

# Le thymol, le carvacrol et l'eugénol réduisent la croissance d'*Escherichia coli* K88 et l'expression des gènes de virulence *in vitro*

Andrea BONETTI (1), Benedetta TUGNOLI (2), Roberto MANINI (2), Barbara ROSSI (2), Giulia GIOVAGNONI (1),  
Andrea PIVA (1,2), Ester GRILLI (1,3)

(1) Université de Bologne, DIMEVET, via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano dell'Emilia (Bologne), Italie ; (2) Vetagro S.p.A.,  
via Porro 2, 42124 Reggio Emilia, Italie ; (3) Vetagro Inc., 116 W. Jackson Blvd., Suite #320, Chicago IL 60604 - USA

roberto.manini@vetagro.com

## Thymol, carvacrol, and eugenol reduce *E. coli* K88 growth and virulence gene expression *in vitro*

In a global context of ever-expanding antimicrobial resistance, antibiotics (AB) are losing their efficacy against *Escherichia coli* K88, the main etiological agent of post-weaning diarrhea (PWD). Currently, nature-identical compounds (NIC) are finding a central role in infection management for their recognized antimicrobial activity. In this study, we first investigated the susceptibility of a field strain of *E. coli* K88 to a panel of AB and NIC by assessing the minimum inhibitory concentration (MIC) using the microdilution method. Growth of *E. coli* K88 was not affected by amoxicillin, ampicillin, lincomycin, neomycin, or penicillin G up to 64 mg/L, while doxycycline and colistin inhibited bacterial growth at 32 and 4 mg/L, respectively. Among NIC, MICs were 1.87 mM for thymol and carvacrol and 3.75 mM for eugenol. Second, we evaluated via RT-qPCR the ability of sublethal doses of colistin, doxycycline, thymol, carvacrol, and eugenol to modulate the *in vitro* expression of *E. coli* K88 virulence genes involved in adhesion to enterocytes, toxins secretion, motility and quorum sensing. The analysis revealed that thymol, carvacrol, and eugenol – like doxycycline and colistin – were able to downregulate ( $P < 0.05$ ) the expression of bacterial genes related to motility (*motA*), adhesion to enterocytes (*faeG*), toxin secretion (*eltA*, *eltB*, *estA*, *estB*), and quorum sensing (*luxS*). Therefore, we demonstrated that the selected NIC not only control the growth of *E. coli* K88 but also modulate the expression of virulence genes at sublethal doses, thus offering new insights into their mechanism of action and suggesting bacterial virulence as a novel approach against PWD.

## INTRODUCTION

La diarrhée post-sevrage (PWD) est l'un des principaux problèmes de l'industrie de l'élevage porcin, ce qui entraîne des pertes économiques importantes. Son apparition est principalement associée à *Escherichia coli* K88, qui déploie ses adhésines fimbriales pour coloniser la surface de l'épithélium intestinal des porcelets. Le cœur de sa pathogénicité réside dans la production de toxines thermolabiles et thermostables qui provoquent la formation de diarrhée en déclenchant une sécrétion sévère d'électrolytes et d'eau dans la lumière intestinale du porc (Dubreuil *et al.*, 2016).

L'expansion continue de la résistance aux antibiotiques met en danger l'efficacité des antibiotiques conventionnels (AB) contre la PWD. La recherche se concentre désormais sur la découverte d'alternatives pour gérer les infections bactériennes intestinales. Une classe de molécules prometteuse est représentée par les composés identiques aux composés naturels (NIC), grâce à leur effet antibactérien reconnu contre plusieurs pathogènes (Rossi *et al.*, 2020).

