



DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

DJILALI ASMAA

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Transformation et Production Laitières

THÈME

**Etude expérimentale de l'effet thérapeutique
de l'huile essentielle du Thym contre
les infections mammaires par *Staphylococcus
aureus***

Soutenu publiquement le 10 /07/2019

DEVANT LES MEMBRES DU JURY

Président Dr BOUCHERF Djillali

Docent A U.Mostaganem

Examineur Dr TAHALAITI

Maître Assistante A U.Mostaganem

Encadreur Dr RECHIDI SIDHOUM Nadra

Maître Assistante A U.Mostaganem

Co-encadreur Dr DAHOU A. El-Amine

Maître Assistant A U. Mostaganem

Travail réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animales « L.S.T.P.A »

Année Universitaire 2018-2019

Remerciements

«Je tiens à remercier Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail ».

Je tiens avant tout à exprimer mes remerciements les plus sincères et ma reconnaissance la plus respectueuse et infinie à mes encadrateurs

Dr RECHIDI SIDHOUM Nadra et Dr DAHOU A. El-AMINE, pour leur suivi, leur patience, leur compréhension et leurs précieux conseils à la bonne réalisation de ce mémoire.

Mes vifs remerciements pour les membres du jury à commencer par Dr BOUCHERF .D l'Université de Mostaganem, pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail en acceptant de présider ce jury.

Très reconnaissante envers Dr TAHLAITI, Maître Assistante à l'Université de Mostaganem, de m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail

Je remercie également à BENHARAT. N technicien du Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animales de l'Université Abdelhamid Ben Badis de Mostaganem.

Je remercie également ceux et celles qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci à tous...

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail qui est le fruit récolté après tant d'années d'efforts :

A mon très cher papa, pour ses précieux conseils et encouragements, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.

A ma très chère Maman et meilleure amie, qui a œuvré pour ma réussite, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.

A mes frères, ma Chérie la petite sœur, NOUR ELHOUDA, à ma Chérie AMANI, a SABAH, et toute ma famille.

A ma tante HALIMA, mes cousines MANEL et FATIMA, à mes chères amies : SOUHILA, CHERIFA, pour leur précieux aide et encouragements pour mon travail.

A mes camarades de la spécialité Production et Transformation Laitière avec lesquels j'ai passé un agréable stage.

Résumé

Une mammite peut être définie comme une inflammation de la glande mammaire entraînant une perte de fonction ou de la production laitière. La lutte contre les mammites passe d'une part, par la prévention et d'autre part par leur traitement. Les antibiotiques sont ainsi classiquement utilisés pour lutter contre les affections mammaires. Actuellement, la réduction de l'utilisation des antibiotiques est un enjeu majeur. Ainsi, l'évaluation comparative *in vitro* de l'activité anti-bactérienne sur *Staphylococcus aureus* d'origine clinique et de référence ATCC6538 a été réalisée par la méthode de diffusion par disque sur gélose, en utilisant l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* (70/30) déposées à la surface gélosée par un écouvillon stérile la comparaison d'efficacité est effectuée par rapport aux antibiotiques. L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a un effet prouvé *in vitro* sur la bactérie isolée de mammites et de référence. Les résultats ont montré que les extraits de thym ont une bonne activité inhibitrice à une concentration de 6 µl étalée par un traitement expérimental sur quatre fois (1.5 µl x 4) sur les souches bactérienne *S.aureus* de référence ATCC6538 et *S. aureus* de Clinique, et l'absence d'activité inhibitrice pour les doses de 2 µl et 4 µl. Ces résultats expérimentaux semblent indiquer que l'on peut remplacer les antibiotiques par l'huile essentielle de thym pour traiter les infections mammaires dues *Staphylococcus aureus* à condition de respecter le principe de l'activité inhibitrice basée sur la nature et la dose de la substance active présente dans les extraits.

Mots clés : Mammite ; Activité anti-bactérienne ; Huile essentielle ; *Thymus vulgaris* ; *Staphylococcus aureus*.

ملخص

ممکن تعريف التهاب الضرع على أنه التهاب في الغدة الثديية مما يؤدي إلى فقدان الوظيفة أو إنتاج الحليب. تمر مكافحة التهاب الضرع من ناحية بالعلاج ومن ناحية أخرى بالوقاية . وبالتالي تستخدم المضادات الحيوية بشكل تقليدي لمحاربة أمراض الثدي. حاليا ، الحد من استخدام المضادات الحيوية هو قضية رئيسية. وهكذا ، تم إجراء طريقة التقييم المقارن في المختبر للنشاط المضاد للبكتيريا على المكورات العنقودية الذهبية والمرجعية السريرية عن طريق نشر قرص أجار ، باستخدام الزيت الأساسي في الغدة الصعترية ترسب على سطح أجار بواسطة مسحة للزيوت الأساسية في المختبر على بكتيريا التهاب ,معقمة ، تتم مقارنة الفعالية فيما يتعلق بالمضادات الحيوية الضرع المعزولة. أظهرت النتائج أن مستخلص الزعتر كان له نشاط تثبيطي جيد على سلالات المكورات العنقودية الذهبية. تشير هذه النتائج التجريبية إلى أنه يمكن تعويض المضادات الحيوية بزيت الأساسي لنبات الزعتر لعلاج التهابات المكورات العنقودية ، شريطة احترام مبدأ النشاط التثبيطي المستند إلى طبيعة وجرعة المادة الفعالة.

الكلمات الرئيسية: التهاب الضرع. النشاط المضاد للبكتيريا ؛ الزيت العطري ؛ الغدة الصعترية الشائع. المكورات العنقودية الذهبية

Abstract

Mastitis can be defined as inflammation of the mammary gland resulting in loss of function or milk production. The fight against mastitis passes on the one hand, by prevention and on the other hand by their treatment. Antibiotics are thus conventionally used to fight against breast diseases. Currently, reducing the use of antibiotics is a major issue. Thus, the in vitro comparative evaluation of the anti-bacterial activity on clinical and reference *Staphylococcus aureus* ATCC6538 was carried out by the agar disk diffusion method, using the essential oil of *Thymus vulgaris* (70). / 30) deposited on the agar surface by a sterile swab the comparison of effectiveness is made with respect to antibiotics. The essential oil of *Thymus vulgaris* has a proven effect in vitro on the isolated bacterium of mastitis and reference. The results showed that the thymont extracts had a good inhibitory activity at a concentration of 6 .mu.l spread by a four-fold experimental treatment (1.5 .mu.l x 4) on the *S. aureus* clinical reference strains ATCC6538 and *S. aureus* of Clinique, and the absence of inhibitory activity for the doses of 2 µl and 4 µl. These experimental results suggest that antibiotics can be substituted for thyroid essential oil to treat *Staphylococcus aureus* breast infections, provided that the principle of inhibitory activity based on the nature and dose of the active substance is respected present in the extracts.

Key words: Mastitis; Anti-bacterial activity; Essential oil; *Thymus vulgaris*; *Staphylococcus aureus*.

Table des matières

Résumé

ملخص

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....9

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre I. Infections mammaires à *staphylococcus aureus*..... 11

1. Généralité 11
2. Réservoir bactériennes..... 11
3. Classification des mammites 12
 - 3.1. Mammite clinique 12
 - 3.2. Mammite subclinique..... 12
4. Anatomie de la mamelle 12
5. Processus infectieux 17
6. Protections naturelles de la glande mammaire 17
7. Caractérisation *Staphylococcus aureus* 20
 - 7.1. Définition..... 20
 - 7.2. Historique..... 20
 - 7.3. Habitat..... 20
 - 7.4. Classification de souches bactériennes testées 21
 - 7.5. Etude bactériologique..... 21
 - 7.6. Caractères biochimiques 23
 - 7.7. Diagnostic bactériologique..... 26

Chapitre II. Antibiotiques 28

1. Généralité 28
2. Familles des antibiotiques 28

2.1. Aminosides.....	28
2.2. Bêta-lactamines	28
2.3. Cyclines.....	29
2.4. Glycopeptides.....	29
2.5. Macrolides.....	30
2.6. Nitrofuranes et nitroimidazoles.....	30
2.7. Quinolones.....	31
2.8. Phénicolés.....	31
2.9. Polypeptide.....	31
2.10. Sulfanilamide.....	32
2.11. Lysocine E.....	32
3. Résistance aux antibiotiques utilisés dans le traitement des mammites	33
3.1. Résistance naturelle et résistance acquise	33
3.2. Résistance acquise.....	34
4. Classification et le mode d'action des antibiotiques.....	35
5. Méthodes pour limiter l'antibiorésistance	36
6. Microorganismes producteurs d'antibiotiques	37
Chapitre III. Plantes aromatiques et médicinales.....	38
1. Généralités	38
2. Méthodes de production et d'extraction	38
3. Huiles essentielles en santé animale	40
3.1. Généralités sur les huiles essentielles.....	40
3.2. Voies d'administration	41
3.3. Activité antibactérienne et mécanismes d'action des huiles essentielles	42
3.4. Huiles essentielles du Thym.....	43
3.4.1. Origine et définition	43
3.4.2. Description morphologique	43
3.4.3. Répartition géographique	44
3.4.4. Composition chimique.....	44
3.4.5. Caractéristiques physiques	45
3.4.6. Description morphologique	45
3.4.7. Classification taxonomique	46
3.4.8. Domaines d'utilisation.....	46

4. Evaluation de l'activité antibactérienne : Technique de diffusion en milieu gélosé (méthode de Kirby Bauer)	48
--	----

Deuxième partie : Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes	50
1. L'objectif	50
2. Matériel.....	50
2.1. Matériel microbien	50
2.2. Huile essentielle de thym	50
2.3. Antibiotiques	50
2.4. Milieu sélectif.....	51
3. Méthodes	51
3.1. Caractérisation des souches testées	51
3.1.1. Revivification des souches étudiées	51
3.1.2. Ensemencement sur milieu solide Chapman	51
3.2. Tests biochimiques.....	52
3.3. Examen macroscopique.....	53
3.4. Examen microscopique	53
3.5. Evaluation de l'activité antibactérienne	54
3.5.1. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de thym	54
3.5.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des antibiotiques.....	55
Chapitre II: Résultats et discussion	56
1. Revivification des souches étudiées	56
2. Examens macroscopiques et microscopiques.....	56
3. Tests biochimiques	57
3.1. Test de catalase.....	57
3.2. Test de l'oxydase.....	57
3.3. Test de la coagulase.....	58
4. Coloration de Gram	58
5. Evaluation d'activité antibactérienne	59
5.1. Evaluation d'activité antibactérienne de l'huile essentielle de thym	59
5.2. Evaluation d'activité antibactérienne des antibiotiques	62

Conclusion et Perspectives	67
Annexes.....	69
Références bibliographiques.....	72

Liste des abréviations, sigle et acronymes

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Aéro : Aérobie

ARN : Acide Ribonucléique

BLSE : β -Lactamases a Spectre Elargi

CLN_a: Chlorure de Sodium

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CO₂: Dioxyde de Carbone

DNAses : Les Désoxyribonucléases

ERV : Entérocoques Résistants à la Vancomycine

HE : Huiles Essentielles

LSTPA : Laboratoire des Sciences et Technique de Production Animale

OIE : L'organisation Mondiale de la Santé Animale

PCA : Plate Count Agar

pH : Potentiel Hydrogène

S : *Staphylococcus Aureus*

SARM : *Staphylocoques aureus* Résistants à la Méricilline

TSST : Toxic Chock Syndrome Toxine

WHO : World Health Statistics

Liste des figures

Chapitre 01

Figure 1: Structure générale de la mamelle (Rémy, 2010).....	12
Figure 2: Conformation intérieure des mamelles de la vache, coupe sagittale passant par les quartiers gauches (Barone, 1968).....	13
Figure 3: Cellules sécrétrices (cellules alvéolaires) et les canaux forment le système sécréteur de la glande mammaire (Michel et Wattiaux, 2000).....	14
Figure 4: Coupe longitudinale de l'extrémité du trayon chez la vache (Gandon., 2010).....	15
Figure 5: Peau et une coupe d'un trayon : le canal du trayon est étroit et court, il occupe uniquement l'extrémité du trayon, ce qui le rend très fragile (Remy., 2010)	16
Figure 6 : Représentation d'une cellule épithéliale mammaire sécrétrice et des voies principales de sécrétion des composants du lait (Bauman <i>et al.</i> ,2006)	16
Figure 7: Coloration de Gram de <i>Staphylococcus aureus</i> , gram positive cocci(Fitzgerald, 2001)	21
Figure 8: Croissance de <i>stapulococcus aureus</i> sur milieu solide (Rechten, 2019).....	22
Figure 9 : Schéma détaillant les composants de la paroi bactérienne (KerroDegoet <i>al.</i> , 2002)	24

Chapitre 02

Figure 1 : Structure de gentamycine (Vaux, 2012)	28
Figure 2 : Composition chimique de l'amoxiciline (Vaux, 2012).....	29
Figure 3 : Composition chimique de tétracycline (Woerther,2012)	29
Figure 4 : Composition chimique de vancomycine (Anses, 2013).....	30
Figure 5 : Structure générale de Macrolides (Arlet, 2012).....	30
Figure 6 : Structure générale de Nitrofuranes (Arlet, 2012).....	30
Figure 7 : Structure générale de La Quinolones (Meyer <i>et al.</i> , 2004).....	31
Figure 8 : Structure générale de chloramphénicol (Alexandre, 2015).....	31
Figure 9: Structure générale de Polypéptide (Vaux <i>et al.</i> , 2012)	32
Figure 10 : Structure générale de Sulfanilamide (Ducom, 2015).....	32
Figure 11 : Structure générale de La lysocineE (Arlet, 2012).....	32
Figure 12: Mode aux résistances des antibiotiques (Aarabet <i>al.</i> ,2010).....	34
Figure 13: Mode d'action des antibiotiques (Madec, 2014).....	36

Chapitre 03

Figure 1 : Plantes aromatiques et médicinales les plus utilisées au quotidien (Mokkadem, 2004)...	38
Figure 2 : Schéma d'un alambic au cours d'une distillation par entraînement à la vapeur (L'Ylang, 2010)	39
Figure 3 : Schéma de l'extraction des huiles essentielles par CO2 supercritique (L'Ylang, 2010).....	40
Figure 4 : Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles par les plantes aromatiques (Vieira et al.,2001; Karray-Bouraoui et al.,2009)	41
Figure 5 : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Burt, 2004)	43
Figure 6 : Morphologie de <i>thymus vulgaris</i> (Quezel& Santa,1963).....	45

Résultats et discussions

Figure 1 : Résultats de la revivification des souches testées.....	56
Figure 2 : Aspect des souches testées sur milieu Chapman solide	56
Figure 3: Résultats du test de catalase	57
Figure 4 : Résultats des tests d'oxydase	57
Figure 5: Résultats du test de coagulase	58
Figure 6 : Observation microscopique après coloration de Gram	58
Figure 7 : Résultats obtenus de l'effet de l'huile essentielle sur <i>S. aureus</i> d'origine clinique	60
Figure 8 : Résultats obtenus de l'effet de l'huile essentielle de thym sur <i>S. aureus</i> de référence ATCC6538.....	60
Figure 9: Résultats obtenus de l'effet de l'huile essentielle de thym sur <i>S.aureus</i> de référence ATCC6538.....	61
Figure 10 : Résultats obtenus de l'effet de l'huile essentielle sur <i>S. aureus</i> d'origine clinique ..	61
Figure 11: Résultats obtenus de l'effet des antibiotiques sur <i>S. aureus</i> d'origine clinique.....	63
Figure 12: Résultats obtenus de l'effet des antibiotiques sur <i>S. aureus</i> de référence ATCC6538.....	63
Figure 13 : Résultats obtenus de l'effet des antibiotiques sur <i>S.aureus</i> de référence ATCC6538.....	65
Figure 14 : Résultats obtenus de l'effet des antibiotiques sur <i>S. aureus</i> d'origine clinique	65

Liste des tableaux

Chapitre 01

Tableau 1 : Liste des cellules du système immunitaire et de leurs principales fonctions (Rainard et Riollet, 2006)	19
Tableau 2 : Classification de souches bactériennes testées (Sutra <i>et al.</i> , 1998 ; Delarras, 2007)	21

Chapitre 02

Tableau 1 : Classification générale et mode d'action des antibiotiques thérapeutiques (Larpent et Sanglier, 1989)	35
Tableau 2 : Représentation de quelques sources de microorganismes productrices des antibiotiques (Madec, 2014)	37

Chapitre 03

Tableau 1: Aspect macroscopique des souches staphylocoques sur le milieu Chapman	57
Tableau 2: Résultats de l'effet de l'huile essentielle sur les souches testés	61
Tableau 3 : Résultats des effets des antibiotiques sur les souches testé	64

Introduction

Les mammites en élevage bovin laitier sont la principale cause de pertes économiques (Dumas *et al.*, 2004). Les pénalités et les traitements pour guérir les infections mammaires coûtent cher, mais c'est surtout la baisse du lait vendu qui pèse le plus sur le budget des éleveurs. En effet, deux tiers des coûts directs d'une mammité sont liés aux pertes de lait.

La baisse de production laitière due à une mammité clinique est en moyenne de 5 % sur une lactation, soit 400 litres de lait pour une lactation de 8.000 litres. Après une infection, certaines vaches ne retrouvent jamais leur niveau de production initial et ces baisses de lait sont généralement plus fortes chez les multipares que chez les vaches en première lactation.

Cette pathologie multifactorielle constitue le grand fléau économique pour l'éleveur producteur de lait. En effet, les pertes économiques, conséquences des mammites, sont diverses et variées. Elles englobent les coûts du traitement, les pertes de production, les réformes prématurées des vaches incurables et la détérioration de la qualité hygiénique et nutritive du lait et de ses produits dérivés (Dumas *et al.*, 2004).

Leurs traitements par les antibiotiques restent le moyen de choix, mais l'émergence de bactéries résistantes pose un problème d'inefficacité de ces molécules anti-infectieuses. Certaines bactéries ont acquis au cours de leur évolution et suite à des mutations génétiques, des allèles qui leur permettent de résister aux antibiotiques. Elles ne sont donc plus éliminées par les traitements aux antibiotiques dans les organismes contaminés (Chardon et Brugler, 2015). Ceci a conduit à la nécessité de rechercher un traitement alternatif tel que les plantes. Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (Bremness, 2002).

Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisée par les êtres humains. Ils continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (Bruneton, 1999).

Notre travail est réalisé au laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animales de l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

Le travail de cette étude est structuré de la façon suivante et a pour objectif l'étude de l'effet thérapeutique de l'huile essentielle de thym contre les infections mammaires dues à *Staphylococcus aureus*.

- La première partie est une synthèse bibliographique sur les infections mammaires bovines et les huiles essentielles
- La deuxième partie consiste à la présentation du matériel et des méthodes utilisées dans le cadre de la réalisation de l'étude expérimentale
- En troisième partie : présentation des résultats et des discussions avec une conclusion générale et des perspectives.

Synthèse
bibliographique

I. Infections mammaires à *staphylococcus aureus*

1. Généralité

Une mammite est une inflammation de la mamelle généralement due à l'introduction d'une bactérie dans un quartier par le canal du trayon.

Différents signes peuvent alors apparaître (Levesque, 2006; Remy, 2010):

- Modification de la sécrétion lactée (quantité, taux cellulaires)
- Symptômes cliniques fonctionnels (pus, sang, grumeaux)
- Symptômes locaux (inflammation)
- Signes généraux (hyperthermie ou hypothermie).

2. Les réservoirs bactériens

Il existe deux types de réservoirs bactériens:

➤ Réservoir mammaire: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* et *Streptococcus dysgalactiae* évoluent principalement dans les mamelles et sur la peau des trayons. Leur transfert d'une vache infectée vers une vache saine s'effectue lors de la traite: par une lavette utilisée sur plusieurs vaches, les mains du trayeur, les manchons trayeurs ou encore du lait si la machine à traire est mal réglée (contaminations croisées entre les quartiers). Ces bactéries sont la plupart du temps source de mammites sub-cliniques persistantes (Institut de l'élevage, 2008).

