

RETOUR D'EXPÉRIENCE SUR LA TECHNIQUE DU PHYTOGRAMME® : SENSIBILITÉ DES SOUCHES BACTÉRIENNES ISOLÉES ET LIEN AVEC L'IFTA.

Boucher S.^{1*}, Mauvisseau T.², Couriera M.³

¹LABOVET CONSEIL (Réseau Cristal), BP 539 85505 Les Herbiers cedex, France

²LABOVET CONSEIL (Réseau Cristal), 40 rue Arsène Mignen, 85140 Les Essarts, France

³VetAgro Sup - Campus vétérinaire, 1, avenue Bourgelat - 69280 Marcy l'Etoile, France

*Correspondant : s.boucher@labovet.fr

Résumé – La filière cunicole s'est engagée à diminuer de 50% l'utilisation des antibiotiques d'ici à 2025. Parmi les techniques pouvant aider à réduire la prescription d'antibiotiques, existe le phytogramme®. Il s'agit d'une méthode de test de sensibilité des bactéries par diffusion de médicaments à base d'huiles essentielles et de plantes en milieu gélosé. Les auteurs montrent que, sur un échantillon de 143 *Staphylococcus aureus* et 158 *Pasteurella multocida* isolés de lapins de chair, les bactéries peuvent être très, moyennement ou pas sensibles aux produits phytothérapeutiques testés et que cela dépend de la souche bactérienne isolée. Cela justifie l'emploi du phytogramme®. Ils ont cherché à savoir si les éleveurs ayant accès à un phytogramme® sont moins utilisateurs d'antibiotique que ceux qui n'y ont pas accès en rapprochant les IFTA (Index de fréquence des Traitements par les antibiotiques) de chaque groupe. La différence observée en faveur des possesseurs de phytogramme® sur l'échantillon étudié s'avère non significative.

Abstract –Feedback on the phytogramme® technique: sensitivity of isolated bacterial strains and link with IFTA.

The cuniculture industry is committed to reducing the use of antibiotics by 50% by 2025. Among the techniques that can help to reduce the prescription of antibiotics, there is the phytogram®. It is a method of testing the sensitivity of bacteria by diffusion of drugs based on essential oils and plants in agar medium. The authors show that on a sample of 143 *Staphylococcus aureus* and 158 *Pasteurella multocida* isolated from rabbits, bacteria can be very, moderately or not sensitive and that it depends on the isolated bacterial strain. This justifies the use of the phytogram® method. They investigated whether breeders with access to a phytogram® are less likely to use antibiotics than those who do not have access to it by bringing the IFTA closer to each group. The difference observed in favor of the phytogramme® owners on the sample studied proves to be insignificant.

Introduction

La filière cunicole s'est engagée à diminuer de 50% l'utilisation des antibiotiques d'ici à 2025. Bien avant le plan écoantibio 2017 qui visait à réduire de 25% cette même utilisation jusqu'en 2017, les vétérinaires de la filière, conscients de l'utilisation importante des antibiotiques en cuniculture, ont cherché des solutions alternatives permettant néanmoins de prévenir et traiter les maladies bactériennes. Plusieurs pratiques comme le recours à des autovaccins ou à une meilleure gestion zootechnique de l'élevage, peuvent limiter l'apparition des troubles bactériens. Néanmoins, lorsque l'affection se déclare, nous avons besoin de solutions alternatives ayant une activité antibactérienne.

La technique d'aromatogramme décrite par Belaiche en 1979 permet de choisir les huiles essentielles ayant le plus grand diamètre d'inhibition pour une bactérie

donnée. Le Phytogramme® est une technique dérivée utilisant des mélanges d'huiles essentielles et d'extraits de plantes. Il permet de tester la sensibilité des bactéries à un produit complexe.

Après une phase de mise au point en 2014 et 2015, cette technique a été systématiquement proposée aux cuniculteurs qui venaient aux laboratoires formés à la technique du Phytogramme® pour effectuer un antibiogramme sur une bactérie pathogène de lapin (Boucher et Mauvisseau, 2015).

L'article proposé ici fait le point sur ce retour d'expérience, évalue l'efficacité des produits référencés et étudie la corrélation existant entre la réalisation d'un phytogramme® dans un élevage et l'utilisation quantitative d'antibiotique dans ce même élevage.

