Lang *et al.*, 2016; Ooi *et al.*, 2006). Globalement, les résultats observés sur cette bactérie sont en accord avec les données présentées par Mayaud *et al.* (2008). En effet dans leurs travaux, une CMI de 2,4 mg/ml était observée pour *P. aeruginosa*, alors que 21,9 mg/ml d'origan étaient nécessaires pour observer le même effet. Les HE de thym, de girofle, et d'eucalyptus, également testées au cours de leurs travaux, ne présentaient pas d'activité sur cette bactérie (Mayaud *et al.* 2008).

À contrario, l'ensemble des HE testées présente une activité sur la bactérie *S. suis*, de Gram +. Globalement, il est reconnu que les HE ont une activité plus forte sur les bactéries de

type Gram + que sur les bactéries de type Gram - et ce en raison de la composition de la paroi (voir section introduction § 2.1.1). En effet, leur diffusion est limitée à travers la paroi d'une bactérie Gram - en raison de la présence de lipopolysaccharides hydrophiles, les HE étant lipophiles. Les concentrations bactéricides observées pour les HE sur les bactéries *S. suis* 1 et *S. suis* 2 sont comprises entre 0,25 mg/ml et 5,00 mg/ml. Les HE les plus actives sont la cannelle, la girofle, l'origan et le thym. L'HE d'origan est à nouveau la plus active avec des CMB de 0,12 et 0,25 mg/ml. On peut également noter que *S. suis* 2 semble moins sensible aux HE que *S. suis* 1. Les HE faiblement actives comme le citron et la menthe par exemple présentent respectivement des CMB de 1,25 et 0,50 mg/ml sur *S. suis* 1. Les concentrations doivent être augmentées à 5,00 mg/ml pour pouvoir observer le même effet sur *S. suis* 2. Ce résultat montre de nouveau l'importance d'évaluer les activités sur différentes souches bactériennes d'une même espèce, afin de pouvoir utiliser des concentrations actives moyennes. Une absence de données concernant les activités antibactériennes des HE sur *Streptococcus suis* nous empêche de comparer nos résultats à la bibliographie. Les HE présentent toutefois des activités sur d'autres streptocoques, comme *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* et *S. uberis*, impliqués dans la mammite et dont il sera question dans le chapitre 4.

Ces résultats font ressortir les HE de cannelle, girofle, origan et thym comme les plus actives sur les bactéries de la sphère respiratoire. Par ailleurs, la cannelle est la seule à développer une activité sur le pathogène *P. aeruginosa*. Ces HE ont donc été incluses dans les mélanges afin d'obtenir des formules actives sur l'ensemble des souches étudiées.

2.4.2 Activité des mélanges

Les concentrations actives obtenues pour les mélanges de la sphère respiratoire sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des mélanges testés sur les bactéries impliquées dans les pathologies respiratoires, exprimées en mg/ml. « - » indique que le mélange est directement bactéricide dans ces conditions. L'indication « >5,0 » signifie que le mélange ne présente pas d'activité aux concentrations testées.

		<i>Pasteurella multocida</i>			<i>Pseudomonas</i>	<i>Streptococcus suis</i>	
		1	2	3	<i>aeruginosa</i>	1	2
Resp 1	CMI	-	-	-	>5,0.	-	-
	CMB	0,25	0,25	0,25	>5,0.	0,25	1,25
Resp 2	CMI	-	0,25	0,25	>5,0.	-	-
	CMB	0,25	0,50	0,50	>5,0.	0,25	1,25
Resp 3	CMI	0,25	0,25	-	>5,0.	-	-
	CMB	0,50	0,50	0,25	>5,0.	0,50	1,25
Resp 4	CMI	-	-	-	2,50	-	-
	CMB	0,12	0,25	0,50	5,00	0,50	1,25
Resp 5	CMI	0,25	-	-	>5,0.	-	-
	CMB	0,50	0,25	0,50	>5,0.	0,50	1,25
Abf1	CMI	-	-	-	1,25	-	-
	CMB	0,50	1,25	1,25	2,50	0,25	0,50

Resp1 : citron girofle origan thym
 Resp2 : citron girofle origan eucalyptus
 Resp3 : girofle thym niaouli eucalyptus

Resp4 : cannelle menthe eucalyptus
 Resp5 : girofle thym eucalyptus
 Abf1 : cannelle menthe ail

Les mélanges candidats de la sphère respiratoire sont tous actifs sur les bactéries *P. multocida* et *S. suis*. Les concentrations bactéricides obtenues sont comprises entre 0,12 et 1,25 mg/ml. Seuls les mélanges Resp4 et Abf1 sont actifs sur *P. aeruginosa*, avec des CMB respectives de 5,00 et 2,50 mg/ml.

La bactérie *P. multocida* est globalement peu sensible aux HE pures et affectée par des concentrations comprises entre 0,25 et 5,00 mg/ml (cf. tableau 4). Pour les mélanges respiratoires, les concentrations actives sont comprises entre 0,12 et 0,50 mg/ml. La formation de mélange a donc pour effet d'abaisser les concentrations actives et de réduire l'écart entre les concentrations extrêmes. Les mélanges Resp1 (CMB = 0,25 mg/ml sur les 3 bactéries) et Resp4 (CMB = 0,12, 0,25 et 0,50 mg/ml respectivement) sont les plus actifs sur ces bactéries. La forte activité du mélange Resp1 est liée à la combinaison des HE de girofle, d'origan et de thym,

toutes trois actives individuellement. D'ailleurs le remplacement du thym par l'eucalyptus dans le mélange Resp2 a pour effet une augmentation de la CMB sur *P. multocida* 2 et 3, passant de 0,25 à 0,50 mg/ml. En ce qui concerne le mélange Resp4, composé de cannelle d'eucalyptus et de menthe, l'activité est principalement liée à la présence de cannelle, les deux autres n'étant pas actives individuellement. Si l'on compare les CMB obtenues avec la cannelle pure - 2,50, 1,25 et 1,25 mg/ml sur les trois bactéries - à celles obtenues pour Resp4 - 0,12, 0,25 et 0,50 mg/ml sur les trois bactéries - on observe un abaissement des concentrations actives pour le mélange. Ce résultat pourrait donc signifier une synergie entre les trois HE constituant le mélange.

La bactérie *P. aeruginosa* est très peu sensible aux HE et seule la cannelle est active dans les concentrations testées, avec une CMB de 1,25 mg/ml. Seuls les mélanges comportant de la cannelle, à savoir les mélanges Resp4 (cannelle menthe eucalyptus) et Abf1 (cannelle menthe ail) sont actifs, avec des CMI respectives de 2,25 et 1,25 mg/ml et des CMB respectives de 5,00 et 2,50 mg/ml. La présence d'ail plutôt que d'eucalyptus permet de réduire de moitié les concentrations actives entre Resp4 et Abf1. Cette HE est riche en composés sulfurés (DADS, ...) connus pour leurs activités sur la souche de référence *P. aeruginosa* PA01 (Casella *et al.*, 2013; Tsao & Yin, 2001). Cependant, elle n'est pas active dans les conditions testées. Le mélange Abf1 présente également un abaissement des concentrations actives par rapport aux HE seules, ce qui peut également laisser penser à une synergie entre les différents composants.

Concernant *S. suis*, les mélanges respiratoires présentent des activités comprises entre 0,25 et 1,25 mg/ml. Comme pour *P. multocida*, on observe donc un abaissement et un resserrement des concentrations actives pour les mélanges, les HE seules présentant des CMB comprises entre 0,12 et 5,00 mg/ml. Les mélanges Resp1 et 2 présentent les concentrations actives les plus basses, certainement liées à la présence d'origan, qui est l'HE la plus active sur cette bactérie.

D'après ces résultats, la réalisation des mélanges permet d'élargir le spectre d'activité et d'homogénéiser les concentrations actives pour un intervalle de concentrations réduit, puisque l'ensemble des bactéries peut être affecté par un même mélange à des concentrations équivalentes. L'apport de cannelle dans les mélanges Resp4 et Abf1 permet notamment d'être actif sur *P. aeruginosa*, une bactérie Gram - normalement peu sensible. Par ailleurs des synergies entre les HE sont pressenties dans ces deux mélanges. Le mélange Resp4 semble donc être le meilleur candidat si l'on

considère les activités antibactériennes. Ce mélange ne présentait toutefois pas de bonnes activités anti-radicalaires et antioxydantes. Le mélange Resp1 quant à lui, présente de fortes activités sur les bactéries *P. multocida* et *S. suis*, sans réussir à affecter *P. aeruginosa*. L'ajout d'HE de girofle, fortement anti-radicalaire, dans le mélange Resp4 pourrait permettre d'augmenter son activité antioxydante, tout en conservant l'activité sur l'ensemble des souches affectées à la sphère respiratoire avec la cannelle. Par ailleurs les propriétés décongestionnantes et expectorantes des HE de menthe et d'eucalyptus pourraient être conservées. En ce qui concerne le mélange Resp1, nous avons vu que l'HE de thym n'était pas indispensable à son activité antibactérienne. Son remplacement par l'HE de cannelle pourrait donc être envisagée afin d'élargir le spectre d'activité du mélange à *P. aeruginosa*, tout en conservant les qualités antioxydantes et anti-inflammatoires du mélange. Le mélange de cannelle, citron, girofle et origan envisagé ici correspond en réalité au mélange Dig1 qui sera étudié dans le chapitre 3.

2.5 Activités anti-herpétiques

2.5.1 Évaluation de la cytotoxicité sur le modèle cellulaire VERO

Le système respiratoire des animaux et soumis aux pathogènes présents dans leur environnement et inhalés. Ces pathogènes peuvent être de nature différentes (bactéries, virus, champignons) et le risque de développer une pathologie grave s'accroît avec les cas d'infections croisées. Ainsi, le système respiratoire d'un animal affaibli par une infection virale peut devenir un terrain favorable au développement de bactéries. Nous avons donc choisi de mesurer l'efficacité des HE et mélanges sur le modèle viral Herpès Simplex de type 1 (VHS-1). Ce virus enveloppé fait partie de la famille des *Herpesviridae*, qui compte également le virus Epstein-Barr et le virus de la maladie d'Aujeszky.

La toxicité des HE et mélanges sur les cellules VERO a été établie dans un premier temps afin de pouvoir utiliser ces cellules comme modèle de cytopathicité. Les concentrations ont été établies après 48h d'incubation, sur un tapis cellulaire préalablement formé en microplaques. Les concentrations impliquant 50% de toxicité (CC₅₀) obtenues pour les différentes HE et mélanges sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 5 : CC₅₀ en µg/ml obtenues pour les HE et les mélanges respiratoires sur les cellules VERO. « >200 » signifie que l'HE ne présente pas de toxicité dans les concentrations testées.

	CC ₅₀ (µg/ml)
Cannelle	31,07
Citron	> 200
Eucalyptus	162,65
Girofle	76,47
Menthe	> 200
Niaouli	> 200
Origan	130,07
Thym	> 200
Resp1	> 200
Resp2	> 200
Resp3	> 200
Resp4	99,15
Resp5	> 200

Les HE de cannelle, eucalyptus, girofle et origan présentent une toxicité sur les cellules VERO dans les concentrations testées, à savoir de 200 à 0,2 µg/ml. L'HE de cannelle est la plus toxique avec une CC₅₀ de 31,07 µg/ml, ce qui est en accord avec son activité sur d'autres organismes comme les bactéries, observée plus haut. Ce résultat est également en accord avec les travaux de Ooi *et al.* (2006), ayant observé une cytotoxicité de la cannelle sur les cellules VERO, lorsque des concentrations supérieures à 50 µg/ml étaient utilisées. Les toxicités observées pour les HE d'origan et de girofle sont par ailleurs également en accord avec leurs activités sur d'autres organismes. L'HE d'eucalyptus présente la CC₅₀ la plus élevée, de 162,65 µg/ml. Ce résultat est en désaccord avec les travaux de Minami *et al.* (2003) dans lesquels l'HE d'eucalyptus est utilisée à des concentrations supérieures à 1mg/ml sans cytotoxicité.

Parmi les mélanges, seul le mélange Resp4 présente une activité cytotoxique, en lien avec sa composition (cannelle, eucalyptus, menthe). Les autres mélanges de la sphère respiratoire ne présentent pas de cytotoxicité dans les concentrations testées. Les HE et mélanges ont été testés à des concentrations inférieures aux CC₅₀ dans le cadre des tests antiviraux.

Globalement les cibles des HE sur les cellules eucaryotes sont les mêmes que sur les cellules procaryotes : elles déstabilisent les membranes de par leur lipophilie, réduisent les gradients de pH et affectent les pompes à protons. Elles sont également capables, dans le cas des cellules eucaryotes, de dépolariser les membranes mitochondriales en réduisant le potentiel membranaire (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008).

2.5.2 Mise en évidence d'activités sur le virus VHS-1

Les tests antiviraux réalisés sur les HE et les mélanges n'ont permis d'observer aucune activité inhibitrice. Peu importe le moment auquel les HE étaient ajoutées, à savoir en prétraitement des cellules, en prétraitement des virus ou après l'infection, la mortalité cellulaire induite par le virus n'a pas pu être réduite.

Ce résultat va à l'encontre des nombreuses observations réalisées sur ce modèle VHS-1, les activités antivirales des HE étant en effet bien connues (Adorjan & Buchbauer, 2010). D'après Schuhmacher *et al.* (2003) l'HE de menthe réduisant l'activité d'VHS-1 avec une CI_{50} de 0,02 mg/ml, sur une lignée de cellules RC-37. Par ailleurs, leurs travaux montraient que cette HE possédait une activité principalement virucide, déstabilisant l'enveloppe du virus VHS-1. Les travaux présentés par Minami *et al.* (2003) montraient également une inhibition totale de l'activité de VHS-1 par les HE de menthe, eucalyptus et citron appliquées à une concentration équivalente à 10 mg/ml.

Cette première observation permet de montrer les écarts de concentrations actives observées dans les différents travaux. Les concentrations actives de 10 mg/ml se sont avérées fortement toxiques lors de nos essais. Par ailleurs, l'ensemble de ces activités ont été mesurées par la méthode de réduction des plages de lyse. Il est en effet considéré qu'une particule virale adhérente sur une cellule va se multiplier et se propager de proche en proche, formant une plage de lyse dans le tapis cellulaire. Les plages de lyse sont alors comptées en fin de tests, et une plaque est attribuée à une particule virale présente. Dans notre cas, l'activité antivirale a été établie par la mesure de viabilité cellulaire. Cette différence représente un deuxième biais concernant l'absence d'activité observée lors de ces travaux.

Face aux difficultés rencontrées lors de cette étude de la mesure d'activité sur le virus VHS-1, nous avons souhaité évaluer l'activité des mélanges sur trois virus animaux non détenus au laboratoire : le virus de la bronchite infectieuse, l'influenza porcine et

l'entérovirus bovin de type 1. Le mélange Resp2, a notamment été sélectionné pour l'évaluation sur le virus de la bronchite infectieuse.

3 Conclusion

L'ensemble des travaux menés dans cette partie nous ont permis de mettre en évidence deux mélanges potentiellement actifs pour la prévention des pathologies de la sphère respiratoire. Le mélange Resp1 (citron girofle origan thym) cumule les activités anti-radicalaires et antioxydantes d'après les tests DPPH, FRAP, TBARS et β -carotène. Il permet également d'inhiber deux enzymes impliquées dans la réponse inflammatoire, à savoir la 15-lipoxygénase et l'élastase. Les activités antibactériennes obtenues avec ce mélange sont également intéressantes puisque les concentrations actives sur les Pasteurelles et *S. suis* étaient réduites par rapport aux HE seules. Le mélange Resp4 (cannelle, eucalyptus, menthe) quant à lui présentait des activités anti-radicalaires et antioxydantes moyennes, mais présentait l'avantage d'être également actif sur la bactérie *P. aeruginosa*, naturellement résistante à différents antibiotiques. L'activité des huiles essentielles sur le modèle VHS-1 n'a pas pu être mise en évidence dans cette étude, bien qu'elle soit fréquemment rapportée (Minami *et al.*, 2003; Schnitzler, Koch, & Reichling, 2007). Les informations obtenues, concernant la cytotoxicité des HE sur les cellules VERO, mettent tout de même en garde sur la toxicité non ciblée des HE les plus puissantes comme la cannelle ou l'origan, qui se sont par ailleurs illustrées pour leurs activités antibactériennes.

Ce premier chapitre permet également de sélectionner les tests les plus informatifs concernant notamment les activités anti-radicalaires et antioxydants. Le test FRAP, réalisé dans un milieu aqueux, ne semble pas favorable à l'étude des HE, tout comme le test TBARS qui ne permet pas d'étudier l'ensemble des HE et mélanges en raison de faux positifs. Ces deux tests seront donc écartés dans la suite de ce manuscrit et dans les études futures.

Conformément aux objectifs de travail, les tests déployés dans cette sphère ont permis de mettre en évidence deux mélanges candidats à l'étude *in vivo*. Ces deux mélanges, de par leur composition, cumulent des activités antioxydantes principalement liées à la présence d'HE de girofle (Resp1), des activités anti-inflammatoires et des activités antibactériennes liées cette fois-ci aux HE d'origan ou de cannelle. Le spectre antibactérien est augmenté et les concentrations actives réduites. Une des perspectives proposées dans cette partie est la

réalisation d'un mélange Resp1 modifié, contenant la cannelle à la place du thym et un mélange Resp4 enrichit par l'ajout de girofle. Ces changements pourraient d'une part, améliorer les activités antibactériennes du mélanges Resp1 sur les bactéries résistantes comme *P. aeruginosa* et augmenter l'effet antioxydant et anti-radicalaire du mélange Resp4. A noter que le mélange citron girofle cannelle origan proposé pour Resp1 correspond au mélange Dig1 présenté dans le chapitre 3.

Valorisation industrielle

Le travail expérimental décrit dans cette partie a permis l'élaboration des noyaux d'huiles essentielles Respilor® par l'entreprise BioArmor. Ce noyau est formulé sous forme de poudre et a pour vocation d'être distribué en mélange avec l'aliment. Ce complément a pour objectif de prévenir l'apparition de pathologies respiratoires liées à des moments clés comme la période post-sevrage ou l'engraissement.

Actuellement, l'efficacité du noyau Respilor® est vérifiée *in vivo* auprès d'élevages partenaires. Différents paramètres permettent de mesurer son activité, notamment les suivis de croissance et de consommation, le relevé des pathologies ou symptômes observés, le décompte des toux et des traitements appliqués ainsi que les différentes données obtenues sur les carcasses (poids, plus-value). Ces essais permettront notamment de valider la formulation, les doses, ainsi que le rythme de distribution du complément (en cure ou en continu).

4 Bibliographie du chapitre 1

A

Adorjan, B., & Buchbauer, G. (2010). Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(6), 407–426.

Alinkina, E. S., Misharina, T. a., & Fatkullina, L. D. (2012). Antiradical properties of oregano, thyme, and savory essential oils. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49(1), 73–78.

B

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475.

Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Biondi, D. M., & Ruberto, G. (1998). Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidative Activity of Laurel, Sage, Rosemary, Oregano and Coriander Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research*, 10(6), 618–627.

Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Figueiredo, a C., & Ruberto, G. (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils, 244, 235–244.

Baylac, S., & Racine, P. (2004). Inhibition of human leukocyte elastase by natural fragrant extracts of aromatic plants. *International Journal of Aromatherapy*, 14(4), 179–182.

Belaouaj, A. (2002). Neutrophil elastase-mediated killing of bacteria: lessons from targeted mutagenesis. *Microbes and Infection*, 4(12), 1259–1264.

C

Casella, S., Leonardi, M., Melai, B., Fratini, F., & Pistelli, L. (2013). The role of diallyl sulfides and dipropyl sulfides in the *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil of garlic, *Allium sativum* L., and leek, *Allium porrum* L. *Phytotherapy Research*, 27(3), 380–383.

Clutterbuck, a L., Woods, E. J., Knottenbelt, D. C., Clegg, P. D., Cochrane, C. A., & Percival, S. L. (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, 121(1–2), 1–17.

D

Dabo, S. M., Taylor, J. D., & Confer, A. W. (n.d.). *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease.

De Cássia Da Silveira E Sá, R., Andrade, L. N., & De Sousa, D. P. (2013). A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*, *18*(1), 1227–1254.

Dorman, H. J., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, *88*(2), 308–16.

G

Guérin, J., & Boissieu, C. (2008). La bronchite infectieuse, 6–8.

J

Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., & Schmidt, E. (2006). Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(17), 6303–7.

L

Lang, M., Rodrigues, S., Boulho, R., Duteil, E., Bazire, A., & Bedoux, G. (2016). An Essential Oil Blend Prevents *Pseudomonas aeruginosa* PA01 from Forming Biofilms. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, *7*(2).

M

Mastelić, J., Jerković, I., Blazević, I., Poljak-Blazi, M., Borović, S., Ivancić-Baće, I., ... Müller, N. (2008). Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(11), 3989–96.

Mayaud, L., Carricajo, A., Zhiri, A., & Aubert, G. (2008). Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Letters in Applied Microbiology*, *47*(3), 167–173.

Mbuthia, P. G., Christensen, H., Boye, M., Petersen, K. M., Bisgaard, M., Nyaga, P. N., & Olsen, J. E. (2001). Specific detection of *Pasteurella multocida* in chickens with fowl

cholera and in pig lung tissues using fluorescent rRNA in situ hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(7), 2627–33.

Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252–87.

Miguel, M. G., Cruz, C., Faleiro, L., Simões, M. T. F., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2010). *Foeniculum vulgare* essential oils: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Natural Product Communications*, 5(2), 319–28.

Minami, M., Kita, M., Nakaya, T., Yamamoto, T., Kuriyama, H., & Imanishi, J. (2003). The Inhibitory Effect of Essential Oils on Herpes Simplex Virus Type-1 Replication *In Vitro*. *Microbiology and Immunology*, 47(9), 681–684.

Ministère de l'agriculture et de la pêche. (2009). *Infections à Streptococcus suis*.

Mori, M., Ikeda, N., Kato, Y., Minamino, M., & Watabe, K. (2002). Inhibition of elastase activity by essential oils *in vitro*. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 1(4), 183–187.

N

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–74.

O

Office Vétérinaire Fédéral. (2013). *Maladie d'Aujeszky*.

Ohbayashi, H. (2002). Neutrophil elastase inhibitors as treatment for COPD. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 11(7), 965–980.

Olszowy, M., & Dawidowicz, A. L. (2016). Essential oils as antioxidants: their evaluation by DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, and β -carotene bleaching methods. *Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly*, 147(12), 2083–2091.

Ooi, L. S. M., Li, Y., Kam, S.-L., Wang, H., Wong, E. Y. L., & Ooi, V. E. C. (2006). Antimicrobial Activities of Cinnamon Oil and Cinnamaldehyde from the Chinese Medicinal Herb *Cinnamomum cassia* Blume. *The American Journal of Chinese Medicine*, 34(3), 511–522.

R

Romeilah, R. M., Fayed, S. a., & Mahmoud, G. I. (2010). Chemical compositions, antiviral and antioxidant activities of seven essential oils. *Journal of Applied Sciences Research*, 6(January), 50–62.

Ross, R. F. (2006). *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. *Animal Health Research Reviews*, 7(1–2), 13–29.

Ruberto, G., & Baratta, M. T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69(2), 167–174.

S

Schnitzler, P., Koch, C., & Reichling, J. (2007). Susceptibility of drug-resistant clinical herpes simplex virus type 1 strains to essential oils of ginger, thyme, hyssop, and sandalwood. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(5), 1859–1862.

Schuhmacher A, Reichling J, S. P. (2003). Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Phytomedicine.*, 10(6–7), 504–10.

T

Tsai, M., Wu, C., Lin, T., Lin, W., Huang, Y., & Yang, C. (2013). Chemical Composition and Biological Properties of Essential Oils of Two Mint Species. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(4), 577–582.

Tsao, S. -m., & Yin, M. -c. (2001). *In vitro* activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(5), 665–670.

V

Viuda-Martos, M., Ruiz Navajas, Y., Zapata, E. S., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour Fragr. J*, 25, 13–19.

W

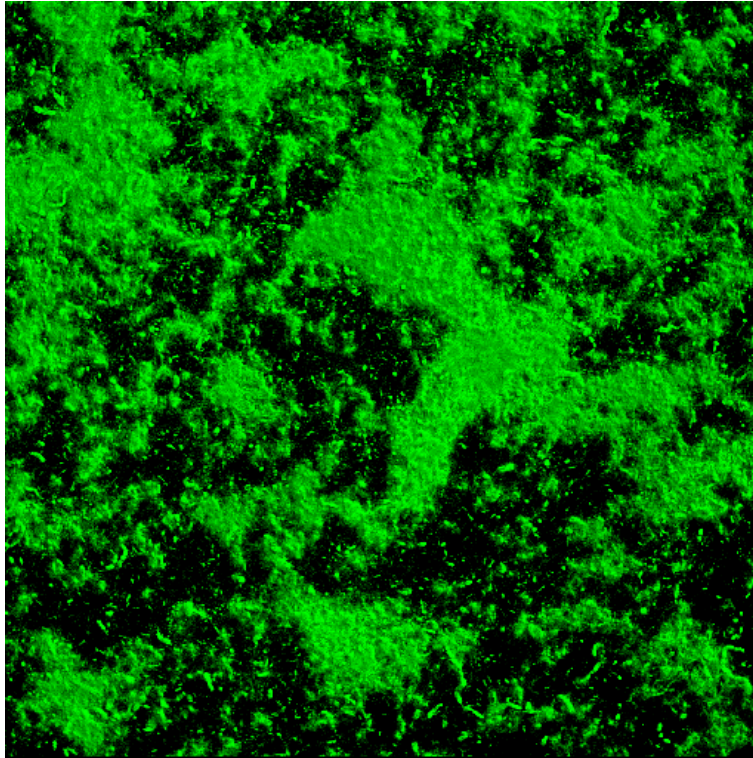
Wang, Y. (2002). The Function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292(2), 396–401.

Wei, A., & Shibamoto, T. (2010). Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7218–7225.

Wretling, B., & Pavlovskis, O. R. (n.d.). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and its role in pseudomonas infections. *Reviews of Infectious Diseases*, 5 Suppl 5, S998-1004.

Y

Yoshikawa, T., & Naito, Y. (2002). What is oxidative stress? *Japan Medical Association Journal*, 45(7), 271–276.



Chapitre 2

Effet des huiles essentielles sur le biofilm bactérien

Liste des figures

Figure 1 : Tryptique de la régulation de la formation du biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Fazli <i>et al.</i> , 2014).	171
Figure 2 : Activités antibiofilm des HE et de leur composés majoritaires à différentes concentrations (mg/ml) sur le biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	183
Figure 3 : Activités antibiofilm des différentes combinaisons d'HE (A) et de composés majoritaires (B) sur le biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	183
Figure 4 : Observation au microscope confocale à balayage laser du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> (incubation 16h à 37°C)..	183

Liste des tableaux

Tableau 1 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des huiles essentielles seules ou en mélanges ainsi que de leurs composés majoritaires seuls ou en mélanges, testés sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (mg/ml).....	182
--	-----

1 Introduction

Ce chapitre constitue un focus sur l'activité des huiles essentielles (HE) et en particulier du mélange Abf1 (ail, cannelle et menthe) sur la capacité des bactéries à former des biofilms. En médecine vétérinaire, les biofilms sont impliqués dans diverses pathologies telles que les pneumonies, les abcès du foie, les entérites, les mammites ainsi que les infections des plaies (Clutterbuck *et al.*, 2007). La présence de biofilms bactériens chez l'hôte, induit une forte résistance des pathogènes face aux cellules du système immunitaire. De plus, en raison de leur résistance accrue aux antibiotiques, l'infection liée aux bactéries planctoniques n'est donc que régulée, alors que des bactéries rémanentes et potentiellement infectieuses restent présentes (Clutterbuck *et al.*, 2007). La présence de biofilm a été associée à différents cas de maladies récurrentes comme les pasteurelloses (Ross, 2006) ou les mammites (Melchior, Vaarkamp, & Fink-Gremmels, 2006). De plus, les biofilms observés *in vivo* sont pour la plupart multi-espèces et peuvent également abriter d'autres pathogènes, notamment les virus (Filloux & Vallet, 2003).

Le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, qui a fait l'objet de premiers travaux présentés dans le chapitre 1, est utilisé ici comme modèle de la formation de biofilm. Cette bactérie développe des résistances naturelles aux antibiotiques d'où l'intérêt de l'utiliser comme modèle pour la recherche d'alternatives. L'activité du mélange Abf1 est évaluée ici par différentes méthodes, en conditions statiques ou dynamiques, c'est-à-dire sous un flux constant de milieu nutritif. Les résultats principaux obtenus pour ce mélange sont présentés sous la forme d'une publication intitulée « An essential oil blend prevents *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 from forming biofilms » et publiée en 2016 dans le « Journal of bacteriology and parasitology ».

Concernant les voies de formation et de régulation du biofilm de *P. aeruginosa*, celle-ci sont bien connues, ce qui en fait un organisme de choix dans notre étude (Filloux & Vallet, 2003). Globalement, on considère qu'il existe trois voies principales de régulation, résumées dans le tryptique de régulation, présenté en figure 1.

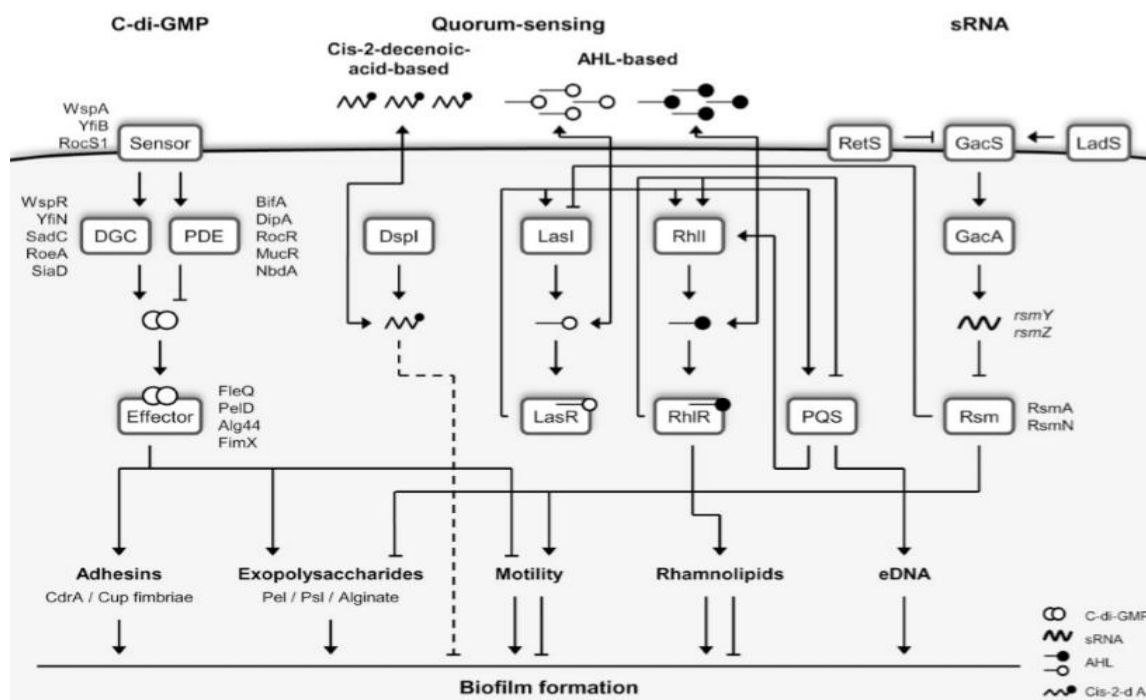


Figure 1 : Tryptique de la régulation de la formation du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* (Fazli et al., 2014).

Le c-di-GMP, cyclic diguanosine-5'-monophosphate, a un rôle important dans la formation du biofilm en particulier sur les adhésines et la synthèse d'exopolysaccharides ce qui permet à la bactérie de passer d'un état mobile à un état de biofilm. Sa synthèse est réalisée par des diguanylate cyclases (DGCs) et sa dégradation est médiée par les phosphodiesterases (PDEs). Un niveau élevé de c-di-GMP intracellulaire induit la production d'adhésines et des composants de la matrice extracellulaire. Un faible niveau de c-di-GMP quant à lui, dérègle la production d'adhésines et la synthèse des composants de la matrice. Cela entraîne une libération des bactéries sous forme planctonique. L'activation des DGCs se fait chez *P. aeruginosa* par le biais de chimiorécepteurs comme WspA (activation en réponse à la croissance des bactéries sur une surface). L'activation de WspA entraîne une phosphorylation de la protéine WpsR qui stimule la synthèse de c-di-GMP. Le c-di-GMP possède quatre effecteurs ayant un rôle dans la formation du biofilm : Alg44 favorise la production d'exopolysaccharides, plus particulièrement les alginates ; PelD régule également positivement la production d'exopolysaccharides ; FimX permet d'inhiber la mobilité (twitching) et donc de favoriser le mode sessile des bactéries ; FleQ inhibe la synthèse des flagelles.

Une deuxième voie de régulation du biofilm est celle du Quorum Sensing (QS). Cette voie dépend de trois principaux systèmes : les systèmes Las et Rhl faisant intervenir des N-

acetyl homoserine lactone (AHLs), et le système *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). Il existe une hiérarchie dans les systèmes : Las est le premier et régule positivement le système Rhl et PQS. Le QS n'a pas de rôle important dans les premières étapes du biofilm (adhésion) mais beaucoup plus dans la maturation et la structure du biofilm. Le QS a également un rôle dans la génération de l'ADN extracellulaire qui fait partie de la matrice *via* le PQS, contrôle la production de biosurfactant (rhamnolipides) et joue un rôle dans la tolérance aux cellules immunitaires.

Les petits ARN sont la troisième voie de régulation de la formation des biofilms de *P. aeruginosa*. La protéine LadS stimule GacS et permet la phosphorylation de GacA. Cela entraîne un contrôle positif de la transcription de deux petits ARN : *rsmz* et *rsmY*. Ces deux ARN réduisent la disponibilité de la protéine RsmA qui a été jugée comme un régulateur négatif de gènes importants dans la formation de biofilm, y compris *psl* et les gènes liés au QS. Les Psl (Polysaccharide synthesis locus) sont des polysaccharides indispensables à la l'adhésion de *P. aeruginosa* à une surface et interviennent dans les étapes post-adhésion pour maintenir la structure du biofilm (Ma, Jackson, Landry, Parsek, & Wozniak, 2006). Les activités du mélange Abf1 et de ses constituants ont donc été mises en évidence sur l'expression de ces gènes afin de comprendre les mécanismes d'action mis en jeu.

2 Résultats et discussion

2.1 Activité du mélange Abf1 sur le biofilm de *P. aeruginosa*

L'activité du mélange Abf1 sur l'adhésion des bactéries et la maturation du biofilm a été mise en évidence par trois méthodes d'analyses différentes. Dans un premier temps, les concentrations actives ont été déterminées en microplaques, par coloration du biofilm au cristal violet. La conservation de l'activité sur support de verre a été évaluée en développant le biofilm sur des lames de verre, en conditions statiques. Enfin, afin d'observer le biofilm en condition dynamique, les biofilms ont été formés en cellules à flux, permettant l'apport continu de nutriments. Cette dernière méthode a également permis l'observation et la quantification du biofilm par microscopie confocale à balayage laser (de l'anglais « confocal laser scanning microscopy », CLSM). Les résultats obtenus sont présentés dans l'article « An essential oil blend prevents *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 from forming biofilms », publié dans le Journal of Bacteriology and Parasitology en 2016 (Lang *et al.*, 2016)

An Essential Oil Blend Prevents *Pseudomonas aeruginosa* PA01 from Forming Biofilms

Lang Marie¹, Rodrigues Sophie¹, Boulho Romain¹, Duteil Emmanuel², Bazire Alexis¹ and Bedoux Gilles^{1*}

¹Université de Bretagne-Sud, EA 3884, LBCM, IUEM, F-56100 Lorient, France

²BioArmor Development SARL, Z.I. de la Gare, F- 22940 Plaintel, France

*Corresponding author: Bedoux Gilles, Université de Bretagne-Sud - Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines Centre de Recherche Yves Coppens-Campus de Tohannic - BP 57356017 Vannes Cedex, France, Tel: (+33) 02 97 01 71 57; E-mail: gilles.bedoux@univ-ubs.fr

Received date: February 29, 2016; Accepted date: March 25, 2016; Published date: March 29, 2016

Copyright: © 2016 Lang M, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Essential oils are natural ingredients exhibiting antimicrobial and antioxidant effects. The properties of a mix of *Allium sativum*, *Cinnamomum cassia* and *Mentha piperita* essential oils are established in this study on a biofilm forming pathogen, *Pseudomonas aeruginosa* PA01.

Minimal inhibitory and bactericidal concentrations were first determined on planktonic cells for the pure essential oils, then for the blend. A crystal violet assay provided the active concentration of a blend for bacterial biofilm. *Pseudomonas aeruginosa* PA01 planktonic and sessile cells were affected by a concentration of an essential oil blend of 0.125%. The active concentration of 0.1% was confirmed using a protocol developed on glass slides, for its activity on adhesion and biofilm formation. The experiment was then repeated in flow cells to monitor the structural biofilm development using confocal laser scanning microscopy. *Pseudomonas aeruginosa* PA01 adhesion was severely inhibited by the blend concentration at 0.5%. Its biofilm was strongly affected from a 0.1% blend concentration and was totally eradicated when the concentration reached 1%.

The essential oil blend has an enlarged spectrum of activity and is effective on early biofilm development stages, with a concentration that does not involve bactericidal activities. These results are predictive for potential use of this blend as a cleanser.

Keywords: Essential oils; Adhesion; Biofilm; *Pseudomonas aeruginosa*; Structural analyses; Confocal laser scanning microscopy

Introduction

Biofilms are complex structures involving different species of microorganisms, embedded in an exopolysaccharidic matrix [1]. Bacteria are able to communicate due to a quorum sensing system-nutrient, DNA and proteins being exchanged between the different protagonists [2]. Due to this structure, biofilms are resistant to disinfectants or detergents and lead to complications in many fields, such as the food industry or medical surgery [1,3]. Well known *Pseudomonas aeruginosa* is a pathogen able to contaminate medical devices like dentures, catheters or prosthesis, but also corporal tissue, leading to severe infections and exhibit multi-drug resistance [4,5].

Although surface cleaning is strongly controlled by chemical or physical methods (mechanical scrubbing, brushing, scraping or high pressure spraying for example), it is rarely effective for total eradication of biofilms [2]. In fact, biofilms are able to adapt themselves to chemical products, leading to high resistance and new solutions have to be investigated. Enzymes, phages, interspecies competition or natural plant extracts - like volatile compounds - have been studied and offer alternatives to obtain new anti-biofilm products [6-9].

Terrestrial plants are sessile organisms, a status which forces them to adapt to biotic or abiotic stresses through the production of secondary metabolites. Biofilm development on their surface is one of the biotic stresses they have to deal with, leading to the excretion of essential oils

[10]. Essential oils are lipophilic and complex chemical mixes with high terpenic and phenolic contents. Antibacterial activities of essential oils and their components have been widely studied over the past few years [11-13]. Due to their lipophilic character, they are able to pass through cell membranes, disrupt the different phospholipids, polysaccharides and fatty acid layers, and finally permeabilize cells causing a loss of integrity. Clove, thyme or oregano essential oils among others are also able to affect bacterial biofilms specifically by interfering with quorum sensing, inhibiting the peptidoglycan synthesis or reducing cell adherence [14].

Allium sativum essential oil has proved its effectiveness against *P. aeruginosa* planktonic cells, due to the presence of diallyl sulphides, compounds containing sulphuric bounds. In their studies, Sandasi and Valeriano also showed the effectiveness of *Mentha piperita* essential oils against biofilms [2,3]. Kim et al. reported the particular ability of cinnamaldehyde, the main compound of *Cinnamomum cassia* essential oil to down regulate quorum sensing in *P. aeruginosa* biofilms [15]. As the effectiveness of these three essential oils has been reported in different publications, we associated them in order to develop products that are active during early and late biofilm formation stages. As bacteria within a biofilm are 10 to 1000 times more resistant than planktonic ones [16], we also combined essential oils in order to enlarge the antimicrobial activity spectrum. Furthermore, a biofilms' morphology is often adaptable against external growth conditions, linked to differences in susceptibility. To prove specific anti-biofilm activity, we tested the blend against both planktonic and sessile bacteria.

Materials and Methods

Plant extracts

The essential oils (EOs) used in this study were purchased from BioArmor Développement SARL (Plaintel, France). Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) reports detail the major constituents, and were joined with each EO. *Cinnamomum cassia* essential oil (CEO) was distilled from leaves and branches, *Allium sativum* essential oil (AEO) was extracted from pods and *Mentha piperita* essential oil (MEO) was extracted from leaves. All EOs were extracted by a steam distillation process and were stored in the dark at 4°C.

Bacteria and culture conditions

Pseudomonas aeruginosa PAO1 was grown aerobically in Lysogeny broth (LB) medium (g l⁻¹: NaCl 10; Tryptone, 10; Yeast Extract, 5) at 37°C overnight. NaCl was purchased from Fischer, France; Tryptone and Yeast Extract were purchased from Dutscher, France. The bacterial strain was stored at -80°C in 20% (v/v) glycerol.