➤ Réservoir environnemental: *Streptococcus uberis* et *Escherichia coli* (et plus généralement les entérobactéries) sont présentes dans les bouses des litières et sur les pâturages dans certains cas. Ces germes se transmettent par simple contact de la mamelle avec les matières fécales.

Certaines souches comme *Streptococcus uberis* peuvent avoir le comportement de bactéries à réservoir mammaire et se transmettre abusivement par l'intermédiaire de la traite (Levesque, 2006; Remy, 2010).

3. Classification des mammites

3.1. Mammite clinique

Les mammites cliniques sont définies par la présence de symptômes fonctionnels, elles entraînent systématiquement une modification du lait dans son aspect, sa texture et dans la quantité produite (grumeaux, pus, caillots sanguins, etc.). Les mammites cliniques peuvent être associées à des signes locaux (douleur, chaleur, œdème, rougeur, etc.) et/ou généraux (hyperthermie, abattement, anorexie, etc.) (Rémy, 2010). Les mammites sans signes généraux sont plutôt d'évolution subaiguë, alors que les mammites avec signes généraux sont plutôt d'évolution aiguë à suraiguë (Institut de l'élevage, 2008).

3.2. Mammite subclinique

Les mammites subcliniques sont asymptomatiques. Les animaux atteints ne présentent ni symptômes fonctionnels (pas de modification du lait), ni symptômes locaux (pas de signes externes d'inflammation), ni symptômes généraux. Ces mammites se traduisent uniquement par une réaction immunitaire mise en évidence indirectement par une augmentation de la concentration en cellules somatiques du lait (Rémy, 2010 ; Bosquet *et al.*, 2013).

4. Anatomie de la mamelle

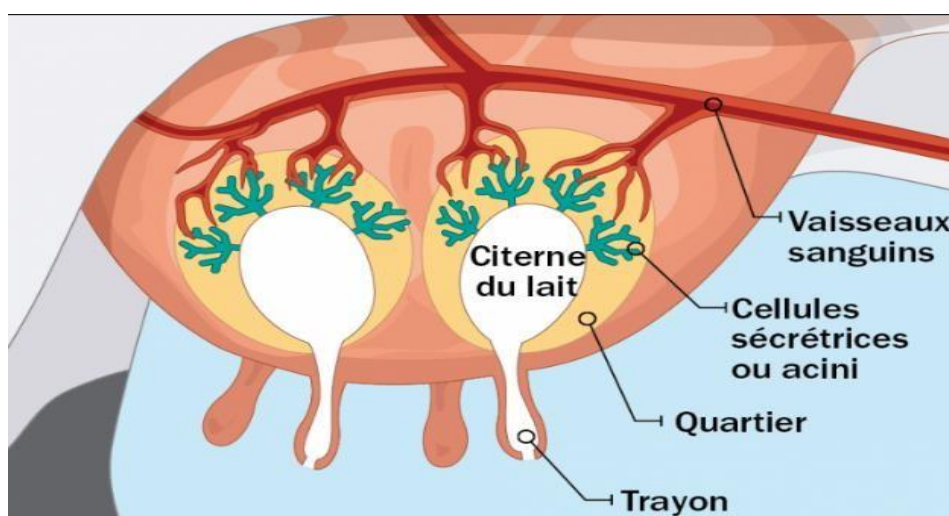


Figure 1: Structure générale de la mamelle (Rémy, 2010).

Le pis de la vache est composé de deux paires de mamelles séparées par le sillon inter mammaire, formant quatre quartiers. La division entre les quartiers avant et arrière est faite par une fine membrane conjonctive. Chaque quartier est indépendant anatomiquement des autres.

Le pis est maintenu en suspension par deux types de lames (Figure 2) : les lames latérales qui s'insinuent sur la tunique abdominale (elles assurent une stabilité transversale) et les lames médiales qui s'adossent deux à deux (quartiers gauches contre quartiers droits). Elles forment le ligament suspenseur du pis. De l'appareil de suspension, partent les septa qui s'enfoncent dans le parenchyme et le partagent en lobes. Il y a 12 lobes par quartier (Rémy, 2010).



Figure 2: Conformation intérieure des mamelles de la vache, coupe sagittale passant par les quartiers gauches (Barone, 1968).

Ces 12 lobes par quartier induisent les 12 conduits lactifères qui convergent dans le sinus lactifère. Ce sinus permet l'accumulation entre les traites de 150 à 500 ml de lait. Chaque lobe est composé de très nombreux acini mammaires, formes de lactocytes, qui synthétisent le lait. Il faut filtrer 300 litres de sang pour faire 1 litre de lait (Bosquet *et al.*, 2013).

La mamelle est irriguée par une artère de chaque côté : l'artère honteuse externe. Cette dernière se divise en 3 branches. Pour une même source artérielle, il y a 3 gros collecteurs veineux : la veine honteuse externe, la veine mammaire crâniale, la mammaire veine caudale (Barone, 1968).

La mamelle des bovins est constituée de quatre quartiers indépendants. Ils contiennent les alvéoles glandulaires ou acini mammaires, qui, formées de lactocytes, synthétisent le lait.

Les alvéoles sont entourées par un tissu parenchymateux, et sont reliées à la citerne de la glande, d'un volume moyen de 400 ml, via les tubules et les canaux galactophores (figures 1 et 2) (Bosquet *et al.*, 2013).

La glande mammaire saine La mamelle est une glande exocrine composée de quatre quartiers indépendants chez les bovins, située sur la face ventrale de l'animal. Les quartiers de droite et de gauche sont séparés par un ligament de suspension central composé de tissu élastique (figure 3). La morphologie de la mamelle est importante à prendre en compte puisque si le ligament médian est trop faible, cela aura pour conséquence une mamelle qui pend trop. Ceci entraînera des difficultés à la fois pour la traite et une exposition plus importante à des agents pathogènes due à la proximité des trayons avec le sol (Rémy, 2010).

Le parenchyme mammaire possède deux lobes, eux-mêmes divisés en lobules formés d'acini ou d'alvéoles glandulaires. Chaque alvéole est constituée principalement d'une couche monocellulaire (lactocytes) qui est le lieu de synthèse du lait. Les lactocytes entourent la lumière alvéolaire et reposent sur un réseau de cellules myoépithéliales. Chaque alvéole irrigue la citerne de la glande via des canaux galactophores (figure 5). La masse glandulaire épithéliale est une structure transitoire, elle ne se forme qu'au cours de la gestation, elle produit le lait pendant la période de lactation et elle disparaît après le sevrage ou le tarissement (Bosquet *et al.*, 2013).

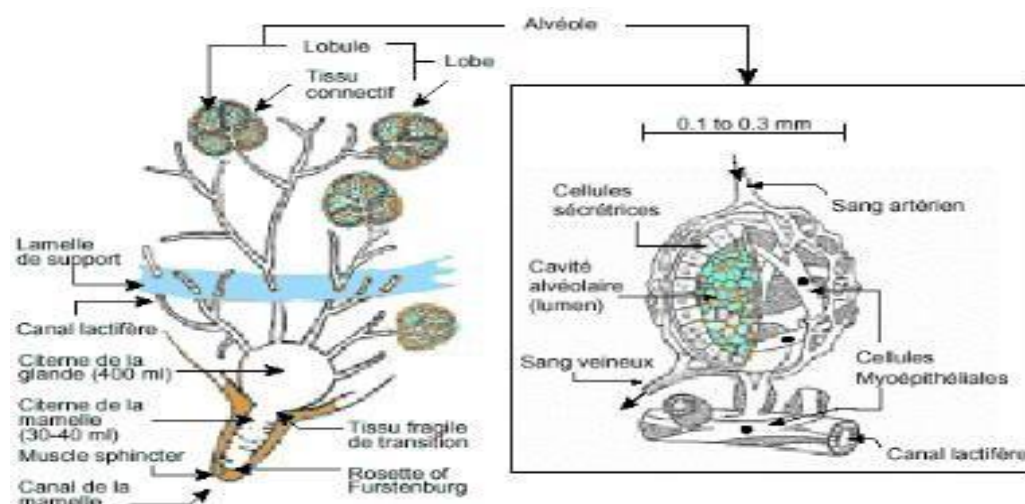


Figure 3: Les cellules sécrétrices (cellules alvéolaires) et les canaux forment le système sécréteur de la glande mammaire (Michel et Wattiaux, 2000).

Les petits canaux galactophores qui drainent chaque alvéole se rejoignent pour former des canaux tertiaires. Ces derniers se rassemblent en canaux secondaires puis primaires qui aboutissent à la citerne de la glande. Des cellules myoépithéliales entourent l'épithélium des canaux et des alvéoles et se contractent sous l'action de l'ocytocine, provoquant l'éjection du lait (Michel et Wattiaux, 2000).

➤ **La citerne de la glande mammaire**

Il existe une citerne de la glande par quartier. La citerne correspond à une dilatation des canaux galactophores en sinus et en poches. Chez la vache, le volume de la citerne est de 400 à 500 mL, mais le volume est variable en fonction de la race (Gandon., 2010).

Les trayons a la base de la citerne de la glande mammaire se trouve le trayon (ou pis) par lequel est éjecté le lait. Le trayon représente le premier contact ouvert entre le milieu extérieur et l'intérieur de la glande. Il constitue ainsi la première protection de la glande face aux agents pathogènes. Le trayon est séparé de la citerne par des plis annulaires de tissus, constituant une barrière contre une invasion par des agents pathogènes (figure 4 et 5) (Gandon., 2010).

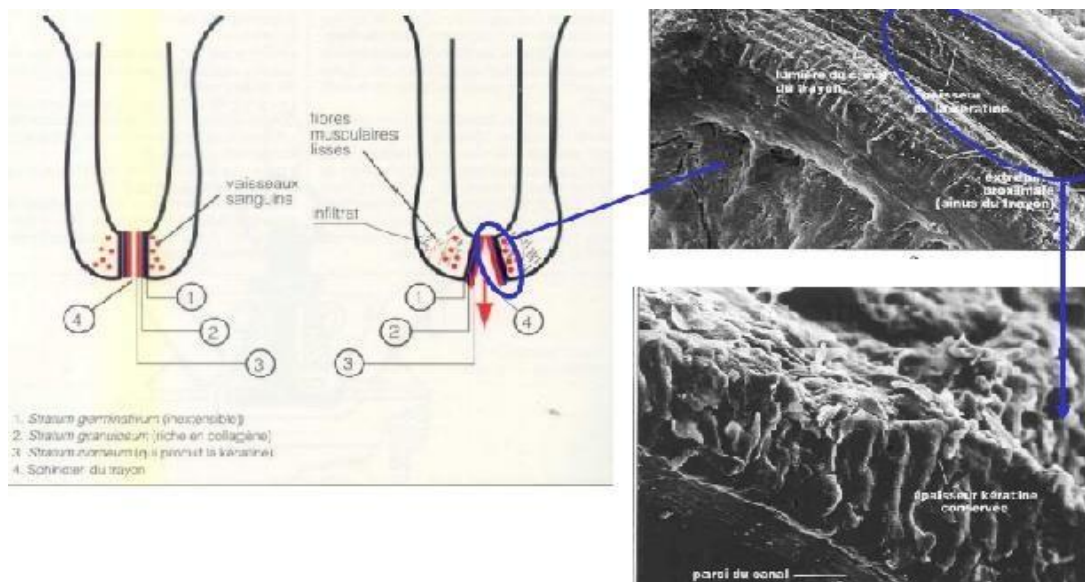


Figure 4: Coupe longitudinale de l'extrémité du trayon chez la vache (Gandon., 2010).



Figure 5: La peau et une coupe d'un trayon : le canal du trayon est étroit et court, il occupe uniquement l'extrémité du trayon, ce qui le rend très fragile (Remy., 2010).

➤ La cellule épithéliale mammaire

La cellule épithéliale mammaire est une cellule sécrétrice constituant la plus petite unité des alvéoles ou acini. En lactation, les cellules épithéliales mammaires sont polarisées avec la face basale située du côté de la lumière alvéolaire. Ces cellules synthétisent les composants du lait par exocytose pour les globules gras et par pinocytose inverse pour les protéines et les sucres (Figure 6), mécanisme par lequel la cellule libère les molécules par fusions de vésicules cellulaire avec la membrane plasmique libérant leur contenu dans le milieu extracellulaire. Ces composants rejoignent les canaux galactophores puis la citerne (Bauman *et al.*, 2006).

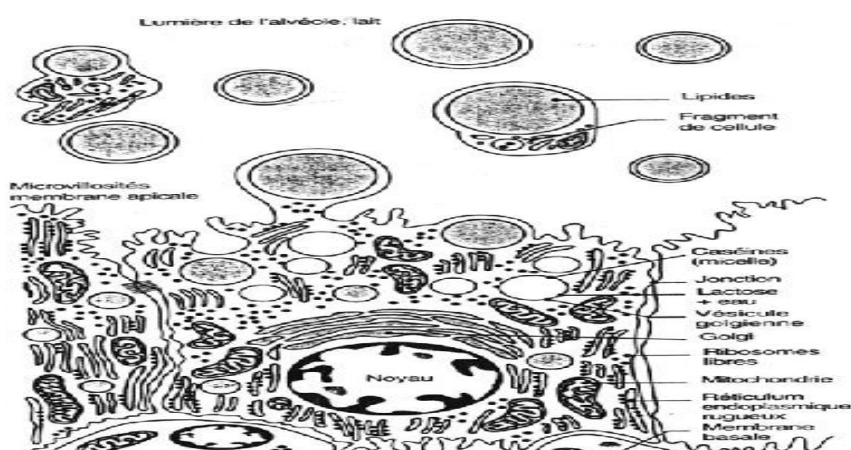


Figure 6 : Représentation d'une cellule épithéliale mammaire sécrétrice et des voies principales de sécrétion des composants du lait (Bauman *et al.*, 2006).

Les voies de sécrétion des gouttelles lipidiques cytoplasmique, la voie de sécrétion des micro-goutelettes lipidiques et du contenu des vésicules de sécrétion voie de sécrétion de composants de lait (Bauman *et al.*,2006).

5. Le processus infectieux

Le processus infectieux au cours d'une mammite d'origine bactérienne n'est pas totalement élucidé. Cependant, l'ensemble des données *in vitro* (lignées cellulaires, explant, culture primaire) ou *in vivo* (infections intramammaires) permettent de dessiner un schéma d'infection cohérent. Les mammites d'origine bactérienne se caractérisent par trois étapes successives : la contamination de la mamelle, l'invasion cellulaire et l'inflammation (Oviodeo-Boysoet *al.*, 2007). La première étape est la contamination du trayon par le pathogène. Une fois le canal du trayon contaminé, les bactéries peuvent atteindre la lumière de la citerne, se multiplier puis envahir le tissu mammaire (Le Loir *et* Gautier, 2010). La réaction inflammatoire et immunitaire qui est induite par l'invasion de la glande mammaire permet le recrutement en très grand nombre de polynucléaires neutrophiles et d'autres leucocytes (monocytes et lymphocytes) (Rainardet Riollet, 2006). Le cycle infectieux sera décrit en détail dans le paragraphe relatif aux mammites staphylococciques, car celui-ci peut se dérouler différemment en fonction du pathogène impliqué (Oviodeo-Boysoet *al.*, 2007).


6. Les protections naturelles de la glande mammaire

Les défenses anatomiques La glande mammaire est protégée par une variété de mécanismes de défense (Nickerson, 1987). Parmi eux, il existe une protection physique assurée par un sphincter musculaire qui assure l'étanchéité de l'entrée du canal du trayon. De plus, à la base de la glande entre la citerne du trayon et la citerne de la glande, la Rosette de Furstenberg est un repliement muqueux enrichi en leucocytes qui participe grandement à la protection vis-à-vis du pathogène présent. Le trayon est le seul orifice entre le système interne de sécrétion et l'environnement et constitue donc la seule voie d'accès naturel possible pour les agents pathogènes (outre une lésion cutanée au niveau de la glande) (Krömker et Friedrich, 2009).

Les défenses immunitaires Outre les barrières physiques, l'immunité de l'hôte assure la seconde ligne de défense. Elle peut être divisée en deux types :

- Immunité innée et acquise. Les défenses immunitaires sont assurées par des cellules produites par la moelle osseuse, les leucocytes (Tableau 1)(Bradley *et al.*, 2002).
- L'immunité innée, ou non spécifique, est particulièrement importante lors d'une première exposition à un agent pathogène. Les réponses non spécifiques sont déjà présentes et rapidement activées au site d'infection. La réponse immunitaire innée est principalement médiée par les macrophages, neutrophiles, les « Natural Killer » ainsi que d'autres facteurs solubles. Si malgré cette immunité innée le pathogène n'est pas éliminé, l'immunité acquise (ou spécifique) sera induite. Ce type de réponse immunitaire reconnaît spécifiquement des déterminants antigéniques d'un pathogène afin de l'éliminer sélectivement. La réponse immunitaire acquise est principalement médiée par les anticorps (immunité humorale), les macrophages (cellules présentatrices d'antigènes ; CPA) et les cellules lymphocytaires (Rainard et Riollot, 2006) (Tableau 1).

Tableau 1 : Liste des cellules du système immunitaire et de leurs principales fonctions (Rainard et Riollet, 2006).



Type de cellules		Rôle principaux
Cellule dendritique		Phagocytose / opsonisation Synthèse de cytokines (médiateur de l'inflammation) Cellules présentatrices d'antigènes
Monocytes - Macrophage		Phagocytose / opsonisation Synthèse de cytokines (médiateur de l'inflammation) Cellules Présentatrices d'Antigènes
Granulocytes (=Polynucléaire)	Neutrophiles	Phagocytose Destruction des agents pathogènes Homéostasie de l'inflammation Synthèse de cytokines (médiateur de l'inflammation)
	Basophiles	Synthèse d'histamine et d'héparine Activation de l'inflammation Action antiallergique Perméabilité tissulaire
	Eosinophile	Action antiparasitaire Activation de l'inflammation Action antiallergique Perméabilité tissulaire
Mastocytes		Sécrétion de sérotonine, histamine et héparine Action antiallergique Synthèse de cytokines
Lymphocytes	B	Immunité humorale Production d'immunoglobuline (anticorps) Plasmocytes (synthèse d'anticorps spécifique à l'opsonisation), cellules B à mémoire (mémorisation des antigènes)
	T	Immunité cellulaire Action cytotoxique (destruction des cellules infectées), auxiliaire (activation de cellules immunitaires), ou suppresseur (retour à l'état basal de l'inflammation)
	Cellule NK	Cellules tueuses naturelles Lyse des cellules du non-soi sans reconnaissance spécifique d'antigène Libération de perforine et granzyme

La défense de la glande mammaire nécessite une action coordonnée et interactive des deux types de réponses immunitaires. Les macrophages sont les cellules dominantes dans le lait sain (Le Loir et Gautier, 2010). Leur rôle est de détecter les flores indésirables et de recruter les neutrophiles du sang vers la glande mammaire via la libération de cytokines (Paapeet *al.*, 2002,2003) (tableau 1). Lors d'une infection, la proportion de macrophages diminue mais assure le rôle de présentation d'antigènes. Les neutrophiles sont donc activement transférés du sang vers la citerne dès le début de l'inflammation et ils représentent jusqu'à 90 % des cellules somatiques lors d'une mammite (Paapeet *al.*, 2000). Si les pathogènes persistent, les lymphocytes B et T seront également recrutés. Les lymphocytes B assurent la synthèse d'anticorps (immunité humorale). Les lymphocytes T assurent une immunité cellulaire. Les lymphocytes T4 (LT4, ou « helper ») sont activés via les CPA et orientent la réponse vers une immunité humorale ou cellulaire. Les LT8, cellules cytotoxiques, assurent l'immunité cellulaire proprement dite (Oviedo-Boysoet *al.*, 2007).

L'immunité des cellules épithéliales La détection du pathogène ainsi que la réponse inflammatoire initiale sont cruciales pour le recrutement des neutrophiles. Certaines cellules du système immunitaire peuvent résider dans la glande mammaire et participer au recrutement des neutrophiles (Riollet *et al.*, 2000 ; 2001)

7. Caractérisation de *Staphylococcus aureus*

7.1. Définition

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des coques (cocci) à Gram positif, groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés, catalase positive et oxydase négative. Parmi les 27 espèces du genre actuellement répertoriées, les principales sont *Staphylococcus aureus*, *S.epidermidis* et *S.saprophyticus*. L'espèce *S.aureus* sera prise comme type de description (Fauchere et Avril, 2002).