1. Matériel et méthodes

1.1. Echantillons biologiques

Les phytogrammes® que nous avons pris en compte pour l'étude ont été réalisés dès 2015 et jusqu'en mai 2017 sur les bactéries isolées de 199 élevages souhaitant participer. Les éleveurs apportaient 4 lapins présentant des signes cliniques de staphylococcie et/ou de pasteurellose (jetage, pododermatite, abcès, dyspnée), une autopsie était réalisée et si les lésions confirmaient la maladie, un examen bactériologique sur les organes lésés était mis en œuvre selon les règles de bactériologie systématique définies par le laboratoire accrédité COFRAC.

1.2. Produits testés

L'essai a été conduit directement sur des mélanges d'huiles essentielles (produits notés A à F) – tels qu'ils se présentent dans les spécialités finales commercialisées - car l'association de plusieurs huiles essentielles peut modifier les chémotypes de base, certains composants d'une huile essentielle pouvant réagir avec d'autres composants d'une autre huile essentielle pour former des molécules ayant des actions synergiques ou antagonistes, comme pour les antibiotiques (Lequeux et Boutin 2013, Civam Adage 2014). La sélection des produits à tester est issue d'une première étude nous ayant permis de définir quels produits disponibles autorisés sur le marché français étaient les plus actifs sur les staphylocoques et pasteurelles pathogènes chez le lapin (Boucher et Mauvisseau 2015).

1.3. Méthode du Phytogramme®

La méthode du phytogramme® a été mise au point par RESALAB en 2014. C'est une méthode de diffusion en milieu gélosé à partir d'un puits de 6mm de diamètre contenant 50 µl de la solution à tester. Le phytogramme® est réalisé à partir d'une souche bactérienne identifiée par un examen bactériologique classique. Chaque souche est mise en suspension dans 3 ml d'eau. La gélose, au préalable creusée du nombre de puits recevant chacune une spécialité différente, est ensuite ensemencée par écouvillonnage croisé à partir de cet inoculum. Chaque puits reçoit ensuite 50 µl de la solution à tester. Les géloses imprégnées et ensemencées sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures +/- 4h. Le type de gélose peut varier en fonction des différentes bactéries testées. Chaque solution est testée pure et diluée à 50 % afin d'apprécier l'effet de la diminution de la concentration du produit sur la bactérie. La diffusion de l'huile essentielle à partir du puits dans la gélose peut inhiber la pousse de la bactérie en faisant apparaître un halo de diamètre plus ou moins grand. La mesure de ce diamètre est réalisée au moyen d'un pied à coulisse. Lorsqu'il n'y a pas de halo, la pousse de la bactérie n'est pas inhibée et donc le diamètre d'inhibition est de 6mm (diamètre du puits). Plus le

diamètre est important plus l'action inhibitrice du mélange sur la bactérie est élevée.

1.4. AntibioGramme

Les antibioGrammes ont également été réalisés sur ces bactéries et l'ensemble des résultats ont été fournis à l'éleveur et au technicien qui le suit.

1.5. Exploitation statistique des données

A partir de ces analyses, nous avons cherché à savoir si un éleveur ayant reçu un phytogramme puis des conseils sur l'utilisation de produits antibactériens phytothérapeutiques en plus de son antibioGramme habituel avait tendance à moins utiliser d'antibiotique. Pour cela, nous avons recueilli lorsque cela était possible les prescriptions d'antibiotiques que ses lapins recevaient (via l'eau de boisson, l'aliment ou en injection). A partir de ces données, nous avons calculé les IFTA de tous les élevages sur les années 2015, 2016. L'IFTA est la somme du nombre de jours de traitement sur la période de référence / durée de la période, soit :

$$\text{IFTA} = \frac{\sum (\text{nb de principes actifs utilisés} \times \text{nb jours de traitement})}{\text{durée de la période de référence}}$$

Pour les femelles reproductrices, la période de référence est le cycle de reproduction (IFTAr), tandis que pour les lapereaux en croissance, la période de référence est la durée de vie de l'animal (IFTAc). (Fortun-Lamothe 2011).

Ces données ont été comparées par un test de Student aux valeurs des indicateurs IFTAr et IFTAc nationaux sur 2015, 2016 et aux valeurs des IFTAr et IFTAc obtenus sur les élevages n'ayant pas reçu de phytogramme.

2. Résultats et discussion

2.1. Résultats

Au total, nous avons réalisé, sur les bactéries isolées de lapins malades, 143 phytogrammes® sur *Staphylococcus aureus*, 158 sur *Pasteurella multocida* (figures 1 et 2). Les six produits (notés A à F) retenus pour l'étude sont en moyenne tous potentiellement actifs sur les bactéries étudiées dans l'échantillon.