Minimal inhibitory concentrations (MIC) and minimal bactericidal concentrations (MBC) of the EOs and blend

The antibacterial activity of the EOs and the blend was measured using a broth dilution method in microplates, adapted from a previously described protocol [17]. CEO, AEO and MEO and the blend were diluted in LB medium within a range of 0.5% to 0.005% (v/v). The same amount of an Ethoxylated Castor Oil (ECO) based emulsifier was added, as for the EO. A volume of 195 µl of each dilution was placed in the wells of a flat bottomed 96 well microplate and bacterial suspension were added to obtain a final Optical Density (OD) of 0.0125 at 600 nm (Shimadzu UV-1800 spectrophotometer Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Germany). Microplates were incubated for 24 h at 37°C without agitation. After cell growth, a tetrazolium salt (MTT, Sigma Aldrich, France) solution in DMSO (Fisher, France) was added to each well at a final concentration of 90 µg ml⁻¹ for 30 min. This allowed viable microorganisms to metabolize the yellow MTT into purple formazan crystals. An aliquot of each well which did not present a formazan production was then spread on LB agar plates, incubated for 24 h at 37°C for the determination of minimal inhibitory concentrations (MIC) or minimal bactericidal concentrations (MBC). MIC and MBC corresponded to the lower concentrations leading to growth or absence of growth, respectively, after spreading. Each test was carried out independently in triplicate.

Anti-biofilm crystal violet assay

Crystal violet assay is a rapid method for the observation of biofilm inhibition [2,10]. EOs was diluted in a LB medium as before. Solution of Gentamycin (Sigma Aldrich, France) at 50 µg ml⁻¹ was used as a positive control. LB medium was used as a negative control. Wells without bacteria inoculation were also used to control the final washing step. For the attachment step, overnight cultures of bacteria were centrifuged for 5 min at 2500 g and the cells were then suspended in sterile physiological saline (SPS 0.9% NaCl) and adjusted at an OD of 0.1 at 600 nm. A volume of 200 µl of this suspension was first placed in a 96 well microplate for adhesion. After 2 h, the wells were rinsed twice with SPS and filled with the different tested conditions. After 24 h incubation at 37°C without agitation, the medium was removed and the wells were rinsed twice with SPS in order to eliminate planktonic

cells. In each well, 200 µl of a 1% crystal violet staining solution in water (Reactif RAL purchased by Servilab, Le Mans, France) was added and rinsed with SPS after 15 minutes until the well which was not inoculated with bacteria was totally colourless. Crystal violet contained in the bacteria was then solubilized with 70% ethanol (Fischer, France) and the OD was read at 600 nm with a Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (ThermoFisher, Illkirch, France). Each test was conducted in triplicate.

Confirmation of active concentration on glass slides

Cell adhesion and biofilm culture

For an adhesion step, clean and sterile glass slides were immersed in SPS (control), in SPS with 0.1% ECO or in SPS with 0.1% ECO and 0.1% EO blend. For each condition, a working solution was inoculated at 0.1 OD at 600 nm with overnight culture of bacteria. After 2 h, glass slides were carefully rinsed once in SPS to remove non-attached bacteria.

For biofilm formation, bacterial adhesion was performed in SPS as previously described. After 2 h, the glass slides were carefully washed once with SPS, and immersed in LB, LB with 0.1% ECO or LB with 0.1% ECO and 0.1% EOB. After 24 h of growth at 37°C without agitation, the slides were rinsed once with SPS before staining. Each experiment was conducted in triplicate.

Fluorescence microscopy

Attached cells and biofilm were observed with an Olympus BX43 fluorescence microscope (Olympus microsystems, Hamburg, Germany) powered by the X-cite 120q led fluorescence illuminator (Lumen dynamics) using a 100x oil immersion lens. Bacteria were detected by immersion in a 28.55 µM DAPI solution, for 10 min in the dark. After staining, the slides were washed once in SPS to remove the excess of dye and covered with cover glasses to enable observation. Three images were taken per slide. The glass surfaces covered by attached bacteria were evaluated by using the ImageJ software (National Institutes of Health, USA).

Anti-biofilm activity tested in flow cells

Cell adhesion and biofilm culture

Biofilm was grown at 37°C under dynamic conditions in a three channel flow cell (1 × 4 × 44 mm; Biocentrum DTU, Denmark) [18]. The flow system was assembled, prepared and sterilized as described before [19]. The substratum consisted of a microscope glass coverslip (24 × 50 st1; KnittelGlasser, Braunschweig, Germany).

For the adhesion step each channel was inoculated with 250 µl of an overnight bacterial culture diluted to an OD of 0.1 at 600 nm in SPS, or in SPS containing 0.5% or 1% ECO, or in SPS containing 0.5% or 1% EOB (with the same amount of ECO). ECO (10% mother solution in SPS) was filtered on a 20 µm sterile membrane to enhance the quality of the images. Bacteria were allowed to attach to the glass substratum during 2 h at room temperature without flow. A constant flow (2.5 ml h⁻¹) of SPS using a Watson Marlow 205U peristaltic pump (Watson Marlow, Falmouth, United Kingdom) was then applied for 15 min in order to remove non-attached cells. Attached bacteria were observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) as described below. This experiment was conducted in duplicate and three images were taken per channel.

For biofilm formation, each channel of the flow cell chamber was connected to LB medium, or LB medium supplemented with ECO (0.1% or 1%) or else with the EOB (0.1% or 1%). The channels were inoculated with 250 µl of a bacterial suspension diluted in SPS to an OD of 0.1 at 600 nm. A two-hour attachment step was performed as described before, and a flow (2.5 ml h⁻¹) of the medium was then applied for 24 h. Biofilms were observed by CLSM as described below. Each experiment was conducted in triplicate and three images were taken per channel.

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Attached bacteria and biofilm observations were performed with a TCS-SP2 microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), using a 63x oil immersion lens. Bacteria were detected after cell attachment by staining with 5 µM of SYTO9 green or after biofilm growth by double-labelling with 5 µM SYTO9 green and 0.3 µM propidium iodide (PI) (Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit, Invitrogen, Carlsbad, USA). The staining was performed by injecting 250 µl of fluorescent dye prepared in SPS into a flow cell channel, incubating at room temperature for 15 min in the dark and washing for 15 min with a flow (2.5 ml h⁻¹) of medium, immediately before CLSM observation. SYTO9 green was excited at 488 nm and fluorescence emission was detected between 500 and 550 nm. PI was excited at 543 nm and fluorescence emission was detected at 620 nm. The fluorescence signal of double-labelled specimens was acquired simultaneously.

The glass surfaces covered by attached bacteria were evaluated by using the ImageJ software. For three-dimensional (3D) visualization, images were taken every micrometer throughout the whole biofilm depth. For the processing of 3D image data (volume rendering with shadow projection), the Leica LAS AF software (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) was used. Quantitative analyses of image stacks

were performed using the COMSTAT software (<http://www.imageanalysis.dk/>) [20]. At least three image stacks from each independent experiment were used for each analysis.

Statistical analysis

Results are expressed as means ± standard deviation (SD). The statistical analysis was carried out with Microsoft® Excel 2013 using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a two-tailed T-test at the 5% level to evaluate differences between the samples. A *p* value of <0.05 was considered significant.

Results and Discussion

Essential oil analysis

The EOs selected here were each constituted of a different family of molecules. As MEO was rich in terpenes, AEO was principally composed of sulphonates and the major compounds of CEO derive from cinnamic acid. The whole composition of the EOs, determined by GC-MS, is presented in Table 1. If their global composition was in accordance with literature, the fine composition was slightly different from published data. MEO is quasi exclusively composed of terpenes (>90%). Main compounds were menthol (32.5%) and its derivate (DL)-menthone (26.5%), menthylacetate (4.9%), isomenthone (4.1%), (D)-neomenthol (3.2%), menthofuran (2.4%) and pulegone (1.6%). Other terpenes like eucalyptol (4.7%), D-limonen (3.2%) and alpha/beta-pinen (2.6%) and the sesquiterpene β-caryophyllen (3.7%) also make up its composition. The qualitative and quantitative compositions are similar to those presented in further published data [21]. The plants from genus *Allium* are well known to be rich in sulphinates (69.8%) and the main components of AEO were identified as diallyl disulphides (53.5%) diallyl trisulphides (9.4%) and diallyl sulphides (6.9%).

Plant	<i>Cinnamomum cassia</i> (CEO)		<i>Mentha piperita</i> (MEO)		<i>Allium sativum</i> (AEO)	
Organ	Leaves, Branches		Leaves		Pods	
Essential oil Composition	Cinnamaldehyde	79.9%	Menthol	32.5%	Diallyl disulphides	53.5%
	o-Methoxy cinnamaldehyde	8%	(DL)-Menthone	26.5%	Diallyl trisulphides	9.4%
	Cinnamyl acetate	2.5%	Menthyl acetate	4.9%	Diallyl sulphides	6.9%
	Coumarin	1.5%	Eucalyptol	4.7%	Propene	6.7%
	Benzaldehyde	0.8%	Isomenthone	4.1%		
	Styrene	0.2%	β-caryophyllen	3.7%		
	Cinnamic alcohol	0.1%	D-neomenthol	3.2%		
	Cinnamic acid	0.1%	D-limonen	3.2%		
	D-limonen	0.04%	α/β-pinen	2.6%		
			Menthofuran	2.4%		
		Pulegone	1.6%			

Table 1: Main components (%) detected by GC-MS in the three EOs tested.

A low presence of propene (6.7%) was also detected. Reported concentrations of disulphides are quite low (from 29.1% to 36.5%), and the rate of trisulphides is higher in other published data (from 21.6% to 30%) [22,23]. In CEO, a majority of components derive from cinnamic acid (0.1%) like cinnamaldehyde (79.9%) which was identified as a major compound, o-methoxycinnamaldehyde (8%), cinnamyl acetate (2.5%), coumarin (1.5%), benzaldehyde (0.8%) and also styrene (0.2%) and cinnamic alcohol (0.1%). A low concentration of terpenes is present in the form of d-limonen (0.04%). This composition is in accordance with most of the published data [24] but diverge from data published by Murbach Teles Andrades et al. [25], where the main compound was eugenol (72.1%). This change in main compound can be explained by the use of leaves instead of branches.

An EO's activity is generally related to the main compounds present (menthol, diallyl sulphides and cinnamaldehyde here), even if the activity of the totum should be taken into account. The cinnamaldehyde and eugenol molecular family are extremely different, the presence of a phenolic cycle leads to various activities: as cinnamaldehyde has been reported not to cause the disintegration of the outer membrane, eugenol leads to high degree of cell lysis [26]. Compounds present in minor concentrations may contribute to bioactivity, but are not estimated as active neither tested. Variations in EO compositions obtained from two of the same plants can generally be explained by the effect of differences in where they are sourced (climatically changes, presence of biotic or abiotic stresses), changes in treated plant parts or the extraction protocol. Several parameters can influence the EO compositions, which leads to modifications in their biological properties [27]. As the main compounds presented here belong to different molecular families, we assume that their blend could target diverse cellular mechanisms.

Antibacterial activity of EOs and blend

MIC and MBC against PAO1 were evaluated for each EO and the blend (Table 2). EOs was diluted from 0.5 to 0.005% (v/v), a concentration range considered as the most usable regarding the literature. MEO was not active in the tested concentrations but Tsai et al. [28] obtained a MIC of 0.92% on PAO1. The activity of monoterpenes and especially menthol has been studied by Trombetta et al. on models. They proved that this molecule and other terpenes were able to enhance membrane fluidity, leading to expansion, altered respiration and destabilisation of intramembranous proteins [29]. AEO inhibited the growth of PAO1 at a concentration of 0.5%. As described by Casella et al. [23], the activity of AEO is due to the presence of diallyl sulphides and diallyl disulphides. These molecules derive from alliin, naturally present in garlic, which acts on planktonic bacteria and on biofilms [30,31]. The presence of sulphuric bounds is a key for sulphhydryl dependent enzyme inactivation [32]. Through their work, Chen et al. [33] also highlighted an N-acetyl transferase inhibition activity induced by diallyl sulphides and diallyl disulphides on *Klebsiella pneumoniae*. As PAO1 also possesses this enzyme, it can be assumed that both molecules act due to the same mechanism [34]. CEO was the most active of the three tested EOs and was bactericidal at a concentration of 0.125%. The activity of CEO and mostly cinnamaldehyde has already been reported for *P. aeruginosa* and other bacteria like *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* [35,36]. Among these previous results, cinnamaldehyde was found to inhibit the Z-ring formation during cell division, by targeting FtsZ protein. Contrary to terpenic compounds, cinnamaldehyde has not been reported to disintegrate the membrane or interfere with ATP formation [37].

The minor differences in active concentrations compared to published data could be explained by slight composition changes as described above (section 3.1) and the use of ECO in our test leading to physico-chemical changes. Glover et al. [38] observed an enhancement of bacterial membrane fluidity when surfactants were added to the growth medium, which was not correlated with high mortality in the case of alcohol ethoxylates.

The three EOs were mixed at an equal concentration (EOB) to evaluate a potential synergistic effect. An inhibiting activity on PAO1 was observed at 0.125% concentration and it became bactericidal at 0.25%. As the EOs were three-times less concentrated in the blend, the appearance of an inhibiting activity at 0.125% and the conservation of a bactericidal effect suggests a synergistic activity between the EOs. An eventual synergistic activity between Cinnamon, Garlic and Peppermint EOs has not been reported yet. It is unusual to study a blends' activity on planktonic and sessile bacteria and the results highlight the benefit of forming an EOs blend.

	CMI % (v/v)	CMB % (v/v)
AEO	0.500	>0.500
CEO	-	0.125
MEO	>0.500	>0.500
EOB	0.125	0.250

Table 2: CMI and CMB of AEO (*Allium sativum* Essential Oil), CEO (*Cinnamomum cassia* Essential Oil), MEO (*Mentha piperita* Essential Oil) and their blend (EOB) on PAO1.

Anti-biofilm concentration of EOB

The crystal violet assay was performed, in order to screen the activity of the blend (EOB). As a first result, we observed that the ECO emulsifier at a maximal concentration of 0.5% had no effect on biofilm formation (data not shown). Using the minimal blend concentration of 0.005%, a slight enhancement of PAO1 biofilm formation was observed, corresponding to a non-significant increase (Figure 1a). Increasing the concentration at 0.25% led to a total biofilm inhibition ($101 \pm 4\%$). Inhibition approximately became stable when the blend's concentration reached 0.1%, an amount of EOB that we conserved for the next steps of our study. In their publication, Kim et al. also showed a 49% reduction of *P. aeruginosa* biofilm formation at 0.1% concentration of CEO according to a 96 well microplate assay [15], suggesting a synergistic effect of EOB.

Confirmation of active concentration on glass slides

Biofilm formation is a process described in different stages, including reversible cell adhesion, non-reversible adhesion, formation of micro-colonies and macro-colonies, leading to the detachment of planktonic cells [4].

Results obtained for cell adhesion on glass slides are presented in Figure 1b. Under control conditions, PAO1 adhered to the glass slides and covered respectively $12.9 \pm 6.7\%$ of the surface. When ECO was added to SPS, attached bacteria seemed to be fewer and less uniform among the slide, but the covered area decreased non-significantly to $10.4 \pm 6.5\%$. This result confirmed the absence of the activity of ECO. After a 2 h treatment with the EOB, the adhesion rate decreased significantly ($P < 0.001$), reaching only $1 \pm 1.1\%$. As EOB was active at a

sublethal concentration, we can consider that it has an anti-adhesive activity, maybe by disrupting the complex cellular processes leading to the development of the adhesive structure [39]. The activity of the other essential oils or components like carvacrol or thymol on early biofilm formation steps has been reported before, and can be related to an inhibition of flagella formation observed on *E. coli* [39,40].

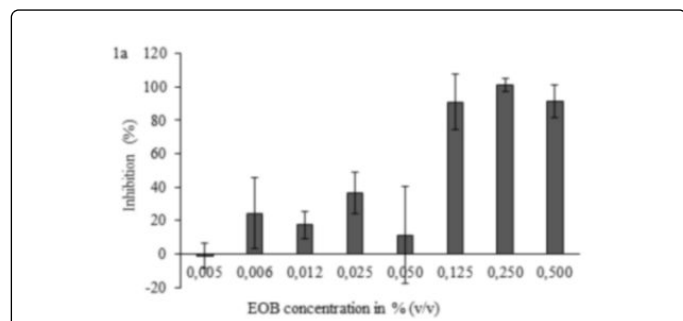


Figure 1a: Impact of a 24 h EOB treatment, with different concentrations ranging from 0.005% to 0.5%, on PAO1 biofilm formation. Biofilms were grown in the wells of a microplate, using the LB medium and increasing concentrations of EOB. In each well ECO was used as emulsifier in same concentrations related to EOB. Use of ECO at a maximal concentration of 0.5% did not cause any inhibition. Biofilm was quantified after a 24 h incubation using crystal violet. Experiments were carried out in triplicate (n=3) and error bars indicate the standard deviation from the mean.

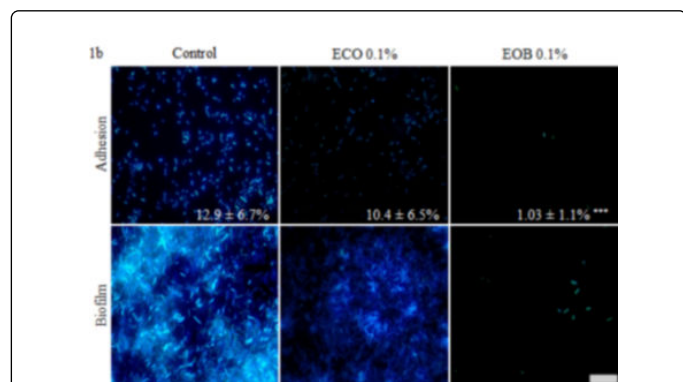


Figure 1b: Fluorescence microscopic visualisation of PAO1 cell adhesion and biofilm formation on glass slides in different conditions. Adhesion and biofilm growth were performed in control condition, in presence of 0.1% ECO or in presence of 0.1% EOB emulsified with 0.1% ECO, according to the respective protocols. Attached cells and biofilms were stained with DAPI (28.5 μ M) and observed at magnification x1000. Scale represents 8 μ m. Covered area fractions of adhered cells were obtained after treatment with IMAGEJ software. Experiments were carried out in triplicate and three images were taken pro slides. Error bars represent standard deviation from the mean (n=9) and ***P<0.001.

When biofilm was grown under control conditions, bacteria were able to colonize the total glass surface, leading to macrocolony formations (Figure 1b, Biofilm control). When ECO was added at 0.1% to the growth medium, biofilm formation was altered (Figure 1b, Biofilm ECO 0.1%). In appearance, the bacteria which adhered to the

glass surface did not form identical biofilm as those observed for the control conditions (Figure 1b). After 24 h of EOB treatment, only few attached bacteria were still present (Figure 1b, Biofilm EOB 0.1%).

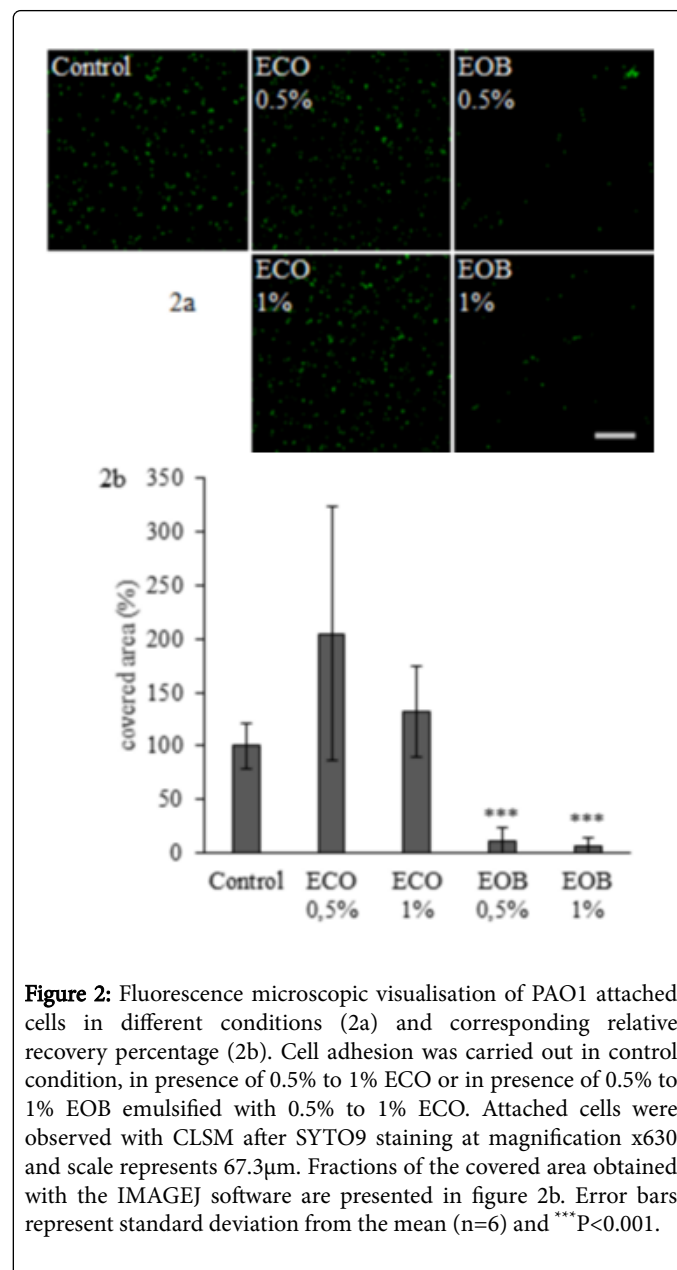


Figure 2: Fluorescence microscopic visualisation of PAO1 attached cells in different conditions (2a) and corresponding relative recovery percentage (2b). Cell adhesion was carried out in control condition, in presence of 0.5% to 1% ECO or in presence of 0.5% to 1% EOB emulsified with 0.5% to 1% ECO. Attached cells were observed with CLSM after SYTO9 staining at magnification x630 and scale represents 67.3 μ m. Fractions of the covered area obtained with the IMAGEJ software are presented in figure 2b. Error bars represent standard deviation from the mean (n=6) and ***P<0.001.

Bacterial adhesion and biofilm formation in dynamic conditions

Biofilm formation was followed in a flow cell chamber (Figure 2). As previously for the adhesion step, bacteria were allowed to adhere to glass slides for 2 h without flow (Figures 2a and 2b). In the control condition, PAO1 covered a mean area of 1.3 \pm 1.1% that we considered as the 100% adhesion rate. The recovery value order of magnitude was slightly lower in these tests than those observed on glass slides (Section 3.4). As we observed no effect on bacterial adhesion with a 0.1% EOB treatment, we tested both 0.5% and 1% concentrations of EOB. When ECO was added at a concentration of 0.5%, the covered area was non-

significantly doubled and increased by a factor of 1.3 when the emulsifier was added at 1%. Statistical testes indicate that bacterial attachment was not significantly changed by the addition of ECO ($P>0.05$) (Figure 2b).

Treatment with 0.5% and 1% of EOB significantly reduced the attachment of PAO1 to the glass surface with only $10 \pm 12\%$ and $6 \pm 7\%$ of the surface remaining covered when compared to the control (Figures 2a and 2b). The EOB remained active at low concentrations while an enhancement of the adhesion phenomenon was observed when ECO was added to SPS. It is recognised that microorganisms are able to secrete bio-surfactants in order to enhance their motility on surfaces [41], a fact that could explain the better cell repartition when 0.5% ECO was used. As cell adhesion is a complex mechanism including the presence of motility and attachment appendix like pili, the surface tension modification can lead to the inhibition of adhesion, observed when a higher dose of ECO was added.

Biofilm growth and mortality were followed as biovolume estimation with COMSTAT software of SYTO9 and PI labelled cells respectively (Figures 3a and 3b). In control conditions, we observed a thin biofilm (maximal thickness (Tm) of $11.4 \pm 1.2 \mu\text{m}$) associated with the filamentous organization of cells (Figure 3a, Control), damaged cells were evenly distributed in all biofilm layers. In this

condition, the biofilm had a total biovolume of $1.6 \pm 1.1 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ with a mortality rate of $1.5 \pm 2.6\%$ (Figure 3a and 3b). When 0.1% ECO was added to the medium, no significant change was observed in the total biovolume, and the mortality rate was not significantly reduced to $0.2 \pm 0.2\%$ (Figure 3a). The biofilm structure was however more heterogeneous since the thickness was increased (maximal thickness of $19.5 \pm 6.9 \mu\text{m}$) and we did not observe any filamentous consortium (Figure 3a, ECO 0.1%). Overall, this result is in total opposition with the observation carried out on glass slides. When the EOB was added in a 0.1% concentration to LB, the total biovolume significantly increased to $2.6 \pm 0.94 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ and mortality reached $1.5 \pm 2.7\%$ (Figure 3 EOB 0.1%). Thickness was close to that observed with 0.1% ECO ($18.8 \pm 2.8 \mu\text{m}$) but all cells grew and formed filamentous consortia (Figure 3a, EOB 0.1%). Filaments are a known response to sublethal stresses in some bacteria, involving the stoppage of cell division mechanism, like the FtsZ ring formation [42]. As described by Domadia et al. [37] cinnamaldehyde bind FtsZ proteins and inhibit their polymerization, which could lead to filament formation. Furthermore, the fact that filamentous cells were all stained by PI proved the limit of Live/Dead staining: in fact filamentous cells multiply in a rapid manner, which leads to a fault in the membrane integrity and a higher permeability of the PI, as the cells are still alive [42].

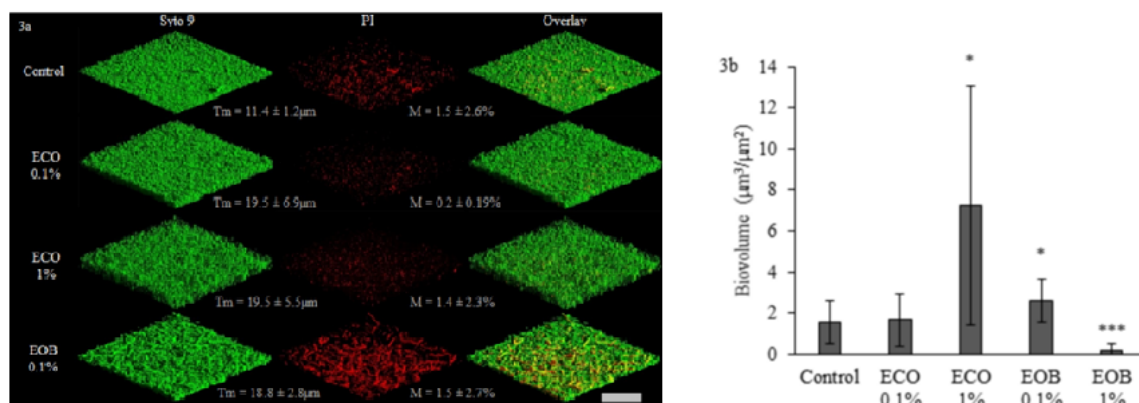


Figure 3: 3D fluorescence microscopic visualisation of PAO1 biofilms grown in different conditions (3a) and corresponding biovolumes (3b). PAO1 biofilms were performed in 3 well chambered cover glasses under 2.5 ml h^{-1} flow. LB (Control), LB with 0.1% or 1% ECO or LB with 0.1% or 1% EOB emulsified with ECO in the same amount, in relation to the EOB concentrations, were used as growth media. No biofilm was observed at 1% EOB concentration (image not shown). Total biofilm cells were detected after SYTO9 ($5 \mu\text{M}$) staining and appear in green, as altered cells stained with Propidium Iodid (PI, $0.3 \mu\text{M}$) appear in red. The overlay represents the superposition of SYTO9 and PI stained cells images. Scale represents $67.3 \mu\text{m}$. Total biovolume and maximal thickness (Tm) were obtained from SYTO9 stained cell images treated with COMSTAT. Mortality rates (M) were obtained by calculating the ratio: total biovolume (SYTO9) / altered biovolume (PI) x 100. Error bars represent standard deviation from the mean (n=9) and * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

As 1% ECO was added to the LB medium, a high augmentation of total biovolume was observed and correlated to a constant mortality rate ($7 \pm 5 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ total biovolume for $1.4 \pm 2.3\%$ mortality, Figure 3b). Again the maximal thickness observed was $19.5 \pm 5.5 \mu\text{m}$ but as we can observe on corresponding pictures, the cells were closely organized (Figure 3a, ECO 1%). As in early biofilm formation stages, Biosurfactants play an important role while enhancing *Pseudomonas* Quinolone System (PQS) solubility and therefore its activity, explaining the dose dependent augmentation of biofilm formation when using ECO [41].

Finally, when the EOB was added at 1%, the biofilm was totally destabilized. The total biovolume observed for this condition was $0.15 \pm 0.27 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ and mortality reached 0.25%. According to these results, the blend's anti-biofilm activity seems to depend on a bactericidal activity but, in a recent publication, Kim et al. also proved the efficiency of cinnamaldehyde to affect the Quinolone Signal, pyocyanin production and swarming motility of *P. aeruginosa* [15]. Another work showed the efficiency of a 1 mg ml^{-1} peppermint extract on *P. aeruginosa* bacterial adhesion and provided a 38% inhibition on preformed biofilms [2].

Conclusion

Due to the three methods, the effectiveness of a blend of three essential oils against a multidrug-resistant pathogen, PA01 has been proved. This work first highlighted the increased effectiveness of a blend, in comparison to pure essential oil, on planktonic cells and on biofilm formation. As expected, each essential oil contributes to global activity by targeting different mechanisms, which enlarge the spectrum of activity. CLSM enabled us to observe filamentous consortia, revealing high stress within PA01 biofilms treated with 0.1% EOB. Total biofilm eradication was finally obtained when the concentration reached 1% under a constant flow. The different active concentrations obtained in each conditions highlighted the importance of varying the methods in order to obtain representative results.

These properties could be used in order to work out a preventive surface treatment using molecular grafting, or a sanitizer active on preformed biofilm. Additionally, further experiments have to be carried out in order to understand the effect of the blend at a genetic scale, to have a better understanding of the mechanism. This could lead to a combination of molecules with known antibiotics in order to obtain new treatments against multi-drug-resistant bacteria like PA01.

Acknowledgements

This work was supported by the Brittany Regional Council (Région Bretagne). We thank CBB Capbioteck for their technical expertise and advice.

References

- Giaouris E, Heir E, Hébraud M, Chorianopoulos N, Langsrud S, et al. (2014) Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Sci* 97: 298-309.
- Sandasi M, Leonard CM, Van Vuuren SF, Viljoen AM (2011) Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms in vitro. *South African J Bot* 77: 80-85.
- Valeriano C, de Oliveira TLC, de Carvalho SM, Cardoso MDG, Alves E, et al. (2012) The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. *Food Control* 25: 673-677.
- Filloux A, Vallet I (2003) Biofilm: set-up and organization of a bacterial community. *Med Sci (Paris)* 19: 77-83.
- Nikaido H (2009) Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem* 78:119-146.
- Donlan RM (2009) Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiol* 17: 66-72.
- Chai Z, Wang J, Tao S, Mou H (2014) Application of bacteriophage-borne enzyme combined with chlorine dioxide on controlling bacterial biofilm. *LWT-Food Sci Technol* 59: 1159-1165.
- Rodrigues S, Paillard C, Dufour A, Bazire A (2014) Antibiofilm Activity of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 Against *Vibrio tapetis*, the Causative Agent of Brown Ring Disease. *Probiotics Antimicrob Proteins* 7: 45-51.
- Bajpai VK, Baek KH, Kang SC (2012) Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Res Int* 45:722-734.
- Niu C, Gilbert ES (2004) Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Appl Environ Microbiol* 70: 6951-6956.
- van Vuuren SF, Suliman S, Viljoen AM (2009) The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett Appl Microbiol* 48: 440-446.
- Nikolic M, Jovanovic KK, Markovic T, Markovic D, Gligorijevic N, et al. (2014) Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five Lamiaceae essential oils. *Ind Crops Prod* 61: 225-232.
- Mihajilov-Krstev T, Radnovic D, Kitic D, Stojanovic-Radic Z, Zlatkovic B (2010) Antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil against pathogenic microbial strains. *Arch Biol Sci* 62: 159-166.
- Faleiro ML (2011) The mode of antibacterial action of essential oils. In: A. Mendez-Vilas (ed) *Sci against Microb Pathog Commun Curr Res Technol Adv*. Formatex Research Center, Badajoz, pp: 1143-1156.
- Kim YG, Lee JH, Kim SI, Baek KH, Lee J (2015) Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *Int J Food Microbiol* 195: 30-39.
- De Oliveira MMM, Brugnera DF, Do Nascimento JA, Piccoli RH (2012) Control of planktonic and sessile bacterial cells by essential oils. *Food Bioprod Process* 90: 809-818.
- Ballester-Costa C, Sendra E, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA, Viuda-Martos M (2013) Chemical composition and in vitro antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. *Ind Crops Prod* 50: 304-311.
- Pamp SJ, Sternberg C, Tolker-Nielsen T (2009) Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *Cytometry A* 75: 90-103.
- Tolker-Nielsen T, Sternberg C (2011) Growing and Analyzing Biofilms in Flow Chambers. *Curr Protoc Microbiol*. pp 1B.2.1-1B.2.17.
- Royden CS, Connors EM (2010) The detection of moving objects by moving observers. *Vision Res* 50: 1014-1024.
- Yang SA, Jeon SK, Lee EJ, Shim CH, Lee IS (2010) Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Nat Prod Res* 24: 140-151.
- Kiralan M, Bayrak A, Abdulaziz OF, Özbucak T (2012) Essential oil composition and antiradical activity of the oil of Iraq plants. *Nat Prod Res* 26: 132-139.
- Casella S, Leonardi M, Melai B, Fratini F, Pistelli L (2013) The role of diallyl sulfides and dipropyl sulfides in the in vitro antimicrobial activity of the essential oil of garlic, *Allium sativum* L, and leek, *Allium porrum* L. *Phytother Res* 27: 380-383.
- Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Portugal H (2006) Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by essential oil from *Cinnamomum cassia*. *Phytother Res* 20: 58-61.
- Andrade BFMT, Barbosa LN, da Silva PI, Fernandes JA (2014) Antimicrobial activity of essential oils. *J Essent Oil Res* 26: 34-40.
- Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol* 94: 223-253.
- Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan RS (2001) Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul* 34: 3-21.
- Tsai ML, Wu CT, Lin TF, Lin WC, Huang YC, et al. (2013) Chemical Composition and Biological Properties of Essential Oils of Two Mint Species. *Trop J Pharm Res* 12: 577-582.
- Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, et al. (2005) Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2474-2478.
- Ankri S, Mirelman D (1999) Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect* 1: 125-129.
- Perez-Giraldo C, Cruz-Villalón G, Sanchez-Silos R, Martínez-Rubio R, Blanco MT, et al. (2003) In vitro activity of allicin against *Staphylococcus epidermidis* and influence of subinhibitory concentrations on biofilm formation. *J Appl Microbiol* 95: 709-711.
- Ross ZM, O'Gara EA, Hill DJ, Sleightholme HV, Maslin DJ (2001) Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Appl Environ Microbiol* 67: 475-480.
- Chen GW, Chung JG, Ho HC, Lin JG (1999) Effects of the garlic compounds diallyl sulphide and diallyl disulphide on arylamine N-acetyltransferase activity in *Klebsiella pneumoniae*. *J Appl Toxicol* 19: 75-81.

34. Tsao S, Yin M (2001) In vitro activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 47: 665-670.
35. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S (2006) In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complement Altern Med 6: 39.
36. Ooi LS, Li Y, Kam SL, Wang H, Wong EY, et al. (2006) Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. Am J Chin Med 34: 511-522.
37. Domadia P, Swarup S, Bhunia A, Sivaraman J, Dasgupta D (2007) Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. Biochem Pharmacol 74: 831-840.
38. Glover RE, Smith RR, Jones MV, Jackson SK, Rowlands CC (1999) An EPR investigation of surfactant action on bacterial membranes. FEMS Microbiol Lett 177: 57-62.
39. Szczepanski S, Lipski A (2014) Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. Food Control 36: 224-229.
40. Burt SA, van der Zee R, Koets AP, de Graaff AM, van Knapen F, et al. (2007) Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. Appl Environ Microbiol 73: 4484-4490.
41. Van Hamme JD, Singh A, Ward OP (2006) Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. Biotechnol Adv 24: 604-620.
42. Jones TH, Vail KM, McMullen LM (2013) Filament formation by foodborne bacteria under sublethal stress. Int J Food Microbiol 165: 97-110.

Les résultats montrent une activité du mélange d'HE Abf1 dès 1 mg/ml en conditions statiques. Le mélange d'HE permet dans ces conditions d'inhiber l'adhésion des bactéries sur une surface en verre, ainsi que la maturation du biofilm à partir de bactéries préalablement adhérees. Sous conditions dynamiques, nous constatons que les concentrations doivent être augmentées dix fois afin de conserver l'activité. Cependant, à la concentration de 1 mg/ml sous conditions dynamiques, le mélange Abf1 induisait un changement de conformation du biofilm, avec notamment la formation de filaments. Cette observation a été attribuée à la présence de cannelle. Le cinnamaldehyde, a en effet la capacité d'inhiber le développement de filaments Z indispensables à la division des bactéries (Domadia, Swarup, Bhunia, Sivaraman, & Dasgupta, 2007).

2.2 Effet des HE et de leurs composants majoritaires sur le biofilm de PAO1

2.2.1 Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des HE et de leurs composés majoritaires, seuls ou en mélanges.

Afin de comprendre l'implication des HE dans l'activité du mélange Abf1, les effets de l'ail, de la cannelle et de la menthe ainsi que de leurs composés majoritaires respectifs ont été établis. Dans un premier temps, leurs concentrations bactéricides et bactériostatiques ont été définies sur *P. aeruginosa*, sur une gamme de concentration comprise entre 10 et 0,07 mg/ml. Pour les associations de deux HE ou composés, la part manquante a été remplacée par du milieu de culture pour rendre la comparaison au mélange possible (par exemple lors du test cannelle-ail, une solution contenant 1/3 de cannelle, 1/3 d'ail et 1/3 de milieu de culture a été diluée en cascade et testée). Concernant la dilution des composés majoritaires, elle tient également compte de leur concentration dans l'HE de départ. Pour rappel, l'HE d'ail contient 53,50% de diallyl disulfides (DADS), l'HE de cannelle contient 80,00% de cinnamaldehyde (Ci) et l'HE de menthe contient 32,50% de menthol (Me). Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des huiles essentielles seules ou en mélanges ainsi que de leurs composés majoritaires seuls ou en mélanges, testés sur *Pseudomonas aeruginosa* (mg/ml). « - » indique que l'échantillon est directement bactéricide dans ces conditions. L'indication « >5.00 » signifie que l'échantillon ne présente pas d'activité aux concentrations testées.

	CMI	CMB
Ail	5,00	>5,00
Cannelle	-	1,25
Menthe	>5,00	>5,00
Diallyl disulfide (DADS)	>5,00	>5,00
Cinnamaldehyde (Ci)	0,50	1,0
Menthol (Me)	>5,00	>5,00
Abf1	1,25	2,50
Mélange cannelle - ail	1,25	2,50
Mélange cannelle - menthe	2,50	5,00
Mélange Ci - DADS - Me	2,50	5,00
Mélange Ci - DADS	2,50	5,00
Mélange Ci - Me	-	2,50

Les composés majoritaires DADS et menthol ne présentent pas d'activité antibactérienne sur *P. aeruginosa* aux concentrations testées. D'après Tsao *et al.* (2001), le DADS reste tout de même responsable des activités antibactériennes de l'HE d'ail. L'équipe a par ailleurs déterminé une CMI de 64 µg/ml pour ce composé sur la bactérie *P. aeruginosa* sensible aux antibiotiques. Le résultat que nous avons observé reste toutefois en accord avec la faible activité des HE respectives. En ce qui concerne le cinnamaldehyde, composé majoritaire de l'HE de cannelle, on observe une CMI de 0,50 mg/ml et une CMB de 1,0 mg/ml. Ce résultat montre que cette molécule est impliquée dans l'activité bactéricide de la cannelle. Ce résultat est donc en accord avec les données de la bibliographie puisque les concentrations actives obtenues pour la cannelle et le cinnamaldehyde sont généralement très proches. La comparaison de l'activité du mélange Abf1 avec les activités des mélanges cannelle - ail et cannelle - menthe montrent que les HE d'ail et de cannelle semblent porter l'activité du mélange Abf1, leurs CMI et CMB respectives étant égales. En effet, lors de leurs essais réalisés sur *P. aeruginosa*, Ooi *et al.* (2006) ont aussi pu déterminer des CMI équivalentes de 0,3 mg/ml pour la cannelle et son composé majoritaire le cinnamaldehyde.

Lorsque le mélange des trois composés majoritaires est testé, on observe une augmentation des concentrations actives, ce qui suggère que l'activité du mélange Abf1 n'est pas portée uniquement par les composés majoritaires. En effet, d'autres molécules minoritaires peuvent également agir ou faciliter l'activité des molécules majoritaires. Généralement on observe également que les HE possèdent de meilleures activités que leurs composés pris de manière unitaire. On peut également noter que le DADS semble réduire la capacité du mélange de composés majoritaires, l'association cinnamaldehyde - menthol permettant d'abaisser la concentration bactéricide de 5,00 à 2,50 mg/ml.

Cette première mesure permet de confirmer que l'activité antibactérienne du mélange Abf1 est portée par l'HE de cannelle et son composé majoritaire, le cinnamaldehyde.

2.2.2 Activités antibiofilm des huiles essentielles et de leurs composés majoritaires.

Les HE et leurs composés majoritaires ont ensuite été testés sur le biofilm de *P. aeruginosa* afin de déterminer leurs activités respectives par un dosage au cristal violet. Les HE ont été testées dans des gammes de concentrations de 1,25 à 0,04 mg/ml. Des solutions contenant les composés majoritaires à des concentrations équivalentes à celles observées dans les HE ont été réalisées puis diluées de la même manière. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 2.