7.2. Historique

Observés par Pasteur en 1879 dans un pus de furoncle, les staphylocoques mot créé par l'anglais Ogston (1881), qui les a mis en évidence dans des abcès aigus et chroniques (Kuroda *et al.*,2001).

7.3. Habitat

S.aureus est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (rhino-pharynx, intestin). On le trouve sur la muqueuse nasale d'un tiers environ des sujets normaux. Éliminé dans le milieu extérieur, cette bactérie peut survivre longtemps dans l'environnement (Kuroda *et al.*,2001).

7.4. Classification de souches bactériennes testées

Tableau 2 : Classification de souches bactériennes testées (Sutra *et al.*, 1998 ; Delarras, 2007).

Classification	souche bactérienne
Règne	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Staphylococcaceae</i>
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

7.5. Etude bactériologique

7.5.1. Microscope

En microscope les *S.aureus* sont des cocci à Gram positif, isolés ou groupés en diplocoques ou en amas ayant la forme de grappes de raisin, de 0,8 à 1 μ de diamètre (figure 1). La grande majorité des souches sont capsulées, mais les souches peuvent perdre leur capsule par culture (Fitzgerald, 2001).

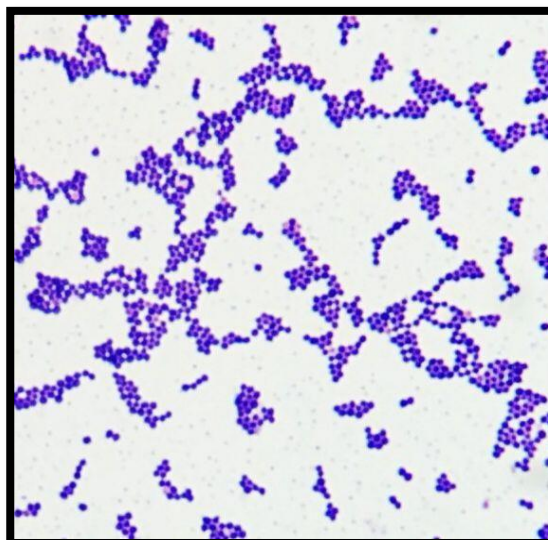


Figure 7: Coloration de Gram de *Staphylococcus aureus*, gram positive cocci (Fitzgerald, 2001).

7.5.2. Culture

Comme tous les germes très répandus dans la nature, *S.aureus* cultive facilement sur les milieux usuels, à des conditions de pH et de température variables. Il est même capable de pousser dans des conditions hostiles, par exemple en présence de 7 % de *ClNa*. Ce caractère est mis à profit dans le milieu de culture sélectif hypersalé de Chapman pour isoler le staphylocoque d'un prélèvement polymicrobien (Fauchereet Avril, 2002).

➤ En bouillon

Donne un trouble uniforme en quelques heures.

➤ Sur gélose ordinaire

Les colonies sont lisses, rondes, bombées, brillantes, opaques, de 1 mm de diamètre. Elles se pigmentent habituellement en jaune doré (aureus), parfois en jaune citron, et parfois sont non pigmentées (Katayaumaet *al.*,2000).



Figure 8: Croissance de *stapulococcus aureus* sur milieu solide (Rechten, 2019)

➤ En gélose profonde

S.aureus pousse dans la zone d'aérobiose et dans la zone d'anaérobiose. C'est donc une bactérie aérobie-anaérobie facultative, capable de se multiplier à la surface de la peau, en aérobiose et dans les tissus mal oxygénés, plaie profonde par exemple (Kuroda *et al.*, 2001).

7.6. Caractères biochimiques

S.aureus a un métabolisme aérobie prédominant et anaérobie facultatif. Il est catalase positive à la différence des bactéries du genre *Streptococcus* qui n'ont pas de métabolisme aérobie. Il est toutefois capable de fermenter le glucose (métabolisme anaérobie) à la différence des microcoques. Il est habituellement capable de fermenter le mannitol. Ce caractère est souvent, mais pas obligatoirement, associé à la pathogénicité. Il est utilisé dans le milieu de Chapman. La fermentation se traduit par le virage au jaune du milieu de culture (Couture, 1990).

Facteurs de virulence de physiopathologie

➤ Composants de la paroi

Les composants de la paroi comme le peptidoglycane, les acides teichoïques et lipoteichoïques possèdent des effets biologiques démontrés in vitro, notamment la sécrétion de cytokines par les cellules lymphomonocytaires. Alors que le peptidoglycane est peu immunogène, les acides teichoïques (polymères linéaires du ribitol phosphate) donnent naissance à des anticorps que l'on trouve dans le sérum de malades atteints d'infection récente. Ces acides teichoïques sont les récepteurs de bactériophages (lysotypie des staphylocoques) (KerroDegoet *al.*, 2002).

Des polysaccharides capsulaires sont trouvés chez 90 % des souches. Onze types capsulaires ont été décrits et les types 5 et 8 sont les plus fréquents. Cette capsule permet une meilleure résistance des souches à l'opsonisation et à la phagocytose. Certaines souches produisent un exopolysaccharide (glycocalix) qui entraîne la formation d'un biofilm engluant les bactéries et leur permettant d'adhérer aux surfaces extérieures. Certaines protéines ou glycoprotéines sont responsables de la spécificité de type. Il existe 14 sérotypes mis en évidence par réaction d'agglutination au moyen d'immunserums (Sutra et Poutrel, 1994 ; KerroDegoet *al.*, 2002).

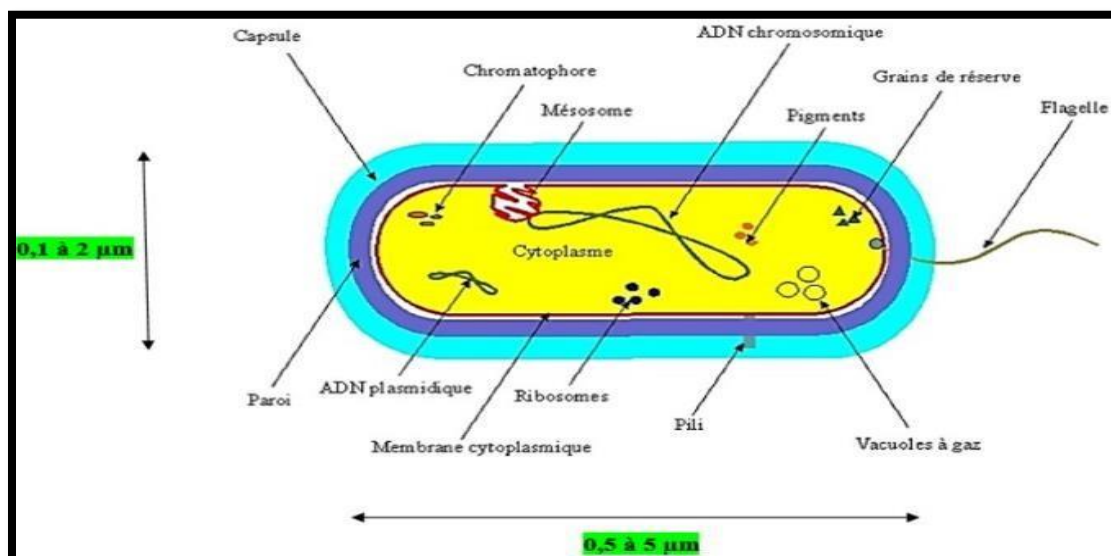


Figure 9 : Schéma détaillant les composants de la paroi de bactérienne (KerroDegoet *al.*, 2002).

➤ Facteurs d'invasion et d'adhésion

S.aureus colonise la peau et les muqueuses en adhérant aux cellules et aux composants de la matrice extracellulaire. *S.aureus* se fixe aux cellules par l'intermédiaire de protéines de surface, les adhésines, qui sont ancrées dans le peptidoglycane. Cinq protéines ont été caractérisées :

- La protéine A, élaborée uniquement par les souches d'origine humaine, se lie au fragment des immunoglobulines. Elle intervient dans l'opsonisation et la phagocytose ;
- La protéine de liaison au collagène permet l'adhésion de *S.aureus* au cartilage ;
- La protéine de liaison à la fibronectine permet l'adhésion de *S.aureus* aux caillots plasmatiques mais aussi aux biomatériaux (cathéters, prothèses) ;
- La protéine de liaison au fibrinogène (clumping factor) qui provoque l'agrégation de bactéries en présence de plasma permettant de transformer directement le fibrinogène en fibrine.
- La protéine de liaison à l'élastine.

Il existe des récepteurs pour d'autres protéines plasmatiques (plasminogènes) ou tissulaires (vitronectine, laminine, sialoprotéines de l'os) (PöhlmannDietze *et al.*, 2000).

➤ Substances élaborées par *S.aureus*

S.aureus élabore des protéines diffusibles douées soit d'activité toxique, soit d'activité seulement enzymatique.

Toxines

Cinq principales toxines sont décrites chez *S.aureus* :

- *Les hémolysines* ont une action cytotoxique sur de nombreuses cellules eucaryotes, notamment les globules rouges et les plaquettes. L'hémolysine a, sécrétée par la quasi totalité des souches de *S.aureus*, est mise en évidence avec des hématies de mouton ; de bœuf ou de lapin. La perméabilisation membranaire entraîne une fuite osmotique du contenu cellulaire aboutissant à la mort des cellules. La cytolysse de plaquettes et de monocytes libère des cytokines et d'autres médiateurs de la réaction inflammatoire expliquant le choc septique des infections sévères à *S.aureus*. La destruction des cellules endothéliales favorise la dissémination des bactéries et les métastases infectieuses (Rosato *et al.*, 2003).

La leucocidine est formée de 2 composés, codés par des gènes distincts, agissant en synergie ; elle agit sur les polynucléaires et les macrophages chez lesquels elle provoque la perte de mobilité, la dégranulation, la destruction nucléaire et la lyse cellulaire. Cette protéine a rôle important dans la formation du pus (Kerrodégo *et al.*, 2002).

- *L'exfoliatine* est une protéine thermostable responsable des lésions d'érythrodermie bulleuse que l'on observe parfois au cours des septicémies à staphylocoques et au cours de l'impetigo. En se fixant à certaines protéines intracellulaires cutanées (profilagrine et filagrine) elle provoque une épidermolyse : décollement intra-épidermique entre le stratum granulosum et le stratum spinosum. Il y a rupture entre les cellules adjacentes suivie de celle des ponts intercytoplasmiques (desmosomes) ce qui entraîne des lésions bulleuses. 80 % des sujets adultes ont des anticorps protecteurs (Rosato *et al.*, 2003).
- *Les entérotoxines*, dont il existe 7 sérotypes différents (A, B, C1, C2, C3, D, E) sont des protéines thermostables responsables d'intoxications alimentaires (diarrhée, vomissements, douleurs abdominales, rarement un collapsus cardiaque, qui apparaissent 1 à 6 heures après l'ingestion). De 30 à 60 % des souches de *S.aureus* produisent une entérotoxine. Il s'agit d'une protéine thermostable, insensible aux enzymes protéolytiques du suc digestif. L'entérotoxine A est de loin la plus fréquente. La toxine responsable du choc toxique *staphylococcique* (TSST-1) : cette protéine antigénique entraîne la formation d'anticorps protecteurs présents chez 85 % des sujets adultes. Cette toxine, comme les entérotoxines, a un effet pyrogène et est un super antigène qui entraîne l'activation simultanée de plusieurs sous-populations lymphocytaires, ce qui entraîne la libération de plusieurs médiateurs (interleukine, interféron gamma, alpha et bêta) responsables de la symptomatologie du choc *staphylococcique* (Rosato *et al.*, 2003).

Enzymes non toxiques

- **La coagulase-libre** est une exo-enzyme coagulant le plasma d'homme ou de lapin. C'est une protéine thermostable, *toujours produite par les souches de S.aureus* (et non produite par *S.epidermidis* et *S.saprophyticus*). Elle active la prothrombine en thrombine. La thrombine ainsi activée agit sur le fibrinogène qu'elle transforme en fibrine. C'est un facteur primordial dans le pouvoir pathogène en coagulant le plasma autour des coques et en les protégeant de la phagocytose ; elle est à l'origine des thrombophlébites suppurées (Pillaret *al.*, 2008).

La fibrinolysine est caractéristique des souches pathogènes humaines. En activant le plasminogène en plasmine, elle provoque la dislocation des caillots en doveineux qui libère des micro-embols septiques, facteurs de septicémie et de localisations septiques secondaires (KerroDegoet *al.*, 2002).

Les désoxyribonucléases (ou DNAses) sont des facteurs de destruction des noyaux cellulaires. La DNase thermostable est spécifique de *S.aureus* (Rosatoet *al.*, 2003).

- **La hyaluronidase** est une enzyme thermolabile hydrolysant l'acide hyaluronique, substance fondamentale du tissu conjonctif : elle favorise ainsi la diffusion des staphylocoques dans le tissu conjonctif. (Montesinoset *al.*, 2002).
- **La lipase** : 80 % des souches produisent cette enzyme qui semble constituer un facteur de virulence dans les abcès où, en modifiant les lipides bactériens, elles favorisent la survie des staphylocoques (Rosatoet *al.*, 2003).

7.7. Diagnostic bactériologique

Le diagnostic bactériologique de l'infection *staphylococcique* est uniquement direct (mise en évidence de la bactérie). Il n'y a pas de diagnostic indirect par recherche des anticorps circulants. Le diagnostic repose sur les principales étapes suivantes :

- Le prélèvement : aseptique (pour être certain que le staphylocoque que l'on va isoler n'est pas un simple commensal de la peau ou des muqueuses) et avant le début du traitement antibiotique (April, 1998).

- L'examen microscopique d'orientation à la recherche de cocci réguliers, à Gram positif, groupés en amas.
- La culture sur gélose ordinaire dans la majorité des cas ou sur milieu de culture sélectif, type milieu de Chapman (qui contient 7 % de ClNa, du mannitol et un indicateur de pH) si le prélèvement est fortement contaminé par d'autres bactéries (Bosserey, 2000).
 - L'identification de la bactérie repose sur la mise en évidence des caractères suivants :
 - *Catalase* (différence avec le streptocoque) fermentation du glucose en anaérobiose (différence avec le microcoque), *coagulase* (différence avec *S.epidermidis* et *S.saprophyticus*), *DNase*. Thermostable (qui signe l'espèce *S.aureus*) (Desplaces, 2006).
 - Le diagnostic sera *toujours* complété par la mesure de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme) étant donné la fréquence de la résistance de *S.aureus* aux bêta-lactamines (ex. : pénicilline), aux aminosides (ex. : gentamicine) et à certains macrolides (ex. : érythromycine), notamment chez les souches hospitalières) (Spilf, 2009).

II. Antibiotiques

1. Généralité

Les antibiotiques utilisés en médecine sont fabriqués à partir de cultures de microorganismes ou sont des médicaments entièrement synthétisés. Le premier d'entre eux (la pénicilline) a été découvert par Alexander Fleming en 1942, par hasard, chez le champignon *Penicillium glaucum* (Larpenet Sanglier 1989). Un antibiotique est une substance qui a la capacité de réduire ou d'interrompre la multiplication des bactéries. Ce médicament est un composé chimique, élaboré sur la base d'un micro-organisme ou à partir de produits de synthèse (WHO, 2011).

2. Familles des antibiotiques

2.1. Aminosides

Les aminosides ou aminoglycosides sont des molécules composées de sucres portant des fonctions amine, connue est la gentamycine. Les aminosides ciblent l'ARN de la petite sous-unité du ribosome, au niveau du site où l'ARN messager est décodé. Ils agissent en perturbant la fidélité du mécanisme de décodage du code génétique (Vaux, 2012).

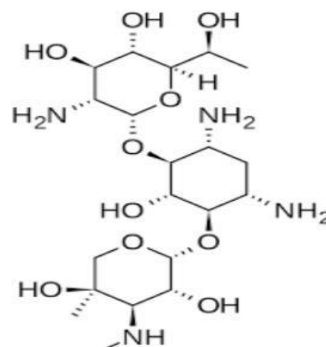


Figure 1 : Structure de gentamycine (Vaux, 2012).

2.2. Bêta-lactamines

Les bêta-lactamines sont des molécules possédant un noyau (cycle bêta-lactame) qui est la partie active de la molécule. Ils comprennent en particulier les pénicillines et les céphalosporines. Ces molécules bloquent la synthèse du peptidoglycane, un composant de la paroi des cellules bactériennes (Vaux, 2012).

Le principal mode de résistance à ces antibiotiques est lié à l'action d'enzymes de dégradation spécifiques qui clivent la molécule en ouvrant le cycle bêta-lactame. L'inhibiteur bloque l'action des enzymes de dégradation, ce qui permet l'action des antibiotiques coadministrés, exemple: l'acide clavulanique qui est souvent associé à l'amoxicilline (Vaux., 2012).

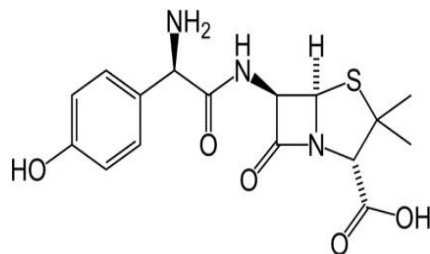


Figure 2 : Composition chimique de l'amoxicilline (Vaux, 2012).

2.3. Cyclines

Les cyclines, correctement appelées tétracyclines, ont pour caractéristique d'être constituées de quatre cycles accolés. Ce sont des inhibiteurs de la traduction au niveau du ribosome. Elles sont capables de pénétrer les cellules eucaryotes et peuvent donc être utilisées pour cibler les parasites intracellulaires. Ces molécules sont bactériostatiques donc il y a un risque de récurrence (Woerther, 2012).

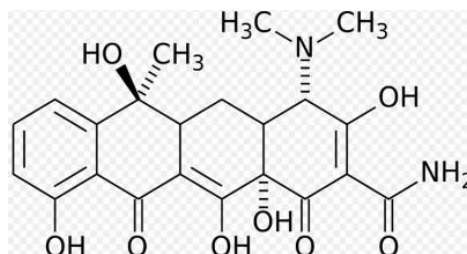


Figure 3 : Composition chimique de tétracycline (Woerther, 2012).

2.4. Glycopeptides

Les glycopeptides sont des molécules très toxiques avec un usage très limité. L'exemple type est la vancomycine. Les glycopeptides sont utilisées en second recours, en cas d'échec du traitement antibiotique prescrit auparavant.

Elles ne sont pas absorbées par le tube digestif, et sont donc toujours administrées par voie intra-veineuse. Comme La vancomycine (Anses, 2013).

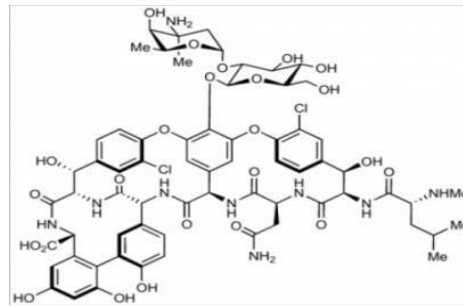


Figure 4 : Composition chimique de vancomycine (Anses, 2013).

2.5. Macrolides

Les macrolides ciblent le site catalytique du ribosome bactérien et empêchent la synthèse de la liaison peptidique. Ces molécules ont des macrocycles souvent associés à des sucres neutres ou aminés. Ces antibiotiques sont capables de diffuser dans les tissus, voire à l'intérieur des cellules. Ils sont donc actifs sur les germes intracellulaires. Ils sont utilisés dans le cas de certaines infections à streptocoques (Arlet, 2012).

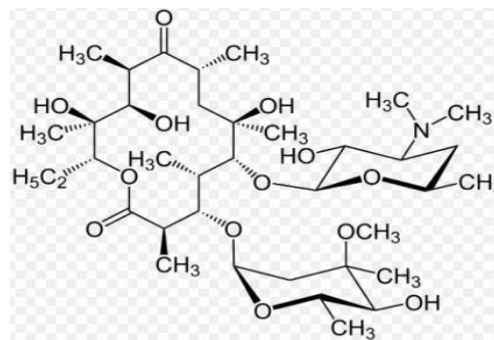


Figure 5 : Structure générale de Macrolides (Arlet, 2012).