On note globalement que les pasteurelles sont plus sensibles aux différents produits que les staphylocoques. Le maximum du diamètre d'inhibition (60 mm) pour une souche de *Pasteurella multocida* est obtenu avec le produit D.

Certaines souches de bactéries semblent résistantes à certains produits dont les minima de diamètre indiquent 6 mm. C'est encore pour les staphylocoques que le score le plus faible est atteint.

Deux produits semblent globalement plus actifs sur les staphylocoques (produit B et F) alors que le produit D est plus actif sur *Pasteurella multocida* (avec une bonne sensibilité pour B et F).

Figure 1 : minimum, moyenne et maximum du diamètre d'inhibition (en mm) pour *Staphylococcus aureus* pour chacun des produits étudiés par la technique du phytogramme®

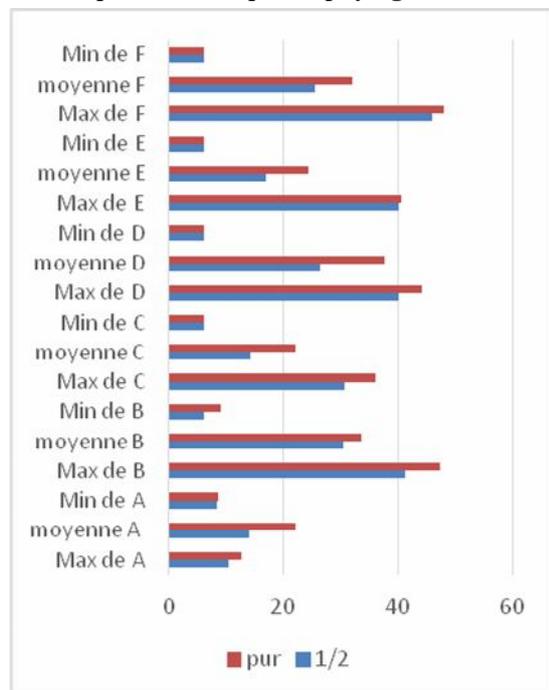
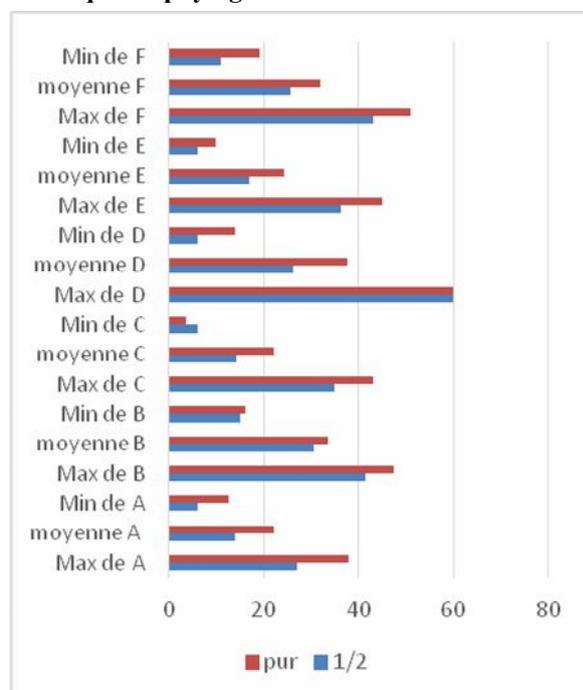


Figure 2 : minimum, moyenne et maximum du diamètre d'inhibition (en mm) pour *Pasteurella multocida* pour chacun des produits étudiés par la technique du phytogramme®



En ce qui concerne les IFTAr et IFTAc, le tableau ci-dessous résume les valeurs trouvées :

Tableau 1 : IFTAr et IFTAc calculés en fonction du groupe d'appartenance des éleveurs (avec ou sans phytogramme® et conseils)

année	Elevés avec phytogramme®		Elevés sans phytogramme®		Moyenne nationale	
	IFTAr	IFTAc	IFTAr	IFTAc	IFTAr	IFTAc
2015	0,54	0,32	0,63	0,35	0,72	0,37
2016	0,59	0,27	0,62	0,32	0,72	0,36

On observe que les éleveurs de notre échantillon qui ont reçu la possibilité de traiter avec des produits phytothérapeutiques (présence de phytogramme® et de conseils d'utilisation via la prescription) ont des IFTAr et IFTAc moins élevés que ceux qui n'en ont pas eu la possibilité (tableau 1). Par rapport aux valeurs nationales, ces éleveurs ont également des valeurs d'IFTA moins élevées (Cadudal com. perso).