Les résultats montrent une forte activité antibiofilm de l'HE de cannelle et de son composé majoritaire, le cinnamaldehyde. Les deux produits présentent respectivement des inhibitions de $99,99 \pm 2,00$ % et $109,50 \pm 9,76$ % à la concentration maximale testée de 1,25 mg/ml. Cette concentration est par ailleurs bactéricide pour la cannelle, ce qui explique également l'activité antibiofilm. La cannelle reste toutefois active à des concentrations inférieures et développe une activité inhibitrice de $53,86 \pm 25,00$ % à la concentration de 0,3 mg/ml, et de $98,88 \pm 0,58$ % à la concentration de 0,6 mg/ml. Le cinnamaldehyde présente une activité inhibitrice significativement supérieure de $116,82 \pm 7,99$ % à cette même concentration. La cannelle par son composé majoritaire, le cinnamaldehyde, présente donc des activités inhibitrices sur le biofilm de *P. aeruginosa* à des concentrations sub-bactéricides. Ce résultat est en accord avec les résultats présentés par Kim *et al.* (2015) selon lesquels la cannelle

et le cinnamaldehyde permettaient d'inhiber significativement la formation de biofilm par *P. aeruginosa* dès 0,01 mg/ml.

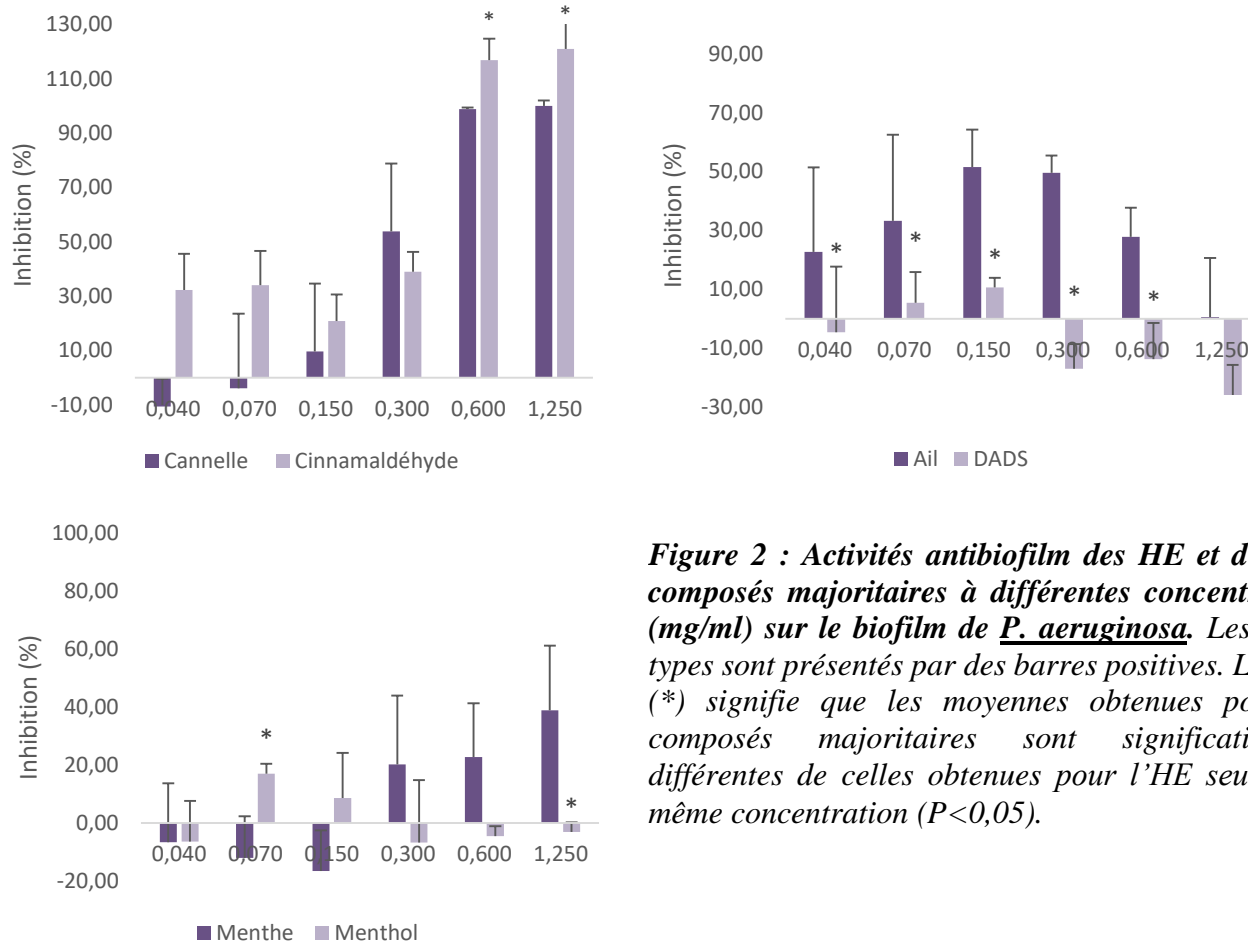


Figure 2 : Activités antibiofilm des HE et de leurs composés majoritaires à différentes concentrations (mg/ml) sur le biofilm de *P. aeruginosa*. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Le signe (*) signifie que les moyennes obtenues pour les composés majoritaires sont significativement différentes de celles obtenues pour l'HE seule à la même concentration ($P < 0,05$).

Les inhibitions observées pour les HE d'ail et de menthe sont inférieures à celles obtenues pour l'HE de cannelle. L'inhibition maximale de $51,56 \pm 12,67\%$ est obtenue pour l'HE d'ail à la concentration de 0,15 mg/ml. A concentration équivalente, le DADS développe une activité significativement inférieure ce qui signifie que ce composé n'est pas responsable de l'activité de l'HE. Concernant l'HE de menthe, l'inhibition maximale de $38,79 \pm 22,35\%$ est obtenue à la concentration maximale testée, soit 1,25 mg/ml. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus par Sandasi *et al.* (2011). En effet dans leurs travaux, une concentration de 1 mg/ml d'HE de menthe permettait d'inhiber de 38% la formation de biofilm par *P. aeruginosa* après 4h d'adhésion. Comme précédemment, les résultats obtenus montrent que le menthol n'est pas impliqué dans l'activité de l'HE de menthe, l'inhibition obtenue avec ce composé

étant significativement inférieure. Dans le cas des HE d'ail et de menthe, le totum est plus actif que les composés pris individuellement.

2.2.3 Détermination des combinaisons d'HE et de composés impliquées dans l'activité du mélange Abf1.

Les activités antibiofilm des combinaisons d'HE et de composés majoritaires ont ensuite été évaluées afin de déterminer leur rôle dans l'activité d'Abf1. Étant donnée la faible activité des HE d'ail et de menthe et soupçonnant la forte implication de l'HE de cannelle, la combinaison ail/menthe (et donc DADS/ menthol) n'a pas été testée. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 3. Pour les combinaisons, les HE ou les composés sont présents à 1/3 comme dans le mélange Abf1, la part restante étant composée de milieu de culture.

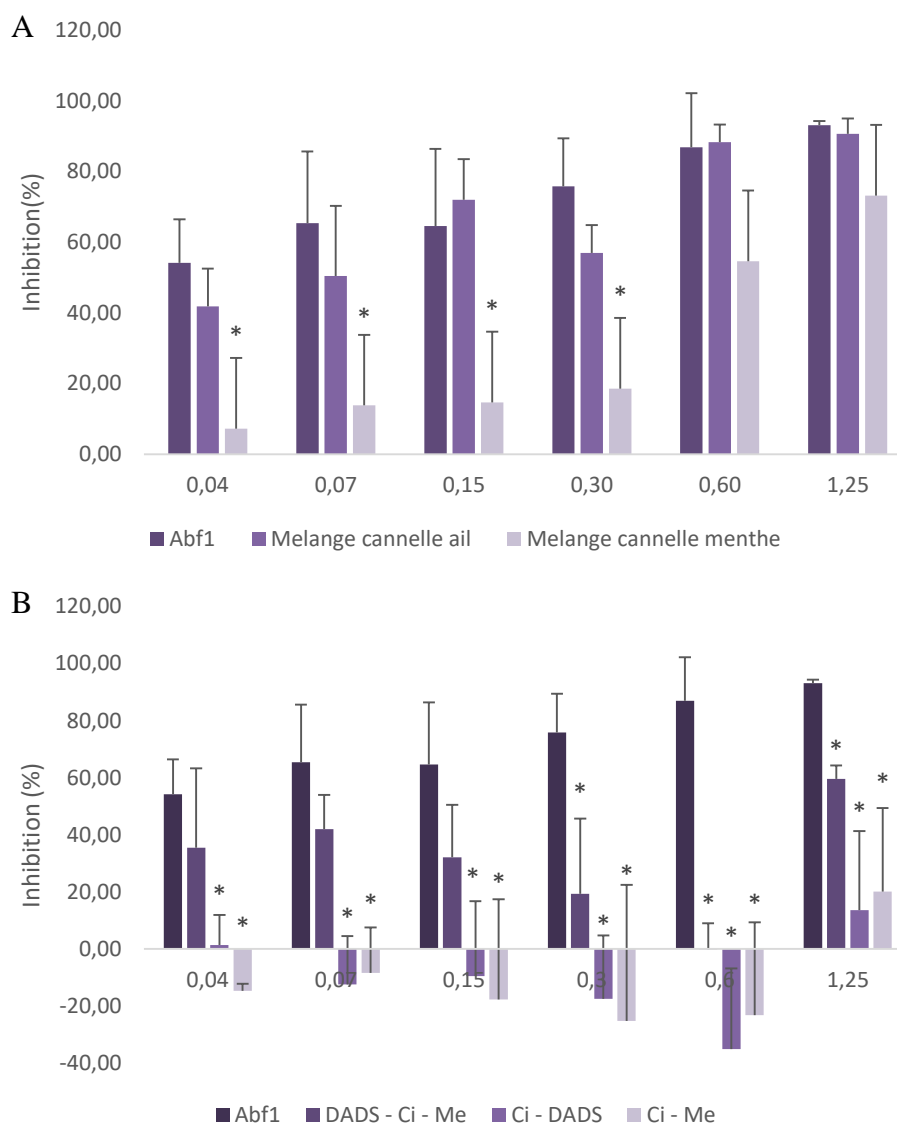


Figure 3 : Activités antibiofilm des différentes combinaisons d'HE (A) et de composés majoritaires (B) sur le biofilm de *P. aeruginosa*. Les concentrations présentées sur l'axe des abscisses sont exprimées en mg/ml. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Le signe (*) signifie que les moyennes obtenues sont significativement différentes de celles obtenues pour le mélange Abf1 à la même concentration ($P < 0,05$).

Lorsque la combinaison d'HE de cannelle et de menthe (figure 3A) est évaluée, les activités antibiofilm restent équivalentes à celle d'Abf1 jusqu'à la concentration de 0,6 mg/ml puis baissent significativement par rapport à l'inhibition observée pour le mélange. À la concentration de 0,3 mg/ml, l'inhibition observée pour cette concentration n'est plus que de $18,58 \pm 5,65\%$ contre $75,80 \pm 13,65\%$ pour le mélange Abf1. Au contraire, aucune différence significative n'est observée pour la combinaison cannelle ail, par rapport au mélange Abf1

utilisé comme référence. Ce résultat montre donc que la combinaison d'HE d'ail et de cannelle permet de maintenir une activité antibiofilm même à de faibles concentrations.

Afin de déterminer les molécules actives, les combinaisons de composés majoritaires, à savoir le DADS, le cinnamaldehyde et le menthol, ont également été étudiées. Les résultats présentés dans la figure 3B montrent une absence d'activité inhibitrice des mélanges de cinnamaldehyde et de menthol et de cinnamaldehyde et de DADS. La comparaison aux combinaisons d'HE montre que les composés majoritaires ne sont pas seuls impliqués dans les activités observées pour les combinaisons d'HE. Concernant le mélange des trois composés majoritaires, les inhibitions observées sont significativement inférieures à celles observées pour le mélange Abf1, lorsque des concentrations supérieures à 0,15 mg/ml sont testées. Encore une fois, ce résultat confirme que les composés majoritaires seuls présentent des activités moindres par rapport aux HE seules ou en combinaisons.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'implication de la cannelle et de son composé majoritaire, le cinnamaldehyde, dans les activités observées pour le mélange Abf1. Cela confirme l'hypothèse émise dans la publication « An essential oil blend prevents *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 from forming biofilms », dans laquelle le mélange Abf1 a été évalué par des méthodes statiques et dynamiques sur le biofilm de *P. aeruginosa*. Cela confirme également notre hypothèse de départ selon laquelle l'utilisation des HE reste une option plus intéressante par rapport à l'utilisation de composés purs.

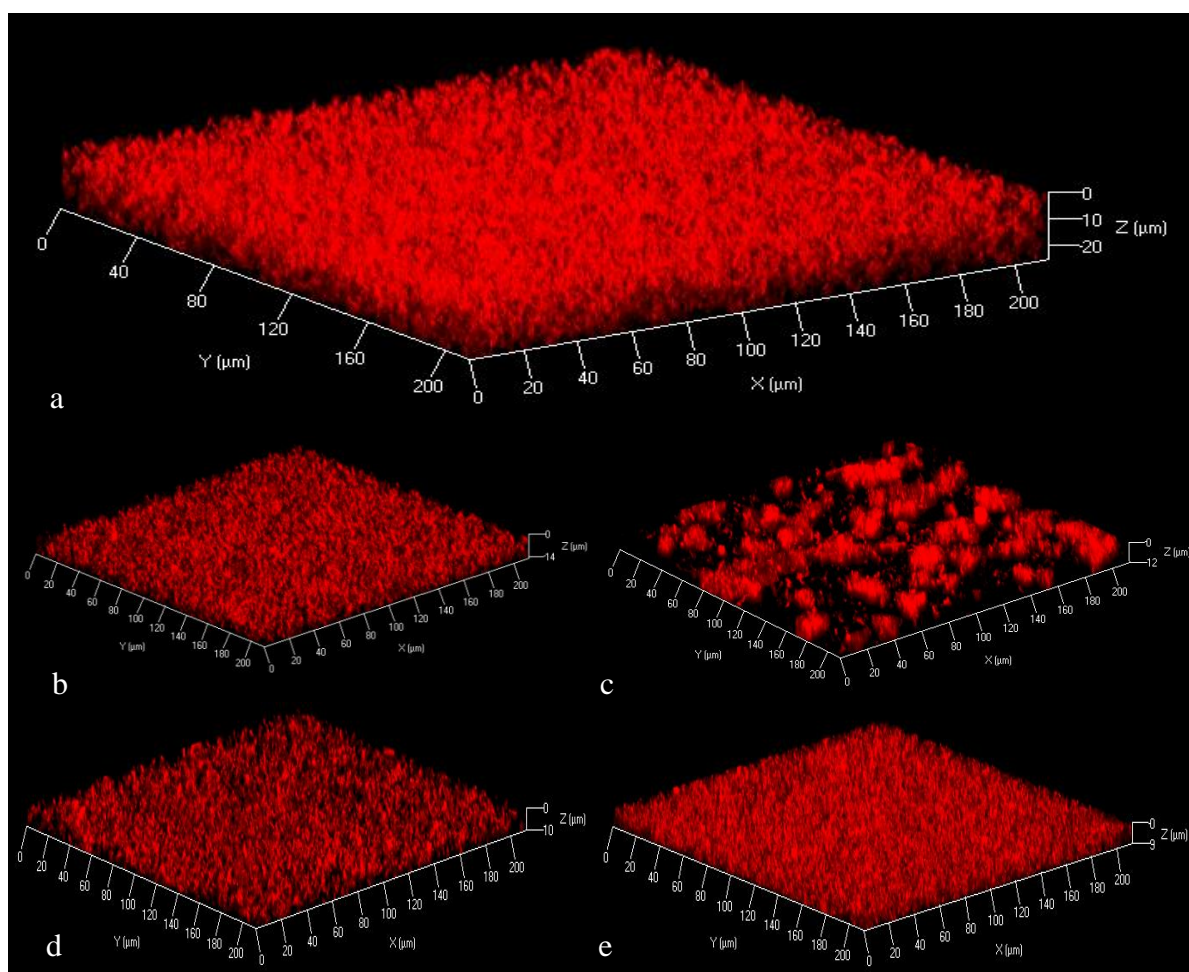
2.3 Modulation des gènes de *P. aeruginosa* PAO1

Figure 4 : Observation au microscope confocale à balayage laser du biofilm de *P. aeruginosa* (incubation 16h à 37°C). a. Condition témoin, sans huiles essentielles. b. En présence de 0,15 mg/ml d'HE d'ail. c. En présence de 0,3 mg/ml d'HE de cannelle. d. En présence de 0,6 mg/ml de mélange Abf1. e. En présence de 0,3 mg/ml de mélange cannelle-ail.

Suite aux travaux concernant la détermination des concentrations actives pour le mélange Abf1 et les HE le composant, leurs effets sur la modulation de gènes impliqués dans la formation de biofilm ont été évalués. Pour cela, 3 gènes d'intérêt ont été sélectionnés pour leur implication dans les grandes voies de régulation de la formation de biofilm, à savoir : le c-di-GMP, le Quorum Sensing (QS) et les petits ARN. Les HE d'ail (0,15 mg/ml) et de cannelle (0,3 mg/ml), le mélange Abf1 (0,6 mg/ml) et la combinaison de cannelle et d'ail (0,3 mg/ml) ont été évalués pour leurs activités sur ces trois voies de régulation. Les concentrations indiquées ont été sélectionnées pour permettre la production de biofilm tout en ne perdant pas l'activité. Les biofilms ont par ailleurs été cultivés en microplaque 24 puits à fond de verre et

observés en microscopie confocale avant l'extraction d'ARN. Les images obtenues pour chaque échantillon sont présentées dans la figure 4.

Ces images nous informent notamment que l'HE de cannelle modifie la structure 3D du biofilm de *P. aeruginosa*, provoquant des regroupements bactériens. Ces résultats, couplés à la formation de filaments, avaient également été observés lors de la formation de biofilm en cellules à flux. Ce phénomène avait alors été attribué à la réponse à un stress (Lang *et al.*, 2016).

Une fois les biofilms formés, les ARN des bactéries cultivées en biofilm et des bactéries planctoniques (en suspension dans les puits) ont été extraits afin de déterminer les effets des traitements sur leur expression. Les premiers résultats obtenus montraient une augmentation conséquente de l'expression de deux gènes d'intérêt - à savoir *lasI* et *rsmY* - dans les biofilms, en présence d'HE. Ce résultat est en opposition avec la diminution de la formation de biofilm observée. En effet, l'augmentation de l'expression de ces gènes devrait au contraire favoriser la production de biofilm. Les résultats obtenus étaient difficilement interprétables car l'efficacité de la PCR quantitative n'était pas toujours reproductible. Différents paramètres comme la qualité des ARNm et des cDNA, le choix des amorces, ou les concentrations utilisées, sont actuellement en cours d'examen pour tenter d'obtenir des amplifications reproductibles et efficaces et pouvoir conclure ou émettre des hypothèses sur le niveau d'expression de ces gènes dans nos conditions. Notre choix s'est pour l'instant porté sur quelques gènes, ce choix orienté ne garantit pas d'obtenir des résultats intéressants ou originaux. L'une des perspectives pourrait être d'adopter une stratégie globale consistant à étudier l'ensemble des différences transcriptionnelles du génome par RNAseq. Ceci nous permettrait ensuite de valider les résultats par qPCR sur des gènes précis et non pas choisis sur critères bibliographiques.

Peu de données sont disponibles concernant l'inhibition de ces gènes par les HE. Seule l'activité du cinnamaldehyde sur le quorum sensing a déjà été mise en évidence et ceci sur d'autres organismes, notamment *Vibrio harveyi*. Dans ce cas, 200 μ M de cinnamaldehyde, permettait l'inhibition de 70% de la transcription de *luxR6*, un gène codant une protéine activatrice impliquée dans le quorum sensing (Faleiro, 2011).

3 Conclusion

L'activité du mélange Abfl a été mise en évidence en conditions statiques et dynamiques. Lors des tests réalisés en microplaques et sur lame de verre sans flux, une concentration non bactéricide de 1 mg/ml permettait d'inhiber l'adhésion de *Pseudomonas aeruginosa* à son support et sa production de biofilm. Les concentrations devaient être augmentées pour observer ce même effet lorsque le biofilm était soumis à un flux. A faible concentration du mélange, les observations réalisées en microscopie confocale à balayage laser ont cependant mis en évidence la formation de filaments bactériens ayant été attribués à un phénomène de stress.

Afin de comprendre les mécanismes d'action mis en jeu lors des traitements par le mélanges Abfl, l'activité des différents constituants a également été évaluée. Alors que l'HE de menthe et son composé majoritaire, le menthol n'avaient pas d'effet, les activités observées pour Abfl ont été attribuées au mélange d'ail et de cannelle. La combinaison de leurs composés majoritaires respectifs, à savoir le DADS et le cinnamaldehyde, ne permet pas de recouvrir les effets, ce qui signifie que d'autres constituants minoritaires entrent en jeu. Il peut notamment s'agir d'autres composés sulfurés présents dans l'HE d'ail. Une grande partie de l'activité du mélange peut toutefois être attribuée au cinnamaldehyde, qui a montré ses capacités inhibitrices sur la formation des biofilms d'autres bactéries. La formation de filaments a notamment été relatée lors d'un traitement de *E. coli* par ce même produit.

Le rôle précis des différentes HE dans l'inhibition de la formation des biofilms n'a pas pu être validée par l'étude de l'expression des gènes impliqués dans la régulation. Afin de pallier aux différentes difficultés rencontrées, la réalisation d'un séquençage complet des biofilms après traitement a été évoqué. Reste toutefois à résoudre la problématique de la quantité d'information génétique à récolter.

La capacité des HE à inhiber l'adhésion des bactéries et la formation des biofilms, à des concentrations non bactéricides, peut permettre de prévenir l'apparition de pathologies chroniques. Si les bactéries restent sous leur forme planctonique, elles sont plus accessibles aux cellules effectrices du système immunitaire, ainsi qu'aux traitements antibiotiques. Par ailleurs, il est important de rappeler que les biofilms sont souvent multi espèces : ils peuvent également abriter d'autres pathogènes comme les virus qui peuvent agir de manière synergique avec les bactéries (cf. Chapitre 1). Des essais sur la formation de biofilms *in vivo* sont toutefois

nécessaires pour confirmer cette activité. Ces résultats montrent à nouveau l'importance de l'HE de cannelle dans les activités antibactériennes, déjà évoquée au cours du chapitre 1.

Valorisation industrielle

Les biofilms sont impliqués dans de nombreuses pathologies, imbriqués dans l'ensemble des sphères étudiées ici. Il existe donc pour cette raison de nombreuses voies de valorisation possibles pour les résultats obtenus ici.

Les biofilms sont également présents dans l'environnement des animaux, et constituent un foyer de bactéries opportunistes. Ils sont notamment présents dans les canalisations, les bacs de distribution d'eau ou de soupes, ou sur les murs. Un produit anti-salissures basé sur un noyau d'huiles essentielles antibiofilm pourrait donc également être envisagé.

4 Bibliographie du Chapitre 2

C

Clutterbuck, a L., Woods, E. J., Knottenbelt, D. C., Clegg, P. D., Cochrane, C. a, & Percival, S. L. (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, 121(1–2), 1–17.

D

Domadia, P., Swarup, S., Bhunia, A., Sivaraman, J., & Dasgupta, D. (2007). Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochemical Pharmacology*, 74(6), 831–840.

F

Faleiro, M. L. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. In A. Mendez-Vilas (Ed.), *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* (Vol. 3, pp. 1143–1156). Badajoz: Formatex Research Center.

Filloux, A., & Vallet, I. (2003). Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *M/S: Médecine Sciences*, 19(1), 77–83.

K

Kim, Y.-G., Lee, J.-H. J., Kim, S.-I., Baek, K.-H., & Lee, J.-H. J. (2015). Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *International Journal of Food Microbiology*, 195, 30–39.

L

Lang, M., Rodrigues, S., Boulho, R., Duteil, E., Bazire, A., & Bedoux, G. (2016). An Essential Oil Blend Prevents *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 from Forming Biofilms. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 7(2).

M

Ma, L., Jackson, K. D., Landry, R. M., Parsek, M. R., & Wozniak, D. J. (2006). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide

in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *Journal of Bacteriology*, 188(23), 8213–21.

Melchior, M. B., Vaarkamp, H., & Fink-Gremmels, J. (2006). Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 171(3), 398–407.

O

Ooi, L. S. M., Li, Y., Kam, S.-L., Wang, H., Wong, E. Y. L., & Ooi, V. E. C. (2006). Antimicrobial Activities of Cinnamon Oil and Cinnamaldehyde from the Chinese Medicinal Herb *Cinnamomum cassia* Blume. *The American Journal of Chinese Medicine*, 34(3), 511–522.

R

Ross, R. F. (2006). *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. *Animal Health Research Reviews*, 7(1–2), 13–29.

S

Sandasi, M., Leonard, C. M., Van Vuuren, S. F., & Viljoen, A. M. (2011). Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms in vitro. *South African Journal of Botany*, 77(1), 80–85.

T

Tsao, S. -m., & Yin, M. -c. (2001). *In vitro* activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(5), 665–670.



Chapitre 3

Prévention de pathologies de la sphère digestive

Liste des figures

Figure 1 : CI ₅₀ (µg/ml) observées pour les mélanges dans le cadre du test DPPH.....	201
Figure 2 : Pourcentage d'inhibition du blanchiment du β-carotène obtenu pour les mélanges d'HE et l'antioxydant de référence, le BHA, testés à la concentration de 50 µg/ml.....	203
Figure 3 : CI ₅₀ (µg/ml) observées pour les mélanges dans le cadre de l'inhibition de la 15- lipoxygénase.....	205
Figure 4 : CI ₅₀ (µg/ml) observées pour les mélanges dans le cadre de l'inhibition de la 15- lipoxygénase.....	206
Figure 5 : Exemple de cycle infectieux observé pour le parasite digestif <i>Cooperia spp.</i> chez les bovins. (MSD - santé animale, n.d.)	212
Figure 6 : Toxicité des mélanges Dig3 et Dig4 sur le nématode <i>C. elegans</i> exprimée en pourcentage de mortalité en fonction de la concentration testée.....	212

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition des mélanges étudiés dans le cadre de la sphère digestive. Les proportions des différentes huiles essentielles sont également indiquées.....	200
Tableau 2 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des huiles essentielles (en mg/ml), testées sur les bactéries impliquées dans les pathologies digestives.....	208
Tableau 3 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) en mg/ml des mélanges testés sur les bactéries impliquées dans les pathologies digestives.....	211

1 Introduction

Ce troisième chapitre est consacré à l'étude des huiles essentielles (HE) et des mélanges dans le cadre de la prévention des pathologies liées à la sphère digestive. Le système digestif correspond à une interface avec le milieu extérieur et est de ce fait soumis à de nombreuses agressions. L'absorption des nutriments et la santé générale des animaux sont étroitement liées à la composition de la flore digestive. Celle-ci est en grande partie constituée de bactéries coliformes et renferme également des bactéries lactiques ou des levures. Ces bactéries occupent l'espace et limitent le développement de la flore négative, constituée entre autre par les bactéries pathogènes, telles que les salmonelles ou les campylobacters (Zeng, Zhang, Wang, & Piao, 2015). L'équilibre entre les différents protagonistes peut être perturbé par différents facteurs qui interviennent également au cours d'étapes charnières, comme par exemple le sevrage chez les porcelets, la phase post-éclosion chez les volailles ou la période d'engraissement des bovins (Franz, Baser, & Windisch, 2010).

Les HE et mélanges d'HE seront donc premièrement soumis aux mesures d'activités anti-radicalaires et anti-inflammatoires. La ration riche apportée aux animaux peut en effet augmenter la production de peroxydes et radicaux libres dans l'organisme de l'animal, provoquant alors un stress oxydant (Gabriel, Alleman, & Dufourcq, 2013). Les inflammations, liées à la présence de pathogènes et aux dégradations qu'ils causent sur les parois intestinales sont également des sources de radicaux libres. Les potentiels anti-radicalaires et antioxydants seront donc évalués par la méthode DPPH et le blanchiment du β -carotène. La capacité des HE à inhiber les enzymes impliquées dans la réponse inflammatoire ont également été évaluées sur la 15-lipoxygénase (15-LOX).

Afin de discriminer les mélanges les plus appropriés à la sphère digestive, les activités antibactériennes ont également été définies sur une sélection de bactéries pathogènes isolées d'animaux malades. Les bactéries coliformes ont été sélectionnées en raison de leur prépondérance dans la flore bactérienne des animaux et de leur implication dans les colibacillooses, des pathologies qui touchent les volailles, les porcins ainsi que les bovins. *Escherichia coli* K88, une bactérie entérotoxique qui touche particulièrement les jeunes porcins, a également été sélectionnée (Si *et al.*, 2006). Les bactéries *Salmonella enterica* sv Typhimurium et Enteritidis ont été sélectionnées pour leur implication dans les salmonelloses. Enfin, le dernier germe étudié est *Clostridium perfringens*, une bactérie touchant également les trois espèces animales et apparaissant souvent en situation de coccidioses (Institut Technique

de l'Agriculture Biologique, 2015). Réduire l'occurrence de ces bactéries pathogènes revêt également un enjeu sanitaire et de santé publique puisqu'elles sont impliquées dans des intoxications alimentaires humaines.

Les parasites internes tels que les coccidies évoquées plus haut mais également les nématodes ou les ascaris, provoquent également des désagréments au niveau de la sphère digestive (Kaplan *et al.*, 2014; Naidoo, McGaw, Bisschop, Duncan, & Eloff, 2008; Remmal, Achahbar, Bouddine, Chami, & Chami, 2011). Les parasites entrent en effet en compétition avec leur hôte pour les nutriments et provoquent également de graves lésions sur les parois intestinales (Institut Technique de l'Agriculture Biologique, 2015). Afin de déterminer les activités vermifuges des HE et mélanges, leur toxicité envers le nématode modèle *Caenorhabditis elegans* a été évaluée. Cet organisme appartient à la même famille que les ascaris et les oxyures, responsables respectivement des ascaridioses et oxyuroses, mais a pour avantage de ne pas présenter de danger pour le manipulateur. Les concentrations toxiques mesurées *in vitro* sur de jeunes larves en stade L1 peuvent donc être indicatrices des potentielles activités antihelminthique *in vivo*.

Les différents tests réalisés dans cette partie doivent permettre d'une part de valider la construction des mélanges, ne devant pas provoquer une perte d'activité et d'autre part de discriminer les mélanges entre eux. En effet, la création de mélanges comme base de compléments alimentaires préventifs a pour intérêt de cumuler les activités naturelles des HE et éventuellement de créer de nouvelles activités. Les formules ont également pour objectifs d'élargir les spectres d'activités, principalement en terme de pathogènes visés et d'harmoniser les concentrations actives sur l'ensemble d'entre eux. Les meilleurs candidats seront définis et testés *in vivo*.

2 Résultats et discussion

Les mélanges testés sont présentés dans le tableau 1. Leur composition est basée sur les résultats préliminaires obtenus pour les HE au cours du projet EVHELISANE (cf. Chapitre 1 §2). Pour rappel, les HE de girofle et d'origan utilisées présentaient alors les meilleures activités anti-radicalaires d'après le test DPPH, alors que la cannelle développait l'activité antibactérienne la plus forte. Les mélanges digestifs (Dig) associent des HE anti-radicalaires et des HE antibactériennes. Les HE ont également été sélectionnées par rapport aux usages de l'aromathérapie classique, les HE d'origan, de cannelle et de menthe étant généralement associées aux pathologies digestives (Farrer-Halls, 2006). Par ailleurs les HE de cannelle et de girofle, sont également reconnues pour leurs propriétés d'appétence et stimulant gastrique chez les animaux d'élevage (Frankič, Voljč, Salobir, & Rezar, 2009).

Tableau 1 : Composition des mélanges étudiés dans le cadre de la sphère digestive. Les proportions des différentes huiles essentielles sont également indiquées.

	Cannelle	Citron	Girofle	Menthe poivrée	Origan
Dig1	1/4	1/4	1/4		1/4
Dig2		1/4	1/4	1/4	1/4
Dig3	1/6		1/6		4/6
Dig4	1/7	1/7	1/7		4/7

2.1 Activités anti-radicalaires et antioxydantes

Le potentiel anti-radicalaire et antioxydant des HE et mélanges digestifs a été établi par le test DPPH d'une part et le test de blanchiment du β -carotène d'autre part. Le test TBARS n'a pu être utilisé ici pour comparer les mélanges, en raison de la présence de cannelle dans une grande partie d'entre eux. En effet cette HE provoque l'apparition de faux positifs en réagissant directement avec l'acide thiobarbiturique.

2.1.1 Évaluation de la capacité de piégeage des radicaux libres

La capacité des HE à capter les radicaux libres est évaluée par le test DPPH et est comparée à celle de l'hydroxyanisole butylé (BHA), un antioxydant de référence. Les résultats obtenus pour les HE présentes ici ont déjà été discutés dans le chapitre 1. Les HE de girofle et d'origan possèdent les meilleures activités anti-radicalaires, avec des CI_{50} respectives de $7,04 \pm 0,40 \mu\text{g/ml}$ et $60,33 \pm 1,26 \mu\text{g/ml}$. Les HE de menthe, cannelle et citron, sont significativement moins anti-radicalaires, avec des CI_{50} de l'ordre du mg/ml (respectivement $7,62 \pm 0,12 \text{ mg/ml}$, $9,82 \pm 0,02 \text{ mg/ml}$ et $26,90 \pm 0,05 \text{ mg/ml}$).

Les activités anti-radicalaires obtenues pour les mélanges destinés à la sphère digestive sont présentées dans la figure 1.

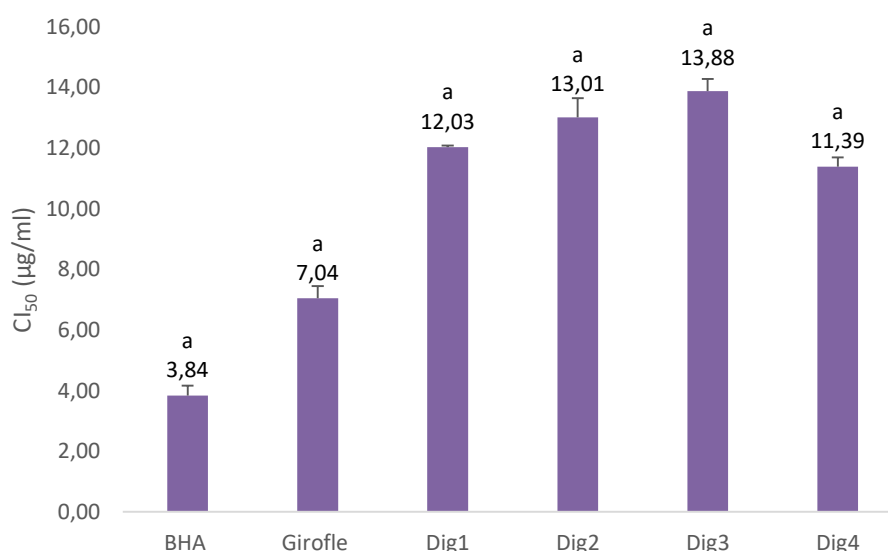


Figure 1 : CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) observées pour les mélanges dans le cadre du test DPPH. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

L'ensemble des mélanges présente des activités anti-radicalaires comparables à celle de l'antioxydant de référence, le BHA. Les CI_{50} obtenues sont comprises entre $11,39 \pm 0,30 \mu\text{g/ml}$ et $13,88 \pm 0,40 \mu\text{g/ml}$, des valeurs également équivalentes à la CI_{50} du girofle. Cette forte activité peut être imputée à la présence de girofle dans l'ensemble des mélanges, malgré son association à des HE très faiblement actives comme la menthe, la cannelle ou le citron. Par

ailleurs dans ces mélanges, l'HE de girofle est associée à l'HE d'origan, une association qui a déjà été relevée lors du chapitre 1.

Il est également intéressant de noter que la variation de la proportion finale de girofle dans les mélanges n'impacte pas significativement leur activité anti-radicalaire dans le cadre du test DPPH. En effet, l'HE de girofle représente 1/4 des HE dans les mélanges Dig1 (cannelle, citron, girofle, origan) et Dig2 (citron, girofle, menthe poivrée, origan) mais seulement 1/6^e du mélange Dig3 (cannelle, girofle, origan) et 1/7^e dans le mélange Dig4 (cannelle, citron, girofle, origan). Compte tenu de ces résultats, des activités synergiques peuvent également être supposées pour les mélanges Dig3 et Dig4.

Les quatre mélanges relatifs à la sphère digestives présentent des activités anti-radicalaires équivalentes à celle du BHA dans le cadre du test DPPH. Cette forte activité est imputée à la présence de girofle, une HE fortement active en raison d'une forte proportion en molécules phénoliques, dont l'eugénol. L'apport de cette HE, même dans de faibles proportions permet de supporter l'activité anti-radicalaire des mélanges.

2.1.2 Évaluation de la capacité à prévenir l'oxydation d'acides gras

Les activités antioxydantes des mélanges ont ensuite été établies par le test d'inhibition de blanchiment du β -carotène. Ce test fait appel à un processus d'oxydation de l'acide linoléique, qui se répercute sur le β -carotène, provoquant la dégradation de son chromophore.

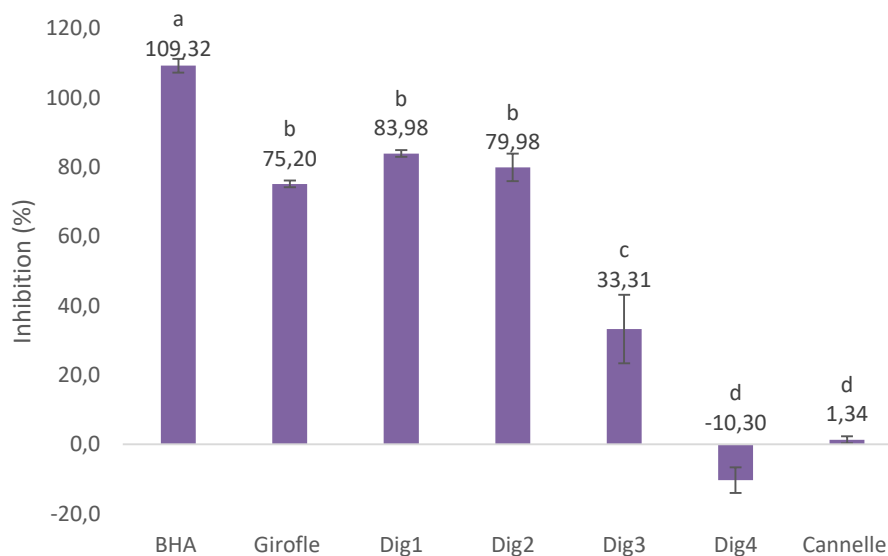


Figure 2 : Pourcentages d'inhibition du blanchiment du β -carotène obtenus pour les mélanges d'HE et l'antioxydant de référence, le BHA, testés à la concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

Les mélanges ont à nouveau été confrontés au BHA et aux HE de girofle et de cannelle (figure 2). Ces deux HE sont présentées ici car elles représentent les activités extrêmes obtenues pour les HE. Les différents échantillons sont testés à la concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$, ce qui permet de comparer les pourcentages d'inhibition obtenus pour chacun d'entre eux.

Les mélanges Dig1 (cannelle, citron, girofle, origan) et Dig2 (citron, girofle, menthe poivrée, origan) possèdent les meilleures activités, avec des pourcentages d'inhibition respectifs de $83,98 \pm 1,00\%$ et $79,98 \pm 3,95\%$. Ces pourcentages d'inhibition sont statistiquement équivalents à celui obtenu pour l'HE de girofle, soit $75,20 \pm 1,00\%$. L'absence de différence entre ces deux mélanges montre l'absence d'incidence du remplacement de l'HE de cannelle (Dig1) par la menthe (Dig2). Ce résultat suppose à nouveau la forte implication de l'HE de girofle dans l'activité antioxydante des mélanges d'HE. La réduction de la part de girofle dans les mélanges Dig3 et Dig4, contenant respectivement $1/6^{\text{e}}$ et $1/7^{\text{e}}$ de girofle, provoque une baisse significative de la capacité de protection par rapport aux deux autres mélanges (respectivement $33,31 \pm 9,90\%$ et $-10,30 \pm 3,70\%$). Cette baisse est effective malgré l'augmentation de la part d'origan dans les mélanges, ce qui confirme que cette HE ne porte pas l'activité antioxydante des mélanges, contrairement à l'HE de girofle.

Le mélange Dig4 (cannelle, citron, girofle, origan) présente par ailleurs une activité pro-oxydante, augmentant de $10,30 \pm 3,70$ % le blanchiment du β -carotène par rapport au contrôle négatif. La comparaison de ce mélange, composé de 4/7^e d'origan et 1/7^e de cannelle, girofle et citron, aux mélanges Dig1 (1/4 de cannelle, d'origan, de girofle et de citron) et Dig3 (4/6^e d'origan et 1/6^e de cannelle et de girofle), permet de supposer que l'HE de citron est responsable de l'effet délétère de ce mélange sur l'oxydation des acides gras. L'activité pro-oxydante de l'HE de citron a été démontrée par Baratta *et al.* (1998), en utilisant le test TBARS également associé à l'oxydation des acide gras. Dans leurs travaux, l'HE de citron présentait une inhibition inférieure à 5% à des concentrations de 100 et 250 $\mu\text{g/ml}$ et des activités pro-oxydantes aux concentrations de 500, 750 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ uniquement en présence d'ABAP (2,2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride), ajouté comme inducteur de l'oxydation. Il semblerait également que contrairement au mélange Dig1, l'HE de girofle n'est pas présente en quantité suffisante dans le mélange Dig4 pour contrer les effets pro-oxydants du citron. La baisse de 25% à 14% de la part d'HE de girofle dans les mélanges n'impacte donc pas les activités anti-radicalaires mesurées par la méthode DPPH, mais réduit la capacité à limiter l'oxydation des acides gras.