2.6. Nitrofuranes et nitroimidazoles

Les nitrofuranes et nitroimidazoles sont des composés qui sont métabolisés par les bactéries et dont les produits introduisent des coupures dans l'ADN (Arlet, 2012).

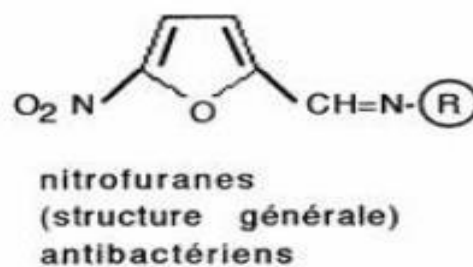


Figure 6 : Structure générale de Nitrofuranes (Arlet, 2012).

2.7. Quinolones

Les quinolones et leurs dérivés plus récents les fluoroquinolones sont molécules dérivées de l'acide nalidixique. Ce sont des inhibiteurs de la gyrase bactérienne (Meyer *et al.*, 2004).



Figure 7 : Structure générale de La Quinolones (Meyer *et al.*, 2004).

2.8. Phénicolés

Molécules très simples, synthétisées maintenant par les chimistes organiciens. Il s'agit principalement du chloramphénicol et du thiamphénicol. Ils ont un spectre d'action très large mais les résistances sont nombreuses et ont de nombreux effets secondaires, entre autres un risque d'agranulocytose. En Belgique, ils sont interdits en usage interne, de même qu'en usage vétérinaire (Alexandre, 2015).

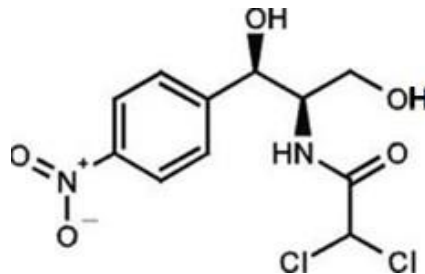


Figure 8 : Structure générale de chloramphénicole (Alexandre, 2015)

2.9. Polypeptide

Ce sont des molécules en chaîne qui comportent plus de 50 acides aminés reliés par des liaisons peptidiques. Ils constituent une famille d'antibiotiques dont les molécules très toxiques ne permettent qu'un usage très limité (Vauxet *et al.*, 2012).

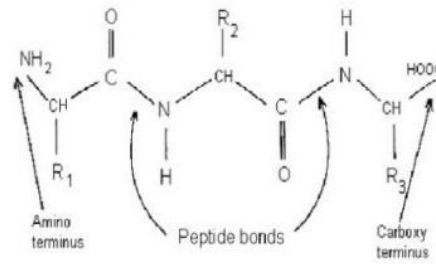


Figure 9: Structure générale de Polypeptide (Vaux *et al.*, 2012).

2.10. Sulfanilamide

Ce sont des dérivés du la sulfanilamide, composé proche de l'acide para-aminobenzoïque. Ces molécules ciblent la synthèse de l'acide folique. Elles sont souvent utilisées dans le traitement des otites, sinusites, infections respiratoires, infections urinaires (Ducom, 2015).

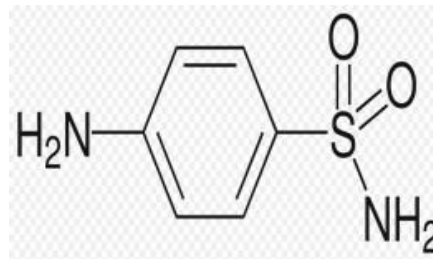


Figure 1 : Structure générale de Sulfanilamide (Ducom, 2015).

2.11. La lysocine E

La lysocine E interagit avec la ménaquinone (ou vitamine K₂) présente dans les membranes bactériennes pour provoquer la mort des bactéries, tout en restant inoffensive pour les eucaryotes et donc pour l'être humain. Il s'agit d'un mode d'action différent de celui de tout autre antibiotique connu, ce qui crée ainsi une nouvelle famille d'antibiotiques (Arlet, 2012).

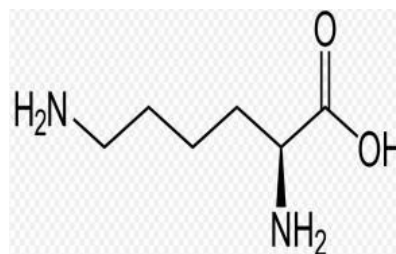


Figure 20: Structure générale de La lysocineE (Arlet, 2012).

3. La résistance aux antibiotiques utilisés dans le traitement des mammites

L'antibiorésistance est un phénomène naturel d'adaptation des bactéries à leur milieu et à la cohabitation avec les autres bactéries, champignons (Yala *et al.*, 2001).

3.1. Résistance naturelle et résistance acquise

La résistance naturelle d'une bactérie par rapport à un antibiotique dépend souvent du mode d'action de celui-ci (absence ou inaccessibilité de la cible). Cette résistance est caractéristique d'un genre bactérien ou d'un groupe de souches et est connue dans la littérature.

Les mécanismes de résistance naturelle sont (Puyt *et al.*, 2013) :

- **L'imperméabilité** : les bactéries Gram + ont une paroi constituée de peptidoglycane qui laisse aisément passer les petites molécules dont les antibiotiques. Les bactéries Gram – ont une paroi plus riche en lipides qui forme une couche hydrophile empêchant le passage des molécules hydrophobes telles les pénicillines G et M, les macrolides et les *lincosamides*. De même, les aminosides pénètrent dans la bactérie via des transporteurs en relation avec la chaîne respiratoire. Ils ne peuvent pas pénétrer les bactéries anaérobies qui n'en possèdent pas (Larpen et Sanglier, 1989).
- **L'efflux actif** : il s'agit de pompes qui permettent d'expulser les toxiques à l'extérieur de la cellule. *E. Coli* possède une pompe *acrAB/tolC* qui expulse entre autres les tétracyclines, les β lactamines et certaines *fluoroquinolones* (Meyer *et al.*, 2004).
- **Une faible affinité pour la cible** : les quinolones de première et deuxième générations ont une faible affinité pour les *topoisomérases II* (leur cible) chez les coques Gram +.
- **Une modification enzymatique de l'antibiotique** : toutes les souches de *Bacillus* sont résistantes aux céphalosporines grâce à l'action de β lactamases chromosomiques. (Larpen et Sanglier, 1989).

3.2. Résistance acquise

La résistance acquise est due à la sélection de bactéries ayant survécu à la pression des antibiotiques et à la transmission de cette capacité de survie via du matériel génétique (plasmides notamment) à d'autres bactéries.

La résistance acquise comporte trois grands mécanismes cellulaires. Le premier est une modification de la cible de l'antibiotique. La cible peut également être produite en plus grande quantité (Vaubourdolle, 2007).

Les antibiotiques d'une même classe ont en général la même cible, donc ce type de résistance agit sur une même classe d'antibiotiques. Les modifications de la cible de l'antibiotique vont avoir lieu suite à une mutation dans le gène codant la cible, la liaison d'une protéine se fixant sur la cible ou une activité enzymatique (Puyt *et al.*, 2013).

Le second est dû à une modification ou inactivation enzymatique. Cela concerne surtout la résistance aux aminosides et aux β lactamines.

La plupart des souches de *Staphylococcus aureus* possède une β lactamase acquise. Le troisième conduit à une baisse de la concentration intracellulaire en antibiotique (figure12) (Perry *et al.*, 2002).

Lors d'une bactériologie, l'antibiogramme est réalisé pour déterminer les résistances acquises de la bactérie isolée vis-à-vis des antibiotiques utilisés.

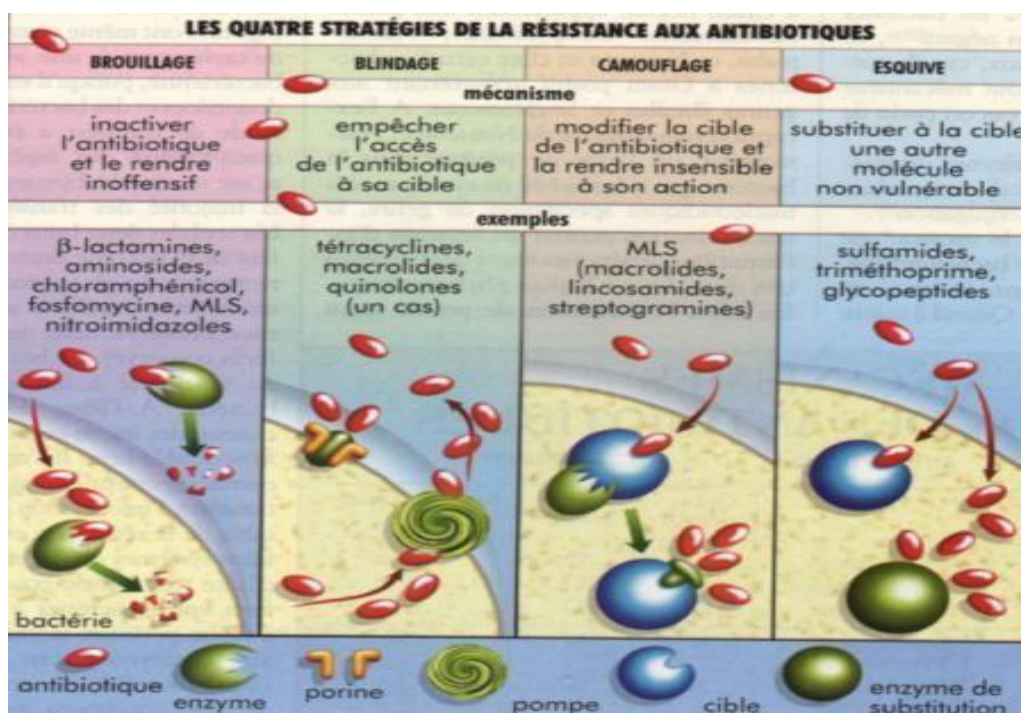


Figure 12: Mode aux Résistances des antibiotiques (Aarabet *al.*, 2010).

4. Classification et le mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine, la nature et la composition chimique, le mécanisme d'action (spectre d'action) et le caractère de résistance bactérien (tableau 1)(Yala *et al.*, 2001).

Tableau 1 : Classification générale et mode d'action des antibiotiques thérapeutiques (Larpen et Sanglier, 1989)

	Familles	Mode d'action
Antibiotiques bactériens	Bêta- lactamines	Pénicillines
		Céphalosporines
		Céphamycines
	Aminosides	Ribosomes (30 S)
	Chloramphénicol	Ribosomes (50S) Bactériostatiques
	Tétracyclines	Ribosomes (50 S) Bactériostatiques
	Macrolides, Lincosamines, streptogramines	Ribosomes (50 S), Bactériostatiques Bactéricide
	Polypeptides	Membrane cytoplasmique, Bactéricide
	Quinolones	ADN Gyrase
	Sulfamides, Trimethoprim	Métabolisme des folates Bactériostatiques
	Vancomycine, novobiocine, Fosfomycine	Paroi Bactéricide
	Acide fusidique	Inhibition de la synthèse des protéines.
Nitrofuranes	ADN Bactéricide	
Antifongiques	Polyenes	Membrane cytoplasmique, fongicide
	Fluorocytosine	ADN et ARN, fongicide
	Imidazole et dérivés	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol. Fongicide
	Griséofulvine	Actif sur les dermatophytes

Les réactions de synthèses sont inhibées par les antibiotiques, ces derniers se fixent sur des sites précis (les cibles moléculaire) de la cellule bactérienne ou fongique ce qui entraîne la perturbation des différents cycles métaboliques (figure13) (tableau.1). Ainsi, chaque famille d'antibiotiques est spécifique pour chaque cible. Les cibles cellulaires ne sont pas toujours connues avec précision et correspondent à 6 niveau différentes de la cellule ; la paroi, la membrane cytoplasmique, le génome (réplication et transcription du l'ADN), la traduction du ARN messager (synthèse des protéines), le métabolisme respiratoire et le métabolisme intermédiaire (Madec, 2014).

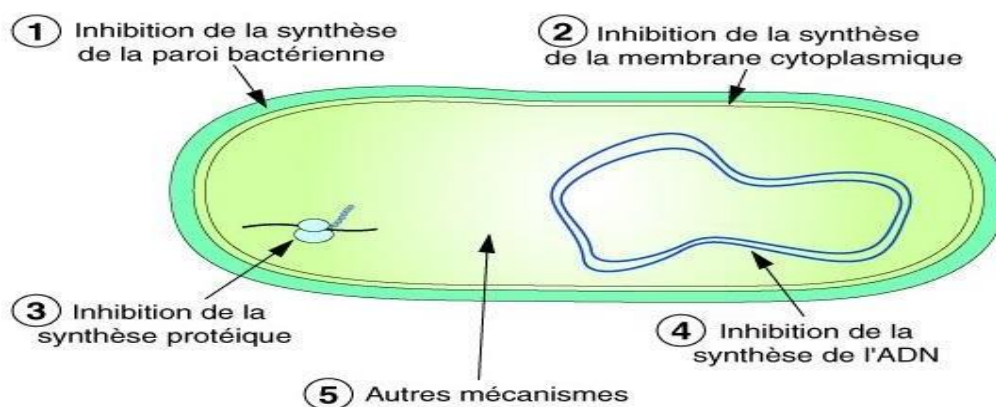


Figure 13: Mode d'action des antibiotiques (Madec, 2014).

5. Méthodes pour limiter l'antibiorésistance

Afin de lutter contre l'antibiorésistance, il faut limiter le contact entre des antibiotiques inadaptés et les bactéries (Bosquet *et al.*, 2013) recommande de limiter l'usage :

- Des antibiotiques dans le traitement des mammites : cela concerne les traitements non justifiés où les chances de guérison sont faibles. La prévention des mammites par des modifications du logement, de l'hygiène de traite ou de la machine à traire diminue le nombre de traitements antibiotiques utilisés (Larpen et Sanglier, 1989)..
- Des traitement par voie générale : ils agissent sur la mamelle mais également sur les flores commensales de l'organisme dont la flore digestive et peuvent induire des résistances au niveau de cette flore. De même, afin de limiter le développement de résistance de la flore digestive, le lait contenant des résidus d'antibiotiques ne doit pas

servir à la nutrition des veaux. Les traitements par voie générale doivent être réservés aux situations l'exigeant comme lors de risque de septicémie ou de rechute de mammite clinique (Loeffeler, 1984).

- Des antibiotiques de dernières générations, appelés aussi antibiotiques d'importance critique ou « antibiotiques critiques » (ce sont principalement les céphalosporines de 3ème et 4ème générations ainsi que les fluoroquinolones), afin de préserver leur efficacité (Ducom, 2015).

6. Microorganismes producteurs d'antibiotiques

Après les travaux et les premières observations d'Anderson en 1870 sur l'effet antagoniste d'un penicillium à vis-à-vis les bactéries et les recherches qui ont été effectués par de nombreux chercheurs comme les travaux de Fleming en 1929, les découvertes des antibiotiques et d'organismes producteurs de ces molécules se sont multipliées (Larpen et Sanglier, 1989). Parmi les 125000 champignons qui ont été décrits, seuls 2000 espèces sont connus comme productrices d'antibiotiques dont le nombre des substances fongiques est actuellement supérieur à 1200 antibiotiques (Loeffeler, 1984).

La plupart des espèces productrices sont des ascomycètes (de formes imparfaites), quelques espèces des basidiomycètes et des zygomycètes qui peuvent également en produits (tableau 2) (Larpen et Sanglier, 1989).

Tableau 2 : Représentation de quelques sources de microorganismes productrices des antibiotiques (Madec, 2014).

Microorganismes	Espec	Antibiotiques
Gram- positive	Bacillus subtilis	Bacitracine
	Bacillus polymyxa	Polymyxine
Actinomycetes	Streptomyces nodosus	Amphaterich B
	Streptomyces venezuelas	Chloramphenicole
	Streptomyces aureofaciens	Chlartetracyline et tetrocycline
	Streptomyces erythaeus	Erythromycine
	Streptomyces fradiae	Neomycine
	Streptomyces griseus	Streptomycine
	Micromonospara purpureae	Gentamicine
Fungi	Cephalosporium spp	Cephalothine
	Penicillium griseofulvum	Griseofulvin
	Penicilium notatum	Penicilium

III. Plantes aromatiques et médicinales

1. Généralités

Une plante médicinale est une plante que l'on cultive ou que l'on cueille dans son milieu naturel pour ses propriétés médicinales. L'être humain utilise des plantes depuis des milliers d'années pour traiter divers maux, le monde végétale est à l'origine d'un grand nombre de médicaments. Récemment, des chercheurs ont estimé qu'il existe environ 400 000 espèces de plantes dans le monde, dont environ le quart ou le tiers ont été utilisées par les sociétés à des fins médicinales. Dans l'Algérie il existe 58 ou plus de différentes familles botaniques (annexe C) (Melero, 2010)..



Figure 1 : Les plantes aromatiques et médicinales les plus utilisées au quotidien (Mokkadem, 2004).

2. Méthodes de production et d'extraction

Il existe différentes méthodes pour obtenir des huiles essentielles. La plus utilisée est l'entraînement par la vapeur ou l'hydrodistillation (Figure 2): ce procédé convient à la majorité des plantes. Cette méthode est très efficace car elle repose sur la particularité des huiles essentielles d'être insolubles dans l'eau mais solubles dans la vapeur. De la vapeur est envoyée sur les plantes, elle se charge ainsi d'huiles essentielles au contact de celles-ci. La vapeur est ensuite envoyée dans un compartiment où elle va être refroidie et ainsi se liquéfier. Le liquide obtenu comporte alors deux phases : l'eau et les huiles essentielles. Il suffit ensuite de récupérer l'huile essentielle par simple décantation. L'inconvénient de cette technique est l'utilisation de températures élevées et l'obtention de composés uniquement volatils (L'Ylang, 2010).

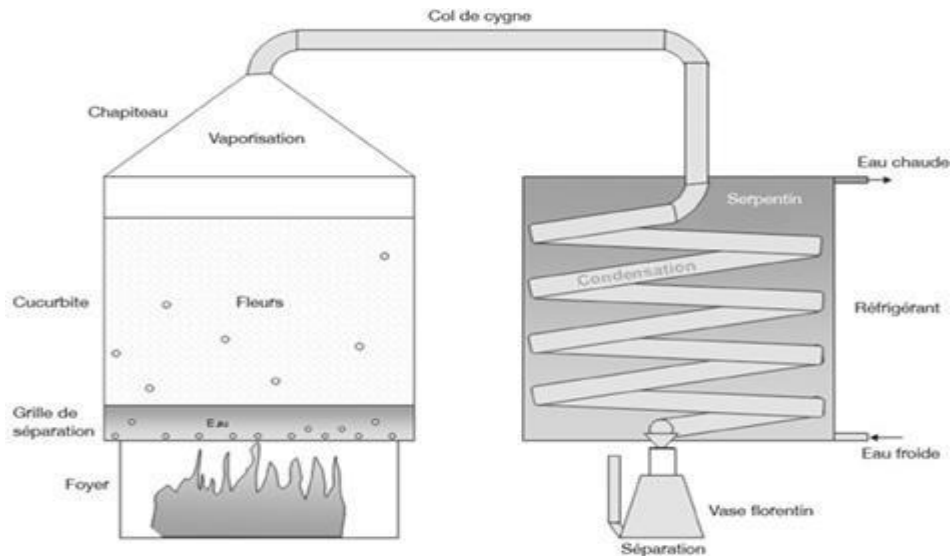


Figure 2 : Schéma d'un alambic au cours d'une distillation par entraînement à la vapeur (L'Ylang, 2010)

La récupération d'huiles essentielles est également possible à l'aide d'appareils appelés extracteurs de Soxhlet. L'extraction est réalisée grâce à des solvants organiques. On obtient ainsi des huiles essentielles avec des solvants volatils type hexanes ou benzènes. Les désavantages de cette technique est la chauffe et l'utilisation de solvants.