Le but de cette étude était d'évaluer la sensibilité *in vitro* d'une souche de terrain d'*E. coli* K88 à certains AB et NIC. De plus, nous avons étudié comment les mêmes molécules pourraient affecter l'expression des gènes de virulence d'*E. coli* K88.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Dosages de concentration minimale inhibitrice (CMI) et de concentration bactéricide minimale (CBM)

Les valeurs CMI et CBM d'*E. coli* K88 ont été déterminées en présence de plusieurs concentrations d'AB (0,5-64 mg/L) et de NIC (0,12-15 mM) en utilisant la méthode de micro dilution. La souche bactérienne ( $10^5$  CFU/mL) a été incubée pendant 24 heures à 37 °C avec les substances testées. Après incubation, l'absorbance de la plaque (630 nm) a été mesurée au spectrophotomètre pour évaluer la croissance bactérienne. La valeur CMI a été définie comme la concentration de substance la plus basse capable de donner une absorbance = 0 après 24 heures d'incubation. Pour évaluer le CBM, des échantillons de puits limpides ont été étalés sur de la gélose BHI. Le CBM a été défini comme la concentration la plus basse des composés testés capables d'éviter la récupération de colonies bactériennes après une incubation d'une nuit à 37 °C.

### 1.2. Analyse de l'expression génique

L'expression génique a été réalisée sur des bactéries incubées pendant 4 heures avec des concentrations sous-CBM (la moitié du CBM) de thymol, carvacrol, eugénol, doxycycline et colistine. Après incubation, les bactéries ont été récoltées et leur ARNm

a été extrait et purifié. Le rendement et la qualité de l'ARNm ont été vérifiés par spectrophotométrie, puis 400 ng ont été transcrits en sens inverse. L'ADNc résultant a été utilisé pour l'analyse de qPCR. La spécificité de chaque réaction a été validée par une analyse de la courbe de fusion. L'expression génique a été normalisée en utilisant deux gènes de référence (*ihfB* et *rrsA*) et des changements relatifs dans l'expression génique calculés en utilisant la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak et Schmittgen, 2001).

## 1.2. Analyse statistique

Les données sont présentées sous la forme de moyenne  $\pm$  SEM (trois répliques). Elles ont été analysées avec une ANOVA unidirectionnelle, suivie d'un test post-hoc de Tukey (Graph Pad Prism 6). Les différences ont été jugées significatives à  $P < 0,05$ .

## 2. RESULTATS

### 2.1. Dosages CMI et CBM

*E. coli* K88 s'est révélé résistant à l'amoxicilline, à l'ampicilline, à la lincomycine, à la néomycine et à la pénicilline G jusqu'à 64 mg/L. Les valeurs CMI et CBM pour la doxycycline étaient respectivement de 32 mg/L et 64 mg/L, tandis que pour la colistine, les deux coïncidaient à 4 mg/L. Parmi les NIC, le thymol et le carvacrol se sont avérés les plus efficaces, avec des valeurs de MIC et de MBC à 1,87 mM, tandis que l'eugénol a inhibé la croissance bactérienne à 3,75 mM (tableau 1).

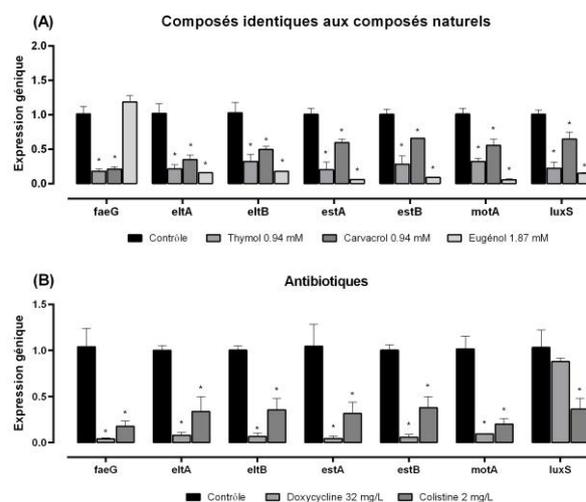
**Tableau 1** – Valeurs CMI et CBM pour tous les AB et NIC<sup>1</sup> testés