Les mélanges Dig1 et Dig2 cumulent d'après ces résultats de bonnes activités anti-radicalaires et antioxydantes. Cet effet est dû principalement à la présence d'HE de girofle, notamment dans une proportion de 25%. L'application des deux méthodes a été nécessaire à la discrimination des mélanges. Ces deux mélanges devraient permettre d'une part de capter les radicaux libres mais également de limiter la dégradation des acides gras lors des réactions métaboliques. Ce sont donc de bons candidats pour le rétablissement d'un statut oxydatif normal chez les animaux malades.

2.2 Inhibition de l'activité de la 15-lipoxygénase

Les activités anti-radicalaires et antioxydantes étant établies, les mélanges et les HE qui les composent sont évalués pour leurs potentielles activités anti-inflammatoires *in vitro*. La méthode enzymatique utilisée ici permet de mettre en évidence l'effet inhibiteur des HE sur la 15-LOX, extraite du soja. Seule cette enzyme pro-inflammatoire est évaluée ici, l'absence d'activité sur la phospholipase A2 ayant été constatée dans le chapitre 1.

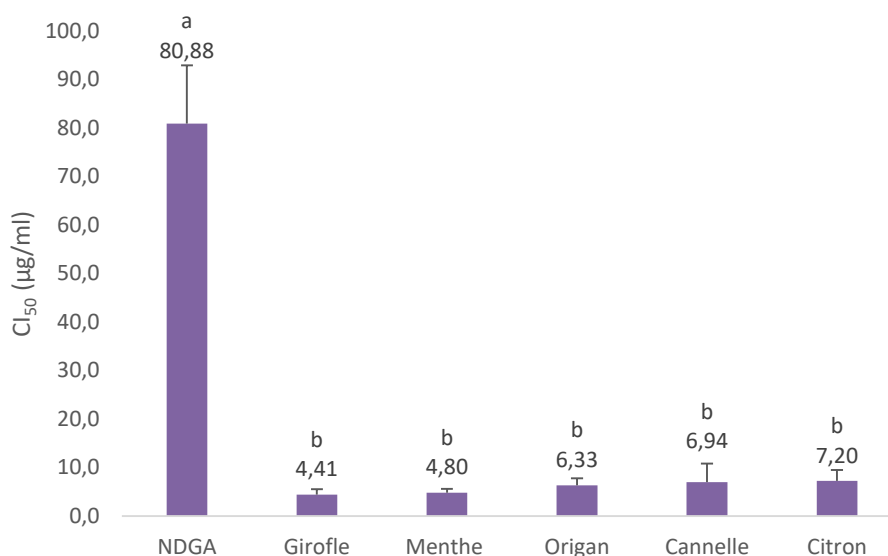


Figure 3 : *CI₅₀ (µg/ml) observées pour les HE dans le cadre de l'inhibition de la 15-lipoxygénase. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).*

Les CI₅₀ obtenues pour les différentes HE de la sphère digestive sont présentées dans figure 3 et comparées à l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA), un antioxydant inhibiteur des lipoxygénases. L'inhibiteur de référence présente une CI₅₀ de $80,87 \pm 12,02$ µg/ml ce qui est élevé par rapport aux données retrouvées dans la bibliographie. D'après les données du fournisseur (Sigma Aldrich) le NDGA devrait présenter sur la 15-LOX une CI₅₀ de 30 µM soit 9 µg/ml. Cette valeur peut cependant évoluer en fonction du test effectué et notamment de la concentration en enzyme, puisqu'au cours de leurs travaux Wei and Shibamoto (2010) ont obtenu une inhibition de 56% avec une dose de NDGA de 0,5 µg/ml. Leur mesure ayant été réalisée à l'aide d'un kit, la concentration initiale en enzyme n'est pas connue.

Dans les conditions que nous avons utilisées, l'ensemble des HE présente des CI₅₀ significativement inférieures à celle du NDGA, ce qui signifie qu'elles sont nettement plus actives. L'HE de girofle est la plus active avec une CI₅₀ de $4,40 \pm 1,13$ µg/ml. Cette valeur n'est cependant pas significativement différente de celles obtenues pour les HE de menthe ($4,79 \pm 0,76$ µg/ml), d'origan ($6,33 \pm 1,43$ µg/ml), de cannelle ($6,69 \pm 3,84$ µg/ml) et de citron ($7,20 \pm 2,25$ µg/ml). Ces activités sont conformes aux données recueillies et discutées au cours du chapitre 1.

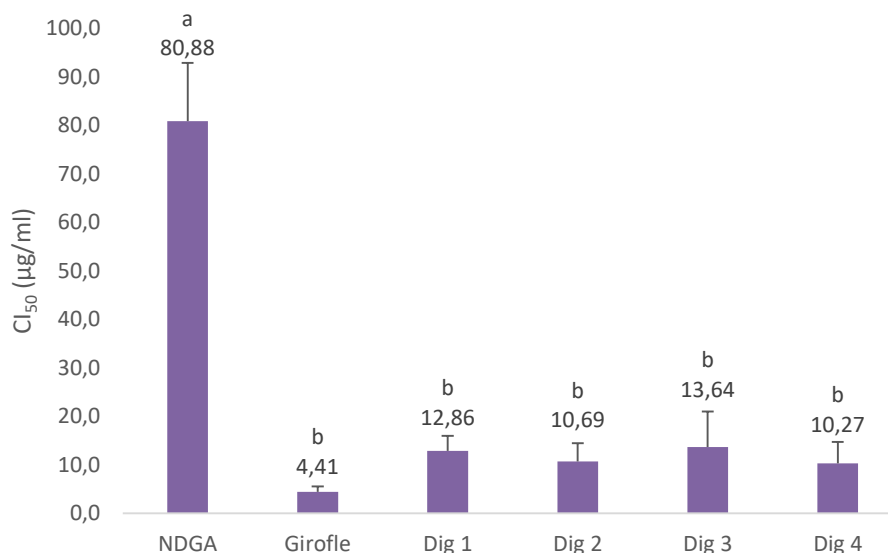


Figure 4 : CI₅₀ (µg/ml) observées pour les mélanges dans le cadre de l'inhibition de la 15-lipoxygénase. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

En ce qui concerne les mélanges, dont les résultats sont présentés dans la figure 4, ils présentent également des CI₅₀ significativement inférieures à celle du NDGA. Leurs CI₅₀ sont comprises entre $10,27 \pm 4,48$ µg/ml (Dig4) et $13,64 \pm 7,38$ µg/ml (Dig3) et sont statistiquement comparables à celle de l'HE de girofle. Contrairement aux activités antioxydantes et anti-radicalaires présentées précédemment, les variations de concentration en HE de girofle et les différentes combinaisons d'HE n'ont pas d'effets significatifs sur l'activité des mélanges. Ce résultat reste étonnant puisqu'il est supposé que le mécanisme d'inhibition de la 15-LOX par les HE repose sur un procédé antioxydant. En effet cette enzyme catalyse l'oxydation des acides gras dérivés de la membrane comme l'acide arachidonique.

Le test 5-LOX n'est ici pas discriminant pour la sélection des mélanges mais nous permet de confirmer la forte activité des mélanges et leur bonne construction. L'ensemble des HE étant actif, nos choix d'association ne portent pas préjudice à l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des mélanges. La formation de mélanges permet jusqu'à présent de cumuler les activités antioxydantes et anti-inflammatoires, notamment grâce à l'apport de girofle dans les formules.

2.3 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB)

Les HE et mélanges sont évalués pour leurs activités contre les bactéries isolées de la sphère digestive, à savoir *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* K88, *Escherichia coli* non typable (N.T.), *Salmonella enterica* sv. Typhimurium et *Salmonella enterica* sv. Enteritidis (CIP). Les bactéries non CIP sont issues d'isolements réalisés en élevage. Pour une même souche, chaque bactérie obtenue à partir d'un isolement différent est numérotée 1, 2 ou 3.

Les concentrations bactériostatiques et bactéricides obtenues pour les HE et exprimées en mg/ml sont présentées dans le tableau 2. Les HE de cannelle, girofle et origan sont actives sur l'ensemble des bactéries testées et présentent des CMB comprises entre 0,25 et 5,00 mg/ml. Il est possible de classer les HE selon leur ordre d'activité : origan > cannelle > girofle. Les activités des HE sont ici indépendantes du type de Gram des bactéries. L'HE de girofle nécessite les concentrations les plus élevées pour obtenir une activité inhibitrice ou bactéricide. Les CMB sont comprises entre 0,50 et 5,00 mg/ml, ce qui représente une gamme large de concentrations. Cette activité est imputée à l'eugénol qui est le composé majoritairement présent dans l'HE de girofle. Ce phénylpropène est connu pour ses activités antibactériennes, liées notamment à sa structure phénolique (Nazzaro, Fratianni, De Martino, Coppola, & De Feo, 2013; Rhayour, Bouchikhi, Tantaoui-Elaraki, Sendide, & Remmal, 2003).

D'après Rhayour *et al.* (2003), l'HE de girofle et son composé majoritaire, l'eugénol, testés à une concentration équivalente de 2 mg/ml perturbent fortement la membrane d'*E. coli*, provoquant des perforations après 1h de contact. *Bacillus subtilis*, également évalué dans cette étude, présentait par contre une déformation des cellules après le même traitement. Les mécanismes d'action des HE et de leurs composés majoritaires sont donc variables d'une bactérie à une autre (Rhayour *et al.*, 2003).

Tableau 2 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des huiles essentielles (en mg/ml), testées sur les bactéries impliquées dans les pathologies digestives. Les numéros représentent les différents prélèvements appartenant à une même souche mais provenant d'isolements différents, comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes. « - » indique que l'HE est directement bactéricide dans ces conditions. « >5,0 » signifie que les HE ne présentent pas d'activités dans les concentrations testées.

		<i>C. perfringens</i>			<i>E. coli</i> K88		<i>E. coli</i> N.T.			<i>S. Typhimurium</i>			<i>S. Enteritidis</i>
		1	2	3	1	2	1	2	3	1	2	3	1
Cannelle	CMI	-	-	0,50	-	0,50	0,50	1,25	0,50	-	0,25	0,50	-
	CMB	0,50	0,50	1,25	1,25	1,25	1,25	>5,0	1,25	0,50	0,50	1,25	0,50
Citron	CMI	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
	CMB	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
Girofle	CMI	0,50	1,25	0,50	0,50	0,50	-	-	-	-	2,50	0,50	-
	CMB	1,25	2,50	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	0,50	0,50	5,00	5,00	0,50
Menthe	CMI	>5,0	>5,0	>5,0	-	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	-
	CMB	>5,0	>5,0	>5,0	1,25	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	1,25
Origan	CMI	-	-	-	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-
	CMB	0,50	0,50	0,50	1,25	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,25

L'HE de cannelle affecte les différentes bactéries avec une gamme de concentrations bactéricides plus resserrée, s'échelonnant de 0,50 à 1,25 mg/ml. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par Ooi *et al.* (2006). L'HE de cannelle et son composé majoritaire, le cinnamaldehyde, ont présenté au cours de leurs travaux une CMI de 0,3 mg/ml sur *E. coli* et de 0,3 mg/ml et 0,2 mg/ml respectivement sur *S. Typhimurium*. Cette publication a également montré l'absence d'efficacité de l'acide cinnamique, un autre constituant de la cannelle, confirmant que le cinnamaldehyde est bien la molécule active. Ce composé est connu pour avoir trois actions possibles sur les bactéries selon sa concentration : à faible concentration il interagit avec différents effecteurs cellulaires, notamment les enzymes impliquées dans l'interaction avec les cytokines ; à plus forte dose, il devient un inhibiteur des ATPases ; à concentration

létale, il perturbe l'intégrité de la membrane (Nazzaro *et al.*, 2013). Dans l'étude réalisée sur le biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*, présentée dans le chapitre 1, nous avons également mis en évidence que la cannelle induisait des modifications de la conformation des cellules, provoquant la formation de filaments bactériens (Lang *et al.*, 2016). Cette observation a été reliée à la capacité du cinnamaldehyde à inhiber la formation de filaments Z nécessaires à la formation du septum permettant une division complète des bactéries *E. coli* (Domadia, Swarup, Bhunia, Sivaraman, & Dasgupta, 2007).

Enfin l'HE d'origan est la plus active ici, avec des concentrations bactéricides $\leq 0,50$ mg/ml sur l'ensemble des bactéries de l'essai, mis à part *E. coli* K88 n°1 (CMI = 0,50 mg/ml et CMB = 1,25 mg/ml). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Henn *et al.* (2010) lors d'essais antibactériens effectués avec l'HE d'origan. La CMB obtenue était de 0,50 mg/ml pour *S. typhimurium* et *C. perfringens*. L'HE présentait également une activité inhibitrice sur *E. coli* à une concentration de 0,50 mg/ml (Henn *et al.*, 2010). Cette HE présente majoritairement des activités bactéricides dans les conditions testées. Ce résultat peut indiquer que la différence entre la concentration impliquant une activité bactériostatique et celle impliquant une activité bactéricide est très réduite. L'activité du carvacrol, composé majoritaire de l'HE d'origan, a également été démontrée par Du *et al.* (2015) sur ces bactéries. Ce composé présentait une activité sur *E. coli*, *C. perfringens* et *S. Typhimurium* (CMI = 0,375 mg/ml CMB = 0,750 mg/ml) ainsi que sur *S. Enteritidis* (CMI = 0,187 mg/ml CMB = 0,750 mg/ml). La fonction phénol provoque des altérations de la membrane (inhibition de la perméabilité à l'ATP et relargage de LPS) (Nazzaro *et al.*, 2013).

Une comparaison effectuée avec les composés majoritaires des trois HE sur *E. coli* K88 et *S. Typhimurium* a montré que le carvacrol et le cinnamaldehyde avaient des activités proches avec des CMB respectives de 0,10 mg/ml et 0,13 mg/ml sur *E. coli* K88 et de 0,16 et 0,10 mg/ml sur *S. Typhimurium* (Si *et al.*, 2006). Des concentrations plus élevées d'eugénol étaient nécessaires pour atteindre la CMB, de 0,30 mg/ml sur *E. coli* K88 et 0,40 mg/ml sur *S. Typhimurium* (Si *et al.*, 2006).

Une autre étude menée sur *E. coli* O157:H7 a démontré la capacité du carvacrol à inhiber la production de flagelline et donc, à provoquer l'absence de flagelle sur la bactérie. En effet un traitement d'une nuit avec 150 μ g/ml (soit une concentration sub-CMI dans notre cas) induisait des bactéries sans flagelle et non mobiles (Burt *et al.*, 2007). La répression des flagelles après la colonisation de l'hôte est un phénomène connu. En effet, ceci permet à la

bactérie d'économiser de l'énergie pour d'autres voies métaboliques (les flagellines représentant près de 8% des protéines totales de la cellule) et de résister face au système immunitaire (Burt *et al.*, 2007). Les flagelles et plus particulièrement la flagelline sont retenus comme des signaux de l'infection et constituent des PAMPs (de l'anglais « Pathogen Associated Motif Patterns »). Ces motifs caractéristiques sont reconnus par les PRR (de l'anglais « Pattern Recognition Receptors ») présents sur les cellules de l'immunité innée (par exemple les macrophages). La reconnaissance des PAMPs stimule le processus de phagocytose et induit la sécrétion de messagers activant les voies de signalisation du système immunitaire. Si le traitement au carvacrol peut effectivement limiter le déplacement et l'adhésion des colibacilles entérotoxiques aux parois intestinales en inhibant la synthèse de flagelline, ces appendices sont également indispensables à leur élimination par l'hôte, *via* le système immunitaire. Le carvacrol à des concentrations sub-CMI pourrait donc en pratique engendrer des surinfections (Burt *et al.*, 2007).

Aux concentrations testées ($\leq 5,0$ mg/ml) l'HE de citron n'est pas active sur les bactéries de la sphère digestive. Les terpènes qui constituent cette HE (majoritairement le limonène) sont connus pour leur faible activité antibactérienne (Nazzaro *et al.*, 2013). L'HE de Menthe n'est active que sur *E. coli* K88 n°1 et sur *S. Enteritidis*, avec une CMB de 1,25 mg/ml. À nouveau, cette HE est riche en terpènes, avec une majorité de menthol (Nazzaro *et al.*, 2013).

Enfin, les concentrations actives observées ici sont supérieures à celles référencées pour les antibiotiques classiques à usage vétérinaire. L'utilisation des quinolones tel que l'acide nalidixique, est conseillée par exemple dans les cas de colibacillose aviaires. Leur concentrations critiques sur les *Enterobacteriaceae* (qui comprennent les colibacilles et les salmonelles) sont situées entre 2 et 4 $\mu\text{g/ml}$: c'est-à-dire que la bactérie est considérée comme sensible dans le cas d'une concentration active inférieure à 2 $\mu\text{g/ml}$ et résistante en cas de concentration active supérieure à 4 $\mu\text{g/ml}$. Les concentrations actives observées pour les HE sont donc globalement 100 à 1000 fois plus élevées (Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 2013).

Les bactéries sélectionnées dans le cadre de l'étude de la sphère digestive sont toutes affectées par les HE de cannelle, de girofle et d'origan, indépendamment de leur type de Gram. Cette activité est liée à la présence de leurs composés majoritaires respectifs, le cinnamaldehyde, l'eugénol et le carvacrol, connus pour leurs activités antibactériennes.

Tableau 3 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) en mg/ml des mélanges testés sur les bactéries impliquées dans les pathologies digestives. Les numéros représentent les différentes bactéries appartenant à une même souche mais provenant d'isolements différents, comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes. L'absence de CMI indique que l'HE est directement bactéricide dans ces conditions. L'indication ">5,0" signifie que l'HE ne présente pas d'activité dans les concentrations testées.

		<i>C. perfringens</i>			<i>E. coli</i> K88		<i>E. coli</i> N.T.			<i>S. Typhimurium</i>			<i>S. Enteritidis</i>
		1	2	3	1	2	1	2	3	1	2	3	1
Dig1	CMI	5,00	-	-	0,50	0,50	-	-	-	-	-	>5,0	-
	CMB	>5,0	0,25	0,25	1,25	1,25	0,25	1,25	1,25	1,25	1,25	>5,0	0,12
Dig2	CMI	-	-	0,50	-	2,50	-	-	5,00	-	-	1,25	0,25
	CMB	2,50	1,25	1,25	1,25	5,00	0,50	5,00	>5,0	2,50	2,50	2,50	0,50
Dig3	CMI	-	-	-	-	-	-	0,50	0,50	-	-	-	-
	CMB	2,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	1,25	2,50	0,50	0,50	2,50	0,25
Dig4	CMI	-	1,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CMB	2,50	2,50	1,25	0,50	0,50	1,25	1,25	1,25	0,50	0,50	2,50	0,25

Les mélanges relatifs à la sphère digestive ont également été évalués sur les 12 bactéries étudiées dans cet essai (tableau 3). Le mélange Dig1 est le seul à présenter une absence d'activité sur *S. enterica* sv Typhimurium n°3 et à ne pas avoir d'activité bactéricide sur la bactérie *C. perfringens* 1. Il est d'ailleurs intéressant de noter que cette dernière est moins sensible aux mélanges qu'elle ne l'est aux HE seules. En effet les CMB des mélanges Dig2, 3 et 4 sur cette bactérie sont de 2,5 mg/ml, alors que les concentrations bactéricides des HE d'origan, cannelle et girofle sont comprises entre 0,50 et 1,25 mg/ml. Ce résultat pourrait être lié à l'effet de la dilution des molécules actives lors de la réalisation du mélange. Toutefois, l'augmentation de la part d'HE d'origan dans le mélange Dig3 (4/6° d'origan) ne diminue pas la CMB.

La comparaison des mélanges Dig2, 3 et 4 permet de faire ressortir le mélange Dig3 comme le plus actif. En effet ce mélange est actif sur l'ensemble des souches, et présente une gamme de CMB très resserrée autour de 0,50 mg/ml. Cette valeur de CMB est observée sur au moins une bactérie de chaque souche. L'activité de ce mélange peut être attribuée à la forte concentration en HE d'origan (4/6° du mélange) et donc en carvacrol. Cette HE est également la plus active dans cette catégorie.

Le mélange Dig1, à défaut d'activité bactéricide sur *S. Typhimurium* n°3 et *C. perfringens* n°1 présente tout de même des activités intéressantes sur les autres bactéries du groupe. Ce mélange composé à parts égales d'origan, de cannelle, de girofle et de citron permet notamment d'abaisser les concentrations actives sur *C. perfringens* n°2 et 3 (CMB = 0,25 mg/ml), sur *E. coli* N.T. n°1 (CMB = 0,25 mg/ml) et sur *S. Enteritidis* (CMB = 0,12 mg/ml). En effet les concentrations actives sur ces souches étaient respectivement de 0,50 mg/ml avec la cannelle et l'origan, 0,50 mg/ml avec l'origan et 0,25 mg/ml avec l'origan. Cet effet n'est pas observé pour le mélange Dig4, contenant les mêmes HE mais avec une part plus importante d'HE d'origan (4/7^e pour 1/7^e d'HE de cannelle, de citron et de girofle). Il n'est pas non plus observé dans le mélange Dig2, dans lequel l'HE de citron est remplacée par de l'HE de menthe. Un effet synergique de l'HE de citron avec les autres HE du mélange peut donc être supposé.

L'HE d'origan développe l'activité antibactérienne la plus forte sur l'ensemble des pathogènes de la sphère digestive testés ici. Son intégration dans les mélanges permet d'apporter une activité antibactérienne qui se cumule aux effets anti-radicalaires, antioxydants et anti-inflammatoires déjà mis en évidence pour les mélanges. Les mélanges Dig1 (1/4 de cannelle, de citron, de girofle et d'origan) et Dig3 (4/6^e d'origan et 1/6^e de cannelle et de girofle) présentent les concentrations antibactériennes les plus basses, bien que Dig1 ne soit pas actif sur l'ensemble des bactéries testées (notamment *S. Typhimurium* n°3). Ce résultat montre l'importance de tester plusieurs bactéries d'une même souche afin d'obtenir une réponse globale. Le mélange Dig3 est quant à lui actif sur l'ensemble des souches. Cette forte activité a été attribuée à sa richesse en carvacrol. L'utilisation de ce composé pourrait cependant poser problème en raison de son activité inhibitrice sur les *pilis* bactériens. En effet, les flagellines sont des PAMPs permettant la reconnaissance du pathogène et l'activation du système immunitaire. La combinaison de trois HE actives (cannelle, girofle et origan) à parts égales dans le mélange Dig1 pourrait être plus sécurisante à long terme, limitant le risque d'apparition de résistance grâce à la multiplication des cibles. Par ailleurs ce mélange présente également de plus fortes activités antioxydantes d'après les résultats obtenus par les méthodes DPPH et blanchiment du β -carotène.

2.4 Toxicité des huiles essentielles sur l'organisme modèle *Caenorhabditis elegans*

Les parasites intestinaux contribuent à l'apparition des pathologies de la sphère digestive. Les ascaris et les oxyures, également appelés strongles, appartiennent à la famille des nématodes et représentent un risque pour la santé des animaux d'élevage. Ces derniers sont en effet des hôtes nécessaires au développement des parasites. Une fois ingérés, les strongles digestifs infestent les intestins ou la caillette dans le cas des ruminants (cf. figure 5). Les strongles pulmonaires, peuplent, eux, les poumons ou les bronches (MSD - santé animale, n.d.). Ils entrent alors en compétition avec leur hôte et causent des lésions des tissus. L'organisme *C. elegans*, appartenant également à la famille des nématodes, a été choisi pour l'étude de l'activité vermifuge des huiles essentielles. Ce vers ne présente pas de risque infectieux pour l'homme ou les animaux, ce qui en fait un modèle sûr.

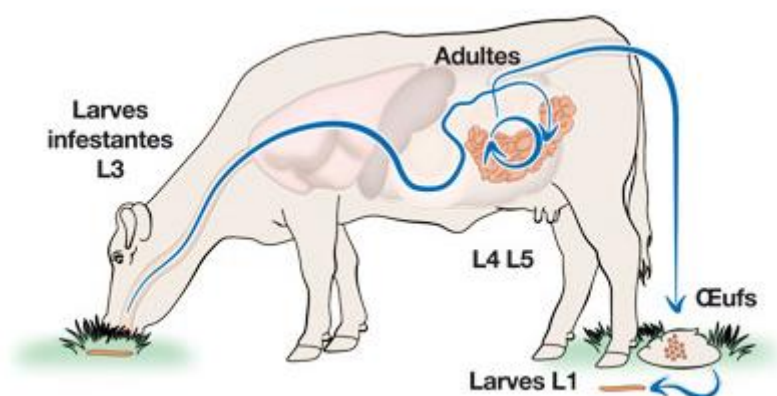


Figure 5 : Exemple de cycle infectieux observé pour le parasite digestif *Cooperia spp.* chez les bovins. (MSD - santé animale, n.d.)

La toxicité des mélanges Dig3 (4/6^e d'origan et 1/6^e de cannelle et de girofle) et Dig4 (4/7^e d'origan et 1/7^e d'HE de cannelle, de citron et de girofle) sur le nématode *C. elegans* a été évaluée. Ces deux mélanges ont été retenus ici en raison de leur richesse en carvacrol, dont l'activité nématicide a déjà été démontrée (Lei, Leser, & Enan, 2010). La toxicité des mélanges a été établie sur le nématode *C. elegans* au stade L1 de son développement après 24h de traitement et les résultats obtenus présentés dans la figure 6. Les valeurs sont comparées à un témoin négatif constitué de tampon ainsi qu'à un témoin constitué de simulsol à la concentration maximale observée, soit 200 µg/ml. Le simulsol, utilisé comme émulsifiant ne présente pas de toxicité sur les vers.

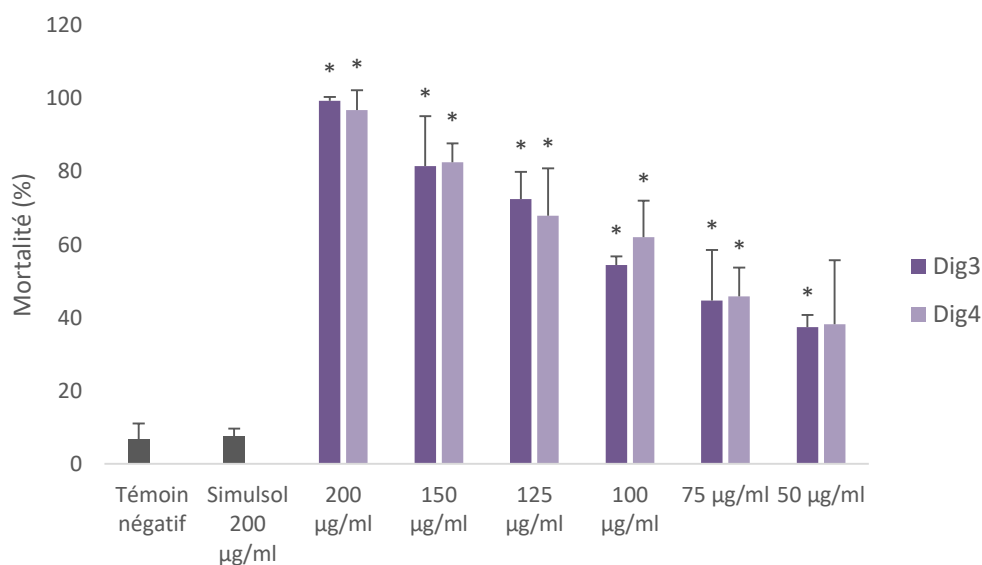


Figure 6 : Toxicité des mélanges Dig3 et Dig4 sur le nématode *C. elegans* exprimée en pourcentage de mortalité en fonction de la concentration testée. Les échantillons présentant un astérisque (*) sont significativement différents du témoin simulsol testé à la plus forte concentration observée ($P < 0.05$)

Les deux mélanges présentent des toxicités significatives dès 50 µg/ml pour le mélange Dig3 et 75 µg/ml pour le mélange Dig4. L'effet des mélanges sur la mortalité est dose-dépendant et la dose maximale testée de 200 µg/ml permet d'obtenir une mortalité de $99,42 \pm 1,01$ % avec le mélange Dig3 et de $96,88 \pm 1,01$ % avec le mélange Dig4. Les concentrations impliquant la mortalité de 50% des individus (CT_{50}) ont été établies par régression linéaire et sont respectivement de $87,47 \pm 1,29$ µg/ml pour le mélange Dig3 et $82,90 \pm 7,19$ µg/ml pour le mélange Dig4. Ces deux valeurs n'étant pas significativement différentes, on peut considérer que les deux mélanges possèdent la même activité.

Ces concentrations actives sont en accord avec les résultats présentés par Lei *et al.* (2010). En effet, le carvacrol et le thymol, deux composés purs testés à 100 µg/ml provoquaient 100% de mortalité chez *C. elegans*. Une activité équivalente du thymol et du carvacrol a parallèlement été observée chez le parasite porcin *Ascaris suum*. Le carvacrol est le composé majoritaire de l'HE d'origan, qui est également le constituant majoritaire des mélanges Dig3 et 4. Cette étude a également montré la présence de déformations à la surface du ver lorsque des concentrations plus faibles en thymol ou carvacrol étaient utilisées. Par ailleurs l'interaction du carvacrol avec le récepteur à la tyramine TyrR (ser-2) a été mise en évidence. L'activité nématocide pourrait être liée à ce récepteur, impliqué notamment dans les fonctions pharyngées

du vers (Rex *et al.*, 2004). D'après ces travaux, le carvacrol inclus dans des préparations pourrait donc induire une activité nématocide *in vivo via* le récepteur TyrR (ser2) mais également potentialiser l'activité d'autres drogues avec lequel il serait combiné, en réduisant l'apparition de résistance.

Par ailleurs, l'eugénol contenu dans l'HE de girofle et présent dans les mélanges Dig3 et 4 est également connu pour ses activités nématocides sur *C. elegans* (Githiori, Athanasiadou, & Thamsborg, 2006). Les HE d'origan, de girofle et de cannelle ont également démontré leur activité sur les oocystes d'*Eimeria*, d'autres parasites affectant les animaux d'élevage, avec des CT₅₀ respectives de $3,73 \pm 1,28$ mg/ml, $0,543 \pm 0,30$ mg/ml et $3,91 \pm 1,61$ mg/ml (Githiori *et al.*, 2006).

Les mélanges Dig3 (cannelle 1/6^e, girofle 1/6^e et origan 4/6^e) et Dig4 (cannelle 1/7^e, citron 1/7^e, girofle 1/7^e et origan 4/7^e) font donc de bons candidats en tant qu'additifs pour la prévention des infections parasitaires, intervenant notamment chez les jeunes animaux ou lors de la mise à l'herbe pour les bovins. L'essai réalisé ici fait appel à des larves L1 pour des raisons pratiques (*C. elegans* stoppe en effet sa croissance à ce stade en absence de nourriture) mais ne permet d'apporter qu'un ordre de grandeur des concentrations actives. En effet, les larves infectieuses étant au stade L3, la mesure devra être répétée sur les différents stades de développement du nématode. S'il n'est pas possible ici de déterminer l'HE dont dépend l'activité du mélange, les HE de cannelle, girofle et origan seules présentent toutes trois des activités antiparasitaires dans la bibliographie (Githiori *et al.*, 2006). La combinaison de ces HE actives permet donc d'une part de cumuler des activités mais également de limiter l'apparition de résistances si les cibles sont différentes.

3 Conclusion

Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence deux mélanges actifs pour la prévention des pathologies de la sphère digestive. Le mélange Dig1 (cannelle, citron, girofle, origan) présente de fortes activités antioxydantes et anti-inflammatoires avec des CI_{50} de $12,03 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ pour le test DPPH et $12,85 \pm 3,13 \mu\text{g/ml}$ pour l'inhibition de la 15-LOX. Les activités antibactériennes observées pour ce mélange sont également bonnes, bien que toutes les bactéries de l'essai n'aient pas été affectées. Le mélange Dig3 (cannelle, girofle, origan) permettait d'obtenir une activité antibactérienne à des concentrations $\leq 0,5 \text{ mg/ml}$ sur l'ensemble des bactéries testées et présentait également un bon potentiel anti-radicalaire et anti-inflammatoire, équivalent à Dig1. Le mélange présentait toute fois une moins bonne activité antioxydante dans le cadre de la peroxydation des lipides (test β -carotène), avec une protection de $33,31 \pm 9,90\%$ à la concentration de $50 \mu\text{g/ml}$.

Dans les deux cas, l'association des huiles essentielles les plus actives, à savoir la cannelle, la girofle et l'origan, permet aux mélanges de cumuler des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes et vermifuges. Leur activité antioxydante a notamment été attribuée à la présence de l'HE de girofle, même en moindre concentration. L'activité antibactérienne a été attribuée aux HE de cannelle et d'origan. Par ailleurs, le fait de réaliser ces combinaisons n'implique pas de perte significative d'activité et pourrait permettre de limiter les risques de résistances chez les organismes ciblés (McGaw, 2013).

La comparaison des concentrations toxiques entre les bactéries et l'organisme modèle ne nous permet pas ici de réaliser une échelle de toxicité en rapport avec la complexité de l'organisme. Il semblerait au contraire que *C. elegans* (ici au stade L1) soit plus sensible aux mélanges que les bactéries.

Ces données sont également des résultats préliminaires pour la suite du projet. En effet, il a été proposé d'évaluer l'activité anti-colonisatrice des HE en utilisant le modèle *C. elegans*. L'objectif est de démontrer une réduction du développement bactérien dans le tractus digestif de l'animal après infection par des germes d'intérêt (notamment les bactéries testées ici) (Kulshreshtha, 2016). Un modèle est actuellement en développement dans le cadre de ce projet, en utilisant la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 à laquelle a été intégré un gène GFP. L'objectif serait de visualiser et quantifier par microscopie confocale les bactéries introduites dans le vers avec ou sans traitement aux HE.

Valorisation industrielle

Les travaux réalisés *in vitro* sur la sphère digestive ont conduit à la création du noyau d'huiles essentielles Digelor® par l'entreprise BioArmor. Ce noyau est pour l'instant décliné sous deux formes distinctes. La première formule consiste en une solution aqueuse à diluer dans l'eau de boisson, visant à prévenir l'apparition des troubles digestifs tels que les entérites. Le second produit est une pâte sous forme de seringue orale unidose à distribuer pour la prévention de la cryptosporidiose chez les veaux.

L'efficacité des deux formes du noyau Digelor® fait actuellement l'objet d'études *in vivo* réalisées auprès d'élevages partenaires. La solution aqueuse, utilisée chez les volailles pour la prévention des entérites, est distribuée en cure de 5 jours lors des périodes à risque. Son effet est mesuré par des paramètres comme la consommation d'aliment par les animaux traités, le taux de mortalité, l'observation des fientes (couleur/aspect) et le poids des animaux à l'abattage. Concernant la formule pâteuse, celle-ci est distribuée à raison de 2 seringues à 8 ou 10 jours d'âge, chez les veaux. L'effet du complément est évalué par le suivi du poids des animaux traités, l'apparition des symptômes tels que les diarrhées et la notation des fèces.

4 Bibliographie

B

Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Figueiredo, a C., & Ruberto, G. (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils, *244*, 235–244.

Burt, S. A., van der Zee, R., Koets, A. P., de Graaff, A. M., van Knapen, F., Gaastra, W., ... Veldhuizen, E. J. a. (2007). Carvacrol Induces Heat Shock Protein 60 and Inhibits Synthesis of Flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(14), 4484–4490.

C

Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. (2013). Antibiogramme vétérinaire, 1–13.

D

Domadia, P., Swarup, S., Bhunia, A., Sivaraman, J., & Dasgupta, D. (2007). Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochemical Pharmacology*, *74*(6), 831–840.

Du, E., Gan, L., Li, Z., Wang, W., Liu, D., & Guo, Y. (2015). *In vitro* antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *6*, 58.

F

Farrer-Halls, G. (2006). *La bible des huiles essentielles et de l'aromathérapie*. (T. Guy, Ed.).

Frankič, T., Voljč, M., Salobir, J., & Rezar, V. (2009). Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta Agriculturae Slovenica*, 95–102.

Franz, C., Baser, K., & Windisch, W. (2010). Essential oils and aromatic plants in animal feeding—a European perspective. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, *25*, 327–340.

G

Gabriel, I., Alleman, F., & Dufourcq, V. (2013). Utilisation des huiles essentielles en alimentation des volailles. 2. Hypothèses sur les modes d'action impliqués dans les effets observés. *INRA Prod. Anim*, 26(1), 13–24.

Githiori, J. B., Athanasiadou, S., & Thamsborg, S. M. (2006). Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology*, 139(4), 308–20.

H

Henn, J., Bertol, T., & Moura, N. (2010). Oregano essential oil as food additive for piglets: antimicrobial and antioxidant potential. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 1761–1767.

I

Institut Technique de l'Agriculture Biologique. (2015). *La santé des volailles en Agriculture Biologique*.

K

Kaplan, R. M., Storey, B. E., Vidyashankar, A. N., Bissinger, B. W., Mitchell, S. M., Howell, S. B., ... Skrypec, D. J. (2014). Antiparasitic efficacy of a novel plant-based functional food using an *Ascaris suum* model in pigs. *Acta Tropica*, 139, 15–22.

Kulshreshtha, G. (2016). *The use of selected red macroalgae (seaweeds) for the reduction of salmonella enteritidis in poultry*.

L

Lang, M., Rodrigues, S., Boulho, R., Duteil, E., Bazire, A., & Bedoux, G. (2016). An Essential Oil Blend Prevents *Pseudomonas aeruginosa* PA01 from Forming Biofilms. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 7(2).

Lei, J., Leser, M., & Enan, E. (2010). Nematicidal activity of two monoterpenoids and SER-2 tyramine receptor of *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Pharmacology*, 79(7), 1062–1071.

M

McGaw, L. (2013). *Use of Plant-Derived Extracts and Essential Oils against Multidrug-Resistant Bacteria Affecting Animal Health and Production. Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and their Components*. Elsevier.

MSD - santé animale. (n.d.). Fiche Pratique Strongle digestif Cooperia spp - Parasites internes. Retrieved April 10, 2018, from http://www.prevention-rentable.fr/parasites_internes_fiches_cooperia.asp

N

Naidoo, V., McGaw, L. J., Bisschop, S. P. R., Duncan, N., & Eloff, J. N. (2008). The value of plant extracts with antioxidant activity in attenuating coccidiosis in broiler chickens. *Veterinary Parasitology*, *153*(3), 214–219.

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, *6*(12), 1451–74.

O

Ooi, L. S. M., Li, Y., Kam, S.-L., Wang, H., Wong, E. Y. L., & Ooi, V. E. C. (2006). Antimicrobial Activities of Cinnamon Oil and Cinnamaldehyde from the Chinese Medicinal Herb *Cinnamomum cassia* Blume. *The American Journal of Chinese Medicine*, *34*(3), 511–522.

R

Remmal, A., Achahbar, S., Bouddine, L., Chami, N., & Chami, F. (2011). *In vitro* destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. *Veterinary Parasitology*, *182*(2–4), 121–6.

Rex, E., Molitor, S. C., Hapiak, V., Xiao, H., Henderson, M., & Komuniecki, R. (2004). Tyramine receptor (SER-2) isoforms are involved in the regulation of pharyngeal pumping and foraging behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neurochemistry*, *91*(5), 1104–1115.

Rhayour, K., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A., Sendide, K., & 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*. *Journal of Essential*

Oil Research, 15(4), 286–292.

S

Si, W., Gong, J., Tsao, R., Zhou, T., Yu, H., Poppe, C., ... Du, Z. (2006). Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 100(2), 296–305.

W

Wei, A., & Shibamoto, T. (2010). Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7218–7225.

Z

Zeng, Z., Zhang, S., Wang, H., & Piao, X. (2015). Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6(1).



Chapitre 4

Contrôle de facteurs liés à la mammite bovine

Liste des figures

Figure 1 : CI ₅₀ observées pour les huiles essentielles dans le cadre du test DPPH.....	229
Figure 2 : CI ₅₀ observées pour les mélanges dans le cadre du test DPPH.	230
Figure 3 : Pourcentage d'inhibition du blanchiment du β -carotène obtenu pour les mélanges d'HE et l'antioxydant de référence, le BHA, testés à la concentration de 50 μ g/ml.	231
Figure 4 : CI ₅₀ observées pour les HE dans le cadre de l'inhibition de la 15-lipoxygénase...	232
Figure 5 : CI ₅₀ en μ g/ml observées pour les mélanges dans le cadre de l'inhibition de la 15- lipoxygénase.....	233
Figure 6 : Inhibition du biofilm de <i>S. agalactiae</i> (A) et <i>S. uberis</i> (B) obtenues après traitement avec le mélange Mam1 à différentes concentrations (mg/ml).	238
Figure 7 : Biovolume ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) et épaisseur moyenne (μm) observés pour les biofilms de <i>S.</i> <i>agalactiae</i> (A) et <i>S. uberis</i> (B) en microscopie confocale à balayage laser.....	238

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition des mélanges étudiés dans le cadre de la prévention des mammites.	228
Tableau 2 Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des huiles essentielles testées sur les bactéries impliquées dans la mammité, exprimées en mg/ml	235
Tableau 3 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des mélanges testés sur les bactéries impliquées dans la mammité, exprimées en mg/ml.	237

1 Introduction

La mammite est une pathologie préoccupante pour les éleveurs laitiers, engendrant de fortes pertes. En effet, l'inflammation de la glande mammaire, qui peut devenir chronique, rend le lait impropre à la consommation et peut impliquer une prise en charge vétérinaire (Web-Agri, 2014). Cette maladie est multifactorielle et peut être engendrée par la présence de pathogènes tels que les bactéries, les virus ou les levures (McDougall, Parker, Heuer, & Compton, 2009). Les bactéries, qui font l'objet de cette étude, peuvent également se présenter sous forme de biofilms, les rendant plus difficiles à éliminer. Les biofilms de *Staphylococcus aureus* ont par exemple été impliqués dans des formes chroniques de mammites (Gomes, Saavedra, & Henriques, 2016).