Une autre pratique utilisée est l'extraction par pression à froid. Ce procédé offre un rendement plus faible que les deux précédents mais ne nécessite pas de chauffage. Il est cependant peu utilisé car il ne s'applique qu'aux écorces ou aux fruits (Melero, 2010)..

Le système à macération n'est utilisé qu'en cosmétique. Il consiste à mettre en contact les parties nobles des plantes (fleur, pétales,...) avec des huiles "neutres" (type amande douce) pour obtenir ensuite des huiles aromatisées (Melero, 2010)..

La dernière technique est l'extraction au CO₂ super-critique (Figure 3). Du CO₂ est utilisé dans des conditions de pression et de température particulières (ni liquide, ni gazeux) lui conférant un excellent pouvoir d'extraction. C'est cette technique qui donne les huiles essentielles les plus pures car elle est moins dégradante que la vapeur d'eau. Mais c'est encore un dispositif très imposant et très onéreux donc peu répandu (L'Ylang, 2010).

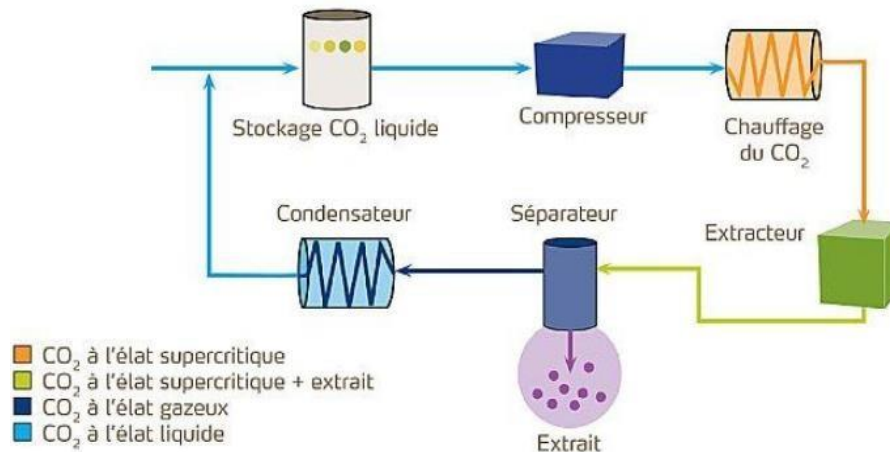


Figure 3 : Schéma de l'extraction des huiles essentielles par CO₂ supercritique (L'Ylang, 2010)

3. Huiles essentielles en santé animale

3.1. Généralités sur les huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont des substances odorantes et volatiles, non grasses, extraites d'un végétal sous forme liquide (Couic-Marinier et Lobstein, 2013). Elles sont synthétisées par des plantes aromatiques en tant que métabolites secondaires (Bakkali et *al.*, 2008). La plupart des végétaux renferment des HE, mais habituellement en quantité infime. Seules les plantes dites « aromatiques » en produisent en quantité suffisante (Lardry et Haberkorn, 2007). Ces dernières fabriquent les huiles essentielles pour se protéger, se soigner, se réparer : elles leur servent à séduire les insectes pollinisateurs, se protéger des brûlures du soleil ou du froid, des prédateurs et des maladies, et enfin à guérir (blessures, maladies, attaques diverses...) (Festy, 2011).

La biosynthèse et l'accumulation des molécules aromatiques sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées. Ces structures, sont souvent situées sur, ou à proximité de la surface de la plante et elles varient selon les familles botaniques, poils sécréteurs externes dans le cas des *Labiées* et des *Géraniacées*, cellules sécrétrices dans le cas des *Lauracées*, des *Magnoliacées* et des *Pipéracées*, poches sécrétrices dans le cas des *Myrtacées* et des *Aurantiacées* et canaux sécréteurs pour les *Ombellifères* et les *Conifères* (figure 1) (Haddouchi et Benmansour, 2008).



Figure 4: Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles par les plantes aromatiques (Vieira *et al.*,2001; Karray-Bouraoui *et al.*,2009).

3.2. Les voies d'administration

Les huiles essentielles ont différents modes d'action selon leur mode d'administration :

- **Par inhalation** : Les huiles essentielles agissent au niveau cérébral sur des récepteurs essentiellement olfactifs et également au niveau des poumons des animaux. Cette voie est utilisée lorsque l'effectif d'animaux à traiter est important évitant ainsi leur manipulation individuelle. Elle a l'avantage de permettre l'administration de mélanges aux propriétés variées telles que les huiles essentielles anti-infectieuses, calmantes, antiseptiques ou insectifuges. Mais l'exploitation doit posséder des locaux à ventilation contrôlée ce qui peut représenter un coût (Melero, 2010).
- **Par ingestion** : Il s'agit du mode d'action le plus efficace après l'injection directe. Cependant le pH très acide au niveau de l'estomac mais aussi des phénomènes d'oxydation entraîne des dégradations ou des modifications d'une grande partie des huiles essentielles. Les pertes lors du passage dans l'estomac sont estimées à 40% de la dose ingérée. Il est donc nécessaire de prendre en compte cette perte métabolique lors du calcul de la dose à administrer (Melero, 2010).

- **Par voie cutanée** : La peau étant perméable aux huiles essentielles, elles pourront la traverser par simple frottement sans subir de modification lors du transfert cutané. Cependant, à forte concentration, les huiles essentielles peuvent être très corrosives pour la peau. On peut donc les diluer dans des huiles végétales. En revanche, des huiles essentielles très toxiques par voie buccale (comme la sauge officinale) possèdent une toxicité moindre quand elles sont administrées en massage sur la peau (Festy, 2011).
- **Par voie colorectale** : Cette méthode d'administration entraîne peu de modifications de la structure et donc des propriétés des huiles essentielles. Il est cependant nécessaire, lors du calcul des doses à administrer, que les muqueuses ne soient pas agressées par les huiles essentielles utilisées (pouvoir corrosif). Cette méthode est bien utilisée dans les élevages de ruminants, elle permet une bonne imprégnation des poumons, dans le cas de pathologies respiratoires
- **Autres voies accessoires** : Les huiles essentielles peuvent également être administrées par voie intramammaire ou par voie intra-utérine (Festy, 2011).

3.3. Activité antibactérienne et mécanismes d'action des huiles essentielles

Les HEs ont un effet sur la croissance des bactéries. Elles agissent en empêchant leur multiplication, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Ces dernières attirent actuellement beaucoup d'attention parce qu'elles ont montré une activité contre les pathogènes résistants aux antibiotiques, tels que les staphylocoques dorés résistants à la méticilline (SARM), les β -Lactamases à spectre élargi (BLSE) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (Tohidpour *et al.*, 2010 ; Warnke *et al.*, 2013).

Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les HEs, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (figure 5).

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases (Calsamiglia *et al.*, 2007 ; Djilani et Dicko, 2012; Goetz et Ghedira , 2012) :

- Attaque de la paroi bactérienne, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires;
- Acidification de l'intérieur de la cellule provoquant la coagulation des constituants cellulaires par la dénaturation des protéines, ce qui bloque la production de l'énergie

cellulaire et la synthèse des composants de structure ;

- Destruction du matériel génétique, ce qui cause la mort de la bactérie (Jalas, 1971).

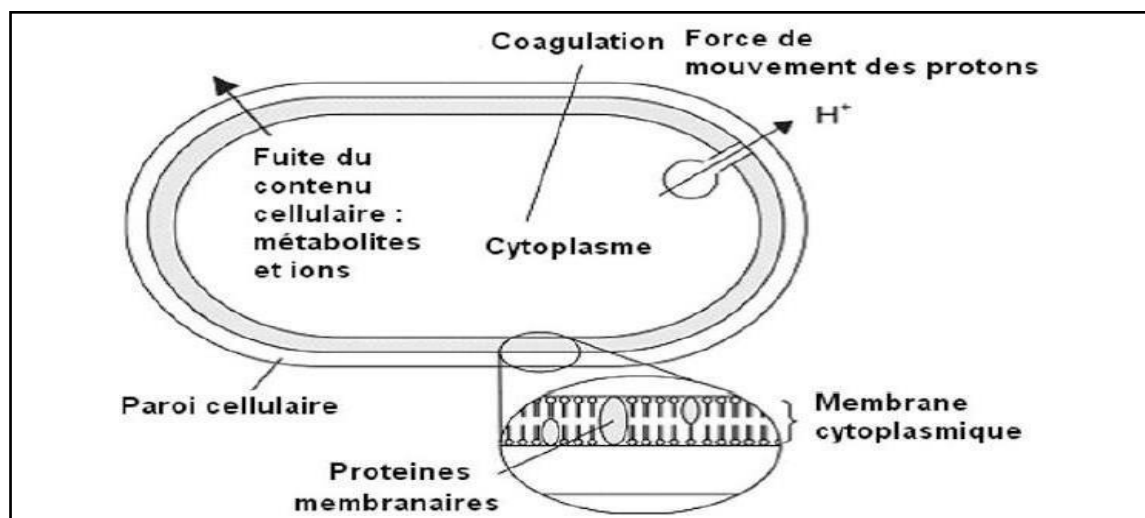


Figure 5 : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Burt, 2004)

3.4. Huiles essentielles du thym

La composition chimique de l'HE de thym comme celles d'ailleurs des autres plantes aromatiques dépend de plusieurs facteurs tels : la génétique de la plante, l'âge, les conditions édaphoclimatiques et la saison de cueillette (Djilani et Dicko, 2012).

3.4.1. Origine et définition

Le nom du thym (en anglais *thyme*) vient du grec *thumos*, qui signifie odeur. Plante sacrée, très recherchée dans l'antiquité, le thym était un symbole de force chez les romains ; il était brûlé au cours des sacrifices et utilisé comme encens dans les temples grecs. Le thym est originaire du bassin méditerranéen, il existe plusieurs espèces de ce genre dans le monde, et sur celles qui sont actuellement connues, l'espèce *Thymus vulgaris* est toutefois la plus répandue. Au Maghreb, on dénombre autres telles que : *Thymus numidicus*, *Thymus pallescens*, *Thymus ciliatus*, etc (Richard, 1992).

3.4.2. Description morphologique

Le thym est une plante sous-ligneuse, odorante, il forme des touffes compactes très ramifiées qui s'élèvent à une vingtaine de centimètres au-dessus du sol. Il pousse de façon spontanée sur les coteaux secs et rocailloux et dans les garrigues (Djilani et Dicko, 2012).

Les feuilles du thym sont plus au moins contractées et les inflorescences sont en faux verticilles. Le calice quant à lui est tubuleux et la corolle est plus au moins exserte (Quezel et Santana, 1963).

3.4.3. Répartition géographique

Le thym est une plante qui est très répandue dans le bassin méditerranéen : Maghreb, France, Espagne, Italie. Aussi dans les montagnes d'Arabie du Sud-ouest et dans la péninsule de Sinai en Égypte. Le thym pousse également en Sibérie et en Europe du Nord (Jalas, 1971).

Le thym est une plante répandue en Algérie, les différentes espèces qui y existent sont réparties le long du territoire national, du Nord Algérois à l'Atlas saharien, et du Constantinois à l'Oranais (Kabouche *et al.*, 2005).

3.4.4. Composition chimique

La composition des huiles essentielles varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte. Elle peut aussi être modifiée au cours de l'extraction ou durant la conservation (Merghache *et al.*, 2009 ; Boukhatem *et al.*, 2010 ; Sui *et al.*, 2012 ; Zaouali *et al.*, 2013).

Dans le teneur de **1,0 à 2,5 %** diverses compositions ont été décrites: ainsi, le *Thymus* semble être le composé majeur des HE de plusieurs espèces de thym. (Wu *et al.*, 2013).

- Les composants de thymus
 - Monoterpènes isomères : thymol = méthyl-6-isopropyl-3-phénol (30 à 50 %)
 - Carvacrol = méthyl-5-isopropyl-2-phénol (3 à 5 %)
 - Une faible partie des phénols est également présente sous forme d'hétérosides.
 - Précurseur biogénétiques des monoterpènes : γ -terpinène (5 à 10 %) et le p-cymène (10 à 20 %), ainsi que les méthyléthers du thymol et du carvacrol.
 - Hydrocarbures sesquiterpéniques : B-caryophyllène (1) est présent en quantité notable (1 à 3 %)

Autres constituants

- Acide rosmarinique et caféique
- Tanins
- Flavonoïdes (thymonine, cirsilinéol et 8-méthoxy-cirsilinéol caractéristiques)

- Triterpènes
- Dérivés du biphényl d'origine monoterpénique

3.4.5. Caractéristiques physiques

Une huile essentielle de Thym vulgaire à thuyanol de qualité doit présenter des caractéristiques physiques proches de celles-ci (Karamanos et Sotiropoulou ,2013) :

- Densité à 20°C : 0,892 à 0,915.
- Indice de réfraction à 20°C : 1,46 à 1,48.
- Pouvoir rotatoire à 20°C : +0° à +20°.
- Point éclair : +60°C.

3.4.6. Description morphologique

Le thym est une plante sous-ligneuse, odorante, formant des touffes compactes très ramifiées qui s'élèvent à une vingtaine de centimètres au-dessus du sol. Il pousse de façon spontanée sur les coteaux secs et rocaillieux et dans les garrigues (Djilani et Dicko, 2012).

Les feuilles du thym sont plus au moins contractées et les inflorescences sont en faux verticilles. Le calice, quant à lui, est tubuleux et la corolle est plus au moins exserte (Quezel & Santa, 1963).



Figure 6 : Morphologie de *thymus vulgaris* (Quezel& Santa, 1963)

3.4.7. Classification taxonomique

Le *Thymus* est un genre de plantes (couramment appelées thym ou serpolet) de la famille des Lamiacées. Ce sont des plantes rampantes ou en coussinet, portant de petites fleurs rose pâle ou blanches. Ces plantes sont riches en huiles essentielles et à ce titre font partie des plantes aromatiques (*Thym*) (Teuscher *et al.*, 2005).

Classification	
Règne	Plantae (végétal)
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Thymus</i>

3.4.8. Domaines d'utilisation

➤ Phytothérapie

Le terme d'aromathérapie apparaît en 1937 (Gattefossé, 1937). C'est une branche de la phytothérapie qui utilise les huiles essentielles pour traiter un certain nombre de maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux) (Djilani et Dicko, 2012).

Plusieurs huiles essentielles ont donné des résultats cliniques très satisfaisants en médecine dentaire, dans la désinfection de la pulpe dentaire ainsi que dans le traitement et la prévention des caries (Sourai, 1989; Kato *et al.*, 1990; Schwartz & Hilton, 1992). La listerine, qui est une solution constituée d'huile essentielle, de thymol et d'eucalyptol, possède une grande activité bactéricide sur les micro-organismes de la salive et de la plaque dentaire (Kato *et al.*, 1990).

L'effet antibactérien de l'huile essentielle de thym et ses constituants actifs, a été mis en évidence pour *Salmonella thyphimurum* (Juven *et al.*, 1994).

L'effet antiviral de l'huile essentielle d'origan et du girofle sur le virus Type 1 de l'herpès simplex, a été montré par une étude *in vitro* (Siddiqui *et al.*, 1996).

L'huile essentielle des feuilles de la Menthe poivrée (*Mentha piperita*) lui confère un grand pouvoir calmant des spasmes intestinaux.

Des études très récentes ont montré que le géraniol a une action sur les cellules cancéreuses du colon (Carnesecchi *et al.*, 2001), en plus de l'activité anti-inflammatoire, récemment mise en évidence (Siani *et al.*, 1999).

➤ Utilisations en aéro-ionisation

Dans les locaux, l'atmosphère peut être aseptisée avec un ionisateur d'huile essentielle. Il se forme ainsi des aérosols vrais aromatiques, ionisés, créant de l'oxygène naissant ionique, fortement bactéricide, tout en contribuant à dépolluer l'atmosphère (Taldykin, 1979; Makarchuk *et al.*, 1981; Inyoue *et al.*, 1983).

➤ Parfumerie et cosmétologie

Dans ce domaine, les huiles essentielles semblent reprendre actuellement le dessus sur les produits de synthèse classiques.

Le cinéole, par exemple, entre dans la fabrication des savons de toilette, des aérosols et des lotions désodorisantes (Borris, 1996). De même, Beylier-Maurel (1976) a réuni une vingtaine de composés bactériostatiques en formulation harmonieuse de point de vue olfactif. Elle a aussi démontré la grande activité de l'huile essentielle de bois de Santal, sur la microflore de la peau, d'où son utilisation en cosmétique. Des usages similaires ont été réalisés avec les essences de Camomille (Schilcher, 1985).

L'utilisation des huiles essentielles dans les crèmes et les gels, permet de préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et antioxydante, tout en leur assurant leur odeur agréable (Maruzzella, 1962; Roulier, 1992; Vargas *et al.*, 1999).

➤ Conservation des denrées alimentaires

La préservation des produits alimentaires à caractère périssable, constitue un des domaines d'utilisation des plantes aromatiques et médicinales.

La lutte contre les champignons toxigènes est l'un des objectifs de cette conservation. En effet, ces micro-organismes élaborent des substances toxiques, les aflatoxines, les ochratoxines et les zéaralenones, réputés pour leurs effets hépatotoxique et cancérigène (Hitokoto *et al.*, 1980; Tantaoui-Elaraki & Beraoud, 1994; Fan & Chen, 1999).

Plusieurs travaux ont montré que les huiles essentielles de thym, d'origan, de cannelle et d'autres plantes aromatiques, ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxinogénèse de plusieurs bactéries et champignons responsables de toxi-infections alimentaires (Hitokoto *et al.*, 1978; Beraoud *et al.*, 1991; Lachowicz *et al.*, 1998; Arora & Kaur, 1999). La quantité d'épices et d'aromates habituellement utilisés étant faible, leur pouvoir antimicrobien semble synergique (Beuchat, 1976; Madhyasta & Bhat, 1984; Bilgrami *et al.*, 1992).

Le carvacrol, un des constituants chimiques des huiles essentielles qui exerce une action antimicrobienne bien distinguée, est additionné à différents produits alimentaires en industrie agro-alimentaire (Hammer *et al.*, 1999). Il y est rajouté pour rehausser le goût et pour empêcher le développement des contaminants alimentaires (Busta & Foegeding, 1980; Hitokoto *et al.*, 1980).

L'eugénol et le cinnamalehyde, extraits à partir d'huile essentielle du *Cinnamum*, comptent parmi les principaux agents de conservation alimentaire, d'origine végétale. Ils sont employés comme additifs pour la préservation des olives de table contre la flore cryptogamique (Kiwank & Akgul, 1990; Wild, 1994).

4. Evaluation de l'activité antibactérienne : Technique de diffusion en milieu gélosé (méthode de Kirby Bauer)

Le recours aux ressources naturelles, en général, et aux plantes médicinales, en particulier, devient alors une des plus importantes et intéressantes pistes à explorer, pour la recherche de nouveaux produits antibactériens plus efficaces (Wright & Sutherland, 2007).

Parmi les méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne d'une plante donnée (extrait ou huile essentielle), la technique de l'antibiogramme, utilisée pour tester les antibiotiques, est la plus couramment utilisée. Quand il s'agit de tester l'huile essentielle d'une plante donnée, on parle d'aromatogramme au lieu d'antibiogramme. En d'autres termes, l'aromatogramme est l'équivalent d'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par les huiles essentielles (Girault & Bourgeon, 1971; Belaiche, 1979), permettant de mesurer *in vitro* leur pouvoir antibactérien.

Différents types d'aromatogrammes ou antibiogrammes en milieu solide, liquide ou gazeux, sont exploitables. Cependant, en pratique quotidienne, c'est le milieu solide qui est le plus simple et le plus facilement reproductible. Ainsi, pour notre étude de l'activité antibactérienne des extraits et des huiles essentielles de *Thymus*, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu solide (Sacchetti *et al.*, 2005; Celiktas *et al.*, 2007) dont le protocole

expérimental sont présentés dans la partie Matériels & Méthodes.

➤ **Technique de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme/aromatogramme)**

Elle est appelée aussi technique de l'antibio/aromatogramme (Dayal & Purohit, 1971). Dans cette méthode, des disques de papier filtre imprégnés d'extrait ou d'huile essentielle de plantes, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé, en surface, d'une suspension bactérienne.