AB			NIC		
Substance	CMI	CBM	Substance	CMI	CBM
Amoxicilline	>64	>64	Carvacrol	1,87	1,87
Ampicilline	>64	>64	Eugénol	3,75	3,75
Colistine	4	4	Thymol	1,87	1,87
Doxycycline	32	64			
Lincomycine	>64	>64			
Néomycine	>64	>64			
Pénicilline G	>64	>64			

<sup>1</sup>Concentrations en mg/L pour AB ; concentrations en mM pour NIC

### 2.1. Analyse de l'expression génique

La doxycycline et la colistine ont régulé à la baisse tous les gènes analysés, à la seule exception de *luxS*, dont le niveau n'a pas été affecté par la doxycycline. Tous les NIC testés ont réduit de manière significative les niveaux d'ARNm des gènes de virulence d'*E. coli* K88, à la seule exception de la *faeG* pour l'eugénol ( $P > 0,05$ ) (figure 1).



**Figure 1** – Effet de AB et NIC sur les niveaux d'expression relatifs des gènes de virulence d'*E. coli* K88 impliqués dans l'adhésion cellulaire (*faeG*), la toxine thermolabile (*eltA* et *eltB*), les toxines thermostables (*estA* et *estB*), la motilité (*motA*), et le quorum détection (*luxS*). Les données sont exprimées sous forme de moyennes ( $n = 3$ ) et SEM représentées par des barres verticales. Entre chaque substance les colonnes avec des astérisques étaient significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

## 3. DISCUSSION ET CONCLUSION

Alors que les antibiotiques représentent toujours une stratégie majeure dans la gestion des infections, notre souche de terrain *E. coli* K88 a montré un large spectre de résistance à de nombreux antimicrobiens. La souche n'était sensible qu'à la colistine et à la doxycycline, qui pouvaient également réprimer la virulence de la bactérie, en particulier sa motilité, ses fonctions adhésives et la production de toxines.

De nombreuses études signalent en permanence des profils de résistance croissants chez les espèces pathogènes d'*E. coli* isolées chez les porcs, ce qui indique que de nouvelles stratégies pour gérer les infections bactériennes sont nécessaires. Notre étude a prouvé que des NIC sélectionnés tels que le thymol, le carvacrol et l'eugénol peuvent contrôler efficacement la croissance d'*E. coli* K88.

Les NIC peuvent également moduler avec succès la virulence d'*E. coli* K88 : les niveaux d'expression de tous les gènes de virulence étudiés ont été considérablement réduits par les NIC, le thymol et le carvacrol étant les plus efficaces. La structure similaire du thymol, du carvacrol et de l'eugénol à celle des antibiotiques comme la colistine et la doxycycline pourrait suggérer un mécanisme d'action partagé qui entraîne une altération du métabolisme bactérien et des fonctions de virulence (Giovagnoni *et al.*, 2019).

Nos données proposent la virulence bactérienne comme cible pionnière contre l'infection à l'*E. coli* K88 et suggèrent les NIC comme une nouvelle approche thérapeutique pour gérer la PWD chez les porcelets.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dubreuil J.D., Isaacson R.E., Schifferli D.M., 2016. Animal Enterotoxigenic Escherichia coli. *EcoSal Plus*, 7, 1-47.
- Giovagnoni G., Tugnoli B., Piva A., Grilli E., 2019. Organic Acids and Nature Identical Compounds Can Increase the Activity of Conventional Antibiotics Against Clostridium Perfringens and Enterococcus Cecorum In Vitro. *J. Appl. Poult. Res.*, 28, 1398-1407.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 25, 402-408.
- Rossi B., Toschi A., Piva A., Grilli E., 2020. Single components of botanicals and nature-identical compounds as a non-antibiotic strategy to ameliorate health status and improve performance in poultry and pigs. *Nutr. Res. Rev.*, 1-17.