L'objectif de ce chapitre est la mise au point d'un mélange pouvant limiter le développement des mammites bovines. Dans un premier temps, les activités anti-radicalaires et antioxydantes de l'ensemble des Huiles Essentielles (HE) et des mélanges sont étudiées, tout comme leur potentiel anti-inflammatoire. Ces activités communes à toutes les sphères ont permis la construction des mélanges et leur sélection. En effet, le processus inflammatoire provoqué par la mammite induit un gonflement et des douleurs. Par ailleurs ce processus est énergivore pour l'animal. Il permet d'éliminer les pathogènes et de réparer les tissus endommagés (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007) mais engendre également la production de radicaux libres, potentiellement délétères. Les activités antioxydantes permettent de maintenir l'équilibre métabolique des animaux, qui peut influencer l'apparition de la maladie (Bradley, 2002). Les activités anti-radicalaires et antioxydantes des HE seront établies ici par les test DPPH et par le blanchiment du β -carotène. Le test TBARS n'a pas été retenu dans cette section car les mélanges sont majoritairement composés de cannelle, une HE qui provoque l'apparition de faux positifs.

La sélection des mélanges se poursuit par la détermination des activités antibactériennes sur un échantillon de pathogènes fréquemment isolés dans les cas de mammites (Watts, 1988), à savoir *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* et *Streptococcus uberis*. Un mélange potentiellement actif dans cette sphère doit pouvoir inhiber le développement de bactéries à risque à la surface du trayon, afin de limiter leur entrée dans le canal.

En cas d'entrée de bactéries dans le canal du trayon, il est également intéressant de limiter leur adhésion sur les parois internes de la glande mammaire et leur développement sous

forme de biofilm (Melchior, Vaarkamp, & Fink-Gremmels, 2006). Cette forme de vie permet aux pathogènes de se soustraire au système immunitaire. Les activités des mélanges seront donc également étudiées sur les biofilms de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* et *S. uberis*. Ces trois organismes ont été sélectionnés car peu de données existent sur leur capacité à former des biofilms (surtout pour *Streptococcus agalactiae* et *Streptococcus dysgalactiae*) et sur leur éventuelle sensibilité aux huiles essentielles, seules ou en mélange. Cette partie du chapitre sera présentée sous la forme d'une publication intitulée « An Essential Oil Blend inhibits mastitis pathogens » soumise dans le « Journal of Dairy Science ». Les formules d'HE étant confidentielles, les résultats obtenus avec le mélange Mam1 sur les biofilms seront présentés à la suite.

2 Résultats et discussion

Les mélanges utilisés dans cette partie sont présentés dans le tableau 1. Pour leur construction, les connaissances liées à l'utilisation des HE en aromathérapie disponibles ont été utilisées. Les mammites étant causées par des pathogènes divers, les HE de cannelle, d'origan et de sarriette ont été utilisées pour leurs activités antibactériennes établies lors du projet EVHELISANE. L'HE de tea tree a également été intégrée ici en raison de ses activités connues contre les virus et les levures (Bishop, 1995; Mondello, De Bernardis, Girolamo, Cassone, & Salvatore, 2006).

Tableau 1 : Composition des mélanges étudiés dans le cadre de la prévention des mammites. Les mélanges sont indiqués par leurs codes, « Mam » pour la mammite suivie du numéro correspondant à chaque mélange. Les concentrations de chaque HE sont également indiquées.

	Cannelle	Citron	Girofle	Origan	Sarriette	Tea tree	Thym rouge
Mam1	1/3			1/3		1/3	
Mam2	1/4	1/4			1/4	1/4	
Mam3	1/4	1/4	1/4			1/4	
Mam4				1/3		1/3	1/3
Mam5	1/4		1/4	1/4		1/4	

2.1 Activités anti-radicalaires et antioxydantes

Les activités des mélanges et des HE qui les composent ont été mises en évidence par le test DPPH et le test de blanchiment du β -carotène.

2.1.1 Évaluation de la capacité de piégeage des radicaux libres

Les CI_{50} des HE obtenues pour le test DPPH sont présentées dans la figure 1.

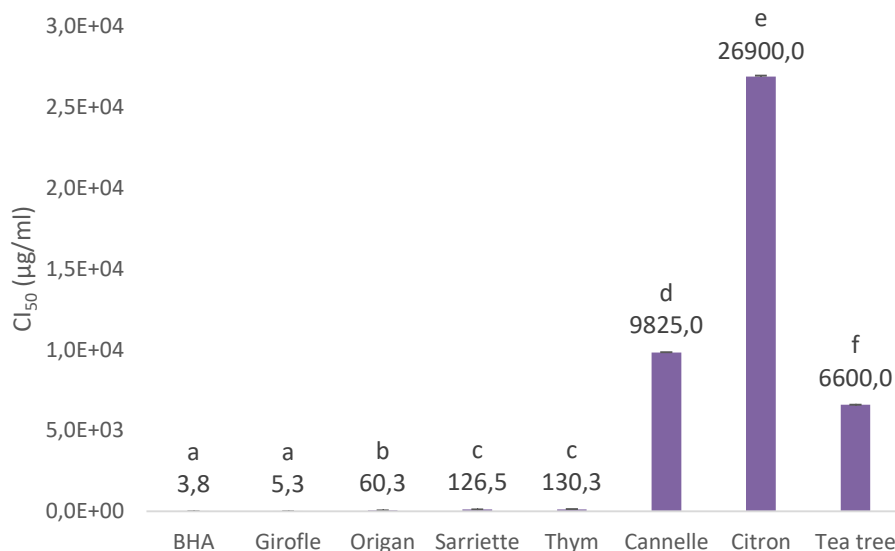


Figure 1 : CI₅₀ observées pour les huiles essentielles dans le cadre du test DPPH. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

L'HE de girofle est la plus active, avec une CI₅₀ de $5,3 \pm 0,1$ µg/ml qui n'est pas significativement différente de la CI₅₀ de l'antioxydant de référence, le BHA ($3,8 \pm 0,3$ µg/ml). À contrario, l'HE de Citron est la moins efficace, avec une CI₅₀ de $26,9 \pm 0,0$ mg/ml. Les résultats obtenus sont en accord avec les résultats de la littérature comme discuté dans le Chapitre 1. L'HE de tea tree, présente uniquement dans les mélanges destinés à la prévention de la mammite, développe une activité faible (CI₅₀ de $6,6 \pm 0,0$ mg/ml). Ces résultats sont comparables avec les données publiées par Kim *et al.* (2004). L'HE de tea tree à hauteur de 10 µl/ml, soit ~9 mg/ml permet en effet d'inhiber de 80% le radical DPPH. La sarriette, qui n'est également présente que dans les mélanges mammites, possède une bonne activité anti-radicalaire avec une CI₅₀ de $126,5 \pm 0,5$ µg/ml. Cette activité est comparable à celle de l'HE de thym, riche en thymol, qui développe une CI₅₀ de $130,3 \pm 0,7$ µg/ml. Par contre, son activité est significativement plus basse que celle de l'origan (CI₅₀ = $60,3 \pm 1,3$ µg/ml), une autre HE riche en carvacrol. Cette baisse d'activité peut être reliée à la part plus faible en carvacrol, qui n'est que de 47,4% dans la sarriette contre 70,7% pour l'origan. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Alinkina *et al.* (2012) où les HE de thym et de sarriette présentent également des CI₅₀ équivalentes (respectivement 245 et 265 µg/ml) et supérieures à celle de l'origan (223 µg/ml).

Le potentiel anti-radicalaire des mélanges mammites a également été évalué et est présenté dans la figure 2. Les résultats sont comparés à la girofle qui est l'HE la plus active avec une CI_{50} de $5,3 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$.

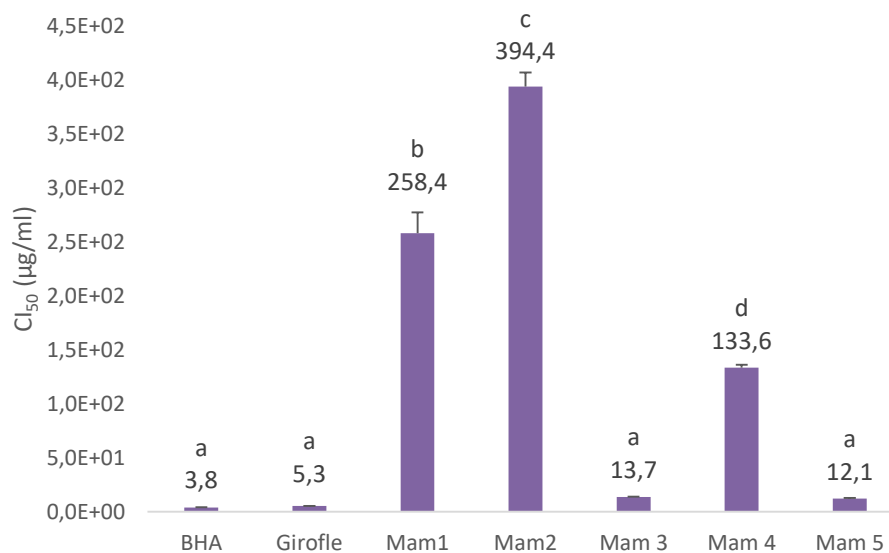


Figure 2 : CI_{50} observées pour les mélanges dans le cadre du test DPPH. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

Les mélanges Mam3 (cannelle, citron, girofle, tea tree) et 5 (cannelle, citron, origan, tea tree) possèdent les plus fortes activités anti-radicalaires en inhibant le DPPH avec des CI_{50} de $13,7 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$ et $12,1 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Ces résultats ne sont pas significativement différents des CI_{50} obtenues pour le BHA et l'HE de girofle. Il est intéressant de noter que ces mélanges sont les seuls à contenir de l'HE de girofle. Les mélanges qui contiennent chacun 1/4 de cette HE conservent donc une activité proche même lorsque des HE très faiblement actives telles que l'HE de cannelle ou de tea tree sont présentes. Par exemple, le mélange Mam3 contient les 3 HE les moins actives (cannelle, tea tree et citron) et son activité n'est portée que par l'HE de girofle. Pour le mélange Mam5, aucune différence significative n'est observée par rapport à Mam3 lorsque l'HE de citron est remplacée par l'HE d'origan ($CI_{50} 60,3 \pm 1,3 \mu\text{g/ml}$). De plus, les CI_{50} des mélanges Mam3 et 5 sont dépendantes de la girofle. Il semblerait donc que l'activité anti-radicalaire de l'HE de girofle soit conservée quelles que soient les autres HE du mélange. L'ajout de cette HE dans les mélanges permet donc de cumuler une activité anti-radicalaire.

2.1.2 Évaluation de la capacité à inhiber l'oxydation d'acides gras

L'activité antioxydante des mélanges a également été évaluée par la méthode de blanchiment du β -carotène. Ce protocole nous informe sur la capacité des mélanges à protéger les acides gras de la peroxydation, en l'occurrence l'acide linoléique. Les pourcentages d'inhibition obtenus pour les mélanges sont présentés dans la figure 3 et comparés aux HE de girofle et de cannelle. Ces deux HE ont été sélectionnées pour représenter les valeurs extrêmes obtenues avec les HE seules.

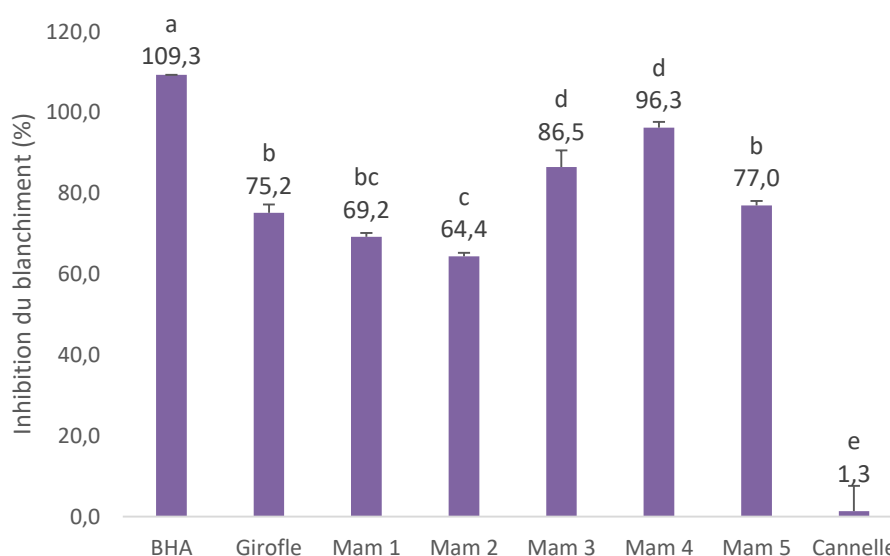


Figure 3 : Pourcentages d'inhibition du blanchiment du β -carotène obtenus pour les mélanges d'HE et l'antioxydant de référence, le BHA, testés à la concentration de 50 μ g/ml. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

Globalement, les mélanges de cette catégorie protègent le β -carotène du blanchiment avec des pourcentages supérieurs à $64,4 \pm 4,1\%$ (Mam2 : cannelle citron sarriette tea tree) malgré la présence d'HE faiblement actives comme l'HE de cannelle ($I(\%) = 1,3 \pm 1,0\%$). Les mélanges Mam3 (cannelle, citron, girofle, tea tree) et Mam4 (origan, tea tree, thym rouge) présentent les inhibitions les plus fortes ($86,5 \pm 1,4\%$ et $96,3 \pm 1,1\%$ respectivement) et significativement supérieures à celle du girofle. En ce qui concerne les mélanges Mam1 (cannelle, origan, tea tree) et Mam2 (inhibition de $69,2 \pm 0,8\%$ et $64,4 \pm 4,1\%$ respectivement), faiblement anti-radicalaires d'après le test DPPH, ils présentent ici des activités comparables aux autres mélanges et à l'HE de girofle.

En comparant les résultats obtenus entre les mélanges Mam2 et Mam3, on peut noter que le remplacement de la sarriette par la girofle dans le mélange Mam3 permet d'augmenter significativement l'activité de 22 %. Ce phénomène a déjà pu être observé lors du test DPPH. Par contre, aucune évolution significative de l'activité n'est observée entre Mam1 et Mam2, bien que Mam1 soit plus riche en origan et de ce fait en carvacrol que Mam2. L'HE de citron n'étant présente que dans le mélange Mam2, la question d'une synergie entre limonène et carvacrol (composés majoritaires respectifs des HE de citron et de sarriette) se pose. Aucune donnée bibliographique sur ce point n'a été recensée.

À l'issue de l'évaluation des activités anti-radicalaires et antioxydantes, le mélange Mam3 se dégage comme étant le plus intéressant selon ces deux critères. L'utilisation de ce mélange permettrait de réduire l'impact des espèces réactives de l'oxygène produites lors de l'inflammation sur les tissus.

2.2 Inhibition de la 15-lipoxygénase

La capacité des HE et des mélanges à inhiber l'activité de la 15-lipoxygénase (15-LOX) a été évaluée par un test *in vitro*. Les CI_{50} des HE constituant les mélanges sont présentées dans la figure 4 face au témoin positif, le NDGA.

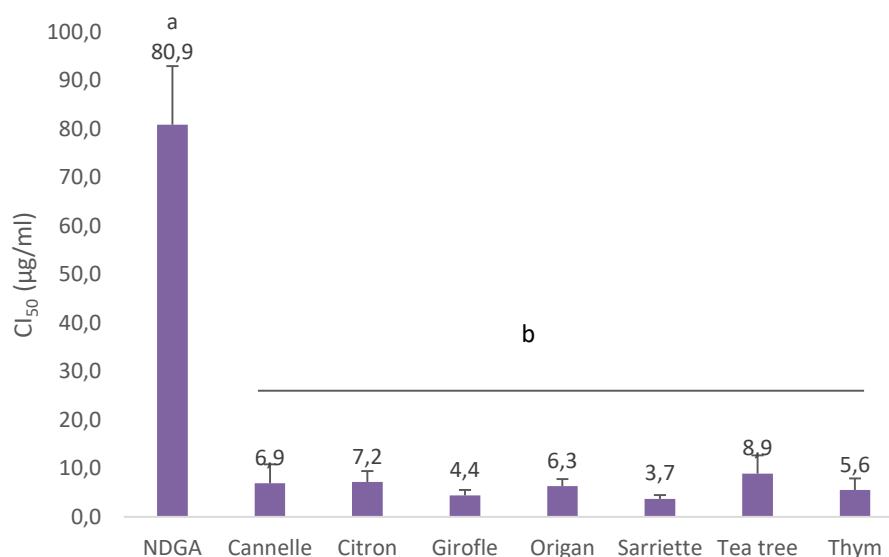


Figure 4 : CI_{50} observées pour les HE dans le cadre de l'inhibition de la 15-lipoxygénase. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

Toutes les HE utilisées dans cette partie présentent des CI_{50} significativement inférieures à celle du NDGA, qui est de $80,9 \pm 12 \mu\text{g/ml}$. Les HE présentent des activités équivalentes et comparables aux données de la bibliographie présentées dans le chapitre 1. L'HE de tea tree présente uniquement dans les mélanges mammites, possède l'activité la plus faible avec une CI_{50} de $8,9 \pm 3,8 \mu\text{g/ml}$. Ce résultat peut être comparé à celui obtenu par Tsai *et al.* (2011) où l'HE de tea tree, utilisée comme témoin, développe une CI_{50} de $0,06 \pm 0,00 \mu\text{g/ml}$. Dans cet article, le tea tree développe une activité plus forte, mais l'activité est évaluée par un kit commercial dont la concentration finale en enzyme n'est pas précisée. La différence de valeur observée peut donc être attribuée à des variations dans le protocole expérimental. L'HE de sarriette développe ici l'activité la plus forte avec une CI_{50} de $3,7 \pm 0,7 \mu\text{g/ml}$. Aucune donnée liée à l'inhibition de la 15-LOX par cette HE n'est disponible, mais son activité peut être liée à la présence de carvacrol comme composé majoritaire. Ce composé a été identifié comme inhibiteur de la cyclooxygénase 2 (COX2) avec une CI_{50} de $120 \mu\text{g/ml}$ (Miguel, 2010). Cette enzyme est également impliquée dans les processus inflammatoires et fonctionne selon un mécanisme équivalent à la lipoxygénase.

Les activités anti-lipoxygénase des mélanges mammites sont présentées ci-dessous, dans la figure 5. Leurs CI_{50} sont comparées à celle de la sarriette, qui présentait la meilleure activité.

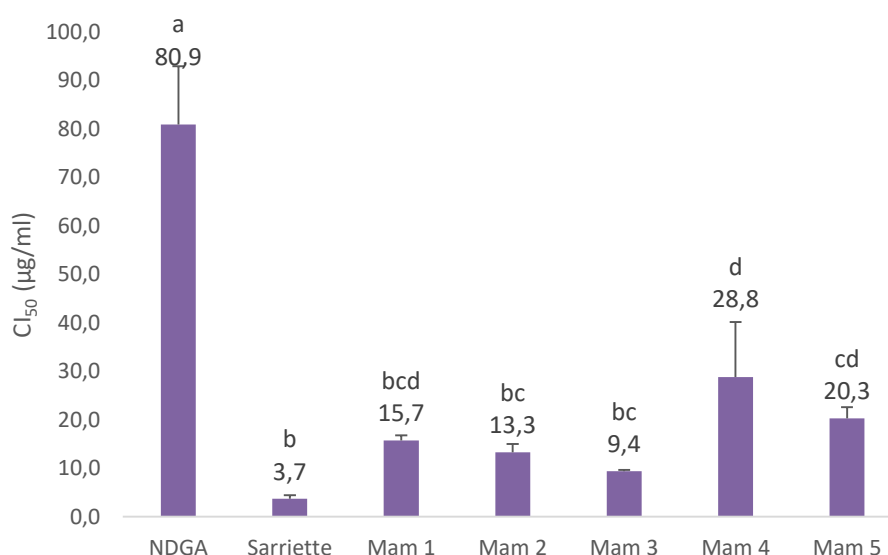


Figure 5 : CI_{50} en $\mu\text{g/ml}$ observées pour les mélanges dans le cadre de l'inhibition de la 15-lipoxygénase. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

Comme dans le cas des HE, les CI_{50} des mélanges sont significativement inférieures à celle du NDGA, l'inhibiteur synthétique de référence et ceux-ci présentent une forte activité inhibitrice. Les valeurs obtenues sont comprises entre $9,4 \pm 0,3$ $\mu\text{g/ml}$ pour le mélange Mam3 (cannelle, citron, girofle, tea tree) et $28,8 \pm 11,4$ $\mu\text{g/ml}$ pour le mélange Mam4. Le mélange Mam3 possède une activité équivalente à celle de la sarriette, tout comme les mélanges Mam1 ($15,7 \pm 1,0$ $\mu\text{g/ml}$) et Mam2 ($13,3 \pm 1,7$ $\mu\text{g/ml}$). Cette fois-ci, le remplacement de la sarriette par le girofle entre les mélanges Mam2 et Mam3 n'implique pas de différence significative. Cela peut s'expliquer par l'absence de différence significative entre les activités des deux HE (figure 4).

Dans le cadre de l'inhibition de la 15-LOX, la réalisation des mélanges n'engendre pas de perte significative d'activité par rapport à l'HE de référence pour les mélanges Mam1, 2 et 3. Le mélange Mam3 présente la plus forte activité et cumule donc les activités anti-radicalaires, antioxydantes et anti-inflammatoires. Ce mélange permettrait donc non seulement d'éviter les effets délétères liés à l'inflammation mais également de réduire les états d'inflammations persistantes liées à la pathologie.

2.3 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB)

Les activités antibactériennes des HE composant les mélanges ont été évaluées sur les bactéries affiliées à la mammite. *Escherichia coli* est ici la seule représentante des bactéries de type Gram-, *Staphylococcus aureus* et les *Streptococcus agalactiae*, *dysgalactiae* et *uberis* étant Gram+. Les HE ont été testées à des concentrations ≤ 5 mg/ml et les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) ont été déterminées.

Tableau 2 Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des huiles essentielles testées sur les bactéries impliquées dans la mammite, exprimées en mg/ml. Les numéros représentent les différents prélèvements appartenant à une même souche mais provenant d'isolements différents, comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes. «-» indique que l'HE est directement bactéricide dans ces conditions. L'indication « >5,0 » signifie que l'HE ne présente pas d'activité aux concentrations testées

		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>			<i>S. agalactiae</i>			<i>S. dysgalactiae</i>			<i>S. uberis</i>
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Cannelle	CMI	-	-	0,50	0,50	-	-	0,50	-	0,25	-	-
	CMB	1,25	1,25	1,25	2,50	0,05	0,25	2,50	0,25	5,00	0,25	0,50
Citron	CMI	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
	CMB	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
Girofle	CMI	>5,0	5,00	2,50	2,50	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
	CMB	>5,0	>5,0	5,00	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
Origan	CMI	-	5,00	-	0,50	0,12	-	0,25	-	-	-	-
	CMB	0,50	>5,0	1,25	2,50	0,50	0,50	0,50	0,25	0,12	0,12	0,25
Sarriette	CMI	-	5,00	-	1,25	0,50	0,50	0,50	0,25	0,25	-	-
	CMB	1,25	>5,0	1,25	5,00	1,25	1,25	1,25	0,50	0,50	0,25	0,50
Tea tree	CMI	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	2,50	-	-	0,50	-	-	-
	CMB	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0	5,00	5,00	5,00	2,50	1,25	2,50	5,00
Thym	CMI	-	5,00	1,25	1,25	-	0,50	-	-	-	-	-
	CMB	1,25	>5,0	2,50	>5,0	0,50	1,25	0,50	0,25	0,25	0,25	0,50

Les données regroupées dans le tableau 2 montrent que les bactéries sont sensibles aux HE. L'HE de citron ne présente pas d'activité à des concentrations inférieures à 5 mg/ml. Ce résultat est cohérent avec les données de la bibliographie. En effet les terpènes comme le limonène, composé majoritaire de l'HE de citron, sont reconnus pour leur faible activité antimicrobienne (Nazzaro, Fratianni, De Martino, Coppola, & De Feo, 2013). Il semble également que les bactéries *E. coli* et *S. aureus* soient moins sensibles aux HE en général que les streptocoques, les CMB étant régulièrement supérieures à 1 mg/ml. Visiblement, la composition de la paroi n'entre pas en jeu ici, puisque les deux types de Gram sont représentés. Ces bactéries étant connues pour leur capacité de résistance aux antibiotiques, d'autres mécanismes comme la présence de pompes à efflux pourraient permettre d'accroître leur tolérance aux HE (Nikaido, 2009).

Suite à ce premier constat il est intéressant de noter que l'HE de girofle, dont le composé majoritaire est l'eugénol, n'est active que sur les souches de *S. aureus*. D'après la revue de Nazzaro *et al.*, (2013), l'eugénol est reconnu pour avoir une bonne activité antibactérienne, semblable à celle d'autres phénylpropènes, tels que l'isoeugénol et le cinnamaldehyde. Cette même revue indique même que l'effet est plus important sur les bactéries de type Gram - que sur les bactéries Gram + (Nazzaro *et al.*, 2013). Cette affirmation s'oppose au résultat observé ici. Toutefois, au cours de travaux portant sur l'activité antibactérienne d'HE, l'équipe de Murbach Teles Andrade *et al.* (2014) a également mis en évidence une activité plus forte de l'eugénol sur *S. aureus* (CMI_{90%} = 1,21 mg/ml) que sur *E. coli* (CMI_{90%} = 2,00 mg/ml). A l'inverse, l'HE de tea tree ne présente une activité que sur les streptocoques. Ces résultats sont en opposition avec ceux de l'étude réalisée par Murbach Teles Andrade *et al.* (2014), dans laquelle l'HE de tea tree présentait une forte activité sur *S. aureus* (CMI_{90%} = 0,21 mg/ml).

Les HE de cannelle, d'origan, de sarriette et de thym, présentent quant à elles des activités sur l'ensemble des bactéries. Ces HE ont pour composés majoritaires le cinnamaldehyde, le carvacrol (origan et sarriette) et le thymol, reconnus pour leurs activités antibactériennes. Des travaux menés par Ananda Baskaran *et al.* (2009) ont également montré l'activité de ces trois composés sur les mêmes bactéries. Le *trans*-cinnamaldehyde développait les meilleures activités antibactériennes, avec une CMI de 1 mg/ml et une CMB de 4,5 mg/ml sur *E. coli*, *S. aureus* et *S. uberis* et une CMI de 0,5 mg/ml et une CMB de 4,0 mg/ml sur *S. agalactiae* et *S. dysgalactiae*. Ce composé est connu pour avoir trois actions possibles sur les bactéries selon sa concentration : à faible concentration il interagit avec différents effecteurs cellulaires, notamment les enzymes impliquées dans l'interaction avec les cytokines ; à plus forte dose, il devient un inhibiteur des ATPases ; et à concentration létale, il perturbe l'intégrité de la membrane (Nazzaro *et al.*, 2013). L'activité du thymol et du carvacrol, est due à la présence de la fonction hydroxyle et d'électrons délocalisés, impliquant des altérations de la membrane (inhibition de la perméabilité à l'ATP et relargage de LPS) (Nazzaro *et al.*, 2013).

Suite à ces résultats, les mélanges ont été construits de manière à contenir au moins une de ces 4 HE. Les activités antibactériennes des mélanges sont présentées dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des mélanges testés sur les bactéries impliquées dans la mammite, exprimées en mg/ml. Les numéros représentent les différents prélèvements appartenant à une même souche mais provenant d'isolements différents, comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes. «-» indique que l'HE est directement bactéricide dans ces conditions. L'indication « >5,0 » signifie que l'HE ne présente pas d'activité aux concentrations testées.

		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>			<i>S. agalactiae</i>			<i>S. dysgalactiae</i>			<i>S. uberis</i>
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Mam1	CMI	-	1,25	-	-	0,50	0,50	0,25	0,12	0,12	0,12	-
	CMB	0,12	2,50	1,25	1,25	1,25	1,25	0,50	0,50	0,50	0,25	2,50
Mam2	CMI	2,50	-	-	-	0,50	0,50	0,25	0,12	0,12	-	-
	CMB	5,00	2,50	2,50	2,50	1,25	1,25	0,50	5,00	1,25	0,25	5,00
Mam3	CMI	-	-	-	-	0,50	0,50	0,25	0,12	0,12	-	-
	CMB	5,00	2,50	2,50	2,50	1,25	1,25	0,50	0,50	0,50	0,12	5,00
Mam4	CMI	1,25	-	-	2,50	0,50	-	0,50	0,12	0,12	0,25	>5,0
	CMB	2,50	5,00	5,00	5,00	1,25	1,25	1,25	0,50	0,50	0,50	>5,0
Mam5	CMI	-	1,25	1,25	1,25	-	-	-	-	0,50	0,25	1,25
	CMB	1,25	2,50	2,50	2,50	1,25	1,25	1,25	0,50	1,25	0,50	2,50

Les mélanges présentent des activités sur l'ensemble des souches affiliées à la mammite. La construction des mélanges, incluant au moins une HE active permet donc de conserver une activité même si l'HE qui la porte est diluée dans le mélange. Seul le mélange Mam4 ne présente pas d'activité sur *S. uberis*.

Les activités obtenues sur les trois streptocoques sont globalement équivalentes d'un mélange à l'autre, avec des concentrations bactéricides comprises entre 0,12 et 1,25 mg/ml. Le mélange Mam1 (composé de cannelle, origan et tea tree) est toutefois actif à des concentrations plus faibles sur *E. coli* et *S. aureus*. La concentration de 0,12 mg/ml est directement bactéricide sur *E. coli*. Le mélange est également bactéricide sur *S. aureus* 2 et 3 dès 1,25 mg/ml. Cette activité sur des bactéries qui se sont présentées auparavant comme plus résistantes aux HE, peut être imputée à la combinaison de cannelle et d'origan (CMB = 1,25 et 0,50 mg/ml respectivement sur *E. coli* et CMB = 2,50 mg/ml sur *S. aureus* 3 pour les deux HE). Les concentrations actives sont abaissées dans le mélange par rapport aux HE seules prises séparément. Ces deux HE sont par ailleurs également présentes en combinaison dans le mélange Mam5, mais en proportions plus faibles, impliquant également une moins bonne activité.

Si l'effet de synergie ne peut pas être confirmé ici, il est possible de supposer que la multiplication de cibles différentes permet d'abaisser la concentration toxique. D'autres essais de combinaisons entre le cinnamaldehyde et le carvacrol sur *E. coli*, ont permis d'observer un abaissement de la CMI de 400 mg/l pour les HE seules à 200 mg/l pour la combinaison. Toutefois, ce résultat a été imputé à un effet additif et non à une synergie (Pei, Zhou, Ji, & Xu, 2009). Ce résultat va dans le sens de l'hypothèse du cumul de cibles.

Le mélange Mam1 s'illustre à l'issue de cette étape de recherche d'activités antibactériennes. Il est en effet actif sur l'ensemble des bactéries utilisées dans cette partie à de faibles concentrations, grâce à la combinaison de cannelle et d'origan. Ce mélange possède également de bonnes activités antioxydantes et anti-inflammatoires, ce qui en fait donc un bon candidat potentiel. Le mélange Mam3, en première position jusqu'ici, présente également des activités antibactériennes sur l'ensemble des souches utilisées pour cette évaluation, mais nécessite des concentrations plus importantes pour inhiber des pathogènes récurrents tels que *E. coli* et *S. aureus*.

2.4 Inhibition des biofilms de *S. agalactiae* et *S. uberis*

Les activités du mélange Mam1 et des HE de cannelle, d'origan et de tea tree qui le composent sur les biofilms de *S. agalactiae* et *S. uberis* ont ensuite été évaluées à des concentrations inférieures à la CMI ou la CMB le cas échéant. *S. dysgalactiae* a été retirée de cet essai car le biofilm formé n'était pas suffisamment résistant aux lavages pour pouvoir être quantifié d'après notre méthode. Ces deux bactéries ont été sélectionnées en raison du faible nombre de données bibliographiques recensées, notamment pour *S. agalactiae* : les biofilms de ces deux bactéries sont très peu étudiés et les effets des HE sur leur formation ne l'ont pas été. Les activités des HE sur les biofilms de *E. coli* et *S. aureus* sont par contre relativement bien renseignées.

Dans un premier temps, la capacité des bactéries disponibles à former des biofilms a été étudiée, en microplaque. À l'issue de cette étape, les bactéries *S. agalactiae* 2, et *S. uberis* ont été conservées pour la suite. Les résultats obtenus pour les HE de cannelle, d'origan et de tea tree, ainsi que leurs composés majoritaires sont présentés sous la forme d'une publication soumise dans le « Journal of dairy science ».

2.4.1 Activités antibiofilm des HE de cannelle, d'origan et de tea tree

Antioxidant and anti-inflammatory essential oils also inhibit mastitis pathogens and their biofilms.

Lang Marie^{a1}, Ollivier Valentin^a, Duteil Emmanuel^b, Bazire Alexis^a, Bedoux Gilles^a

^a Université de Bretagne-Sud, EA 3884, LBCM, IUEM, F-56100 Lorient, France.

^b, BioArmor S.A., Z.I de la Gare, F- 22940 Plaintel, France.

¹Corresponding author:

Lang Marie

Université de Bretagne-Sud - Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines

Centre de Recherche Yves Coppens - Campus de Tohannic - BP 573

56017 Vannes Cedex, France

marie.lang@univ-ubs.fr

Phone: (+33) 02 97 01 71 22

Abstract

Essential oils (EO) are natural extracts with high added value, used in many areas such as veterinary medicine and livestock nutrition. EOs from cinnamon, oregano and tea tree are evaluated here for their potential preventive application in the context of mastitis.

As a first step, their anti-radical and anti-inflammatory activities are evaluated *in vitro* using DPPH· scavenging assay and 15-lipoxygenase (15-LOX) inhibition assay. Oregano EO provided the best scavenging activity, inhibiting DPPH free radical with an IC₅₀ of 60.3 ± 0.3 µg/ml. The EOs also possess consistent anti-inflammatory activities, inhibiting the 15-LOX enzyme with IC₅₀ ranging from 6.3 ± 1.4 µg/ml to 8.9 ± 3.8 µg/ml. These activities have been associated to the presence of active compound namely carvacrol, cinnamaldehyde and terpinen-4-ol.

As mastitis depends on the presence of pathogenic bacteria on the mammary gland, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* isolated from infected cows were used to challenge the EOs. Minimal inhibitory and bacterial concentrations (MIC - MBC) were established using a broth microdilution assay. Cinnamon and oregano EOs provided the lowest active concentrations on all the strains, and especially *S. dysgalactiae* (MBC = 0.25 ± 0.00 mg/ml). As it is obvious that biofilm formation plays a key role in the development of mastitis, we also established the anti-biofilm potential of the EOs on *S. agalactiae* and *S. uberis*. According to these *in vitro* assays, these EOs alone or in combination could be good candidates for the prevention of bovine mastitis.

Keywords: essential oil blend, antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, anti-biofilm.

Introduction

Bovine mastitis (BM) is currently one of the most worrisome and costliest disease affecting dairy cows (Bradley, 2002). The inflammation of the mammary gland causes a drastic milk loss, milk withholding after treatment, and for the most severe infections, animal culling or death. Repeated mastitis also affects fertility and is the first cause of death in adult cows (Oviedo-Boyso et al., 2007; McDougall et al., 2009). It is accepted that BM arises from a physiologic or metabolic change, a trauma or a microbiological infection, and combinations thereof (Oviedo-Boyso et al., 2007). Contamination may be from environmental or contagious origin, due to opportunistic and pathogenic bacteria. Environmental mastitis generally implies *Streptococcus uberis* or enteric bacteria like *Escherichia coli* (Bradley, 2002). These bacteria are not adapted to the mammary gland and are rapidly eradicated by the immune system. In case of mastitis with contagious origin, the implicated pathogenic organisms (mycoplasma, yeasts, bacteria...) are adapted to the environment of mammary gland and are able to settle durably on the epithelium, and affect mammary gland immunity by impairing defense mechanisms (Oviedo-Boyso et al., 2007). Bacteria generally identified in contagious mastitis are *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus agalactiae* (Bradley, 2002; Oviedo-Boyso et al., 2007; McDougall et al., 2009). The pathogens *E. coli* and *S. aureus* are well known for their ability to develop bacterial biofilm during the bovine mastitis (Oliveira et al., 2006). Biofilm consists in a community of cells embedded in a matrix rich in exoproducts. The formation of these multispecies communities and their development is governed by many signals like quorum sensing and it allows the exchange of nutrients and genetic information (Filloux and Vallet, 2003). The extracellular matrix increases the resistance of bacteria to external mechanical or chemical aggressions. It also reduces the diffusion of molecules such as antibiotics, which makes it difficult to eliminate (Oliveira et al., 2006). In fact, bacteria at the surface are affected but those at the base of the biofilm remain infectious. This form of life also allows pathogenic bacteria to escape the immune system and has been associated to chronic mastitis (Melchior et al., 2006).

Essential oils (EOs) are plant extracts developing several biological properties like antioxidant and anti-inflammatory, antimicrobial and also analgesic activities (Bakkali et al., 2008). They are used in alternative medicine and their use as preventive feed supplement is rising. Recently, our group has shown that *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 adhesion was inhibited by an EO blend composed

of *Allium sativum*, *Cinnamomum cassia* and *Mentha piperita*. Its biofilm was strongly affected from a 0.1% blend concentration and was totally eradicated when the concentration reached 1% (Lang et al., 2016).

As BM results in an important inflammatory burst, inducing the production of deleterious free radicals and reactive oxygen species (ROS) (Sordillo et al., 1997), the free radical scavenging abilities of EOs are established here using the DPPH scavenging assay. Their anti-inflammatory potential is also assessed *in vitro* using a 15-lipoxygenase (15-LOX) inhibition assay.

The control of bacterial development is central to the prevention of mastitis. Therefore, the bactericidal and bacteriostatic activities of EOs have been established here on three pathogenic bacteria isolated from mastitis, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*.

Since it now seems obvious that bacterial biofilms are involved in the severity and recurrence of mastitis (Melchior et al., 2006; Gomes et al., 2016), the anti-biofilm activity of the EOs has also been evaluated on *S. agalactiae* and *S. uberis* using a colorimetric method. According to our knowledge this is the first time that essential oils are tested on the biofilms of these bacteria isolated from bovine mastitis.

Material and Methods

1 Plant extracts

Essential oils (EOs) of cinnamon (*Cinnamomum cassia* J. Presl, 1825), oregano (*Origanum vulgare* L., 1753) and tea tree (*Melaleuca alternifolia* Cheel, 1924) were purchased from BioArmor S.A. (Plaintel, France). Cinnamon EO (CEO) was distilled from leaves and branches, oregano EO (OEO) was obtained from the whole plant and Tea tree EO (TEO) was obtained from leaves. All the EOs were extracted by a steam distillation. During process, EOs were stored in the dark at room temperature. Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) reports detail the major constituents and were joined with each EO. *Trans*-cinnamaldehyde was the main compound of CEO, with a concentration of 79.98%. In OEO, carvacrol was the main constituent, reaching a concentration of 70.72%. Terpinen-4-ol was the main compound found in TEO, reaching a

concentration of 41.51%. These three compounds were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA).

Simulsol® (Seppic SA, Paris, France) a commercial emulsifier, was used for EOs solubilisation in aqueous media. A 10% (m/v) solution was realized in distilled water and filter sterilized using a 0.2 µm syringe filter (Corning™, NY, USA). This solution was added to the media in order to reach equivalent volumes of pure Simulsol® and EOs.

2 Bacteria and culture conditions

Streptococcus agalactiae, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* were provided by the Laboceca laboratory (Ploufragan, France) and were isolated from cows suffering from mastitis. Bacteria were grown aerobically in Brain Heart Infusion medium (BHI, Conda™, Madrid, Spain) at 37°C and stored at -80°C in a 20% (v/v) glycerol solution. Before each experimentation, 10 ml pre-cultures were realised from stock solution and grown overnight under an orbital shake (90 RPM) at 37 °C.

3 Free radical scavenging activity on DPPH

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) is used here as a source of free radicals. In solution, DPPH radical has a purple colour absorbing at 517 nm and turning to yellow when neutralised. Protocol presented by Bedoux et al. (2011) was used here with some modifications. Dilutions of EOs were prepared in methanol and tested in a range of final concentration framing the IC₅₀ (concentration allowing 50% scavenging of DPPH·). Five serial dilutions were realised for each tested product. Butylated hydroxy anisole (BHA, Thermo Fisher Scientific) was used as positive control and tested in concentrations ranging from 1 to 12.5 µg/ml. Wells consisting in 100 µl of pure methanol were used as negative control. The wells of a microplate were filled with 100 µl of each dilution and completed with 100 µl of a 0.25 mM DPPH· methanolic solution (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Wells consisting in 100 µl of pure methanol and 100µl of DPPH solution were used as negative control. The blank was realised on wells containing 200 µl of methanol.