Une variante de cette technique consiste en l'aménagement de puits, à l'emporte pièce, dans la gélose coulée et solidifiée en boîte. Le puits est rempli d'un volume donné d'extrait ou d'huile essentielle de plantes, qui va diffuser dans la gélose (Beylier-Maurel, 1976).

Dans l'une ou l'autre de ces deux variantes de cette technique, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne (en mm) après incubation à 37°C (Sacchetti *et al.*, 2005).

Partie
expérimentale

Matériel
et
méthodes

IV. Matériel et méthodes

1. L'objectif

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire des sciences et techniques de production animale de l'université Abdalhamid Ben Badis sis à Mostaganem.

Cette étude a été conduite in vitro sur l'effet thérapeutique de l'huile essentielle de thym contre les infections mammaires à *staphylococcus aureus*.

2. Matériel

Tout le matériel doit être stérilisé et le travail effectué dans une zone stérile.

2.1. Matériel microbien

Les microorganismes utilisés dans ces travaux sont des souches de l'espèce bactérienne *staphylococcus aureus* responsables des infections mammaires.

- Une souche de référence, *Staphylococcus aureus* ATCC6538.
- Une souche clinique fournie par le laboratoire vétérinaire régional de Tlemcen.

2.2. Huile essentielle de thym

Il s'agit de l'huile essentielle extraite d'une plante médicinale aromatique, le thymus ou Farigoule (espèce botanique : *Thymus vulgaris. L.*).

Cette plante à été soumise à une hydro-distillation dans un laboratoire de synthèse pétrochimique « du département de Génie des procédés chimiques et pharmaceutiques, de l'université M'hamed Bougara de Boumerdes.

2.3. Antibiotiques

Nous avons testé l'effet de quatre antibiotiques (souvent utilisés contre les infections mammaires) sur les souches bactériennes.

Il s'agit de l'amoxicilline, la gentamicine, la vancomycine et la tétracycline.

2.4. Milieu sélectif

Nous avons utilisé deux milieux de culture PCA (Annexe A) et Chapman (Annexe B).

3. Méthode

3.1. Caractérisation des souches testées

3.1.1. Revivification des souches étudiées

➤ Préparation de l'inoculum

La revivification des staphylocoques conservés, *S.aureus* d'origine clinique et *S.aureus* de référence ATCC6538 a été réalisée sur un milieu de culture liquide, le PCA.

Dans chacun des tubes stériles de 10 ml contenant de milieu PCA liquide, on met 100 µl de la suspension bactérienne de *staphylococcus aureus* (le 1^{er} tube avec *S.aureus* d'origine clinique et la 2^{ème} *S.aureus* de référence ATCC6538). Les tubes sont incubés pendant 72 heures à 37 C°.

La suspension bactérienne conservée au préalable dans un milieu spécifique a été décongelée au bain-marie à 37 C°.

○ Etude du type respiratoire

Après incubation plusieurs cas peuvent se produire :

- Croissance bactérienne au niveau de la partie supérieure du tube : bactéries aérobies strictes.
- Croissance bactérienne dans tout le milieu : bactéries aéro-anaérobies facultatives.
- Croissance au fond du tube : bactéries anaérobies strictes.

3.1.2. Ensemencement sur milieu solide Chapman

A partir des bouillons de la revivification on prend 0,1 ml et on le répartit en gouttes à la surface de la gélose, on étale l'échantillon sur la surface du milieu à l'aide d'un râteau (étaloir) en verre stérile. Les boîtes sont ensuite incubés pendant 7 jours à 25 °C.

Si la suspension est trop trouble, on ajuste l'opacité en ajoutant de l'eau physiologique.

3.2. Tests biochimiques

3.2.1. Test de catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en H_2O et $1/2 \text{O}_2$. Ce test est fondamental pour l'identification des bactéries à Gram +.

Mode opératoire

On dépose une goutte d'eau oxygénée sur une lame, à l'aide de l'anse de platine ou d'une pipette Pasteur boulée, on dépose ensuite une colonie isolée de la souche à tester sur la goutte d'eau oxygénée. On observe s'il y a l'apparition de bulles.

Une réaction positive se traduit par le dégagement de bulles de gaz (oxygène).



3.2.2. Test de la coagulase ou Staphylocoagulase

La mise en évidence de la coagulase libre permet la différenciation des espèces du genre *Staphylococcus*. En effet, seule l'espèce *Staphylococcus aureus* peut posséder cette enzyme qui joue un rôle important dans le pouvoir pathogène de la bactérie.

Nous réalisons une subculture en bouillon nutritif. Dans un tube à hémolyse contenant 0,5 ml de plasma, on introduit 0,5 ml de la suspension bactérienne déjà préparée, puis on incube à 37°C pendant 24 heures. Un témoin négatif est préparé en mélangeant le bouillon nutritif au plasma de sang humain. Ces témoins ne sont pas ensemencés.

La prise en masse recherchée par inclinaison du tube est observée, au point que le tube peut être retourné. Un caillot moins compact, visible avant les 24 heures doit être considéré comme positif.

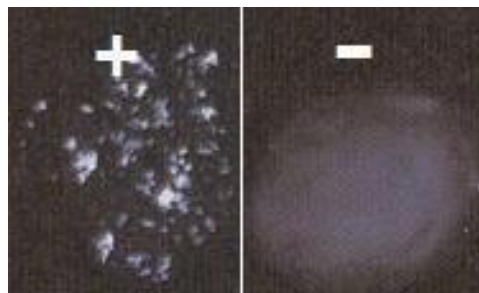


Figure 1 : Résultats positifs de test de la coagulase (Sagar, 2018)

3.2.3. Test d'oxydase

Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram -.

On prélève à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée une colonie et on la dépose sur « un disque oxydase », celui-ci contient de l'oxalate de diméthyl-paraphénylène diamine. Les bactéries « oxydase-positives » donnent rapidement une coloration violette foncée ; dans le cas contraire, il n'y a pas de coloration.

3.3. Examen macroscopique

- On observe l'aspect, la couleur et la forme des colonies.

Les staphylocoques sont des Cocci à Gram positif disposés en amas. L'espèce *S.aureus* se distingue généralement des autres staphylocoques appelés staphylocoques à coagulase négative (SCN) par la présence d'une coagulase) (Dal Pozzo, 2011).

Les colonies sont souvent pigmentées et entourées d'une aréole jaune.

La plupart des souches de *S. aureus* fermentent le mannitol et font virer le milieu du rouge au jaune orangé.

3.4. Examen microscopique

- On procède à l'examen microscopique d'une colonie nette bien isolée après Coloration de Gram :

Le colorant utilisé est le violet de Gentiane qui colore l'intérieur des bactéries. Celles-ci sont ensuite décolorées à l'alcool-acétone. En raison de leur paroi de structure plus épaisse et de composition chimique particulière, les bactéries Gram+ garde la coloration violette. Les bactéries Gram-, avec une paroi plus fine et plus perméable à la décoloration, perdent la couleur violette. De manière à visualiser les bactéries Gram-, on recolore avec de la Fuschine (rose). Les bactéries Gram+ resteront violettes alors que les Gram- seront maintenant teintées en rose.

3.5. Evaluation de l'activité antibactérienne

Pour cette évaluation, on utilise l'antibiogramme standard en milieu gélosé : méthode *de Kirby Bauer* (méthode des disques), le protocole suivi est celui décrit par (**Mazari *et al* 2010**), avec quelques modifications (gélose Chapman à la place de Mueller-Hinton, étalement de la suspension à la place d'un écouvillonnage).

3.5. 1. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de thym

L'évaluation de l'activité antimicrobienne l'huile essentielle de thym a été réalisée vis-à-vis *staphylococcus aureus* de deux origine différentes (un *S.aureus* de référence ATCC6538 et *S.aureus* clinique).

Nous avons également étudié l'effet antimicrobien de quatre antibiotiques de familles différentes : l'amoxicilline, la gentamicine, la vancomycine et la tétracycline vis-à-vis de ces *staphylococcus aureus*.

-On prépare la suspension bactérienne à partir de l'isolement (souche pure) : *staphylococcus aureus* (clinique et référence ATCC6538.). On dépose un volume de 0,1 ml de chaque suspension et on étale sur la gélose Chapman avec un râteau, on laisse sécher en tapis sur le milieu.

- On dépose dans chaque boîte quatre disques, ensuite sur chaque boîte on dépose des volumes de l'huile essentielle de Thym respectivement : 0,5 µl ; 0,1 µl et 1,5 µl.

- On place après les boîtes dans le réfrigérateur pendant 1 heure, après, les boîtes sont mises en l'incubateur pendant 5 jours à 37 C°.

- On à renouvelé l'opération, en imbibant de nouveaux disques avec les même volumes respectivement (0,5 µl ; 0,1 µl et 1,5 µl.) que l'on dépose sur les anciens disques. Le traitement in vitro est étalé en 3 fois chaque 72 heures.

- La lecture et réalisée à l'issu d'une durée de 5 jours et 12 jours.

3.5.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des antibiotiques

➤ Technique

On prépare des disques de papier Wathman de 6 mm de diamètre, ils sont stérilisés par autoclavage à 120 C° minutes, puis conservés dans des tubes en verre stériles fermés hermétiquement jusqu'à utilisation.

Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité pour les antibiotiques (Bouharb *et al.*, 2014) :

- $D < 8$ mm : bactérie non sensible ;
- $9 < D < 14$ mm : bactérie sensible ;
- $15 < D < 19$ mm : bactérie très sensible ;
- $D > 20$ mm : bactérie extrêmement sensible

D = diamètre

On dépose un volume de 0,1 ml de chaque suspension (staphylococcus aureus (clinique, référence) est étalé sur la gélose Chapman avec un râteau, on laisse sécher en tapis sur le milieu.

- On dépose ensuite dans chaque boîte quatre disques pour un même antibiotique.
- Sur chaque disque on dépose 5 µl de l'antibiotique.
- On place après les boîtes dans le réfrigérateur pendant 1 heure après, les boîtes sont mises au niveau de l'incubateur, pendant 5 jours à 37 C°.
- On renouvelée l'opération, en imbibant des nouveaux disques avec le même volume (5 µl) que l'on dépose sur les anciens disques. Le traitement in vitro est étalé en 3 fois chaque 72 heures.
- La lecture et réalisée à l'issu d'une durée de 5 jours et 12 jours.

*Résultats
et
discussion*

V. Résultats et discussion

1. Revivification des souches étudiées

Après l'incubation des tubes à 37°C pendant 48 heures, on remarque qu'il y a une croissance bactérienne et se développent rapidement dans tout le milieu liquide du PCA donc les souches bactériennes sont des aéro-anaérobies facultatives.

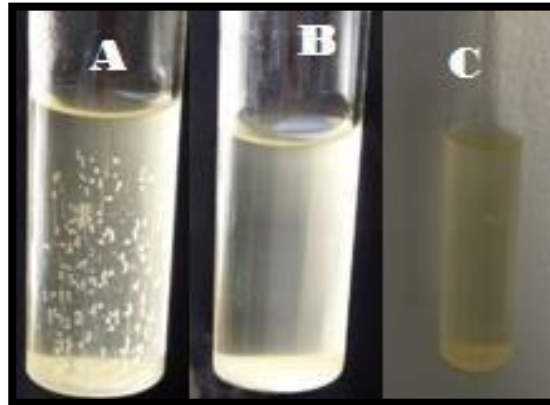


Figure 1 : Résultats de la revivification des souches testées

A : *S. aureus* de référence ATCC6538 ; **B :** *S. aureus* de clinique e ; **C :** Témoin

2. Examens macroscopiques et microscopiques

➤ Observation morphologique

❖ Après 48 h d'incubation à 37°C, on observe:

Des colonies lisses, de forme rondes, bombées, brillantes, de 1 à 1,5 mm de diamètre. Elles se pigmentent habituellement en jaune doré virage de la couleur du milieu, il s'agit probablement de *S. aureus*.

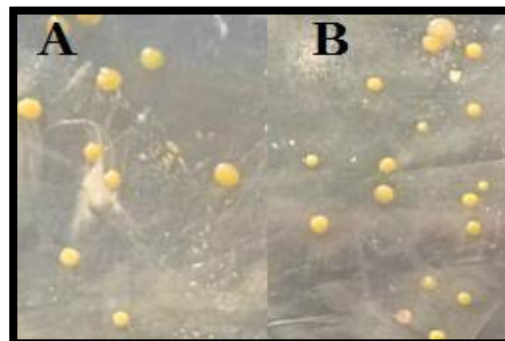


Figure 2 : Aspect des souches testées sur milieu Chapman solide après incubation

à 37°C pendant 72h.

A : *S. aureus* de référence ATCC6538 ; **B :** *S. aureus* de clinique

Tableau 1 : Aspect macroscopique des souches staphylocoques sur le milieu Chapman

Souche	Taille	Forme	Pigmentent	croissance
<i>S. aureus</i> de référence ATCC6538	Petit	Bombé	Jaune doré	Faible
<i>S. aureus</i> de clinique	Petit	Bombé	Jaune doré	Bonne

3. Tests biochimiques

3.1. Test de catalase

On observe un dégagement gazeux, donc les souches sont catalase positive.

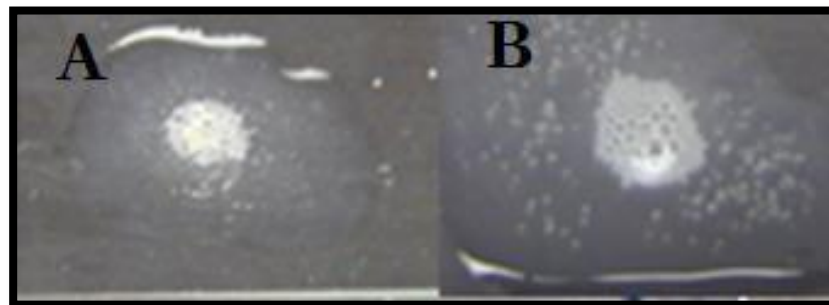


Figure 3: Résultats des tests de catalase

A : *S. aureus* de référence ATCC6538 ; **B** : *S. aureus* de clinique

3.2. Test de l'oxydase

On observe que la couleur des disques ne change pas et l'absence de la coloration violette foncée des deux bactéries (*S. aureus* de référence ATCC6538 ; *S. aureus* d'origine clinique), donc elles sont oxydases négatives.

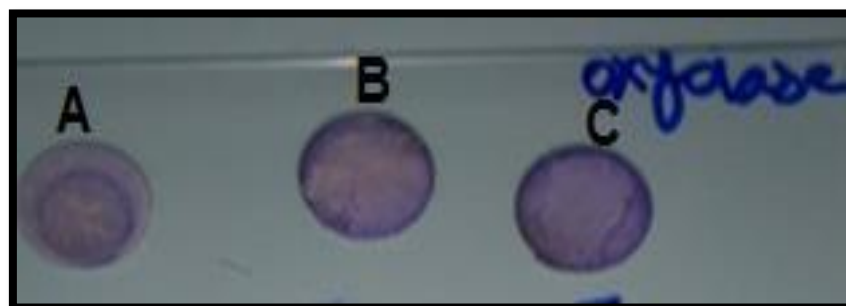


Figure 4 : Résultats des tests d'oxydase

A : *S. aureus* de référence ATCC6538 ; **B** : *S. aureus* de clinique ; **T** : Témoin

3.4. Test de la coagulase

Après 24 h d'incubation, on peut incliner les tubes, le plasma reste sous forme d'un culot, cela signifie qu'il a coagulé, les souches (*S.aureus* de référence ; *S. aureus* de clinique). Les souches possèdent la coagulase, elles sont coagulase positives.

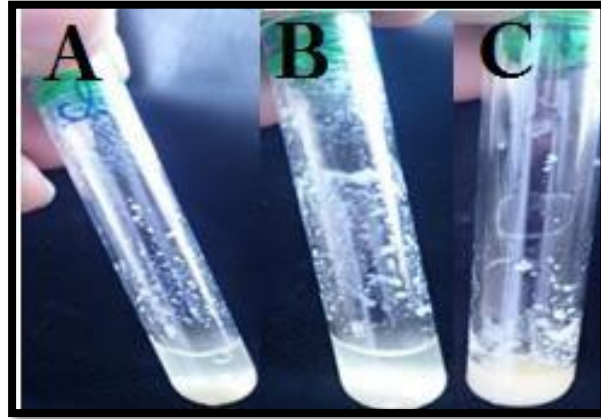


Figure 5: Résultats des tests coagulase

A : *S. aureus* de référence ATCC6538 ; **B :** *S. aureus* de clinique ; **C :** Témoin

4. Coloration de Gram

Après coloration de Gram l'observation microscopique a révélé que les souches étudiées (*S.aureus* de référence ATCC6538 ; *S. aureus* de Clinique) des colorés de façon homogène en violet de forme des coques en amas, c'est à dire des coques Gram positive, elles sont rondes régulières de petit diamètre (de 1 à 1,5 μm).

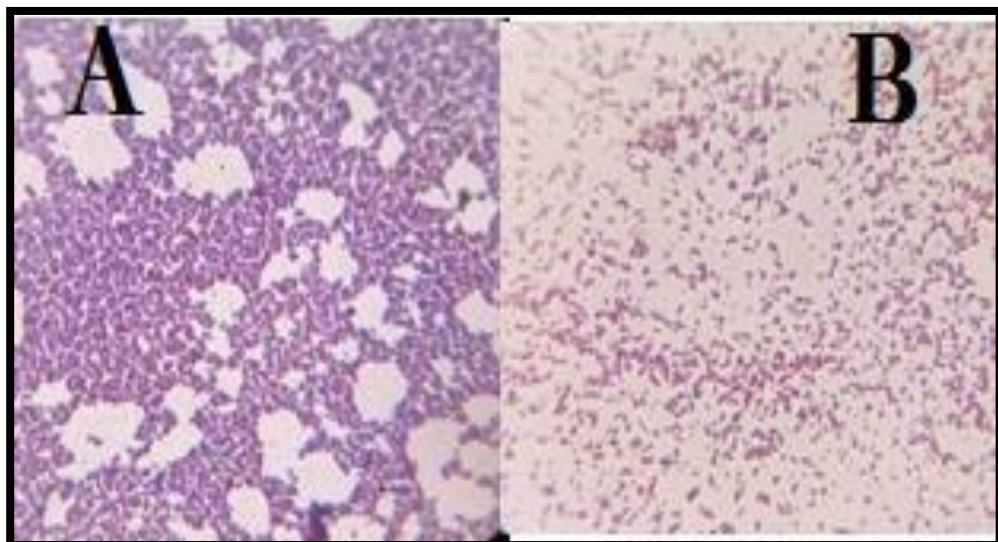


Figure 6 : Observation microscopique après la coloration de Gram (grossissement x100).

A : *S. aureus* de référence ATCC6538 ; **B :** *S. aureus* de clinique

5. Evaluation d'activité antibactérienne

- La présence de l'activité antibactérienne est traduite par l'apparition des zones claires autour des puits, l'absence de l'inhibition se traduit par l'absence des halos autour des puits. Le diamètre des halos varie en fonction de la souche testée, de composition et la dose de la substance active présente dans l'extrait de l'huile essentielle ou des antibiotiques (Vaux *et al.*, 2012). On teste l'expérience sur deux souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* de référence ATCC6538 et autre d'origine clinique).
- Pour l'huile essentielle de thym, il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du halo qui entoure le disque : souche ou bactérie sensible, intermédiaire ou résistante.
 - **Sensible (S)** : signifie que la probabilité de succès thérapeutique est forte, à condition que les autres paramètres pharmacologiques (diffusion au site de l'infection), toxicologique et clinique soient pris en compte.
 - **Résistant (R)** : signifie que le risque d'échec thérapeutique est grand quelque soit le traitement.
 - **Intermédiaire (I)** : signifie que l'action de l'huile se situe dans la zone d'incertitude qui ne peut pas prédire du succès ou de l'échec thérapeutique.
 - La réponse S/I/R est suffisante dans la majorité des infections.
- Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité pour les antibiotiques (Bouharb *et al.*, 2014) :
 - $D < 8$ mm : bactérie non sensible ;
 - $9 < D < 14$ mm : bactérie sensible ;
 - $15 < D < 19$ mm : bactérie très sensible ;
 - $D > 20$ mm : bactérie extrêmement sensible.