2.2. Discussion

On note que, si un produit est globalement actif sur une espèce de bactérie, certaines souches, comme pour les antibiotiques, sont résistantes à certains produits. Cela confirme l'utilité du phytogramme® pratiqué systématiquement au laboratoire sur les bactéries issues de lapins malades.

Il n'est pas possible de prescrire un produit « universel », même en raisonnant par espèce bactérienne.

L'étude proposée ici évalue l'efficacité de produits référencés mais il faut savoir que ces produits sont issus d'un choix car, au début du référencement, nous avons dû éliminer 80% des produits pourtant proposés sur le marché à cause du manque d'efficacité *in vitro* (Boucher et Mauvisseau, 2015).

Les principaux mélanges utilisés ont été sélectionnés à partir d'huiles essentielles ayant une activité antibactérienne. Ces mélanges, notamment parce qu'ils contiennent aussi des extraits de plantes, peuvent avoir des propriétés thérapeutiques autres telles que les actions détoxifiante, drainante, mucolytique ou encore stimulante de l'immunité qui ajoutent à leur pouvoir curatif (Boucher et Mauvisseau 2015). Le choix du traitement doit être fait en tenant compte aussi des propriétés annexes des huiles essentielles qui peuvent être très importantes dans la guérison de l'animal.

On se rend compte que l'éleveur qui a accès à un phytogramme® et à une prescription possible de produit phytothérapeutique ciblée (et potentiellement efficace) est moins utilisateur de produits antibiotiques qu'un éleveur dont les prescriptions sont plus classiquement orientées vers l'antibiothérapie. A première vue, on pourrait supposer une différence en faveur des éleveurs disposant d'un phytogramme®,

ces derniers ayant des IFTA plus bas que les autres. Cependant, un test de Student montre que ces valeurs IFTAr et IFTAc ne sont pas significativement différentes, que l'éleveur ait eu ou pas accès au phytogramme® ($p > 0,05$).

L'utilisation du phytogramme® s'est généralisée à partir de 2016 sur notre clientèle. Il serait sans doute très intéressant de pouvoir refaire ce type de comparaison en prenant en compte les prescriptions de produits phytothérapeutiques comparativement à 2015 et 2016, l'échantillon plus grand devenant alors peut-être significativement différent.

Conclusions

La filière souhaite limiter l'usage des antibiotiques et nous avons pensé que, parmi d'autres solutions, l'utilisation des produits à base d'huiles essentielles et d'extraits de plantes pouvait être utile. Pour cela, il fallait encore pouvoir assurer l'efficacité d'un produit sur les bactéries isolées, nombre de traitements phytothérapeutiques supposés actifs dans la littérature n'ayant pas d'activité sur une souche donnée de bactérie. Cela semble se confirmer. L'utilisation du phytogramme® permet non seulement de choisir parmi les produits disponibles sur le marché ceux qui présentent un réel intérêt mais il permet aussi pour un élevage donné de prescrire un produit actif sur les bactéries isolées.

Remerciements

Les auteurs remercient l'ensemble du personnel des laboratoires du réseau RESALAB pour la transmission de leurs données et en particulier Martine Martineau pour son travail de collecte.

Références

- Belaiche P. « Traité de phytothérapie et d'aromathérapie » Paris Editions Masson 1979.
- Boucher S., Mauvisseau T., 2015. Sensibilité de *Pasteurella multocida* et de *Staphylococcus aureus* isolés sur des lapins de chair (*Oryctolagus cuniculus*) à des solutions phyto-aromathérapeutiques à l'aide de la technique du Phytogramme®. Journées de la Recherche cunicole Le Mans 24 et 25 novembre, 39-42.
- Cadudal F., 2017 (communication personnelle)
- CIVAM ADAGE 2014. « Acte du colloque 24 mars 2014 Agrocampus Ouest-Rennes Retour de 6 années d'expérimentation avec les huiles essentielles sur les bovins ».
- Fortun Lamothe L., Courtadon H., Croisier A., Gidenne T., Combes S., Le Bouquin S., Chauvin C., 2011. L'index de traitement par les antibiotiques (IFTA) : un indicateur de durabilité dans les élevages. 14^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, 22-23 Novembre 2011, 135-138.
- Lequeux G., Boutin M., 2013 « Aromatogramme : Mise en place d'une méthodologie. Résultats préliminaires sur des souches de mammites bovines » Journées Nationales GTV Nantes 2013