After 30 minutes of incubation at 40°C, absorbance of the wells was read at a wavelength of 517 nm using a Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham,

MA, USA). The percentage of inhibition (I%) was then calculated for each concentration using the equation below:

$$I(\%) = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{assay}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

where A_{control} is the absorbance of the negative control well after blank subtraction and A_{assay} the absorbance obtained with antioxidant after blank subtraction. The IC_{50} was then calculated using linear regression. Three replicates were realised for each tested product

4 Inhibition of 15-lipoxygenase

Anti-inflammatory potential of EOs has been evaluated using a 15-LOX inhibition assay. Five ethanolic dilutions of EOs were prepared in order to frame the IC_{50} (concentration leading to 50% inhibition of enzymatic activity when compared to control). Nordihydroguaiaretic acid (NDGA, Sigma Aldrich) was used as positive control and tested at final concentrations ranging from 50 to 500 μM . Reaction was realized in a quartz microplate (Thermo Fisher Scientific), to avoid background absorbance in UV. 15- lipoxygenase from glycine max (Sigma Aldrich) was used here and diluted in borate buffer (0.2 M pH 9) at a concentration of 280 U/ml. 180 μl of this suspension were dispensed in the wells and mixed with 10 μl of inhibitors. Negative control was realised using 10 μl of ethanol, corresponding to 100% of enzymatic activity. Reaction was then initiated by adding 10 μl of 1 mM linoleic acid (Sigma Aldrich) in an ethanol:water (1:10) solution as a substrate. Absorbance were measured immediately ($t=0$) and after 10 min, at 234 nm. The microplate was incubated at 25°C between each measurement. For each inhibitor, final absorbance was corrected by subtracting absorbance at $t=0$ (ΔA). Inhibition (I%) of enzymatic activities were calculated using the equation

$$I(\%) = \left(\frac{\Delta A_{100\% \text{ control}} - \Delta A_{\text{inhibitor}}}{\Delta A_{100\% \text{ control}}} \right) \times 100$$

where $\Delta A_{100\% \text{ control}}$ is ΔA obtained for the negative control, and $\Delta A_{\text{inhibitor}}$ is the ΔA obtained for each concentration of inhibitor. IC_{50} was then determined using linear regression.

5 Determination of Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimal Bactericidal Concentrations (MBC)

Antibacterial activities were measured using a broth dilution method in microplates, adapted from Lang et al., (2016). Essential oils were diluted in BHI using Simulsol®, in a range of 5 mg/ml to 0.05 mg/ml. An amount of 195 µl from each dilution was placed in the wells of a flat bottomed 96 well microplate. Wells were then inoculated with 5 µl of bacterial suspension previously diluted at an absorbance of 0.5 at 600 nm (Shimadzu UV-1800 spectrophotometer Shimadzu Europa GmBh, Duisburg, Germany). Negative control wells consisting in 195 µl of pure BHI were also inoculated. Microplates were then incubated for 24 h at 37 °C without agitation. After cell growth, a tetrazolium salt (MTT, Sigma Aldrich) solution in DMSO (Fisher, France) was added to each well at a final concentration of 90 µg.ml⁻¹ for 60 min. This allowed viable microorganisms to metabolize the yellow MTT into purple formazan crystals. An aliquot of each well which did not present a formazan production was then spread on BHI agar plates and incubated for 24 h at 37 °C. MIC and MBC were determined as the lower concentrations leading respectively to growth or absence of growth after spreading. Three replicates were carried out for each sample.

6 Inhibition of biofilm formation using MTT assay

MTT assay is a rapid method for the observation of biofilm inhibition, and has been adapted from the protocol presented by Trafny et al. (2013). EO blend was tested at sub-MIC concentrations using 4 two-fold serial dilution. Dilutions were realized in the wells of a microplate in order to reach a final volume of 100 µl. BHI medium without inhibitor was used as a negative control. The solutions were then inoculated using 100 µl of a bacterial suspension adjusted to an absorbance of 0.2 at 600 nm. Wells without bacterial inoculation and containing 200 µl of BHI were used to control the final washing steps. After 24 h incubation at 37°C, 20 µL of an MTT solution (2.5 mg/ml in BHI) were added for 1 h in order to color the biofilm. The supernatant was then carefully removed and the wells were rinsed twice with sterilized physiological serum (SPS, 0.9% NaCl) in order to eliminate planktonic cells. Formazan contained in the metabolic active bacteria was then solubilised with 200 µL of DMSO (Fischer, France) and the absorbance was read at 540 nm with a Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Each test was conducted in triplicate.

Results and discussion

1 DPPH scavenging assay

According to the DPPH scavenging assay (see table 1), EOs provided antioxidant activities that were significantly lower to the chemical reference BHA ($IC_{50} = 3.8 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$). Values of IC_{50} ranged between $60.3 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$ for oregano (OEO) and $9.8 \times 10^3 \pm 0.0 \mu\text{g/ml}$ for Cinnamon (CEO). The best activity was shown by OEO ($60.3 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$), whose main compound is carvacrol. Antioxidant activity of carvacrol rich EOs like oregano or savory, has already been assessed by Alinkina et al. (2012). IC_{50} was established for these EOs using DPPH scavenging assay were respectively 223 and 262 $\mu\text{g/ml}$, a result in agreement with our data. The antioxidant capacity can be affected by high content of carvacrol, a phenolic compound that allows a fast electron transfer to DPPH radical. Scavenging ability of pure carvacrol was also established by Mastelić et al. (2008) with an IC_{50} of 267 $\mu\text{g/ml}$. The scavenging activity observed for tea tree (TEO) ($IC_{50} = 6.6 \pm 0.0 \text{ mg/ml}$) is in agreement with the result obtained by Kim et al., (2004) which was an inhibition by 80% by using ~9 mg/ml of TEO. Concerning CEO, its low scavenging potency was also found by Olszowy and Dawidowicz (2016) with an IC_{50} of $9.38 \pm 0.47 \text{ mg/ml}$.

Table 1: IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) of EOs in DPPH scavenging assay and 15-lipoxygenase inhibition assay.

In each assay, compounds are tested against a reference, BHA in DPPH assay and NDGA in 15-LOX inhibition. Values are means \pm SD (n=3). Samples with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

	Reference	CEO	OEO	TEO
DPPH scavenging	3.8 ± 0.3^a	$9.8 \times 10^3 \pm 0.0^c$	60.3 ± 0.3^d	$6.6 \times 10^3 \pm 0.0^e$
15-LOX inhibition	80.9 ± 12.0^a	6.9 ± 3.8^b	6.3 ± 1.4^b	8.9 ± 3.8^b

2 Anti-inflammatory activity of essential oils

The 15-LOX inhibition assay informs about the potential anti-inflammatory activity of EOs. According to results recorded in table 1, EOs provided significantly higher activities than the

reference compound NDGA. IC₅₀ for the EOs are not significantly different and ranged between $6.3 \pm 1.4 \mu\text{g/ml}$ for OEO and $8.9 \pm 3.8 \mu\text{g/ml}$ for TEO. During inflammatory processes, arachidonic acids are released from cell membranes by phospholipase A2 and are metabolised by cyclooxygenases and lipoxygenase into leukotrienes (Miguel, 2010). This process involves oxidative reactions that are reduced by EOs. Interestingly, the three EOs provided good anti-lipoxygenase activity even when DPPH scavenging was low. Many essential oils are able to provide such activities, as described by Wei & Shibamoto (2010). According to their results, thyme, ylang ylang and bergamot EOs provided about 80% of enzymatic inhibition at a concentration of $0.5 \mu\text{g/ml}$. When tested by Tsai et al. (2011), TEO developed an IC₅₀ of $0.06 \pm 0.00 \mu\text{g/ml}$. The discrepancy between these results can be attributed to the concentration of enzyme used.

3 Antibacterial activity of EOB and essential oils

Minimal inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC) were established for three major mastitis pathogens that are *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*.

Table 2: Minimal inhibitory and bactericidal concentrations of essential oils on *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* and *S. uberis* (MIC and MBC in mg/ml). Values are means \pm SD (n=3). Absence of value means that sample is directly bactericidal.

		<i>S. agalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. uberis</i>
CEO	MIC	-	-	-
	MBC	0.25 ± 0.00	0.25 ± 0.00	0.50 ± 0.00
OEO	MIC	-	-	-
	MBC	0.50 ± 0.00	0.25 ± 0.00	0.25 ± 0.00
TEO	MIC	-	0.50 ± 0.00	-
	MBC	5.00 ± 0.00	2.50 ± 0.00	5.00 ± 0.00

Samples were tested using a broth microdilution assay and results are presented in table 2. CEO and OEO exhibited the best activities for all strains, with MBCs ranging from 0.25 ± 0.00 mg/ml to 0.50 ± 0.00 mg/ml. For TEO, higher concentrations ranging from 2.5 ± 0.00 mg/ml to 5.00 ± 0.00 mg/ml were necessary to observe bactericidal activities. This EO is rich in terpinen-4-ol, a compound that implies a loss in membrane integrity, lysis of cells and also an inhibition of cellular respiration (Murbach Teles Andrade et al., 2014). CEO and OEO are respectively rich in cinnamaldehyde and carvacrol, two compounds known for their antibacterial properties. These two pure compounds have otherwise been tested on *Streptococcus agalactiae*, *dysgalactiae* and *uberis* by Ananda Baskaran et al. (2009). MBC ranged from 4.0 to 4.5 mg/ml using *trans*-cinnamaldehyde and 8.0 to 2.0 mg/ml using carvacrol. Bactericidal activities of essential oils are established for a long time and are linked to their liposolubility. Cinnamaldehyde for instance, is able to inhibit the activity of membrane ATPases at low concentrations and to damage the bacterial cell wall at lethal concentrations (Nazzaro et al., 2013). Potential activity of carvacrol is due to the presence of an hydroxyl function, which also implies damages to the cell walls, inhibiting their permeability to ATP and leading to a release of lipopolysaccharides (LPS) (Nazzaro et al., 2013).

4 Anti-biofilm activity of essential oils

Figure 1: Inhibition of biofilm formation (%) evaluated by an MTT assay on *S. agalactiae* using sub-inhibitory concentrations ($\mu\text{g/ml}$) of (A) CEO and cinnamaldehyde (B) OEO and carvacrol (C) TEO and terpinen-4-ol. Values are means \pm SD (n=6). (*) Samples are significantly different from the control biofilm ($P<0.05$). (#) Samples are significantly different from the inhibition due to simulsol at the same concentration ($P<0.05$).

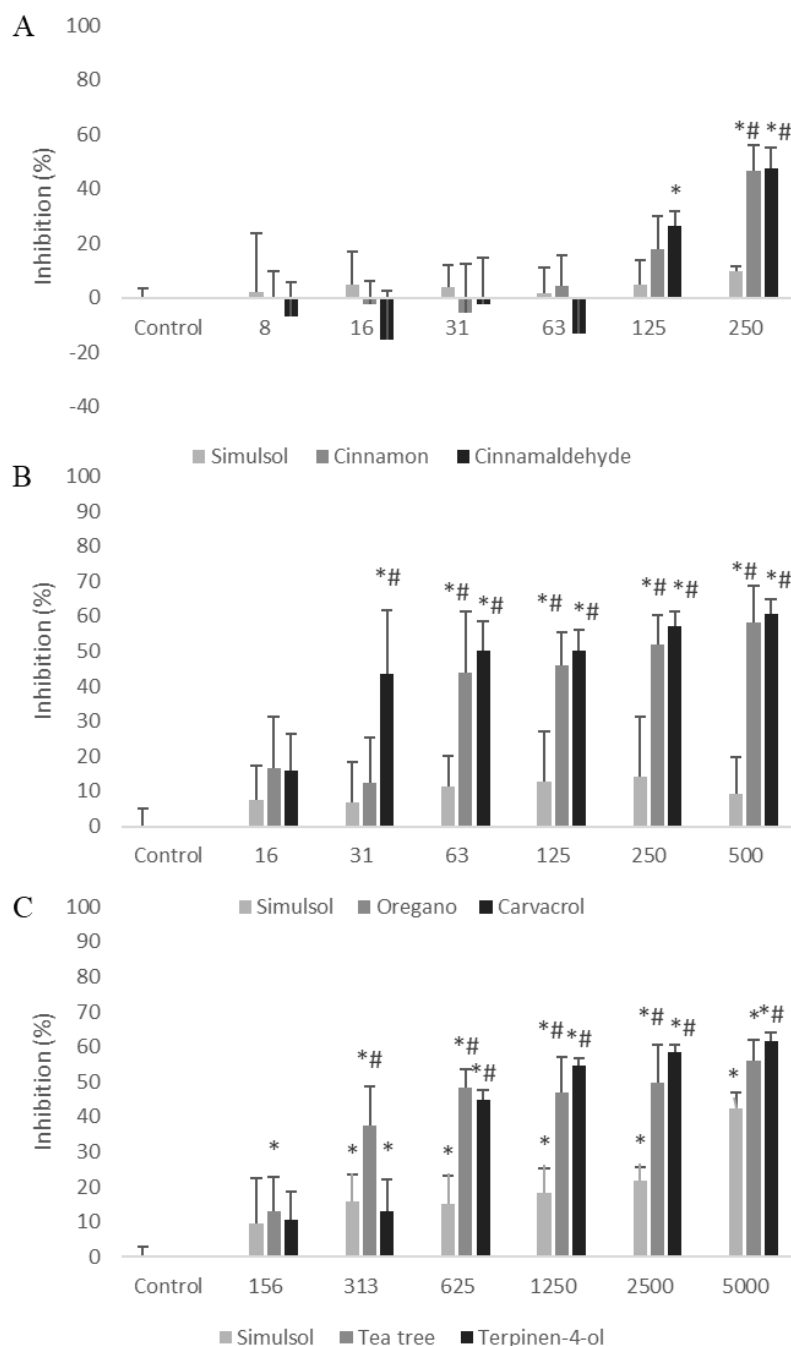
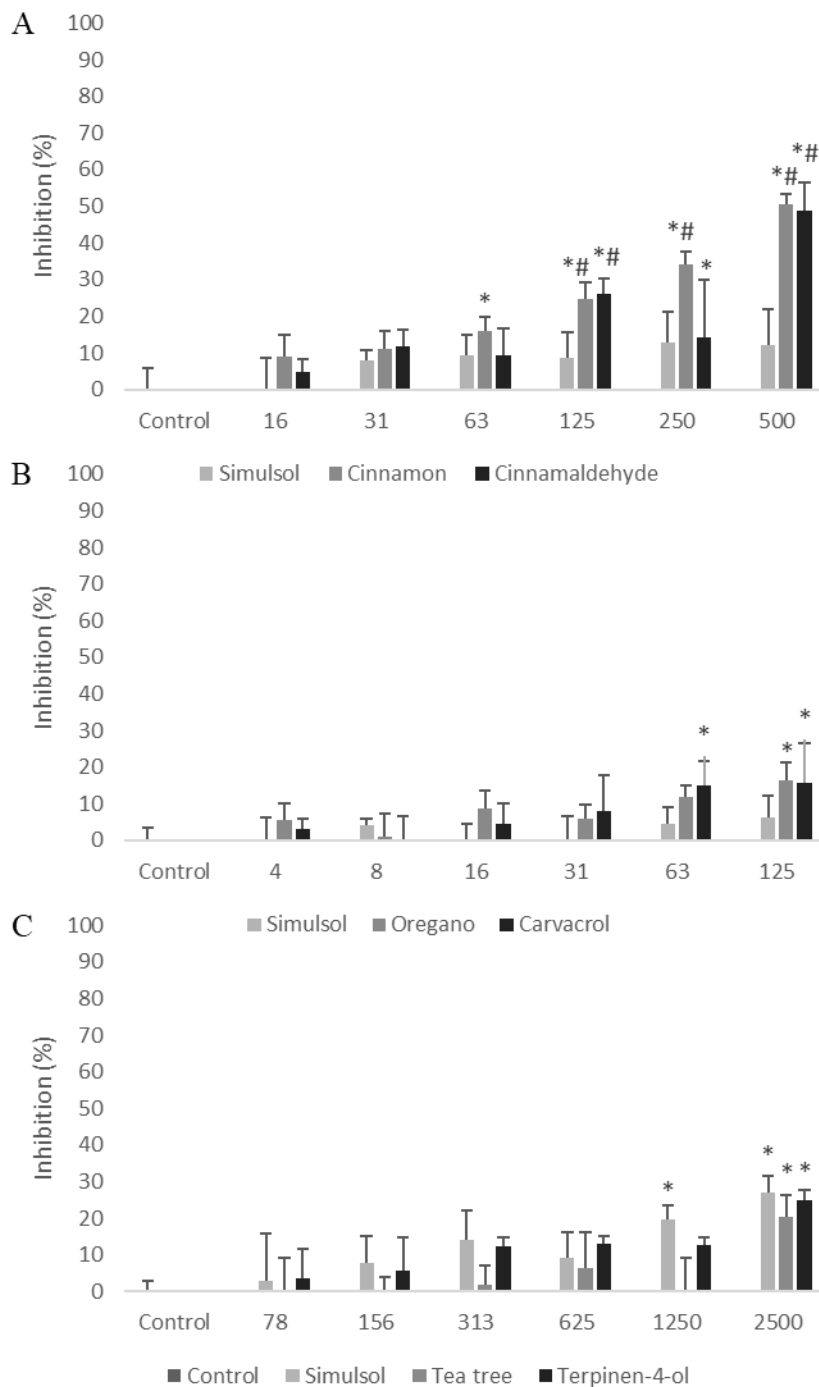


Figure 2: Inhibition of biofilm formation (%) evaluated by an MTT assay on *S. uberis* using sub-inhibitory concentrations ($\mu\text{g/ml}$) of (A) CEO and cinnamaldehyde (B) OEO and carvacrol (C) TEO and terpinen-4-ol. Values are means \pm SD (n=6). (*) Samples are significantly different from the control biofilm ($P<0.05$). (#) Samples are significantly different from the inhibition due to simulsol at the same concentration ($P<0.05$).



Since biofilm are the main sources of contamination and are more resistant to antibacterial compounds, we also studied the potential biofilm inhibitory activity of the essential oils. As *S. dysgalactiae* failed to develop adherent biofilms, this work was carried out on *S. agalactiae* and *S. uberis*. We used sub-inhibitory concentrations (or sub-bactericidal concentrations where applicable) to avoid killing free-living bacteria inoculated at the beginning of the experiment and to only observe an anti-biofilm effect. Biofilms were formed in microplate for 24 hours, after what the viable biomass was estimated using an MTT assay. Results obtained for *S. agalactiae* are presented in figure 1 as the results obtained for *S. uberis* are presented in figure 2. CEO and its main compound cinnamaldehyde were tested at concentrations ranging from 8 to 250 µg/ml, this maximal concentration corresponding to MBC of CEO on this strain. Simulsol®, an emulsifier added here to disperse EOs had no significant effect on the biofilm formation in the tested concentration. With CEO, only the maximal concentration of 250 µg/ml led to a significant inhibition by $46.59 \pm 9.51\%$. Cinnamaldehyde developed the same effect with an inhibition by $47.58 \pm 7.47\%$. These results suggest that CEO and its main compound cinnamaldehyde only develop here a bactericidal activity. The use of OEO led to persistent biofilm inhibition until the concentration reaches 63 µg/ml ($I\% = 43.92 \pm 17.47\%$). This concentration is 8 time lower than the MBC of 500 µg/ml, leading to an inhibition in biofilm formation by $58.28 \pm 10.43\%$. Carvacrol also induced an inhibition of biofilm formation when used at low concentration: 31 µg/ml led to $43.64 \pm 18.01\%$ of inhibition. These effects were significantly different from control and also from Simulsol® for each tested concentration. Concerning TEO which was tested from 5000 µg/ml to 156 µg/ml, higher concentration of Simulsol® were needed, leading to a significant inhibition of biofilm formation. The results presented by Nielsen et al. (2016) warn about the use of emulsifiers in the characterization of anti-biofilm molecules. They showed that Tween 80, a popular emulsifier, used at a concentration of 0.1% led to a reduced biofilm formation by *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens*. Nevertheless, the use of TEO led to an inhibition of biofilm formation significantly different from control and from the one obtained with Simulsol®, when concentration ranging from 5000 to 313 µg/ml were used. The concentration of 313 µg/ml which is 16 time less than the MBC led to an inhibition in biofilm formation by $37.56 \pm 11.16\%$. At the same concentration, terpinen-4-ol only provide an inhibition by $13.16 \pm 9.03\%$, suggesting that not only this compound is implied in the activity of TEO.

Considering the activity of EOs on the biofilm of *S. uberis*, OEO and TEO had no effect. The maximal tested concentration for OEO, which was 125 µg/ml, only provided an inhibition by $16.54 \pm 4.85\%$. For TEO which was tested at the maximal concentration of 2500 µg/ml, only $20.48 \pm 5.21\%$ of inhibition were observed. Both inhibitions were not significantly different from the one observed with Simulsol® alone. Contrariwise CEO and its main compound cinnamaldehyde, tested at a maximal concentration of 500 µg/ml led to a significant inhibition of biofilm formation until the concentration of 125 µg/ml. This concentration led to an inhibition of biofilm formation by $24.67 \pm 4.64\%$ with CEO and $25.98 \pm 4.18\%$ with cinnamaldehyde. According to these results, CEO is able to inhibit the production of biofilm by *S. uberis* at sub-inhibitory concentration due to its high content in cinnamaldehyde (80% of CEO content).

In our knowledge, no data are available concerning the activities of CEO, OEO or TEO on biofilm formation by these two strains, but cinnamaldehyde and carvacrol are known for their anti-biofilm properties against other bacteria. Cinnamaldehyde for instance, is known for down regulating the expression levels of *luxS* and *speB* in *Streptococcus pyogenes*. These genes are involved respectively in quorum sensing and expression of virulence factors (Beema Shafreen et al., 2014). The inhibition of biofilm formation by cinnamaldehyde has also been linked to its capacity to bind the LuxS protein of *S. pyogenes* (Beema Shafreen et al., 2014). Carvacrol was shown to inhibit the expression of glycosyl transferase B (*gtfB*), a gene involved in biofilm production by *Streptococcus mutans*. This led to an inhibition of biofilm formation by $82 \pm 6\%$ when 200 µg/ml of carvacrol were applied (Khan et al., 2017). Inhibition of key structures such as flagella by carvacrol at non-bactericidal concentrations has notably been observed by Burt et al. (2007) on *Escherichia coli* O157:H7. Adhesins allowing the attachment of biofilms to their support could therefore be a target of OEO in the inhibition of biofilm formation by *S. agalactiae*.

Conclusion

Essential oil evaluated here showed efficient antioxidant and anti-lipoxygenase activities. Oregano EO developed the most important scavenging activity, inhibiting DPPH radical with an IC_{50} of 60.3 ± 0.3 µg/ml. All the essential oils tested inhibited 15-LOX in a significant manner when compared

to NDGA (IC₅₀ = 80.9 µg/ml). As lipoxygenase are enzymes involved in the inflammatory process, they could be good candidates for anti-inflammatory products. CEO, OEO and TEO were also active on three bacteria isolated from mastitis, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*. CEO and OEO were active at concentrations ≤ 0.50 mg/ml as higher concentrations were needed with TEO. For the first time to our knowledge, the activity of essential oils has also been evaluated on the biofilms of these three bacteria. OEO and TEO disturbed the biofilms of *S. agalactiae* at sub-inhibitory concentrations. Concerning *S. uberis*, only CEO was active. According to these conclusions, these three EOs alone or in combination could be good products to prevent the adherence of bacteria on the udder, reducing the production probability of a sustainable biofilm.

Bibliography

- Alinkina, E.S., T. a. Misharina, and L.D. Fatkullina. 2012. Antiradical properties of oregano, thyme, and savory essential oils. *Appl. Biochem. Microbiol.* 49:73–78. doi:10.1134/S000368381301002X.
- Ananda Baskaran, S., G.W. Kazmer, L. Hinckley, S.M. Andrew, and K. Venkitanarayanan. 2009. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens *in vitro*.. *J. Dairy Sci.* 92:1423–9. doi:10.3168/jds.2008-1384.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idaomar. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46:446–475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106.
- Bedoux, G., H. Ceapraz, C. Marty, C. Mainguy, M. Bedoux, A. Lejeune, and N. Bourgougnon. 2011. Essential oils of *Zingiber officinale* and *Angelica archangelica* plants. *J. EcoAgriTourism* 7:23–25.
- Beema Shafreen, R.M., C. Selvaraj, S.K. Singh, and S. Karutha Pandian. 2014. *In silico* and *in vitro* studies of cinnamaldehyde and their derivatives against LuxS in *Streptococcus pyogenes*: Effects on biofilm and virulence genes. *J. Mol. Recognit.* 27:106–116. doi:10.1002/jmr.2339.
- Bradley, A.J. 2002. Bovine mastitis: An evolving disease. *Vet. J.* 164:116–128. doi:10.1053/tvjl.2002.0724.

Burt, S.A., R. van der Zee, A.P. Koets, A.M. de Graaff, F. van Knapen, W. Gaastra, H.P. Haagsman, and E.J. a Veldhuizen. 2007. Carvacrol Induces Heat Shock Protein 60 and Inhibits Synthesis of Flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4484–4490. doi:10.1128/AEM.00340-07.

Filloux, A., and I. Vallet. 2003. Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *M/S médecine Sci.* 19:77–83.

Gomes, F., M.J. Saavedra, and M. Henriques. 2016. Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms.. *Pathog. Dis.* 1–19. doi:10.1093/femspd/ftw006.

Khan, S.T., M. Khan, J. Ahmad, R. Wahab, O.H. Abd-Elkader, J. Musarrat, H.Z. Alkathlan, and A.A. Al-Kedhairy. 2017. Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *AMB Express* 7:49. doi:10.1186/s13568-017-0344-y.

Kim, H.-J., F. Chen, C. Wu, X. Wang, H.Y. Chung, and Z. Jin. 2004. Evaluation of Antioxidant Activity of Australian Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Oil and Its Components. *J. Agric. Food Chem.* 52:2849–2854. doi:10.1021/jf035377d.

Lang, M., S. Rodrigues, R. Boulho, E. Duteil, A. Bazire, and G. Bedoux. 2016. An Essential Oil Blend Prevents *Pseudomonas aeruginosa* PA01 from Forming Biofilms. *J. Bacteriol. Parasitol.* 7. doi:10.4172/2155-9597.1000268.

Mastelić, J., I. Jerković, I. Blazević, M. Poljak-Blazi, S. Borović, I. Ivancić-Baće, V. Smrecki, N. Zarković, K. Brcić-Kostić, D. Vikić-Topić, and N. Müller. 2008. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives.. *J. Agric. Food Chem.* 56:3989–96. doi:10.1021/jf073272v.

McDougall, S., K.I. Parker, C. Heuer, and C.W.R. Compton. 2009. A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. *Vet. Microbiol.* 134:177–185. doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.026.

Melchior, M.B., H. Vaarkamp, and J. Fink-Gremmels. 2006. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections?. *Vet. J.* 171:398–407. doi:10.1016/j.tvjl.2005.01.006.

- Miguel, M.G. 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review.. *Molecules* 15:9252–87. doi:10.3390/molecules15129252.
- Murbach Teles Andrade, B.F., L. Nunes Barbosa, I. da Silva Probst, and A. Fernandes Júnior. 2014. Antimicrobial activity of essential oils. *J. Essent. Oil Res.* 26:34–40. doi:10.1080/10412905.2013.860409.
- Nazzaro, F., F. Fratianni, L. De Martino, R. Coppola, and V. De Feo. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria.. *Pharmaceuticals* 6:1451–74. doi:10.3390/ph6121451.
- Nielsen, C.K., J. Kjems, T. Mygind, T. Snabe, and R.L. Meyer. 2016. Effects of Tween 80 on Growth and Biofilm Formation in Laboratory Media.. *Front. Microbiol.* 7:1878. doi:10.3389/fmicb.2016.01878.
- Oliveira, M., R. Bexiga, S.F. Nunes, C. Carneiro, L.M. Cavaco, F. Bernardo, and C.L. Vilela. 2006. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates.. *Vet. Microbiol.* 118:133–40. doi:10.1016/j.vetmic.2006.07.008.
- Olszowy, M., and A.L. Dawidowicz. 2016. Essential oils as antioxidants: their evaluation by DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, and β -carotene bleaching methods. *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.* 147:2083–2091. doi:10.1007/s00706-016-1837-0.
- Oviedo-Boyso, J., J.J. Valdez-Alarcón, M. Cajero-Juárez, A. Ochoa-Zarzosa, J.E. López-Meza, A. Bravo-Patiño, and V.M. Baizabal-Aguirre. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J. Infect.* 54:399–409. doi:10.1016/j.jinf.2006.06.010.
- Sordillo, L.M., K. Shafer-Weaver, and D. DeRosa. 1997. Immunobiology of the mammary gland.. *J. Dairy Sci.* 80:1851–65. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)76121-6.
- Trafny, E.A., R. Lewandowski, I. Zawistowska-Marciniak, and M. Stepińska. 2013. Use of MTT assay for determination of the biofilm formation capacity of microorganisms in metalworking fluids. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29:1635–1643. doi:10.1007/s11274-013-1326-0.
- Tsai, M.-L., C.-C. Lin, W.-C. Lin, and C.-H. Yang. 2011. Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils from Five Selected Herbs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75:1977–1983. doi:10.1271/bbb.110377.

Wei, A., and T. Shibamoto. 2010. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 58:7218–7225. doi:10.1021/jf101077s.

2.4.2 Activités antibiofilm du mélange Mam1

Les résultats préliminaires montrent que les HE d'origan et de tea tree à des concentrations sub-inhibitrices présentent une activité inhibitrice sur le biofilm de *S. agalactiae* alors que la cannelle ne présente pas d'activité sur cette bactérie. L'inverse se produit pour *S. uberis* puisque la cannelle est la seule à développer une inhibition du biofilm à des concentrations quatre fois inférieures à la CMB. Les résultats obtenus pour le mélange Mam1 sont présentés dans la figure 6.

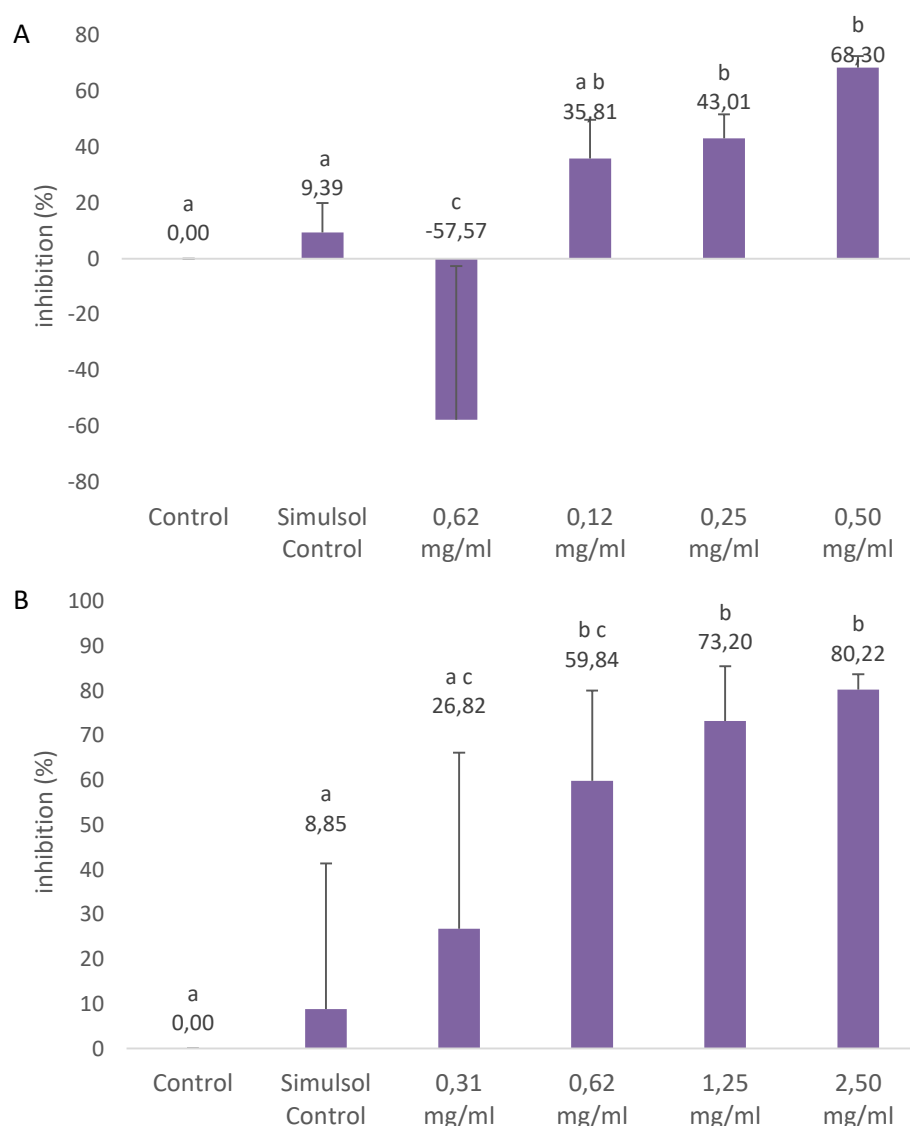


Figure 6 : Inhibition du biofilm de *S. agalactiae* (A) et *S. uberis* (B) obtenues après traitement avec le mélange Mam1 à différentes concentrations (mg/ml). Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

Le mélange Mam1 présente une activité inhibitrice sur les biofilms des deux bactéries testées. Concernant *S. agalactiae*, des inhibitions significativement différentes du contrôle et du simulsol®, de $68,0 \pm 4,2\%$ et $43,0 \pm 8,6\%$, sont observées pour les concentrations de 0,25 et 0,50 mg/ml respectivement. L'activité observée à la concentration de 0,16 mg/ml peut être imputée à l'activité bactéricide du mélange. A la concentration sub-inhibitrice de 0,25 mg/ml, les HE se trouvent chacune à une concentration de 0,08 mg/ml soit 80 µg/ml. A cette concentration, seule l'HE d'origan présentait une activité sur le biofilm de *S. agalactiae*, avec une inhibition observée de $43,92 \pm 17,47\%$ à la concentration de 63 µg/ml. On peut donc supposer que l'HE d'origan et son composé majoritaire le carvacrol supportent l'activité antibiofilm du mélange Mam1 sur *S. agalactiae*.

Concernant *S. uberis*, le mélange implique également des inhibitions significatives aux concentrations sub-inhibitrices de 2,50, 1,25 et 0,62 mg/ml. Ces inhibitions sont respectivement de $80,2 \pm 3,4\%$, $73,2 \pm 12,2\%$ et $59,8 \pm 20,20\%$. Pour rappel, seule l'HE de cannelle présentait une activité sur le biofilm de *S. uberis*. A la concentration sub-inhibitrice de 0,62 mg/ml, les différentes HE se retrouvent chacune à la concentration de 0,20 mg/ml soit 200 µg/ml. A la concentration de 250 µg/ml, l'inhibition observée pour l'HE de cannelle n'était que de $34,23 \pm 3,29\%$. Cette inhibition étant inférieure à celle observée pour Mam1, il est possible qu'une synergie soit mise en place entre les différentes HE du mélange. Si l'on considère que les HE et les composés présentent des cibles différentes sur les biofilms, leur combinaison reviendrait donc à multiplier ces cibles et augmenter l'effet inhibiteur.

2.5 Confirmation des activités par observation en microscopie confocale à balayage laser

Afin de confirmer les effets des HE et du mélange Mam1 sur les biofilms de *S. agalactiae* et *S. uberis*, leur quantification a été réalisée après formation en microplaque 96 puits. Afin de pouvoir observer d'éventuels effets sur l'aspect des biofilms, le mélange Mam1 a été appliqué à une concentration de 300 µg/ml sur *S. agalactiae* et de 600 µg/ml sur *S. uberis*. Les concentrations ont été déterminées d'après les résultats obtenus au §2.4.2. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 7.

Contrairement aux observations réalisées plus tôt, le simulsol® testé à sa concentration maximale augmente significativement le biovolume et l'épaisseur moyenne des biofilms de *S.*

agalactiae et *S. uberis* par rapport à la condition contrôle. La même observation peut être réalisée pour les différents traitements bien que tous n'impliquent pas une augmentation significative. Par ailleurs, comparée au contrôle avec simulsol®, ni le mélange, ni les HE ou les composés majoritaires ne provoquent une inhibition significative du biovolume ou de l'épaisseur du biofilm. Les inhibitions obtenues lors des essais de quantifications colorimétriques réalisés en microplaque ne sont pas retrouvées ici.

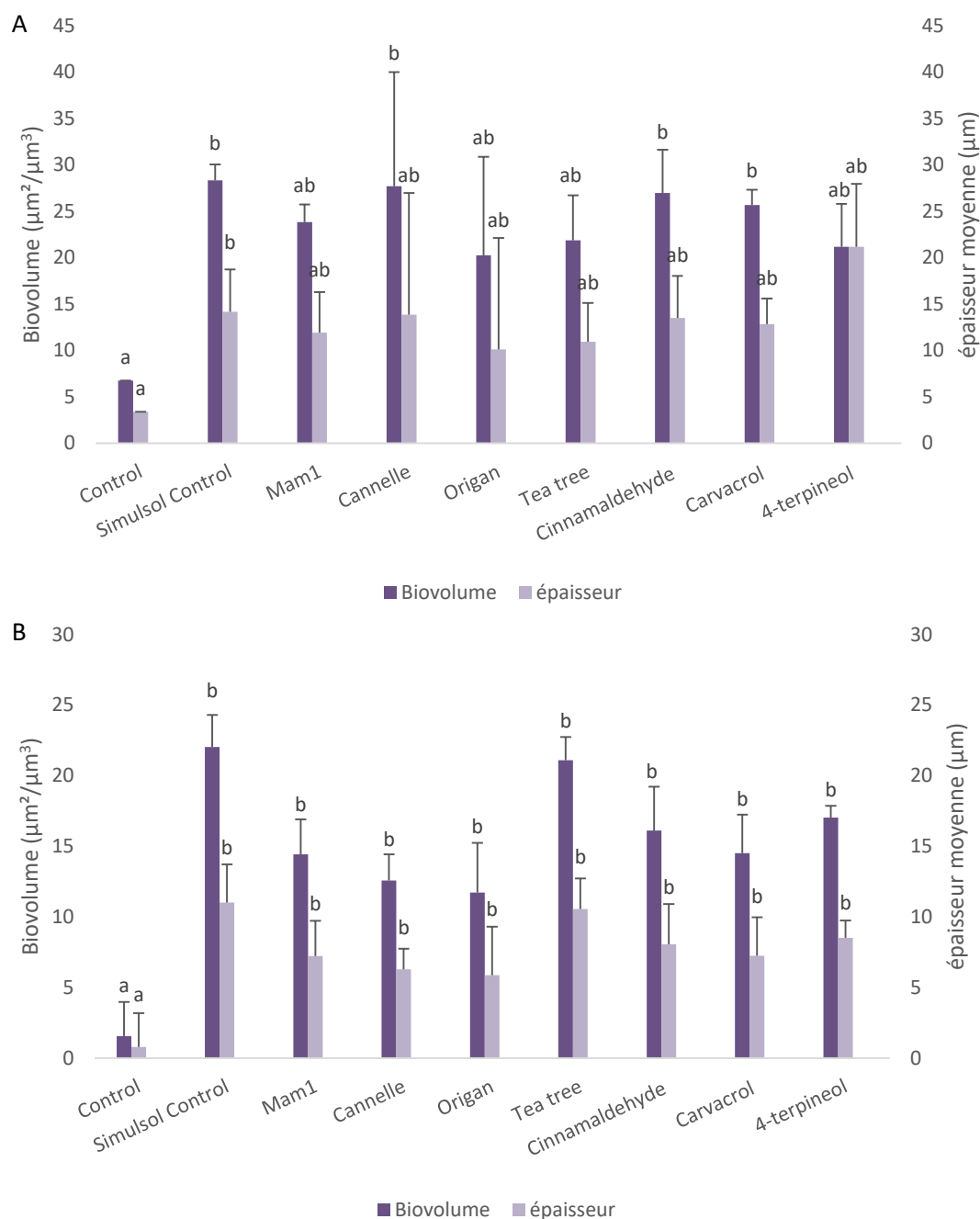


Figure 7 : Biovolume ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) et épaisseur moyenne (μm) observés pour les biofilms de *S. agalactiae* (A) et *S. uberis* (B) en microscopie confocale à balayage laser. Les biofilms de *S. agalactiae* ont été traités avec 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Simulsol® ou Mam1 et 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'HE ou de composés majoritaires respectifs. Les biofilms de *S. uberis* ont été traités avec 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Simulsol® ou Mam1 et 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'HE ou de composés majoritaires respectifs. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

La différence majeure entre les deux protocoles étant les étapes de rinçages appliquées pour retirer les bactéries non adhérentes dans la méthode colorimétrique, il est possible de

suggérer que les HE seules ou en mélange n'impliquent pas directement une inhibition du développement des bactéries au sein du biofilm, mais rendrait l'ensemble moins solide. L'augmentation du biovolume observée ici et l'activité à concentrations non inhibitrices vont dans le sens de cette hypothèse, qui devra être confirmée par d'autres méthodes.

3 Conclusion

Ce chapitre a pour objectif la mise en évidence d'un mélange présentant des activités biologiques liées à la prévention de la mammites. Pour cela, les activités anti-radicalaires et antioxydantes ont été évaluées pour les HE et les mélanges. Le mélange Mam3 présente les meilleures activités, avec une CI_{50} de $13,7 \pm 0,2$ $\mu\text{g/ml}$ dans le test d'inhibition du DPPH et inhibant le blanchiment du β -carotène de 86,5% à la concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$. Par ailleurs ce mélange présente également une potentielle activité anti-inflammatoire, inhibant l'activité de la lipoxigénase avec une CI_{50} de $9,4 \pm 0,3$ $\mu\text{g/ml}$. Les activités antioxydantes et anti-inflammatoires sont liées *in vitro* du fait du mécanisme de la 15-LOX. L'activité du mélange Mam3 est imputée à la présence d'HE de girofle et de son composé majoritaire, l'eugénol, fortement antioxydant.