D = Diamètre de zone d'inhibition

5.1. Evaluation d'activité antibactérienne de l'huile essentielle de thym

- Après 5 jours d'incubation et les disques imbibés 2 fois, il n'y a aucun changement sur la croissance bactérienne et l'absence des halos d'inhibition, les résultats mentionnés sur la figure (7 et 8).

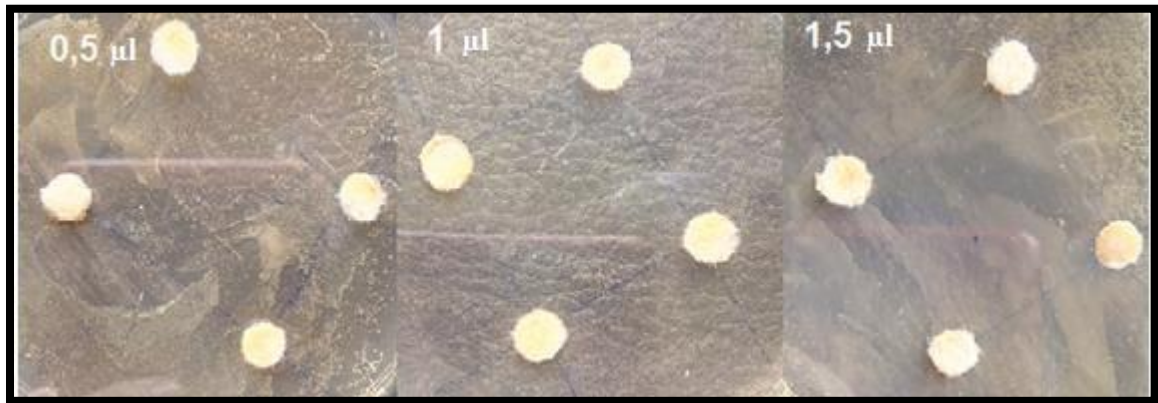


Figure 7 : Résultats obtenus de l'effet de l'huile essentielle sur *Staphylococcus aureus* d'origine clinique.

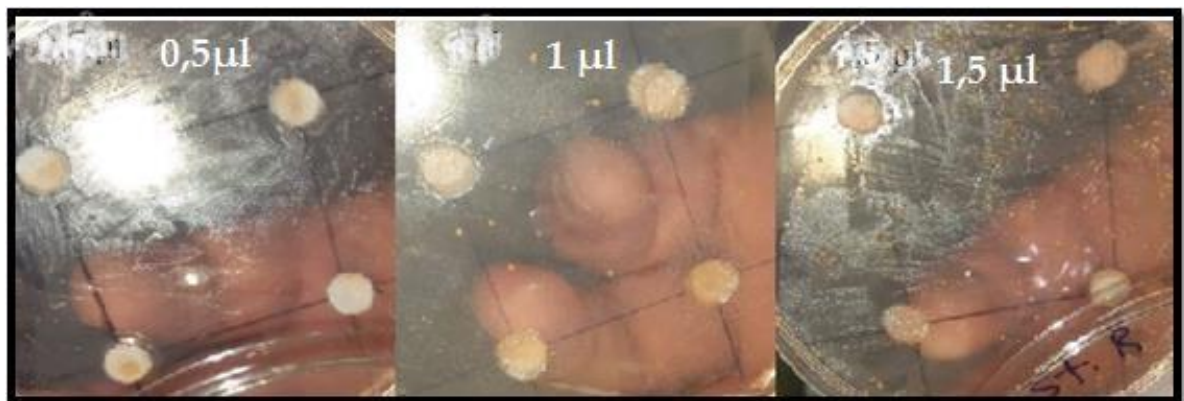


Figure 8 : Résultats obtenus de l'effet de l'huile essentielle de thym sur *Staphylococcus aureus* de référence ATCC6538.

- Après 12 jours d'incubation et les disques imbibés 4 fois, il y a une croissance bactérienne avec la présence des halos d'inhibition. Les résultats mentionnés sur la figure (9 et 10).

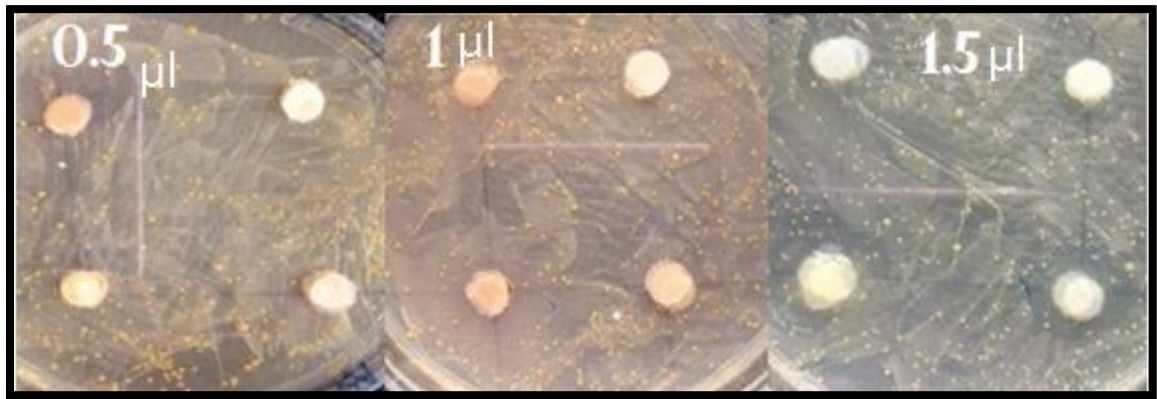


Figure 9: Résultats obtenus de l'effet de l'huile essentielle de thym sur *Staphylococcus aureus* de référence ATCC6538.

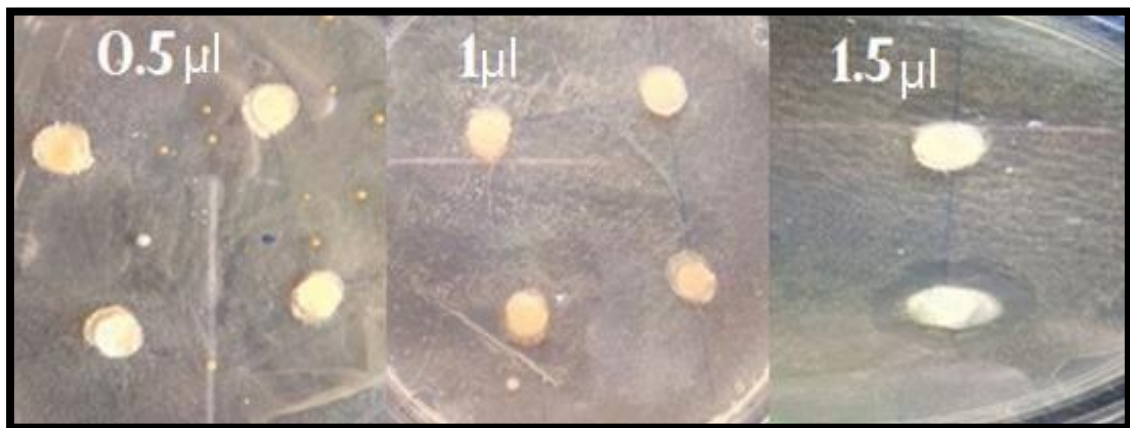


Figure 10 : Résultats de l'effet de l'huile essentielle sur *Staphylococcus aureus* d'origine clinique.

Résultats obtenus de l'effet de l'huile essentielle sur les souches testés sont résumé dans le tableau ci-dessous.

Tableau 02: Résultats de l'huile essentielle sur les souches testées

L'huile essentielle	La dose µl	Diamètre de zone d'inhibition	
		<i>S.aureus</i> de référence ATCC6538	<i>S.aureus</i> de clinique
Thym	0,5	Résistant	Résistant
	1	Résistant	Résistant
	1,5	Sensible	Sensible

- Selon les recommandations de l'organisation mondiale de la santé animale OIE (projet 2017-2019), l'utilisation de la phytothérapie des mammites subcliniques et cliniques aux huiles essentielles se fait par un traitement des trayons en pré-trempe et en trempe à des doses allant de 5 à 20 µl suivant l'état sanitaire et infectieux des pis de vache (Leperlier *et al.*,2013).
- L'huiles essentielles de thym sont à 70/30 (70% de constituants liposolubles et à 30% de constituants solubles).a montré qu'en traitement *in vitro* à des doses allant de 5 µl à 25 µl l'huile diffuse entre 1 et 5 mm pour une inhibition de prolifération et de 5 à 15 mm pour une action bactéricide. La concentration minimale bactéricide CMB vis-à-vis des staphylocoques à coagulase positive est de l'ordre de 5 à 15 µl pour un traitement curative / trayon de 15 à 20 jours et de l'ordre de 2 à 5 µl/ trayon pour un traitement préventif de 05 à 07 jours inhibant toute prolifération des germes responsables des mammites.
- Les résultats consignés dans le tableau 2 ont montre que les extraits de thym ont une bonne activité inhibitrice à une concentration de 6 µl divisé étalé sur quatre fois (1,5 µl x 4) testées sur les souches bactérienne pathogènes à Gram positif étudiées (*S.aureus* de référence ATCC6538 et *S. aureus* de Clinique) et l'absence d'activité inhibitrice pour les doses de 2 µl et 4 µl et montrent que les deux souche de *Staphulococcus aureus* sensible à l'huile essentielle de thym avec une zone d'inhibition de diamètre 9 à 11 mm.

5.2. Evaluation d'activité antibactérienne des antibiotiques

- Après 5 jours d'incubation, il n'y a aucun changement sur la croissance bactérienne, les résultats mentionné sur la figure (11 et 12).

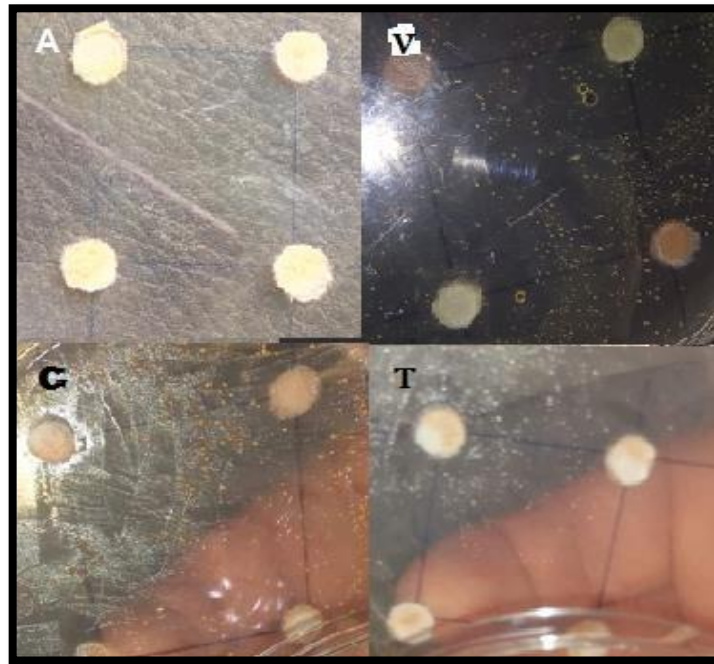


Figure 11 : Résultats obtenus d'un antibiogramme établi par les antibiotiques sur *S. aureus* d'origine clinique après 5 jours d'incubation.

G : Gentamicine ; **A** :Amoxuciline ; **V** : Vancomynice ; **T** : Tetracycline

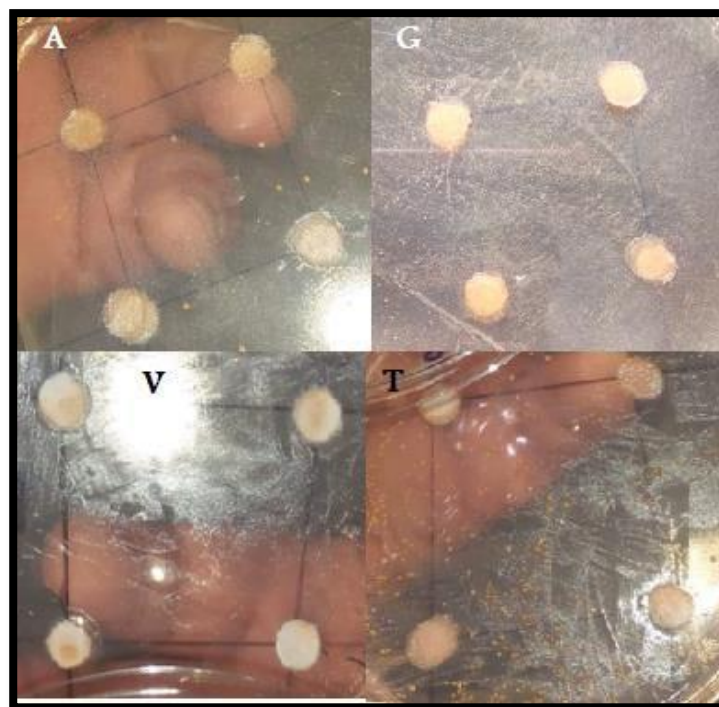


Figure 12 : Résultats obtenus d'un antibiogramme établi par les antibiotiques sur *S. aureus* de référence ATCC6538

G : Gentamicine ; **A** :Amoxuciline ; **V** : Vancomynice ; **T** : Tetracycline

- Après 12 jours d'incubation et les disques imbibés 4 fois, il y a un changement sur la croissance bactérienne avec la présence des halos d'inhibition, les résultats mentionné sur la figure (13 et 14).
- A partir des différentes mesures des diamètres d'inhibition sur les boites de pétri, Les résultats obtenus montrent que les antibiotiques (amoxiciline, gentamicine, vancomicine et tetracycline) bloque la croissance des deux staphylocoques dorés (*Staphylococcus aureus* de référence ATCC6538 et d'origine clinique), avec une zone d'inhibition inférieur de 8 mm et pour une dose de 20 µl (5 µl x 4). les staphylococcus que l'on teste sont résistant aux antibiotiques (tableau 3).

Les résultats obtenus sont résumé dans le tableau ci-dessous

Tableau 03 : Résultats des antibiotiques sur les souches testées

Antibiotiques	La dose en µl	Diamètre de zone d'inhibition en mm	
		<i>S.aureus</i> de référence ATCC6538	<i>S.aureus</i> clinique
Gentamicine	5	D < 8	D < 8
Amoxiciline	5	D < 8	D < 8
Vancomycine	5	D < 8	D < 8
Tetracycline	5	D < 8	D < 8

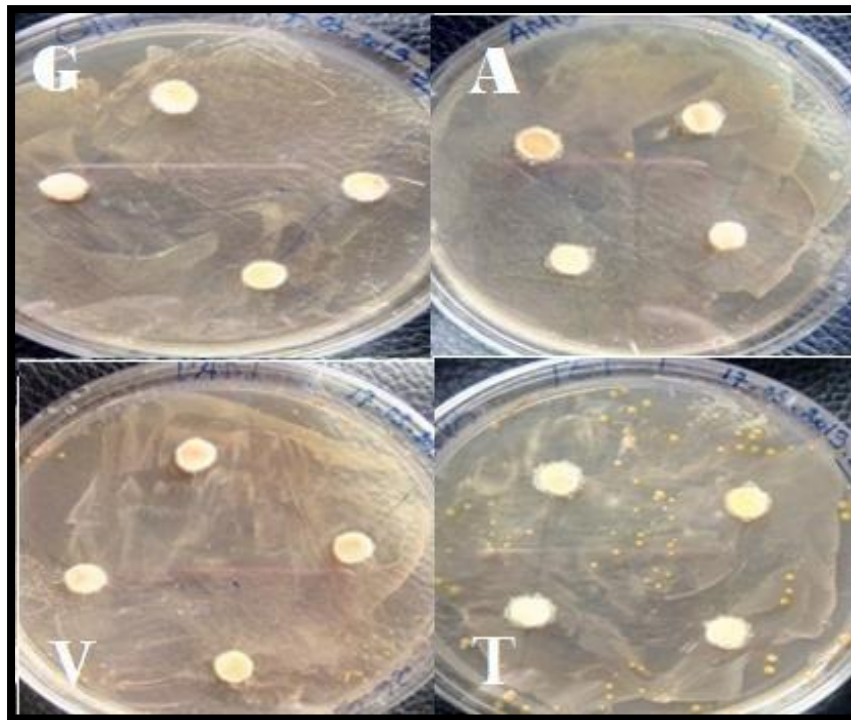


Figure 13 : Résultats obtenus d'un antibiogramme établi par les antibiotiques sur *S.aureus* de référence ATCC6538.

G : Gentamicine ; **A** :Amoxuciline ; **V** : Vancomynice ; **T** : Tetracycline

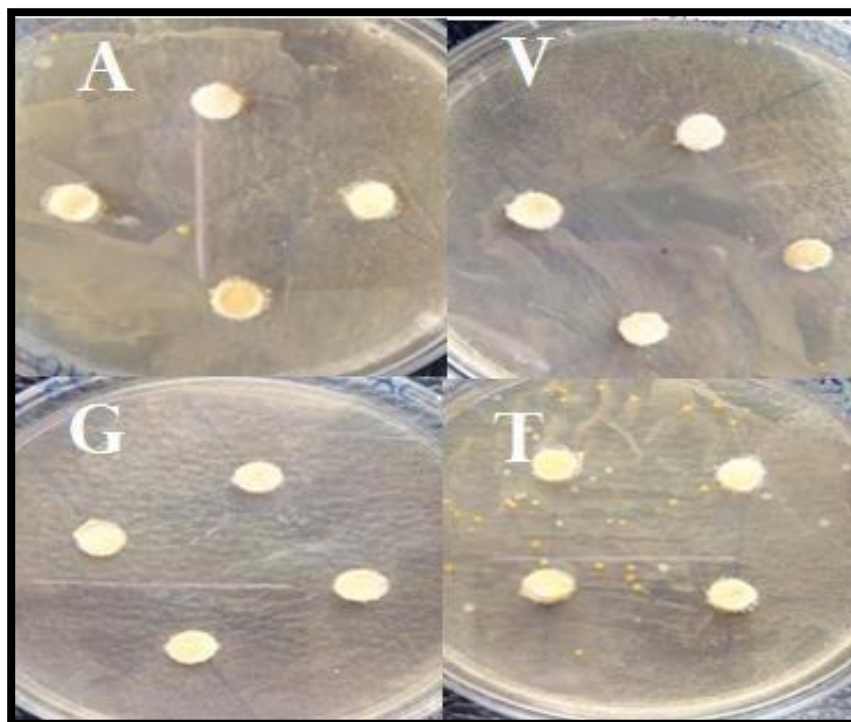


Figure 14 : Résultats obtenus d'un antibiogramme établi par les antibiotiques sur *S. aureus* d'origine clinique.

G : Gentamicine ; **A** :Amoxuciline ; **V** : Vancomynice ; **T** : Tetracycline

➤ **Comparaison entre l'effet de l'huile essentielle et les antibiotiques sur les bactéries de *staphylococcus aureus* étudiées**

Les HEs ont un effet sur la croissance des bactéries. Elles agissent en empêchant leur multiplication, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Ces dernières attirent actuellement beaucoup d'attention parce qu'elles ont montré une activité contre les pathogènes résistants aux antibiotiques, tels que les *Staphylocoques aureus* résistants à la méticilline (SARM), les β -Lactamases à spectre élargi (BLSE) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (Tohidpour *et al.*, 2010 ; Warnke *et al.*, 2013).

Ces résultats semblent indiquer que HE de *Thymus vulgaris. L* inhibe la croissance de staphylocoque, de plus, il donne un effet curatif pour traiter les infections mammaires, en effet, on peut dire que le traitement des antibiotiques, que HE du thym pour traiter les infections mammaires à *Staphylococcus aureus* est efficace à condition de respecter le principe de l'activité inhibitrice qui basie sur la nature et la dose de la substance active présente dans les extraits (Tohidpour *et al.*, 2010).

Les avantages de la méthode de diffusion sur gélose (méthode des puits) sont sa rapidité et sa reproductibilité pour l'obtention des résultats. Mais, également les inconvénients de cette méthode sont l'étude de la bactériostase uniquement, le manque de précision, l'absence de détection de certaines résistances, la réponse ne tient pas compte du site de l'infection mais seulement des concentrations sériques pour des posologies usuelles et d'interprétation pouvant être complexe.