L'activité antibactérienne des mélanges sur des bactéries spécifiques à la mammites a également été évaluée. À l'issue de cette étape, le mélange Mam1 s'est révélé plus efficace, affectant l'ensemble des souches à des concentrations bactéricides inférieures à 2,5 mg/ml. Cette activité a été imputée à la présence de cannelle et d'origan, dont les composés majoritaires sont le *trans*-cinnamaldehyde et le carvacrol. Ces composés sont reconnus pour leurs activités bactéricides. Par ailleurs ce mélange Mam1 possède également des activités antioxydantes et anti-inflammatoires, toujours en raison de la présence de carvacrol. En effet ce composé possède une fonction phénolique, permettant un transfert d'électrons impliqués dans les activités antioxydantes et donc anti-inflammatoires.

Ce mélange a également révélé de bonnes activités inhibitrices sur les biofilms de *S. agalactiae* et *uberis*. L'activité d'HE sur *S. agalactiae* est mise en évidence pour la première fois ici. Le mélange des trois HE permet également de réduire la formation de biofilms par les deux bactéries à partir des concentrations de 0,5 et 2,5 mg/ml respectivement. L'HE d'origan et son composé majoritaire le carvacrol sont supposés porter l'activité du mélange sur *S. agalactiae*. Concernant *S. uberis*, il semblerait qu'une synergie prenne place entre les trois HE

du mélange. L'hypothèse d'une fragilisation des biofilms ayant été avancée, les effets des HE sur l'expression de gènes régulant la formation de biofilm chez les streptocoques pourraient apporter un complément d'information. Le cinnamaldehyde a en effet déjà montré un effet régulateur sur l'expression du gène LuxS chez *Streptococcus pyogenes* (Beema Shafreen, Selvaraj, Singh, & Karutha Pandian, 2014). Le carvacrol à la concentration de 200 µg/ml a, pour sa part, montré une activité inhibitrice sur l'expression de la glycosyl transferase B (gtfB), un gène également impliqué dans la production de biofilm par *Streptococcus mutans*. (Khan *et al.*, 2017). De plus, la formation de ces biofilms en cellules à flux permettrait d'appliquer une force de cisaillement pour confirmer ces hypothèses. Enfin, les biofilms étant généralement des formations multi-espèces, il serait également intéressant de suivre l'activité du mélange et des HE sur la combinaison des streptocoques étudiés ici, ainsi qu'une éventuelle combinaison à *S. aureus* ou *P. aeruginosa*, également impliquées dans les mammites. La difficulté consistera alors à différencier les bactéries les unes des autres, nécessitant l'intégration de protéines fluorescentes spécifiques par transgénèse.

Valorisation industrielle

Le mélange Mam1 a révélé *in vitro* son efficacité sur des pathogènes spécifiques de la mammite et notamment sur leurs biofilms. Il permet également de cumuler des activités antioxydantes et anti-inflammatoires. En fonction des résultats obtenus, BioArmor souhaite formuler un noyau, commercialisé sous le nom de Mastilor®. La galénique et la définition d'un mode d'emploi adapté à cette pathologie sont en cours d'élaboration.

4 Bibliographie

A

Alinkina, E. S., Misharina, T. a., & Fatkullina, L. D. (2012). Antiradical properties of oregano, thyme, and savory essential oils. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49(1), 73–78.

Ananda Baskaran, S., Kazmer, G. W., Hinckley, L., Andrew, S. M., & Venkitanarayanan, K. (2009). Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1423–9.

B

Beema Shafreen, R. M., Selvaraj, C., Singh, S. K., & Karutha Pandian, S. (2014). *In silico* and *in vitro* studies of cinnamaldehyde and their derivatives against LuxS in *Streptococcus pyogenes*: Effects on biofilm and virulence genes. *Journal of Molecular Recognition*, 27(2), 106–116.

Bishop, C. D. (1995). Antiviral Activity of the Essential Oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden amp; Betche) Cheel (Tea Tree) Against Tobacco Mosaic Virus. *Journal of Essential Oil Research*, 7, 641–644.

Bradley, A. J. (2002). Bovine mastitis: An evolving disease. *Veterinary Journal*, 164(2), 116–128.

G

Gomes, F., Saavedra, M. J., & Henriques, M. (2016). Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. *Pathogens and Disease*, 1–19.

K

Khan, S. T., Khan, M., Ahmad, J., Wahab, R., Abd-Elkader, O. H., Musarrat, J., ... Al-Kedhairi, A. A. (2017). Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *AMB Express*, 7(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0344-y>

Kim, H.-J., Chen, F., Wu, C., Wang, X., Chung, H. Y., & Jin, Z. (2004). Evaluation of Antioxidant Activity of Australian Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Oil and Its

Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 2849–2854.

M

McDougall, S., Parker, K. I., Heuer, C., & Compton, C. W. R. (2009). A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. *Veterinary Microbiology*, 134(1–2), 177–185.

Melchior, M. B., Vaarkamp, H., & Fink-Gremmels, J. (2006). Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 171(3), 398–407.

Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252–87.

Mondello, F., De Bernardis, F., Girolamo, A., Cassone, A., & Salvatore, G. (2006). In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infectious Diseases*, 6, 158.

Murbach Teles Andrade, B. F., Nunes Barbosa, L., da Silva Probst, I., & Fernandes Júnior, A. (2014). Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 26(1), 34–40.

N

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–74.

Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 119–146.

O

Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J. J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J. E., Bravo-Patiño, A., & Baizabal-Aguirre, V. M. (2007). Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection*, 54(4), 399–409.

P

Pei, R., Zhou, F., Ji, B., & Xu, J. (2009). Evaluation of Combined Antibacterial Effects of Eugenol, Cinnamaldehyde, Thymol, and Carvacrol against *E. coli* with an Improved Method. *Journal of Food Science*, 74(7), M379–M383.

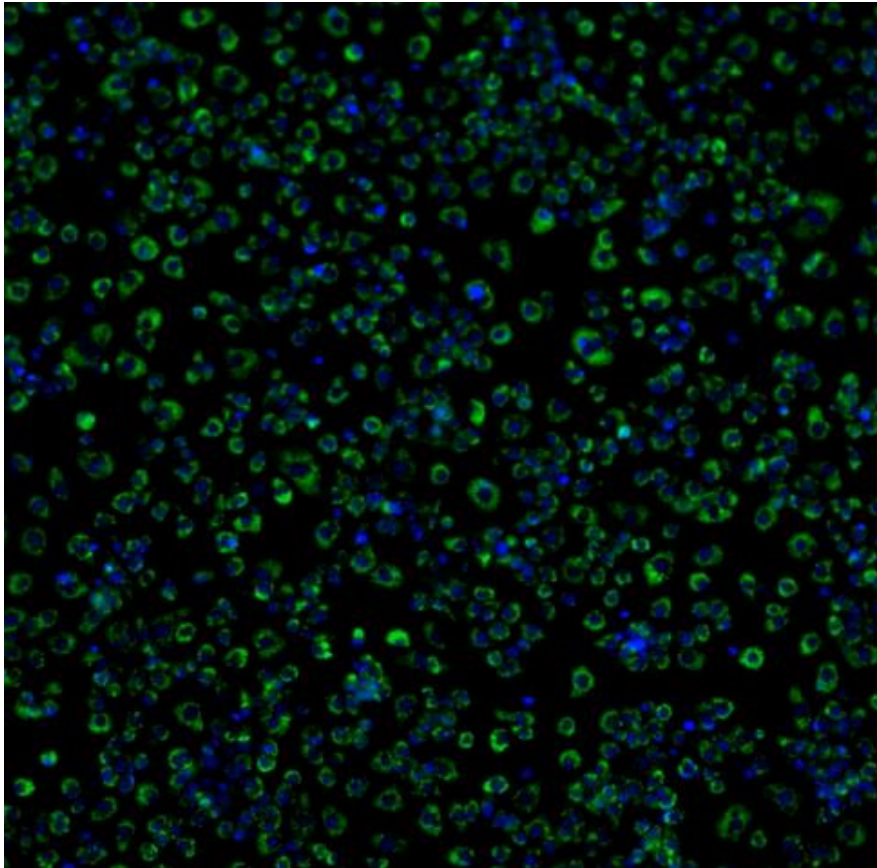
T

Tsai, M.-L., Lin, C.-C., Lin, W.-C., & Yang, C.-H. (2011). Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils from Five Selected Herbs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(10), 1977–1983.

W

Watts, J. L. (1988). Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 16(1), 41–66.

Web-Agri. (2014). Mammites - L'impact économique atteint 230€/vache/an. Retrieved from <http://www.web-agri.fr/conduite-elevage/sante-animale/article/l-impact-economique-atteint-230-vache-an-1184-97330.html>



Chapitre 5

Effet des huiles essentielles sur la sphère immunitaire

Liste des figures

Figure 1 : Schéma résumant les grandes étapes de l'intervention de l'immunité innée au cours d'une infection (crédit : www.maxicours.com).	269
Figure 2 : Intensité de phagocytose par rapport au contrôle (cellules non prétraitées) après prétraitement par les mélanges Resp1, 3 et 4 et Abf1, avec ou sans LPS à 0,1µg/ml. ..	292
Figure 3 : Taux d'expression de l'iNOS dans les cellules après prétraitement par les mélanges Resp1, 3 et 4 et Abf1, avec ou sans LPS à 0,1µg/ml.	293
Figure 4 : Concentration en IL-6 sécrétée par les cellules RAW264.7 après prétraitement par les mélanges Resp1, 3 et 4 et Abf1, avec ou sans LPS à 0,1µg/ml.....	295

1 Introduction

Les travaux réalisés dans les chapitres 1, 3 et 4 ont permis de mettre en évidence des mélanges candidats, cumulant des activités anti-radicalaires, anti-inflammatoires, antibactériennes et antiparasitaires, conformément aux essais réalisés dans chaque sphère. Il s'agit des mélanges Resp1 (citron, girofle, origan, thym) et Resp4 (cannelle, eucalyptus, menthe) pour la sphère respiratoire, des mélanges Dig1 (cannelle, citron, girofle, origan) et Dig3 (1/6^e cannelle, 1/6^e girofle 4/6^e origan) pour la sphère digestive et du mélange Mam1 (cannelle, origan, tea tree) pour la prévention de la mammite bovine. Le mélange Abf1, affilié à la sphère respiratoire, a également démontré son potentiel sur l'inhibition du biofilm de la bactérie résistante *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Ces mélanges ciblés pourront permettre de limiter l'impact des facteurs environnementaux sur l'état de santé des animaux, à des étapes précises de leur croissance.

Le système immunitaire inné constitue la première ligne de défense en cas d'infection. La figure 1 résume les principales étapes intervenant juste après la contamination par un pathogène.

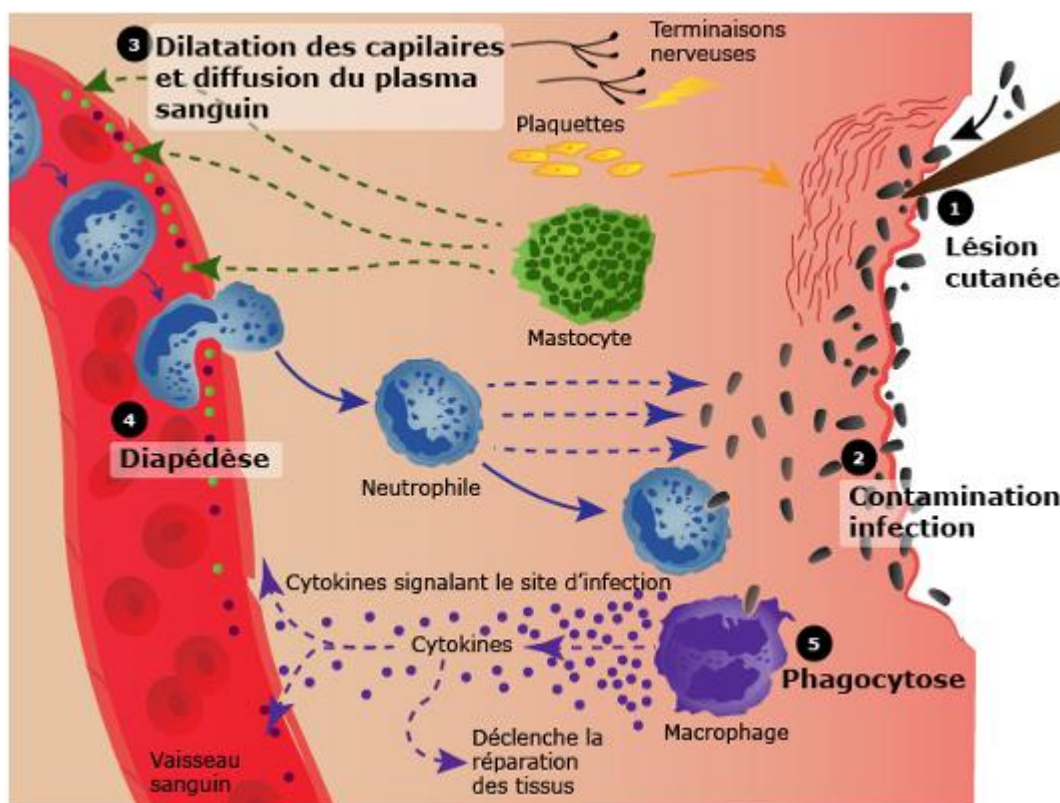


Figure 1 : Schéma résumant les grandes étapes de l'intervention de l'immunité innée au cours d'une infection (crédit : www.maxicours.com).

Suite à la pénétration du pathogène, une dilatation locale des capillaires sanguins intervient, conduisant aux principaux symptômes de l'inflammation qui sont rougeur, chaleur et douleur. Cet afflux sanguin permet l'arrivée sur le site de phagocytes circulatoires, par un phénomène de diapédèse. Leur contact avec des motifs spécifiques des pathogènes, également appelés PAMP (de l'anglais « Pathogen Associated Motif Pattern ») induit l'activation des macrophages qui démarrent alors la phagocytose. Les macrophages activés sécrètent également des cytokines (IL1, IL8, IL6, TNF- α (de l'anglais « Tumor Necrosis Factor ») etc...) permettant une signalisation intracellulaire visant au recrutement des cellules du système immunitaire. Ces cellules (polynucléaires neutrophiles, macrophages et lymphocytes « natural killer ») vont accroître la capacité de destruction du pathogène (Actor, 2014). Stimuler l'immunité innée des animaux pourrait permettre de les protéger contre l'ensemble des pathogènes sans distinction. Cette voie permettrait d'une part de limiter le recours aux antibiotiques, mais pourrait d'autre part également limiter les risques de résistances, le pathogène n'étant pas la cible directe du traitement.

Les macrophages sont des cellules actives du système immunitaire inné, réalisant la phagocytose et une signalisation pro-inflammatoire. Ils disposent à leur surface de récepteurs spécifiques aux motifs bactériens (PAMP) appelés les PRR (de l'anglais « Pattern Recognition Receptor »). Cette famille de récepteurs inclut entre autres les récepteurs Fc, les récepteurs du complément et les Toll Like Receptors (TLR) (Underhill & Ozinsky, 2002). Les motifs reconnus, peuvent être de différentes natures. Il s'agit par exemple du mannose des levures, de peptides formylés chez les bactéries ou des lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram -. La fixation ligand / récepteur induit l'internalisation du récepteur et l'activation de cascades signalétiques. Le pathogène peut alors adhérer à la surface du macrophage (Aderem & Underhill, 1999). Il est ensuite endocyté et inclus dans une vésicule intracytoplasmique, le phagosome. La fusion du phagosome avec les lysosomes, va induire la lyse du pathogène. Le macrophage peut réaliser la production de superoxydes intervenant dans la destruction de pathogènes et la sécrétion de messagers, les cytokines (Underhill & Ozinsky, 2002). La phagocytose permet aussi la présentation de l'antigène à la surface de la cellule, induisant le passage de l'immunité innée à l'immunité acquise.

La capacité de l'HE d'eucalyptus à moduler la phagocytose effectuée par les cellules MDMs (de l'anglais « Monocyte Derived Macrophages ») a été établie en 2008 (Serafino *et al.*, 2008). Le traitement *in vitro* par l'HE à une concentration de 160 $\mu\text{g/ml}$ permettait notamment d'activer les macrophages, induisant un changement morphologique, mais également

d'augmenter leur capacité à phagocyter des particules fluorescentes. Ces observations montrent l'intérêt d'utiliser l'HE d'eucalyptus dans le cadre de la prévention des pathologies animales.

Ce dernier chapitre a pour objectif d'établir les capacités préventives des HE sur le système immunitaire des animaux. L'influence d'un prétraitement de 24h sur le modèle de macrophages murin RAW264.7 est évalué *in vitro* grâce à des méthodes de screening à haut débit, permettant le suivi de la phagocytose, de l'expression de l'iNOS et de la sécrétion d'IL-6. Les HE de citron, de cannelle, de girofle, de menthe et d'origan ont été utilisées ici ainsi que le cinnamaldehyde et le carvacrol. Concernant leurs associations, les mélanges Resp1 (citron, girofle, origan, thym), Resp3 (eucalyptus, girofle, niaouli), Resp4 (cannelle, eucalyptus, menthe) et Abf1 (ail, cannelle, menthe) ont été retenus.

Les résultats obtenus pour les HE sont présentés sous forme d'une publication soumise à « Journal of phytotherapy research ». Les résultats obtenus pour les mélanges sont présentés à la suite.

2 Résultats et discussion

2.1 Activité immuno-modulatrice des huiles essentielles

Assesment of immunomodulative activities of EOs by using high content screening methods

Lang Marie^{1*}, Ferron Pierre-Jean², Bursztyka Julian², Duteil Emmanuel ³, Bazire Alexis¹,
Bedoux Gilles¹

¹. Université de Bretagne-Sud, EA 3884, LBCM, IUEM, F-56100 Lorient, France.

². HCS-Pharma, Rennes Biopôle, 6 rue Pierre Joseph Colin, 35000 Rennes.

³. BioArmor S.A., Z.I de la Gare, F- 22940 Plaintel, France.

* Corresponding author:

Marie Lang

Université de Bretagne-Sud - Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines

Centre de Recherche Yves Coppens - Campus de Tohannic - BP 573

56017 Vannes Cedex, France

marie.lang@univ-ubs.fr

Phone: (+33) 2 97 01 71 22

Abstract

Essential oils (EO) are volatile plant extracts well known for their antimicrobial, anti-inflammatory or antioxidant activities. Bacterial resistances are more and more frequent and can complicate the care of bacterial infections. The use of EOs as alternatives of antibiotics is therefore current. In this work, the effects of five EOs and two major compounds were evaluated on macrophage cells, which are in first line of immune response during microbial infection. The preventive effect of clove, cinnamon, lemon, mint and oregano essential oils, cinnamaldehyde and carvacrol was assessed on murine macrophage RAW264.7 cells. After a 24 hours' pre-treatment with each EOs or compound, supplemented or not with LPS, the ability of macrophages to phagocyte, the intracellular expression of iNOS and the secretion of IL-6 was measured. Phagocytic activity was evaluated using pHrodo® fluorescent probes in combination with epifluorescent microscopy. The tested EOs did not affect significantly the intensity of phagocytosis. The expression of iNOS was significantly enhanced by clove EO at a concentration of 100 µg/ml coupled or not with LPS, by 2.26 ± 0.40 and 2.36 ± 0.92 times respectively. Cinnamon EO at a concentration of 10 µg/ml also potentiated the capacity of LPS to enhance the expression of iNOS. Finally, clove EO and cinnamaldehyde also strongly inhibited the expression of IL-6 induced by the treatment with LPS. This anti-inflammatory effect suggests an inhibition of NF-κB activation contrasting with the enhancement of iNOS expression. If EOs did not potentiate phagocytosis, the results observed for clove and cinnamon EOs suggest that they could enhance the production of NO, killing pathogens, without involving high inflammation signalisation.

Key words: essential oils, immunomodulative, phagocytosis, iNOS, IL-6

Introduction

Inflammation is a natural response from the innate immune system (IS) in case of injury or microbial invasion (Beningo & Wang, 2002). Phagocytic cells and especially macrophages provide a first line effectors from the IS, leading to the detection and elimination of pathogenic micro-organisms invading the body (Beningo & Wang, 2002; Underhill & Ozinsky, 2002). Activation of macrophages is associated to the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) like the lipopolysaccharides (LPS) associated to Gram negative bacteria and lipoproteins and lipoteichoic acid for Gram positive bacteria. In a second time they also fulfil other functions like the emission of intracellular signals which leads to an enhanced inflammation (Serafino et al., 2008; Underhill & Ozinsky, 2002). If this is a normal and helpful process, a long lasting inflammation also induces the production of deleterious products like reactive oxygen species (ROS) or reactive nitrogen species (RNS) (Miguel, 2010). These species are produced through the activation of an inducible nitroxide synthase (iNOS) during phagocytosis, in order to kill the pathogenic microorganisms. They also have a key role in the modulation of membrane receptors, channels or transcription factors (Miguel, 2010). However, an overproduction of ROS or RNS during inflammatory process could lead to the saturation of detoxification procedures and generate cell damages being responsible for diseases (Miguel, 2010).

In recent years, measurements of antimicrobial properties of essential oils (EOs) have become an increasing research topic (Dorman & Deans, 2000; Murbach Teles Andrade, Nunes Barbosa, da Silva Probst, & Fernandes Júnior, 2014; Silva, Alves, Goncalves, Amaral, & Poeta, 2013). Antibacterial activities of commercial EOs and their major compounds are known and these results are prospects for the development of new drugs (Ananda Baskaran, Kazmer, Hinckley, Andrew, & Venkitanarayanan, 2009; Burt, 2004). However, very few information is available about the effect of essential oils on the immune system. The potential of *Eucalyptus globulus* EO as phagocytosis promoter was assessed *in vivo* and *in vitro* by Serafino et al. (2008). When tested on human monocyte-derived macrophages (MDMs), 0.008% of eucalyptus EO led to an acquirement of typical activated features and enhanced phagocytosis by treated cells (24h pre-treatment) (Serafino et al., 2008). The secretion of pro-inflammatory cytokines was not modified by the treatment when compared to control cells, which indicates that eucalyptus EO could be able to protect the body from pathogenic invaders without involving inflammation (Serafino et al., 2008). *In vivo*, eucalyptus EO was also able to enhance the number of circulating monocytes in immunocompetent rats and concomitantly, the phagocytic activity of

granulocytes. *Ex-vivo*, phagocytic ability of macrophages obtained from these rats was also enhanced (Serafino et al., 2008). EO components like limonene or citral also show anti-inflammatory properties, reducing LPS-induced interleukines and NO production in RAW267.4 cells (De Cássia Da Silveira E Sá, Andrade, & De Sousa, 2013).

With its emergence in the late 1990's, high content analysis (HCA) is an approach with great potential to change the way in which efficacy assays are performed. Multiple markers of interest can be quantified simultaneously for individual cells and cell populations thereby allowing the screening of extracts and purified fractions for a better identification of active extracts, and structure activity relationship assessment. In this study, the immunomodulatory effect of five EOs and two main compounds is evaluated on RAW264.7 murine macrophages. The effect of a 24h pre-treatment with EOs was monitored by using High Content Imaging (HCI) techniques. The monitoring was performed with or without LPS as enhancer, on phagocytic capacity, expression of iNOS and secretion of IL-6. The objective is to determine if these EOs could be integrated in complementary food products, preventing the apparition of infections.

Materials and methods

1 Plant extracts and pure components

Essential oils (EOs) of cinnamon (*Cinnamomum cassia* J. Presl, 1825), clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry, 1939), lemon (*Citrus ×limon* (L.) Burm. f., 1768), peppermint (*Mentha ×piperita* L., 1753) and oregano (*Origanum vulgare* L., 1753) were purchased from BioArmor S.A. (Plaintel, France). Cinnamon EO was distilled from leaves and branches, clove and peppermint EOs were extracted from leaves, lemon EO was expressed from pericarps and oregano EO was obtained from the whole plant. Cinnamon, clove, peppermint and oregano EOs were extracted by a steam distillation. Lemon EO was obtained by expression of fruit pericarps. During process, EOs were stored in the dark at room temperature. Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) reports detail the major constituents and were joined with each EO. *Trans*-cinnamaldehyde and carvacrol, the respective main constituent of cinnamon and oregano EOs were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA).

2 Cell culture

Murine monocytic macrophages from cell line RAW264.7 were grown in plastic culture flasks (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austria) in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) with L-glutamine, supplemented with 10% FBS, 1% L-Glutamine and 1% penicillin/streptomycin solution under 5% CO₂ at 37 °C (Dominique Dutcher, Brumath, France). When 80% confluence was reached, cells were removed from the culture flask by scraping and centrifuged for 5 min at 1500 rpm. The medium was then removed and the cells were resuspended with fresh DMEM. Cells counts and viability were performed using a standard trypan blue cell counting method. The cell concentration was adjusted to 5.10⁵ cells/ml or 1.10⁵ cells/ml in the same medium. Hundred microliter of the above suspension were cultured in a 96-wells plate for 6 hours to become adherent. The medium was then replaced by fresh DMEM with EOs or EOs and 0.1 µg/ml LPS, for 24 hours.

3 Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was evaluated with a live dead assay using Hoechst® 33342 and propidium iodid (PI) to reveal the total and the dead cells respectively. Toxicity was evaluated during 24 h on 5x10⁴ cells/well. EOs and main compounds were diluted in culture medium in order to achieve final concentrations ranging from 2000 to 1.95 µg/ml. DMSO at the maximal final concentration of 0.3% was used to disperse EOs. The assay for each concentration of samples was performed in triplicate. The culture plates were kept at 37 °C with 5% (v/v) CO₂. After 24 h of incubation, 100 µl of medium was removed from each well. Subsequently, 100 µL of dying solution (16.2 µM Hoechst® 33342 and 0.66 µM PI diluted in DMEM) were added and plates were incubated for a further 30 min. The supernatant was then removed and cells were washed twice using phosphate buffer saline (PBS). Cells were observed using epifluorescence microscopy (ImageXpress Micro XLS, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) and 4 images were taken per well. The obtained images were processed using the associated MetaXpress® software. Cytotoxicity was expressed as CC₅₀ which is the concentration leading to 50% of PI positive cells with reference to control (untreated cells).

4 Cell pre-treatment conditions

In order to determine the effects of essential oils on macrophage behaviour, a 24 h pre-treatment was performed. For this, a final concentration of 1x10⁴ cells per well was used. As

aforementioned, cell suspension was first spread in the wells and incubated for 6 h before treatment, in order to let them adhere to the surface. Supernatant was then replaced by solutions of EOs at 100, 10 and 1 µg/ml for clove, lemon and peppermint EOs, or at 10, 1 and 0.1 µg/ml for cinnamon and oregano EOs and also for cinnamaldehyde and carvacrol. Cells were then pre-treated with EOs alone or with the different concentrations of EOs plus 0.1 µg/ml of lipopolysaccharide (LPS). Negative and positive controls consisted in medium containing respectively DMSO at the maximal concentration observed (0.5 %) or LPS at 0.1 µg/ml.

5 Evaluation of phagocytic capacity

After pretreatment, the culture media were removed and cells were washed twice using PBS to avoid traces of EOs or LPS. Cells were incubated with pHrodo™ Red *S. aureus* Bioparticles™ diluted at a final concentration of 100 µg/ml and mixed with Hoechst at 1:1000 (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The pHrodo™ Red *S. aureus* Bioparticles™ probes (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) consists in *Staphylococcus aureus* cell particles coupled with pH dependent rhodamine, becoming fluorescent when pH reaches 5, *i.e.* after phagocytosis. Fluorescence intensity was measured at t=0 h, t=1 h and t=2 h using epifluorescence microscopy (ImageXpress Micro XLS, Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The obtained images were processed using the associated MetaXpress® software. Phagocytosis intensity was expressed as a percentage of fluorescence intensity, considering untreated cells (negative control) as the 100% of phagocytic activity.

6 Measurement of iNOS expression

Once the phagocytosis step over, the cell supernatants were recovered to determine the effect of EOs on IL-6 secretion (see §3.7). Wells were washed twice with PBS to remove non phagocytosed pHrodo™ probes. Remaining cells were then fixed using formaldehyde solution (Dominique Dutcher, Brumath, France) during 15 minutes and washed twice again. Quantification of the inducible nitroxyde synthase (iNOS) expressed in cells was then performed using immunostaining. Briefly, 100 µl of murine macrophage iNOS specific antibody (ABR iNOS, Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific) were added on the cells at a dilution of 1:250 (v:v) in PBS. Recognition has been processed during 3 h at 4°C before washing and addition of the secondary antibody. After 1h of incubation, a last washing step was realised before fluorescence quantification using (ImageXpress Micro XLS, Molecular

Devices, San Jose, CA, USA). The obtained images were processed using the associated MetaXpress® software. The rate of iNOS expression was calculated using fluorescence intensity, considering that the rate of expression in untreated cells (negative control) was equal to 1.

7 Determination of IL-6 secretion

Production of IL-6 by phagocytosing macrophages was determined on cell supernatant using a specific commercial Elisa Kit (Termo Fisher Scientific). The test was performed according to the supplier's recommendation. The previously recovered supernatants were added to the wells of the microplate in an amount of 50 µl. Samples were tested against a range of IL-6 with concentrations ranging from 2000 to 31.25 pg/ml. After 2 h of incubation, wells were emptied and washed thrice thanks to the provided washing buffer. The specific biotinylated antibody solution was then added in an amount of 50 µl in all the wells, and the plate was incubated for one hour. Again, wells were rinsed thrice, and 100 µl of Streptavidin-HRP solution were added for 30 minutes. Finally, 50 µl of TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) substrate solution were added to each wells in order to develop the reaction. Enzymatic reaction was revealed after 30 min by adding 50 µl of stop solution. The absorbance measurement is carried out at 450 and 550 nm. The absorbance values obtained at 550 nm are subtracted to the values obtained at 450 nm in order to avoid the absorbance due to plate imperfections. Concentrations in the samples were finally calculated by linear regression from the values obtained with the calibration range of IL-6. This experiment was performed at 24°C and samples were assayed in duplicates.

8 Statistical analyses

Cytotoxic concentrations, phagocytic activity and iNOS expression levels were determined using triplicates as IL-6 concentrations were calculated from duplicates. Conventional statistical methods were used to calculate means and standard deviations. Analysis of variance (ANOVA) was performed to determine differences ($p < 0.05$). Means were then compared pairwise using Tukey's. The statistical analyses were realised using XLSTAT for windows.

Results and discussion

1 EOs composition

Table 1: Chemical compositions of essential oils (%) determined by gas chromatography.
The compounds are classified according to their concentration in all the tested EOs.

	Cinnamon	Clove	Lemon	Peppermint	Oregano
Eugenol		80.5			
<i>Trans</i> -cinnamaldehyde	80.0				
Carvacrol					70.7
<i>d</i> -Limonene			64.5	3.2	1.7
Menthol				32.5	
(DL)-Menthone				26.3	
β -Caryophyllene		15.2		3.8	3.6
β -Pinene			13.5	1.6	1.2
γ -Terpinene			9.8		5
<i>o</i> -Methoxycinnamaldehyde	8				
Menthyl acetate				5	
<i>p</i> -Cymene			0.6		3.7
(D/L)-Isomenthone				4.1	
α -Pinene			2.3	1	
(D)-Neomenthol				3.2	
Linalool					3
Citral			2.6		
Cinnamyl acetate	2.5				
Menthofuran				2.4	
Thymol					2.1
Eucalyptol					1.4
α -Terpineol			0.2		0.8

The main compounds detected by GC-MS in the essential oils (EOs) used in this study are presented in table 1. Cinnamon EO is rich in cinnamaldehyde, containing 80.0% of this compound. This composition is in agreement with results published by Ooi et al. (2006) where *Cinnamomum cassia* EO contained 85.06% of *trans*-cinnamaldehyde. Lemon and peppermint are rich in terpenes, containing respectively 64.5% of *d*-limonene and 32.5% of menthol. Equivalent concentrations of 64.54% of limonene in lemon EO and 33.37% of menthol in

peppermint oil, were reported by Yang et al. (2010). Clove and oregano EOs are rich in phenolic compounds, with respectively 80.5% of eugenol and 70.7% of carvacrol as main compound. Again, this results are similar to previously published data where the compositions of clove and oregano EO were described as 85.5% of eugenol and 61.2% of carvacrol (Viuda-Martos, Ruiz Navajas, Zapata, Fernández-López, & Pérez-Álvarez, 2010). The composition of the EOs depends on the plant part used and on the extraction processes, that is the reason why some minor changes can be observed.

2 Assessment of toxic concentrations

Table 2: Concentrations of EOs and main compounds leading to 50% of mortality in treated RAW264.7 cells. CC₅₀ was determined using the intensity of PI integration as a marker of cell death.

	CC ₅₀ (µg/ml)
Cinnamon	37.87
Cinnamaldehyde	40.59
Clove	> 1000
Lemon	> 2000
Peppermint	> 1000
Oregano	244.63
Carvacrol	287.24

In order to establish working concentrations, the cytotoxicity of EOs and main compounds has been established on RAW264.7 cells. Concentrations leading to 50% mortality (CC₅₀) after 24 h of pre-treatment are presented in table 2. Integration of propidium iodid (PI) by cell nuclei has been used as a marker of the cell mortality. The EOs of clove, lemon and peppermint did not develop a CC₅₀ in the tested concentrations. Terpenic compounds like limonene and menthol, present in lemon and peppermint EO respectively are well known for their low cytotoxicity on eukaryotic or prokaryotic cells (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008). The absence of toxicity on murine macrophages has also been noticed by Bachiega et al. (2012) in the same range of concentrations (from 100 to 5 µg/well in a 96 well plate). Oregano and its main compound carvacrol had equivalent CC₅₀ of 244.63 µg/ml and 287.24

$\mu\text{g/ml}$ respectively. This result suggest that the toxicity of oregano EO is supported by carvacrol. Cinnamon EO and its main compound cinnamaldehyde triggered the highest cytotoxicity with respective CC_{50} of $37.87 \mu\text{g/ml}$ and $40.59 \mu\text{g/ml}$. This suggest that toxicity of cinnamon EO is supported by cinnamaldehyde. Tung et al. (2010) observed no cytotoxic effect on RAW264.7 cells after a treatment with *Cinnamomum osmophleum* EOs (also rich in cinnamaldehyde) when using concentrations up to $100 \mu\text{g/ml}$, suggesting that the toxicity of essential oils can be variable and is related to their chemical composition.

3 Influence of pre-treatment on phagocytic activity

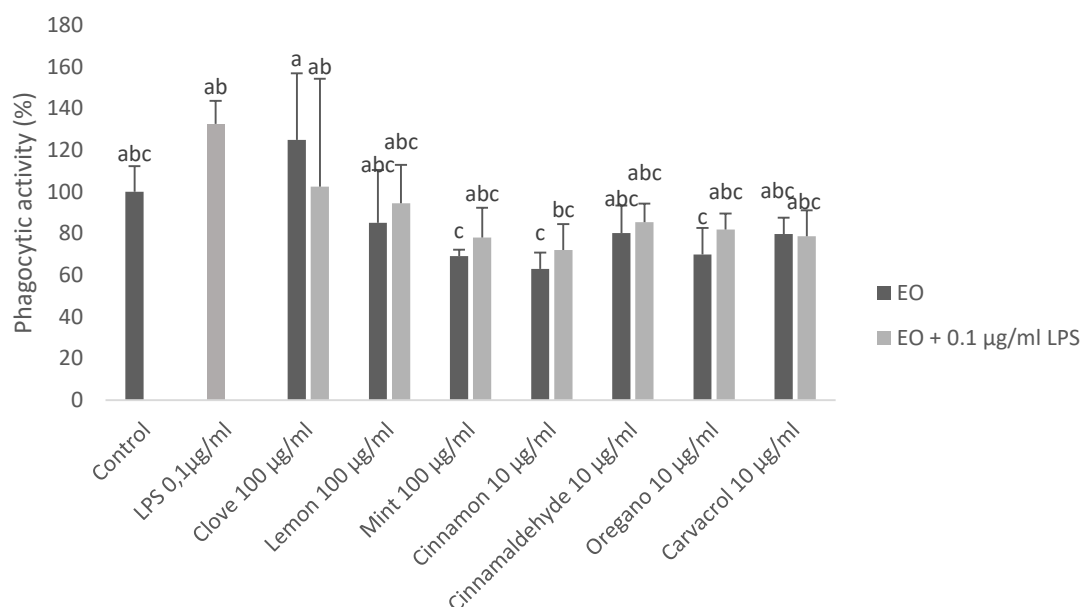


Figure 1: Phagocytic capacity of RAW264.7 cells after 24 h of pre-treatment with EO, cinnamaldehyde and carvacrol, with or without LPS. Fluorescence intensity was measured after two hours of incubation with pHrodo™ particles. Values are means \pm SD (n=3). Samples with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

The capacity of RAW264.7 cells to phagocyte fluorescent probes after a 24 h pre-treatment with EOs or EOs with LPS has been established. LPS is used here as an inducer of macrophage activation. Rates of phagocytoses obtained with the maximal tested concentrations are presented in figure 1. Concerning phagocytic activity, no significant difference was observed between control cells ($100.00 \pm 12.33\%$) and cells treated with $0.1 \mu\text{g/ml}$ LPS ($132.54 \pm 11.10\%$). We suggest that the low difference observed between LPS treated and non-treated

RAW264.7 cells activation is linked to the presence of PAMP on the surface of the bio-particles used in this assay. A synergistic activity between LPS and *E. coli* bioparticles has previously been observed by Suzuki & Umezawa (2006). When compared to their respective control (treatment with or without LPS), EOs inhibited the phagocytic activity in a non-significant manner. A pre-treatment with 100 µg/ml of clove + LPS led to a decrease of 30% in phagocytic activities when compared to LPS control. Lemon, mint, cinnamon and oregano EO led to a decrease in phagocytic activity ranging from 38 to 60%. Inhibition of phagocytic activity by EOs has already been observed before on human neutrophils, by Pérez-Rosés et al. (2015). According to their results, clove EO and eugenol, its main compound, both strongly inhibited phagocytosis. A concentration of 50.40 µg/ml of EO led to an inhibition of phagocytosis by 36% (Pérez-Rosés et al. 2015). Cinnamon EO led to the highest inhibition at the concentration of 10 µg/ml. Cinnamon EO led to a phagocytic activity of $62.99 \pm 7.79\%$ compared to $100 \pm 12.33\%$ in control condition. When LPS at 0.1 µg/ml was added, cinnamon pre-treatment, led to a phagocytic rate of $72.06 \pm 12.47\%$, compared to $132.11 \pm 11.10\%$ with LPS alone. Results are not significantly different, but the trend is in agreement with observations of Tung et al. (2010). These authors showed that cinnamon and its main compound cinnamaldehyde are anti-inflammatory products. This effect suggest that EOs act as TLR-4 (Toll Like Receptor 4) or NF-κB (Nuclear Factor κB) inhibitors, in a similar way than DHMEP, a synthetic product tested by Suzuki & Umezawa (2006). TLR-4 is a receptor involved in the recognition of LPS in RAW264.7 cells inducing the activation of NF-κB. The activation of this transcription factor is involved among others in a positive feedback on phagocytosis, in the production of NO and in the cytokine secretion (Suzuki & Umezawa 2006). EOs and their main compound are also known for their ability to inhibit the activation of NF-κB (De Cássia Da Silveira E Sá et al., 2013; Miguel, 2010).

4 Modulation of iNOS expression in pre-treated cells

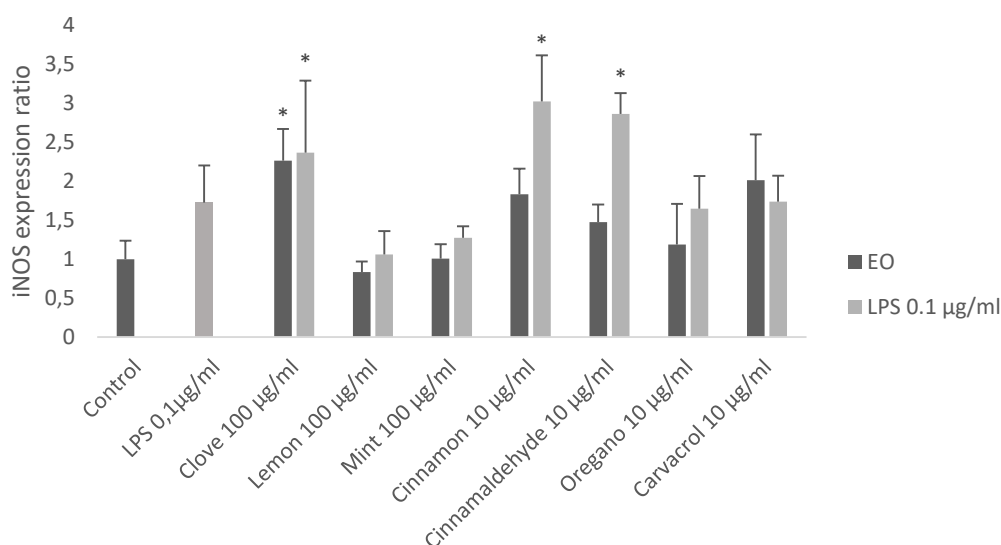


Figure 2: iNOS expression in RAW264.7 cells after 24 h pre-treatment with EO, cinnamaldehyde and carvacrol, with or without LPS. Values are means \pm SD (n=3). (*) values are significantly different from cells treated with LPS at 0.1 μ g/ml ($P < 0.05$).

The effect of EOs pre-treatment on iNOS expression has then been assessed. iNOS activation is mediated by the recognition of pathogenic specific patterns like LPS. Nitroxyde (NO) produced by this enzyme and secreted by macrophages will affect the pathogens' membrane integrity (Miguel, 2010). Again, no significant differences were observed between control cells and cells treated with 0.1 μ g/ml LPS. Lemon, mint and oregano EO with or without LPS had no significant effect on iNOS expression. Clove with or without LPS significantly enhanced the expression of iNOS when compared to control cells, with respective expression levels of 2.26 ± 0.40 and 2.36 ± 0.92 . This observation is in opposition with the inhibition of iNOS expression on RAW264.7 cells treated with eugenol, the main compound of clove EO, observed by Li et al (2006). According to our assay, clove EO is able to significantly enhance production of NO by macrophages even if phagocytosis was not modified. Cinnamon EO pre-treatment in combination with LPS also significantly enhanced the iNOS expression, with a ratio of 3.02 ± 0.59 . As the same effect was observed with cinnamaldehyde combined to LPS, we can suggest that cinnamon EO activity is supported by cinnamaldehyde. According to the absence of effect with cinnamon or cinnamaldehyde alone, it seems that cinnamon leads to a potentiation of the activation cascade implicated by the recognition of LPS by macrophages. This result contrasts with previously reported data. Indeed, in a study carried out by Kim et al. (2010), the

treatment of RAW267.4 cells with 2.6 $\mu\text{g/ml}$ cinnamaldehyde and 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS showed a 10 time inhibition on the synthesis of iNOS mRNA and also inhibited NO production. If both EOs of clove and cinnamon led to an inhibition of phagocytic activities, they could improve the macrophage efficiency by enhancing the production of toxic NO. This effect is in opposition with the proposed inhibitory activity of EOs on TLR-4 or NF- κB . Indeed, the expression of iNOS and subsequently the production of NO in macrophages are upregulated by the activation of NF- κB (Suzuki & Umezawa, 2006; Underhill & Ozinsky, 2002).

5 Inhibition of IL-6 production.

Interleukins are mediators of inflammation, produced by macrophages when pathogens are detected. They lead in the recruitment of immune cells and they promote the transition from innate to adaptive immunity (Meager & Wadhwa, 2001). The activity of EOs on IL-6 production by macrophages has been evaluated on supernatants using an ELISA assay. Concentrations of IL-6 detected after two hours of phagocytosis are presented in figure 3.

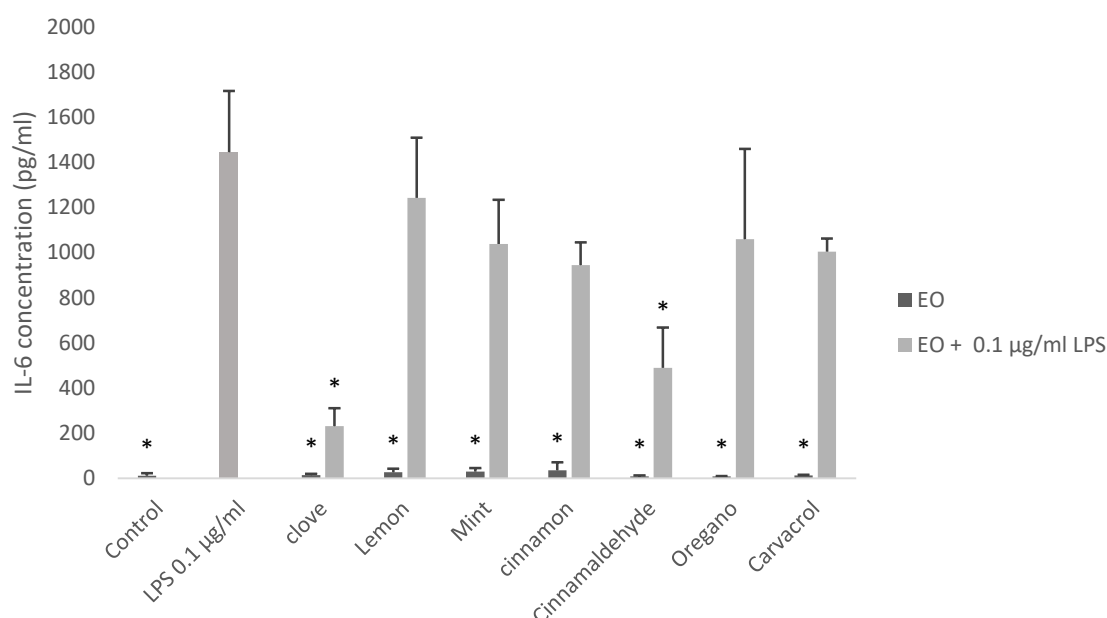


Figure 3: Concentrations of IL-6 (pg/ml) secreted by RAW264.7 cells after 24 h pre-treatment with EO, cinnamaldehyde and carvacrol, with or without LPS. Values are means \pm SD (n=3). (*) values are significantly different from cells treated with LPS at 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0.05$).

When LPS was absent from pre-treatment, only small amounts of IL-6 were produced by cells and detected. Concentrations were above the limit of detection of 31.25 pg/ml. Concentration of secreted IL-6 increased when LPS was added into the pre-treatment and reached 1444.75 ± 270 pg/ml when 0.1 $\mu\text{g/ml}$ of LPS was added. EO of lemon, mint, cinnamon and oregano and the main compound carvacrol had no significant effect on the IL-6 production induced by LPS. Clove EO and cinnamaldehyde significantly inhibited by six and three times respectively the secretion of IL-6 by the cells. Clove EO was the most active one, leading to concentration of secreted IL-6 of 231.33 ± 79.20 pg/ml. This result is in agreement with the data published by Bachiega et al. (2012) concerning the efficiency of clove and eugenol on IL-6 inhibition. The addition of 100 $\mu\text{g/well}$ of clove EO led to the reduction by 1.6 times of the IL-6 secretion when compared to LPS used alone (Bachiega et al., 2012). The addition of 10 $\mu\text{g/ml}$ of cinnamaldehyde also led to a decreased concentration of IL-6 (489.58 ± 177.60 pg/ml) when compared to LPS treated cells. This result is also in agreement with previously published data. Chao et al. (2008) showed that cinnamaldehyde at a concentration of 3.18 $\mu\text{g/ml}$ added on LPS treated cells, led to a significant decrease in IL-6 production, from 15 ng/ml to 6 ng/ml. EOs and their main compounds are known for their ability to inhibit the activation of NF- κ B, a nuclear factor involved in the secretion of cytokines. Inhibition of IL-6 secretion and the tendency of EO to inhibit phagocytosis is consistent with inhibition of this transcription factor. Clove EO and cinnamaldehyde are able to inhibit intracellular signalisation induced by PAMPs recognition in RAW264.7 cells. This inhibition could limit the propagation of inflammatory process. Moreover, EOs develop a long-lasting effect on phagocytic activity, even after their withdrawal.

Conclusion

Five essential oils and two main compounds were evaluated here for their activity on phagocytosis, iNOS expression and IL-6 secretion in RAW264.7 cells. Lemon, mint and oregano essential oils and also carvacrol did not show significant activities in these three fields. The anti-inflammatory activity of cinnamon EO and its main compound cinnamaldehyde has been assessed here. Cellular pre-treatment induced an augmentation in iNOS expression but led to a reduction of IL-6 secretion and an inhibition of phagocytosis. Clove essential oil exerted the most interesting effect, enhancing the cellular expression of iNOS and inhibiting the production of IL-6. He had also the lowest activity on phagocytosis. These results suggest that clove EO could lead to an enhanced capacity of macrophages to destroy pathogens through an improved production of NO, without implying high inflammatory rates. Moreover, this activity was observed even when the EO was removed from the cell, suggesting a long-lasting preventive activity.

Bibliography

- Ananda Baskaran, S., Kazmer, G. W., Hinckley, L., Andrew, S. M., & Venkitanarayanan, K. (2009). Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1423–9. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1384>
- Bachiega, T. F., de Sousa, J. P. B., Bastos, J. K., & Sforcin, J. M. (2012). Clove and eugenol in noncytotoxic concentrations exert immunomodulatory/anti-inflammatory action on cytokine production by murine macrophages. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(4), 610–616. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01440.x>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils--a review. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(2), 446–75. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Beningo, K. a, & Wang, Y. (2002). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 4), 849–56. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.593>
- Burt, S. A. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Chao, L. K., Hua, K.-F., Hsu, H.-Y., Cheng, S.-S., Lin, I.-F., Chen, C.-J., ... Chang, S.-T. (2008). Cinnamaldehyde inhibits pro-inflammatory cytokines secretion from monocytes/macrophages through suppression of intracellular signaling. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 220–231. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.07.016>
- De Cássia Da Silveira E Sá, R., Andrade, L. N., & De Sousa, D. P. (2013). A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*, 18(1), 1227–1254. <https://doi.org/10.3390/molecules18011227>
- Dorman, H. J., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10736000>
- Kim, B. H., Lee, Y. G., Lee, J., Lee, J. Y., & Cho, J. Y. (2010). Regulatory effect of cinnamaldehyde on monocyte/macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators*

- of Inflammation*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/529359>
- Li, W., Tsubouchi, R., Qiao, S., Haneda, M., Murakami, K., & Yoshino, M. (2006). Inhibitory action of eugenol compounds on the production of nitric oxide in RAW264.7 macrophages. *Biomedical Research (Tokyo, Japan)*, 27(2), 69–74. <https://doi.org/10.2220/biomedres.27.69>
- Meager, A., & Wadhwa, M. (2001). An Overview of Cytokine Regulation of Inflammation and Immunity. In *eLS*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0024658>
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252–87. <https://doi.org/10.3390/molecules15129252>
- Murbach Teles Andrade, B. F., Nunes Barbosa, L., da Silva Probst, I., & Fernandes Júnior, A. (2014). Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 26(1), 34–40. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.860409>
- Ooi, L. S. M., Li, Y., Kam, S.-L., Wang, H., Wong, E. Y. L., & Ooi, V. E. C. (2006). Antimicrobial Activities of Cinnamon Oil and Cinnamaldehyde from the Chinese Medicinal Herb *Cinnamomum cassia* Blume. *The American Journal of Chinese Medicine*, 34(3), 511–522. <https://doi.org/10.1142/S0192415X06004041>
- Pérez-Rosés, R., Risco, E., Vila, R., Peñalver, P., & Cañigüeral, S. (2015). Effect of some essential oils on phagocytosis and complement system activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(5), 1496–1504. <https://doi.org/10.1021/jf504761m>
- Serafino, A., Sinibaldi Vallebona, P., Andreola, F., Zonfrillo, M., Mercuri, L., Federici, M., ... Pierimarchi, P. (2008). Stimulatory effect of Eucalyptus essential oil on innate cell-mediated immune response. *BMC Immunology*, 9(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-9-17>
- Silva, N., Alves, S., Goncalves, A., Amaral, J. S., & Poeta, P. (2013). Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. *Food Science and Technology International*, 19(6), 503–510. <https://doi.org/10.1177/1082013212442198>
- Suzuki, E., & Umezawa, K. (2006). Inhibition of macrophage activation and phagocytosis by a novel NF- κ B inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(9), 578–586. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2006.07.089>

- Tung, Y.-T., Yen, P.-L., Lin, C.-Y., & Chang, S.-T. (2010). Anti-inflammatory activities of essential oils and their constituents from different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves. *Pharmaceutical Biology*, 48(10), 1130–1136. <https://doi.org/10.3109/13880200903527728>
- Underhill, D. M., & Ozinsky, A. (2002). Phagocytosis of microbes : Complexity in Action. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 825–852. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.103001.114744>
- Viuda-Martos, M., Ruiz Navajas, Y., Zapata, E. S., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour Fragr. J*, 25, 13–19. <https://doi.org/10.1002/ffj>
- Yang, S.-A., Jeon, S.-K., Lee, E.-J., Shim, C.-H., & Lee, I.-S. (2010). Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Natural Product Research*, 24(2), 140–151. <https://doi.org/10.1080/14786410802496598>

Ces premiers travaux ont permis de mettre en évidence les activités des HE sur le modèle cellulaire RAW264.7. Les HE de citron, menthe et origan, ainsi que le composé majoritaire carvacrol, ne présentaient pas d'activités significatives sur l'activité des macrophages en prétraitement avec ou sans LPS. Lorsque l'HE de cannelle et son composé majoritaire, le cinnamaldehyde étaient utilisés, une tendance à inhiber la phagocytose a été observée, bien que le résultat obtenu ne soit pas significatif. Par ailleurs, la cannelle permet d'augmenter significativement l'expression de l'iNOS dans les cellules prétraitées. Le cinnamaldehyde quant à lui, associé au LPS, inhibe significativement la sécrétion d'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire. L'HE de girofle présente les propriétés les plus intéressantes : elle n'inhibe pas la phagocytose et utilisée seule, elle tend même à l'augmenter par rapport au témoin non traité (résultat non significatif). Par ailleurs, associée au LPS elle augmente également significativement l'expression de l'iNOS par rapport au témoin LPS et inhibe la sécrétion d'IL-6.

L'utilisation de cette HE en traitement préventif permettrait donc d'améliorer la qualité de réponse des macrophages face à un pathogène, en augmentant la sécrétion de NO. Le bénéfice anti-inflammatoire de cette HE serait tout de même conservé, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire étant limitée.

2.2 Résultats complémentaires sur les mélanges

Les résultats obtenus pour les mélanges Resp1 (citron, girofle, origan, thym), Resp3 (eucalyptus, girofle, niaouli), Resp4 (cannelle, eucalyptus, menthe) et Abf1 (ail, cannelle, menthe) concernant la modulation de l'activité des macrophages sont présentés ci-dessous.

2.2.1 Modulation de la phagocytose

Les intensités de phagocytose calculées par rapport aux cellules contrôles sont présentées dans la figure 2.

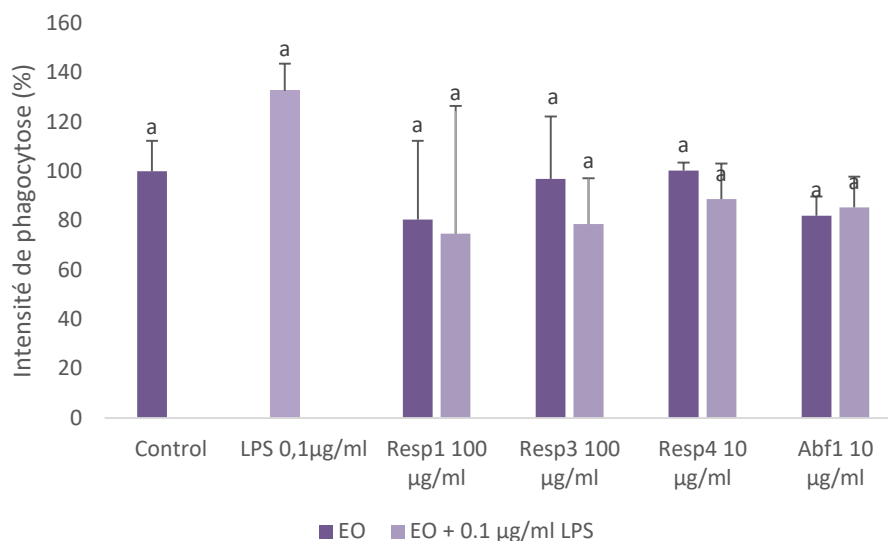


Figure 2 : Intensité de phagocytose par rapport au contrôle (cellules non prétraitées) après prétraitement par les mélanges Resp1, 3 et 4 et Abf1, avec ou sans LPS à 0,1µg/ml. « EO » correspond au traitement avec huiles essentielles. Les écarts types sont présentés par des barres positives. Les échantillons avec des lettres différentes sont significativement différents entre eux ($P < 0,05$).

Le prétraitement des cellules RAW264.7 n'a pas d'effet significatif sur leur capacité à phagocyter les particules fluorescentes. La présence ou l'absence de LPS lors du prétraitement n'a par ailleurs pas d'effet significatif sur les taux de phagocytose observés. Les fragments bactériens du produit pHrodo® contenant également des PAMP, on peut suggérer que les macrophages sont rapidement activés à leur contact ce qui rend le prétraitement aux LPS non perceptible en ce qui concerne l'activité phagocytaire. Un effet synergique entre traitement au LPS et les particules bactériennes fluorescentes sur la phagocytose a déjà été observé par Suzuki et Umezawa (2006).

La composition des mélanges n'a pas non plus d'effet significatif sur leur activité. La tendance observée consiste en une baisse de la phagocytose, lié à un effet anti-inflammatoire. Compte tenu de la complexité du mécanisme de régulation de la phagocytose, plusieurs mécanismes d'inhibition peuvent être proposés. Le dehydroxyméthylepoxyquinomicin (DHMEQ) est un composé de synthèse également capable d'inhiber l'activité des macrophages. La phagocytose en présence de ce composé a également été évaluée par un système comparable au pHrodo® par Suzuki et Umezawa en 2006. Un traitement de 2h par 10 µg/ml de DHMEQ permettait d'observer une inhibition de phagocytose chez des cellules RAW264.7 traitées au LPS. Les auteurs suggèrent que le DHMEQ interviendrait en inactivant les TLR-4 associés à la

reconnaissance du LPS, et NF- κ B (Nuclear Factor κ B) un facteur de transcription nécessaire à l'activation des macrophages (Suzuki & Umezawa, 2006). La tendance inhibitrice observée pour les HE et les mélanges suggère donc également une activité sur ces deux cibles. La capacité des HE, et notamment du cinnamaldehyde présent dans l'HE de cannelle, à inhiber l'activation de NF- κ B a déjà été répertoriée (De Cássia Da Silveira E Sá, Andrade, & De Sousa, 2013; Miguel, 2010). Cette inhibition peut intervenir en différents points de la cascade d'activation du facteur de transcription (Miguel, 2010).

2.2.2 Effet du prétraitement sur l'expression intracellulaire de l'iNOS

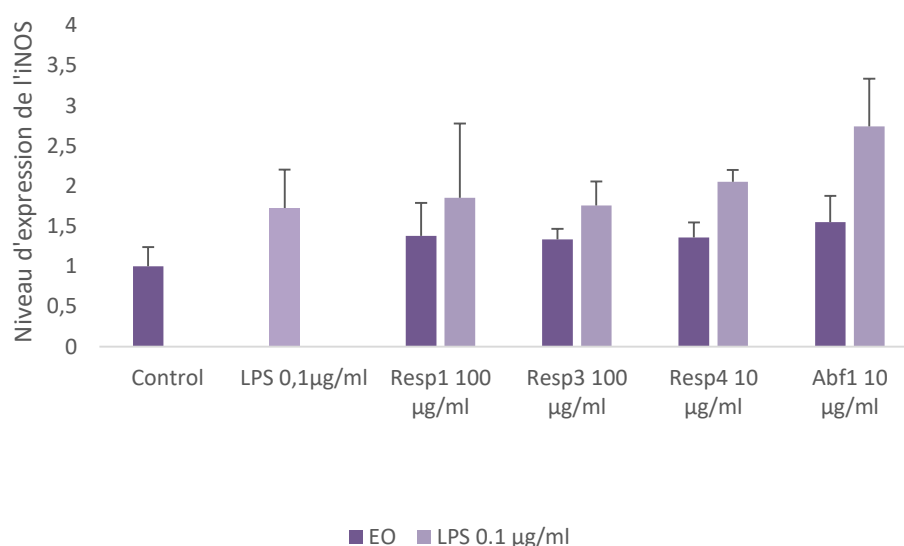


Figure 3 : Taux d'expression de l'iNOS dans les cellules après prétraitement par les mélanges Resp1, 3 et 4 et Abf1, avec ou sans LPS à 0,1 µg/ml. « EO » correspond au traitement avec huiles essentielles seules et « LPS » aux traitements avec 0,1 µg/ml et les mélanges d'huiles essentielles respectifs. Les écarts types sont présentés par des barres positives. (*) les échantillons sont significativement différents par rapport au témoin LPS ($P < 0,05$).

Contrairement aux HE de girofle et de cannelle, les mélanges ne présentent pas d'activité significative sur l'expression de l'iNOS dans les cellules prétraitées (figure 3). L'apport de LPS augmente de façon non significative l'expression de l'iNOS à un seuil de $1,72 \pm 0,47$. A nouveau, la différence entre cellules non traitées et cellules traitées avec 0,1 µg/ml de LPS n'est pas significative. L'effet des PAMP présents sur les particules bactériennes utilisées peut à nouveau être suggéré. Le mélange Abf1 en combinaison avec le LPS, permet

toutefois d'augmenter l'expression de l'iNOS à un seuil de $2,74 \pm 0,53$. Ce mélange comporte par ailleurs 33% d'HE de cannelle, qui permet à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ d'augmenter de façon significative le seuil d'expression de l'iNOS ($3,02 \pm 0,56$). L'effet de l'HE de cannelle semble donc réduit par le mélange (et donc l'effet de dilution). L'induction observée avec le mélange Abf1 (ail cannelle menthe) reste toutefois supérieure à celle du mélange Resp4 (cannelle eucalyptus menthe), contenant également 33% d'HE de cannelle, ce qui suggère un effet de l'HE d'ail. Les mélanges ne semblent donc pas augmenter la capacité des macrophages à éliminer les potentiels pathogènes par la production de superoxydes.

L'inhibiteur de la phagocytose DHMEQ présentait également une activité inhibitrice sur l'expression de l'iNOS et la production de NO lors des essais réalisés par Suzuki et Umezawa en 2006. Cette observation leur a permis de conforter l'hypothèse d'une activité de ce composé sur l'activation de NF- κ B, régulant l'expression de l'iNOS (Suzuki & Umezawa, 2006).

2.2.3 Effet du prétraitement sur la sécrétion d'IL-6

Enfin, le surnageant cellulaire obtenu après la phagocytose est analysé pour mesurer la concentration en interleukine 6 (IL-6) sécrétée par les cellules RAW264.7 au cours de la phagocytose. Les résultats obtenus pour les mélanges sont présentés dans la figure 4. En absence de LPS à 0,1 $\mu\text{g/ml}$ lors du prétraitement, les taux d'IL-6 restent significativement inférieurs à la concentration de $1444,75 \pm 270,00$ pg/ml observée pour le témoin LPS. L'effet significatif du LPS n'a pas été observé pour la phagocytose et la synthèse d'iNOS. Cela a été attribué à la présence de PAMP sur les particules pHrodo® détectés par les macrophages. Cette observation suggère que le mécanisme de sécrétion d'IL-6 est plus long à se mettre en place que la phagocytose ou la synthèse d'iNOS. Un pic de production d'IL-6 24h après l'activation des cellules RAW264.7 par le LPS a également été observé par Suzuki et Umezawa (2006).

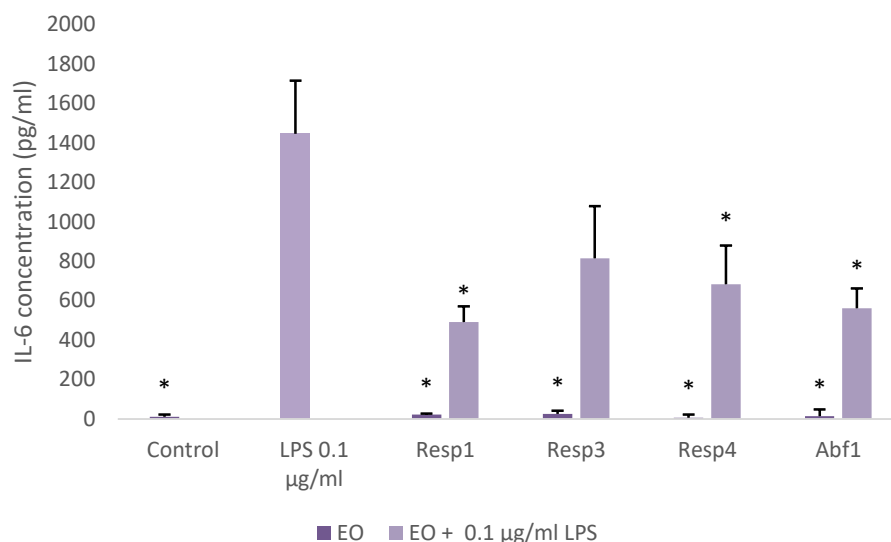


Figure 4 : Concentration en IL-6 sécrétée par les cellules RAW264.7 après prétraitement par les mélanges Resp1, 3 et 4 et Abf1, avec ou sans LPS à 0,1 µg/ml. « EO » correspond au traitement avec huiles essentielles. Les écarts types sont présentés par des barres positives. (*) les échantillons sont significativement différents par rapport au témoin LPS.

En présence de LPS à 0,1 µg/ml, les mélanges Resp1, Resp4 et Abf1 appliqués en prétraitement permettent d'inhiber significativement la concentration d'IL-6 sécrétée par rapport au LPS seul. Celles-ci sont respectivement de $491,08 \pm 53,39$ pg/ml, $683,00 \pm 22,11$ pg/ml et $561,33 \pm 276,48$ pg/ml. Ces mélanges présentent donc une activité anti-inflammatoire, réduisant la signalisation intracellulaire et le recrutement des cellules de l'immunité adaptative (Bachiega, de Sousa, Bastos, & Sforcin, 2012). Ce résultat a également été observé pour l'HE de girofle et le cinnamaldehyde. Le mélange Resp1 (citron, girofle, origan, thym) contient de l'HE de girofle, potentiellement porteuse de l'activité du mélange. La comparaison à Resp3 (eucalyptus, girofle, niaouli) qui en contient également sans présenter d'inhibition significative indique que les autres HE du mélange Resp1 sont également actives. Les mélanges Resp4 (cannelle menthe eucalyptus) et Abf1 (ail cannelle menthe) contiennent quant à eux de l'HE de cannelle, riche en cinnamaldehyde. L'activité inhibitrice supérieure d'Abf1 par rapport à Resp4 suggère à nouveau un apport d'activité dû à l'HE d'ail. Ces résultats sont en accord avec les données bibliographiques concernant les activités anti-inflammatoires des HE. Chao *et al.* (2008) ont pu montrer que le cinnamaldehyde à la concentration de 3.18 µg/ml permettait de réduire la production d'IL-6 de 15 ng/ml à 6 ng/ml.

En présence de LPS, 3 µg/ml de DHMEQ permettait également un arrêt de la sécrétion de la production d'IL-6 par les cellules RAW264.7. Cette activité a permis à Suzuki et Umezawa (2006) de confirmer l'activité de leur composé sur NF-κB et/ou le récepteur TLR-4

induisant son activation. Les résultats obtenus pour les mélanges Resp1, Resp4 et Abf1 suggèrent également une telle activité.

3 Conclusion

Contrairement à l'effet escompté, les HE et mélanges ne permettent pas d'augmenter significativement la phagocytose effectuée par les cellules RAW264.7. Toutefois l'HE de girofle permet d'augmenter significativement l'expression intracellulaire de l'iNOS, lorsque le prétraitement est effectué en présence de LPS. Cette enzyme est impliquée dans la sécrétion de NO par les cellules et son expression est induite entre autre par l'activation des récepteurs TLR-4 et de NF- κ B lors de la détection des pathogènes. Le NO implique un stress oxydant pour le pathogène provoquant son élimination. Cette HE a également démontré sa capacité à inhiber la sécrétion d'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans le recrutement des cellules de l'immunité adaptative et dans les processus inflammatoires. L'apport d'HE de girofle à titre préventif pourrait donc permettre de limiter la propagation des pathogènes, tout en évitant l'amplification de la réponse inflammatoire. La présence de NO dans l'organisme a toutefois été reliée au stress oxydant délétère (Miguel, 2010). Les propriétés antioxydantes et anti-radicalaires de l'HE de girofle, démontrées plus tôt dans les chapitres 1, 3 et 4 permettraient de rééquilibrer la balance oxydative et d'éviter les effets délétères sur les tissus.

Les activités des autres HE et mélanges concordent avec les résultats anti-inflammatoires observés généralement, bien que la phagocytose ne soit généralement pas observée directement pour les HE. En effet à notre connaissance, seule l'équipe de Serafino *et al.* (2008) a mis en évidence les effets des HE sur l'activité des macrophages en observant la phagocytose grâce à des particules fluorescentes.

La capacité des HE à inhiber les réponses induites normalement par le LPS suggère que les HE interviendraient sur le récepteur TLR-4 des cellules RAW264.7, ainsi que sur l'activation de NF- κ B. Des essais impliquant entre autres des cellules mutées sur TLR-4 ou NF- κ B permettraient de confirmer ce mécanisme d'action. Les observations réalisées dans ce chapitre confirment tout de même l'effet anti-inflammatoire des mélanges mis en évidence par le test d'inhibition de la 15-LOX. L'effet pro-phagocytaire de l'HE d'eucalyptus ayant été démontré par Serafino *et al.* (2008), un mélange enrichi avec cette HE pourrait être proposé dans le cadre de la stimulation immunitaire.

4 Bibliographie

A

Actor, J. K. (2014). *Introductory immunology: basic concepts for interdisciplinary applications*.

Aderem, A., & Underhill, D. M. (1999). Mechanism of Phagocytosis in Macrophages. *Annual Review of Immunology*, 17(1), 593–623.

B

Bachiega, T. F., de Sousa, J. P. B., Bastos, J. K., & Sforcin, J. M. (2012). Clove and eugenol in noncytotoxic concentrations exert immunomodulatory/anti-inflammatory action on cytokine production by murine macrophages. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(4), 610–616.

C

Chao, L. K., Hua, K.-F., Hsu, H.-Y., Cheng, S.-S., Lin, I.-F., Chen, C.-J., ... Chang, S.-T. (2008). Cinnamaldehyde inhibits pro-inflammatory cytokines secretion from monocytes/macrophages through suppression of intracellular signaling. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 220–231.

D

De Cássia Da Silveira E Sá, R., Andrade, L. N., & De Sousa, D. P. (2013). A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*, 18(1), 1227–1254.

M

Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252–87.

S

Serafino, A., Sinibaldi Vallebona, P., Andreola, F., Zonfrillo, M., Mercuri, L., Federici, M., ... Pierimarchi, P. (2008). Stimulatory effect of Eucalyptus essential oil on innate cell-mediated immune response. *BMC Immunology*, 9(1), 17.

Suzuki, E., & Umezawa, K. (2006). Inhibition of macrophage activation and phagocytosis by a novel NF- κ B inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(9), 578–586.

U

Underhill, D. M., & Ozinsky, A. (2002). Phagocytosis of microbes : Complexity in Action. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 825–852.



Conclusion générale et perspectives

Les huiles essentielles (HE), de par leur composition chimique variée, représentent une source importante de produits à usage préventif. Leurs activités biochimiques et biologiques ont été mises en évidence par divers tests *in vitro*. L'HE de girofle a montré une capacité à prévenir les effets délétères liés à l'inflammation, grâce à des propriétés anti-radicalaires et antioxydantes équivalentes à celle de la molécule de référence, le BHA. D'autres HE riches en composés phénoliques, telles que les HE d'origan, de thym ou de sarriette, ont également présenté des activités anti-radicalaires et antioxydantes intéressantes, alors que les HE riches en terpènes, telles que les HE de citron ou d'eucalyptus développaient des propriétés anti-radicalaires faibles, voir des activités pro-oxydantes dans le cadre de la protection des acides gras.

Le potentiel anti-inflammatoire des HE a également été établi grâce aux tests d'inhibitions enzymatiques sur la 15-lipoxygénase (15-LOX) et la phospholipase A2 (PLA2). Alors que les HE ne présentaient aucune activité inhibitrice sur la PLA2, l'ensemble des HE présentait des activités inhibitrices sur la 15-LOX, significativement supérieures à celle du composé de référence, le NDGA. Les HE sont donc de potentiels produits anti-inflammatoires, agissant en amont de la cascade signalétique, inhibant la synthèse de messagers pro-inflammatoires issus de l'oxydation des phospholipides membranaires. La différence d'activité sur les deux enzymes a été attribuée au mécanisme d'action, la PLA2 exerçant une hydrolyse alors que la 15-LOX dégrade l'acide arachidonique par voie oxydative. Cette observation permet également de faire le lien avec les activités antioxydantes des HE établies plus haut.

Concernant les activités antibactériennes, celles-ci ont été établies sur des bactéries planctoniques et des bactéries sous forme de biofilms. Les HE d'origan et de cannelle ont montré de fortes capacités à inhiber le développement des pathogènes traités ici. Concernant ces pathogènes, ils ont été isolés d'animaux malades et ne font pas partie des bactéries classiquement étudiées dans la bibliographie. Cette étude apporte donc de nouvelles données concernant les activités antibactériennes des HE, bien que leurs mécanismes d'action n'aient pas été étudiés. Plusieurs hypothèses basées sur les observations réalisées sur d'autres pathogènes (modification de la fluidité membranaire, inhibition du métabolisme) ont toutefois été apportées. Il a été intéressant de noter que les HE - et notamment la cannelle - présentaient des activités sur des bactéries connues pour leur résistance aux antibiotiques, telles que le pathogène *Pseudomonas aeruginosa*. Les concentrations actives observées étaient tout de même supérieures à celles utilisées pour les antibiotiques de référence.

Par ailleurs les HE sont aussi capables d'inhiber le développement de communautés bactériennes complexes que sont les biofilms. Les biofilms formés par *P. aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae* et *Streptococcus uberis* ont été étudiés ici. C'est d'ailleurs la première fois que l'effet d'HE sur les biofilms de ces deux streptocoques, impliqués notamment dans les mammites bovines, est caractérisé. L'activité de l'HE de cannelle à des concentrations sub-inhibitrices a été mise en évidence sur les biofilms des trois pathogènes. L'activité des HE d'origan et de tea tree, également à des concentrations sub-inhibitrices, a été caractérisée sur le biofilm de *S. agalactiae*. La présence de biofilms *in vivo* ayant été décelée dans les formes chroniques de pathologies, il est plus intéressant de viser cette forme de développement dans une optique de prévention. En effet les HE utilisées ici n'ont pas pour vocation d'être curatives.

La toxicité de l'HE d'origan a également été mesurée sur *C. elegans*, utilisé ici comme modèle d'activité nématocide.

Les essais réalisés sur le modèle de cellules macrophages RAW264.7 ont également démontré la capacité des HE à moduler la réponse inflammatoire. Si, contrairement aux activités pro-phagocytaires qui ont pu être mises en évidence dans la bibliographie, les HE ne développaient pas d'effet sur la phagocytose, elles ont montré leurs capacités à réduire la sécrétion d'IL-6 induite par le LPS. Cette observation confirme les activités anti-inflammatoires mises en évidence par le test d'inhibition de la 15-LOX. Les HE de girofle et de cannelle ont également permis d'augmenter l'expression de l'iNOS, une enzyme impliquée dans la génération de NO, utilisé par les macrophages pour la destruction des pathogènes. Ces paramètres ont été suivis conjointement grâce à la mise au point d'une méthode d'analyse à haut débit, liée à la microscopie à épifluorescence.

Suite à ces résultats, les HE ont été combinées avec pour objectif de cumuler les activités portées par les HE de manière individuelle. Ainsi, les HE de girofle, d'origan, de thym ou de sarriette ont été appliquées dans les mélanges pour leurs propriétés antioxydantes et anti-radicalaires. Les HE d'origan et de cannelle apportaient quant à elles leurs propriétés anti-pathogéniques. L'appétence est un aspect qui a également été pris en compte dans la formation des mélanges. Les formules proposées ont également été soumises aux différents essais. Cette trame allant des propriétés génériques (activités antioxydantes et anti-inflammatoires) aux plus spécifiques (ciblage de pathogènes, activités vermifuges, ...) a conduit à la sélection de mélanges spécifiques à chaque sphère, cumulant les propriétés des HE seules. Des effets de synergies ont été mis en évidence, notamment dans le cadre du traitement des biofilms de *S.*

uberis, entre les HE de cannelle, d'origan et de tea tree. Concernant les activités bactériennes, la formation de mélanges a conduit à une harmonisation des concentrations actives sur l'ensemble des pathogènes étudiés.

Les mélanges mis en avant par ces tests sont Resp1 (citron, girofle, origan, thym) et Resp4 (cannelle, eucalyptus, menthe) pour la sphère respiratoire, Dig1 (cannelle, citron, girofle, origan) et Dig3 (4/6^e d'origan, 1/6^e de cannelle et 1/6^e de girofle) pour la sphère digestive et Mam1 (cannelle origan, tea tree) dans le cadre de la prévention des mammites. Ces résultats ont été valorisés par la création des noyaux Respilor®, Digelor®, Mastilor® et Immulor®, testés *in vivo* et commercialisés par BioArmor.

De par ces essais, différentes combinaisons clés ont été mises en évidence. Il s'agit notamment :

- de l'HE de girofle, qui apporte systématiquement une activité anti-radicalaire lors de son application en mélange. Son association à l'HE d'origan permet également de potentialiser l'activité antioxydante.
- des HE de cannelle et d'origan présentant de fortes activités antibactériennes, notamment pour la cannelle, active sur l'ensemble des bactéries pathogènes étudiées.

Ces HE devraient être systématiquement incluses dans les futurs mélanges pour assurer les fonctions antioxydantes et anti-radicalaires, anti-inflammatoires et antibactériennes.

L'ensemble des résultats obtenus a également conduit à un épurement de la trame de tests suivis. En effet, le test FRAP s'est révélé peu reproductif alors que le test TBARS n'a pas pu être appliqué à l'ensemble des HE et mélanges. Ils peuvent donc être retirés au profit des test DPPH et de blanchiment du β -carotène. Le test LOX s'est révélé très peu discriminant, l'ensemble des HE et mélanges formés étant actif. Son application pourra donc être réservée aux nouvelles HE entrantes. Le test élastase visiblement peu adapté à une application aux HE pourra également être retiré.

En terme de perspectives, les mécanismes d'action impliqués dans les activités antibiofilms doivent encore être élucidés. Pour le pathogène *P. aeruginosa*, un séquençage total a été proposé. Concernant les biofilms de *S. agalactiae* et *S. uberis*, une formation en cellule a flux permettra d'appliquer une force de cisaillement afin de confirmer le mécanisme proposé, à savoir une modification de la résistance du biofilm. La formation de biofilms multi-espèces,

impliquant entre autres ces trois bactéries pourra également être réalisée, permettant ainsi de définir un modèle plus proche de la réalité. La difficulté de ce travail réside entre autre dans la différenciation des bactéries au sein du biofilm, nécessitant leur marquage par transgénèse.

Enfin, dans l'objectif de palier les variabilités dues aux difficultés de solubilisation des HE, la proposition d'un modèle unique permettant de mesurer l'ensemble des caractéristiques a également été proposée. L'organisme modèle *C. elegans* permet entre autres de mesurer les activités antioxydantes, antibactériennes et anti-colonisatrices, l'effet sur les facteurs de virulence et l'effet immuno-modulateur des HE. Ce modèle est actuellement en développement au laboratoire, notamment pour la mesure d'activités antioxydantes. Il est également adaptable aux méthodes d'analyse à haut débit qui ont déjà été valorisées dans ces travaux.

Titre : Évaluation des huiles essentielles en complémentation animale préventive

Mots clés : Huiles essentielles, antioxydant, anti-inflammatoire, antimicrobien, antibiofilm, immunomodulation

Résumé : L'usage de la phytothérapie pour la prévention de pathologies récurrentes dans les élevages s'est récemment développé. Les huiles essentielles (HE) sont des extraits végétaux complexes, constituant une source d'alternatives de par leur composition chimique variée et d'intéressantes activités biologiques.

Ce projet de thèse a été réalisé dans un contexte industriel, avec pour objectif principal la mise en évidence des propriétés des HE et de leurs mélanges par des méthodes *in vitro*. Les mélanges formés doivent permettre de cumuler les activités naturelles des HE dans les sphères respiratoires, digestives et immunitaires et dans la prévention des mammites. Une sélection en entonnoir intervient d'après une trame d'essais spécifiques à chaque sphère.

L'HE de girofle, intégrée dans les mélanges, développe d'après différentes méthodes biochimiques de fortes activités antioxydantes et anti-inflammatoires.

Les HE de cannelle et d'origan se sont illustrées pour leur capacité à inhiber le développement des pathogènes comme les bactéries sous forme planctonique ou de biofilm, les virus ou les parasites internes. Les effets sur le biofilm bactérien ont notamment été observés par microscopie confocale à balayage laser. Enfin la capacité de l'HE de girofle à moduler la réponse inflammatoire a été démontrée sur le modèle de macrophage RAW264.7. La phagocytose, l'expression de la nitroxyde synthase et la sécrétion d'interleukine-6 ont été suivis par criblage à haut débit associé à la microscopie à épifluorescence.

La caractérisation des mélanges a abouti à la formulation des noyaux Respilor®, Digelor®, Immulor® et Mastilor®, testés *in vivo* et commercialisés par BioArmor.

Title: Evaluation of essential oils for their use in preventive animal complementation

Keywords : Essential oils, antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, antibiofilm, immunomodulation.

Abstract: The use of phytotherapy for the prevention of livestock associated pathologies is increasing since recent years. Essential oils (EO) are complex plant extracts, forming a large source of alternatives due to their chemical diversity and interesting biological activities.

This project, carried out over three years and anchored in an industrial context, aims to highlight the properties of EO and their blends using *in vitro* assays. The objective is to cumulate the natural properties of EO through their blending. The prevention of respiratory and digestive tract diseases, of mastitis and the promotion of the animals' immunity are particularly targeted. A funnel selection takes place according to tests selected for their specificity to each area.

Clove EO, integrated in the mixtures, develops according to different biochemical methods strong antioxidant and anti-inflammatory activities.

EOs of cinnamon and oregano have been shown to inhibit the development of pathogens such as planktonic or biofilm embedded bacteria, viruses or internal parasites. The effects on the bacterial biofilm were especially measured using confocal laser scanning microscopy. Finally, the ability of clove EO to modulate the inflammatory response has been demonstrated on the RAW264.7 macrophage cells. Phagocytosis, the expression of Nitroxide synthase, and the secretion of interleukin-6 were followed by high content screening methods associated with epifluorescence microscopy.

The characterization of the mixtures resulted in the formulation Respilor®, Digelor®, Immulor® and Mastilor®, four blends of EO tested *in vivo* and commercialized by BioArmor.