En tous cas, de nombreux essais sur laboratoire et terrains avec des protocoles standardisés sont nécessaires pour donner aux éleveurs cette possibilité thérapeutique (Warnke *et al.*, 2013).

Conclusion

Les mammites ont des conséquences économiques importantes dans les élevages laitiers .elles sont d'origine multifactorielle ce qui rend leur maîtrise plus difficile .La lutte contre les mammites passe par la mise en place de mesures prophylactiques comme l'hygiène de la traite et du bâtiment.

La qualité de gestion des cas cliniques et de la détection des cas subcliniques font partie intégrante du plan de maîtrise sanitaire des mammites.

En élevage laitier, les mammites constituent l'une des principales causes de retour à l'utilisation des antibiotiques. Leur efficacité est prouvée limitée. Les mammites peuvent engendrer des pertes économiques importantes (coût du traitement, baisse de la qualité du lait, pertes de production, temps d'attente,...).C'est pourquoi les éleveurs biologiques sont particulièrement intéressés par le développement d'autres méthodes dans ce domaine.

Parmi ces méthodes, l'aromathérapie à base d'huiles essentielles de plantes fleuries semble se développer fortement durant ces dernières années .C'est dans ce contexte notre méthodologie menée dans ce sens a donné les résultats escomptés.

Nos résultats ont montré que les extraits de thym « *Thymus vulgaris* » ont une bonne activité inhibitrice à une concentration de 6 µl étalée par un traitement expérimental sur quatre fois (1,5 µl x 4) testée sur les souches bactérienne à Gram positif étudiée (*S.aureus* de référence ATCC6538 et *S. aureus* Clinique) et l'absence d'activité inhibitrice pour les doses de 2 µl et 4 µl .Ces résultats expérimentaux semblent indiquer que l'on peut remplacer les antibiotiques par l'huile essentielle de thym et pour traiter les infections mammaires par *Staphylococcus aureus* à condition de respecter le principe de l'activité inhibitrice basée sur la nature et la dose de la substance active présente dans les extraits.

L'aromathérapie avec l'huile essentielle de Thym in vitro semble être très efficace que l'antibiothérapie et reste une méthode de traitement à développer et à priori très intéressante dans le traitement des infections mammaires.

En perspectives

Il reste à accomplir de nombreux travaux concernant les huiles essentielles extraites des plantes fleuries et leur utilisation sur les mammites

De nombreux essais sur terrains avec des protocoles standardisés sont nécessaires pour donner aux éleveurs cette possibilité thérapeutique. La mise en place d'autres essais de terrain et la détermination de délais d'attentes sont donc nécessaires pour offrir aux éleveurs cette possibilité thérapeutique dans un cadre législatif défini.

Annexes

Annexe A : milieux de cultures

➤ Milieux PCA

La gélose glucosée à l'extrait de levure, appelée par les Anglo-Saxons "Plate Count Agar" ou PCA, est utilisée en bactériologie alimentaire pour le dénombrement des bactéries aérobies psychrotrophes, mésophiles dans le lait, les viandes, les produits à base de viande, les autres produits alimentaires, ainsi que pour l'analyse des produits pharmaceutiques, des produits cosmétiques et de leurs matières premières.

Milieu PCA-Lait : en grammes pour un litre d'eau distillée

Peptone caséine.....	5,00
Extrait de levure.....	2,50
Glucose	1,00
Lait écrémé	2,50

pH final à 25°C : 7,00 ±0,2

➤ Milieux Chapman

Milieu d'isolement sélectif des bactéries du genre Staphylococcus (coques Gram + regroupés en amas).

Composant de milieux Chapman : pour 1L (Ph : 7,4)

Extrait de viande de bœuf.....	1
Peptones.....	10
Mannitol.....	10
Chlorure de sodium.....	75
Rouge de Phénol	0.025
Agar	15

Annexe B

Méthode d'extraction huile essentielle de thym

Le matériel végétal séché est soumis à une hydro-distillation au moyen d'un dispositif d'extraction type Clevenger (Figure 01). Cette technique se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles. L'opération consiste à introduire 100 g de masse végétale séchée dans un grand ballon en verre, on y ajoute une quantité suffisante d'eau distillée sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'une chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentin de refroidissement où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée. L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière. L'huile ainsi obtenue est récupérée puis traitée par un déshydratant, le sulfate de sodium, pour éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans l'huile et enfin conservée dans des flacons opaques bien scellés à température basse (4-5 C°). L'opération d'extraction dure trois heures à partir du début d'ébullition.

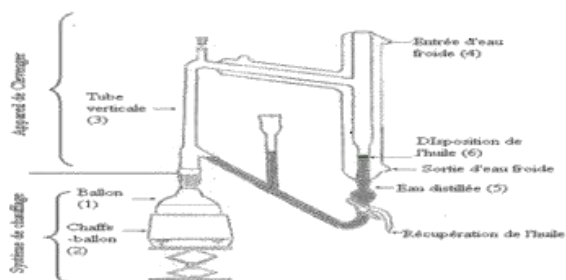


Figure 1 : Dispositif d'extraction Clevenger

Annexe C

Familles Botaniques algériennes

Distribution des différentes familles de la flore de l'Algérie en fonction du nombre d'espèces (ce nombre comprend aussi bien les espèces définies en tant que telles que les sous-espèces, les variétés et les hybrides).

Famille	Nb. d'espèces*	Pour cent.	Famille	Nb. d'espèces*	Pour cent.
Astéracées	648	15,72%	Plantaginacées	26	0,63%
Fabacées	453	10,99%	Iridacées	24	0,58%
Poacées	368	8,93%	Fumariacées	21	0,50%
Brassicacées	200	4,85%	Dipsacacées	20	0,48%
Lamiacées	184	4,46%	Résédacées	20	0,48%
Caryophyllacées	182	4,41%	Amaranthacées	19	0,46%
Apiacées	163	3,95%	Linacées	19	0,46%
Scrofulariacées	110	2,66%	Polypodiacées	19	0,46%
Cistacées	94	2,28%	Primulacées	19	0,46%
Liliacées	86	2,08%	Amaryllidacées	18	0,43%
Boraginacées	81	1,96%	Papavéracées	17	0,41%
Chénopodiacées	75	1,82%	Asclépiadacées	16	0,38%
Cypéracées	73	1,77%	Clusiacées	16	0,38%
Orchidacées	60	1,45%	Gentianacées	15	0,36%
Ranunculacées	54	1,31%	Polygalacées	14	0,33%
Euphorbiacées	51	1,23%	Onagracées	13	0,31%
Rosacées	50	1,21%	Potamogetonacées	13	0,31%
Rubiacées	50	1,21%	Rhamnacées	13	0,31%
Géraniacées	46	1,11%	Tamaricacées	13	0,31%
Plumbaginacées	44	1,06%	Aizoacées	12	0,29%
Convolvulacées	43	1,04%	Oléacées	12	0,29%
Malvacées	39	0,94%	Thyméliacées	12	0,29%
Campanulacées	37	0,89%	Cucurbitacées	10	0,24%
Valérianacées	35	0,84%	Fagacées	10	0,24%
Polygonacées	34	0,82%	Frankéniacées	10	0,24%
Solanacées	33	0,80%	Violacées	10	0,24%
Orobanchacées	32	0,77%	Autres familles	303	7,35%
Crassulacées	27	0,65%	Total	4120	
Juncacées	27	0,65%			
Zygophyllacées	27	0,65%			

Source : Plantes natives d'Algérie -<http://algerianativeplants.net/index.php>.

Références bibliographiques

A

Aarab H ; Bentbib H ; Ismaili S et Tadlaoui R.,: Peniciline résistance bactérienne. Travaux personnels encadrés 2010-2011

Al Fadel F et Al Laham S (2013). Antibacterial efficacy of variety plants against the resistant streptococcus which cause clinical mastitis in cows. *Asian J. Pharm. Res. Heal. Care*, 5(1), pp. 32-41.

Anses Résapath. Réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, bilan 2013. ANSES Édition. 2014, 168 p.

April. JL, Carlet. J. *Les infections nosocomiales et leur prévention.* Edition ellipse, 1998 :255-275 P.

Arlet G. Panorama épidémiologique des résistances aux antibiotiques en France et dans le monde. *Revue du praticien.* sept 2012;62:962•967 P.

B

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

Bauman, D. E., I. H. Mather, R. J. Wall, and A. L. Lock. 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *J. Dairy Sci.* 89(4):1235-1243.

Bosquet G, Faroult B, Labbé J-F, Le Page P, Sérieys F. *Référentiel Vétérinaire 2013 pour le traitement des mammites bovines.* 2013. SNGTV, Paris, France. 100 p.

Bosseray. A, Micoud. M. Les infections nosocomiales. *Encyclopédie médico chirurgicale maladies infectieuses,* 2000, 8-001-F-10 :8.

Bouharb H., El Badaoui K., Zair T., El Amri J., Chakir S. Et Alaoui T., 2014 - Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa.* *Journal of Applied Biosciences,* 78 : 6685- 6693 P.

Bradley, A. 2002. *Bovine mastitis: an evolving disease.* *Vet. J.* 164(2):116-128 P.

Bremness, L. (2002) *Plantes aromatiques et médicinales.* Bordas (Ed). Paris, 303 p.

Bruneton J (2009). Pharmacognosie : *Phytochimie, Plantes médicinales,* 4e éd. Tech et Doc Paris, 1269 p.

Burt S et Reinders R (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.*, 36(3), pp. 162-167 P.

Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int.J.Food Microbiol.* 94, 223-253.

C

Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L et Ferret A. (2007). Invited Review : *Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation.* *Journal of Dairy Science.* 90, 2580- 259.

CCE. (2001). Commission des Communautés Européennes: propositions de la commission en matière de lutte contre la résistance antimicrobienne. Bruxelles, vol 885.

Couic-Marinier F et Lobstein A. (2013). Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques.* N° 525. 3 p.

Couture B. (1990). *Bactériologie médicale* «Etude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical». Vigot, Paris. 15-32.

D

Dal Pozzo M et al. (2011). Activity of essential oils from spices against *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. *Arq. Bras. Med. Veterinaria e Zootec.*, 63(5), pp. 1229-1232.

Deans S et Richie G (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *Int. J. Food Microbiol.*, 5(2), pp.165-180.

Delarras, C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.* Ed. Tec & Doc, Paris, p. 356-357.

Desplaces. N. Bactériologie des infections ostéo articulaires chez l'adulte. *Revue du rhumatisme*, volume73, n°2, 2006 :129-35.

Djilani A et Dicko A.(2012). *The Therapeutic Benefits of Essential Oils.* Nutrition, Well Being and Health, Dr. Jaouad Bouayed (Ed.), ISBN: 978-953-51-0125-3, In Tech, Available from: [ition-well-being-and-health/ the therapeutic benefits-of- essential-oils.](#)

Dorman HJ, Deans SG (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88: 308-316.

Dumas Pl, Faroult B, Serieys F. Assurer le traitement en exploitation laitière : expérience et perspectives de l'action G.T.V. Partenaire. Journées Nationales des G.T.V., Tours 2004 : 71-75.

Durel L, Faroult B, Lepoutre D, Brouillet P, LE PAGE Ph. Mammites des bovins (cliniques et subcliniques). Démarches diagnostiques et thérapeutiques. *La Dépêche Technique*. Supplément technique 87 à la Dépêche Vétérinaire du 20 Décembre 2003 au 2 Janvier 2004. 39 p.

F

Fasquelle R. (1974). *Eléments de bactériologie médicale* 9ème édition. Flammarion, Paris. 27-36.

Fauchere J.L. and Avril J.L. (2002). *Bactériologie générale et médicale*. ellipses, Paris. 213-217.

Festy D. (2011). *Les huiles essentielles ça marche. A propos de l'aromathérapie*. Editions:Leduc.s .Paris. 9 p.

Fitzgerald J.R., Sturdevant D.E., Mackie S.M., Gill S.R. and Musser J.M. (2001). Evolution arygenomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 8821-8826.

Fratini F et al. (2014). *Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis*. *Fitoterapia*, 96(1), pp. 1-7.

Friedman M, Henika PR et Mandrell RE (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.*, 65(10), pp. 1545-1560.

G

Germann G et Germann P (2014). *Plantes d'aromathérapie*. Éd. Delachaux et Nestl Paris, 208 p.

Goetz P et Ghedira K. (2012). *Phytothérapie anti-infectieuse*. Edition : Springer-Verlag France, Paris.Pp 4-194.

Green MJ. *National intervention study of mastitis control in dairy herds in England and Wales*. *Veterinary Record* 2007, 160(9) : 287-296.

H

Hammer K, Carson C et Riley T (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.*, 86(6), pp. 985-990.

Hoferl M et al. (2009). Correlation of Antimicrobial Activities of Various Essential Oils and Their Main Aromatic Volatile Constituents. *J. Essent. Oils Res.*, 21(5), pp. 459-463.

I

Institut De L'elevage (2008). *maladie des bovins*, 4e éd., éd. France agricole Paris, 797 p.

J

Jalas J., 1971 - Note of *Thymus L. (Labiatae)* in Europe. I. Supraspecific classification and nomenclature. *Botanical Journal of the Linnean Society*, N° 64, pp. 199-215.

K

Kabouche A., Kabouche Z. Et Bruneau C., 2005 - Analysis of the essential oil of *Thymus numidicus* (Poiret) from Algeria. *Flavour and Fragrance Journal*, N° 20, pp. 235-236.

Kalembe D, Kunicka A (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10: 813-829.

Karamanos AJ et Sotiropoulou DEK. (2013). Field studies of nitrogen application on Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum* (Link) Iets waart) essential oil during two cultivation seasons. *Industrial Crops and Products*. 46, 246–252.

Karray-Bouraoui N, Rabhi M, Neffati M, Baldan B, Ranieri A, Marzouk B, Lachaâl M et Smaoui A. (2009). Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichomemorphology and density on leaves of *Mentha pulegium*. *Industrial Crops and Products*. 30, 338–343.

Katayauma Y., Ito T. and Hiramatsu K. (2000). A new class of genetic element, Staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 1549-1555.

Kavanaugh NI et Ribbeck K (2012). Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(11), pp. 4057-4061.

Kerro Dego O, Van Dijk J, Nederbragt H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion: a

review. *Vet. Q.*, 2002, 24, 181-198.

Kloos W.E. and Bannerman TL (1999). *Staphylococcus and Micrococcus*. In: Murray PR., Baron EJ., Tenover FC. et Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th edition Washington. 271-276.

Kromker, V., and J. Friedrich. 2009. Teat canal closure in non-lactating heifers and its association with udder health in the consecutive lactation. *Vet. Microbiol.* 134(1- 2):100-105.

Kuroda M., Ohta T. and Uchiyama .I et al. (2001). Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 357: 1225-1240.

L

Labre P (2012). *Phytothérapie et aromathérapie chez les ruminants et le cheval - Tome 2, éd. Femenvet Thônes, 352 p.*

Lardry JM et Haberkorn V. (2007). *L'aromathérapie et les huiles essentielles*. *Kinesither Rev*; volume. 61, 14-7.

Larpent JP., Sanglier JJ. (1989). *Biotechnologie des antibiotiques*. Edition : Masson. Paris : 481p.

Le Loir Y. and M. Gautier. 2010. *Monographie de microbiologie: Staphylococcus aureus*. Lavoisier. Tec&Doc.

Le Minor L. and Veron M. (1990). *Bactériologie Médicale «Staphylococcus et Micrococcus»* J.Fleurette 2ème édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 773794.

Leperlier .L et al., 2013 "*traitement des mammites cliniques et subcliniques par des huiles essentielles en application cutanée* (bulletin des GTN , 68 ,pp77-86).

M

Madec J et Gay E (2014). Dossier : *Antibiothérapie et antibioresistance en élevage*. *Nouv. Prat. Vét. Elevage et Santé*, 7(26), pp. 13-45.

Mason S, Byrd E, West C et Thomas M (2015). Antimicrobial Activity of a Commercially Available Plant-Based Product. *J. Pharmacol. Clin. Toxicol.*, 3(1), pp. 1040-1043.

Medzhitov R, Janeway CA Jr. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* 9(1):4-9.

Melero C. P., Medarde M, and Feliciano A.S, (2000). A Short Review on Cardiotonic

Steroids and Their Aminoguanidine Analogues, *Molecules*, Vol 5 : 51-81.

Merghache S, Hamza M et Tabti B. (2009). *Etude physicochimique de l'huile essentielle de Ruta Chalepensis L.* de Tlemcen, Algérie. *Afrique SCIENCE*. 05 (1), 67 – 81.

Meyer. A, Deiana. J Et Bernard.A ,2004. *Coure de microbiologie générale*, DOIN ÉDITEURS, 2e édition, France. P257microbiology. Marcel Dekker, INC. New York. 547- 575.

Michel A. Et Wattiaux, (2000). *Lactation et récolte du lait. Institut Babcock pour la recherche et le développement international du secteur laitier.* UW. Madison, wisconsin p3-30 ,60-72.

Montesinos I., Saldo E., Delgado T., Cuervo T. and Sierra A. (2002). Epidemiology genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by PulsedField Gel Electrophoresis at a University Hospital and Comparison with Antibiotyping and Protein A and Coagulase Gene Polymorphisms. *J Clin Microbiol.* 40: 2119-25.

Motlagh M, Kazemi M, Ghasemi H et Khaltabadi A (2014). Antibacterial effect of medicinal plant essence (*Thymus vulgaris*) on major bacterial mastitis pathogène in vitro. *Int. J. Biol. Biomed. Res.*, 2(2), pp. 286-294.

Mullen K et al. (2014). Short communication: an in vitro assessment of the antibacterial activity of plant-derived oils. *J. Dairy Sci.*, 97(9), pp. 5587-5591.

Mullen K, Andrson K et Washburn (2014). Effect of 2 herbal intramammary products on milk quantity and quality compared with conventional and no dry cow therapy. *J. Dairy Sci.*, 97(6), pp. 2509-3522.

N

Naimi T., Le Dell K., Como-Sabetti K., Borchardt S., Boxrud D. and Etienne J. et al. (2003). Comparison of community-and healthy care-associated methicillin– resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA*. 290: 2976–2984.

Nickerson, S. C. 1987. *Resistance mechanisms of the bovine udder: new implications for mastitis control at the teat end.* *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191(11):1484-1488.

O

Oviedo-Boyso J, JJ. Valdez-Alarcón, M. Cajero-Juárez, A. Ochoa-Zarzosa, JE. LópezMeza, A. Bravo-Patiño, VM. Baizabal-Aguirre. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J. Infect.* 54(4):399-409.

P

- Paape, M. J., D. D. Bannerman, X. Zhao, and J. W. Lee.** 2003. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet. Res.* 34(5):597-627.
- Paape, M., J. Mehrzad, X. Zhao, J. Detilleux, and C. Burvenich.** 2002. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 7(2):109-121.
- Perry, J., Staley, J et Lory, S,** 2002. *Microbiologie.* Édition par Sinauer Associates .États-Unis. P 160,163, 164,165 phénomènes aux interfaces, Éditions France Agricole.
- Piccinini R., Cesaris L., Daprà V., Borromeo V., Picozzi C., Secchi C., Zecconi A.** The role of teat skin contamination in the epidemiology of *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *J. Dairy Res.*, 2009, 76, 36-41.
- Pillar CM., Draghi D.C., Sheehan D.J. and Sahm DF.** (2008). Prevalence of multi drug-resistant, methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: *findings of the stratified analysis of the 2004 to 2005 LEADER Surveillance Programs.* *Diagn Microbiol Infect Dis* 60: 221-224.
- Pinedo P et al.** (2013). Efficacy of a botanical preparation for the intramammary treatment of clinical mastitis on an organic dairy farm. *Can. Vet. J.*, 54(5), pp. 479-484.
- Pöhlmann-Dietze P., Ulrich M., Kiser K., Döring G., Lee J., Fournier J., Botzenhart K., Wolz C.** Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator agr, and bacterial growth phase. *Infect. Immun.*, 2000, 68, 4865-4871.
- Poulose AJ et Croteau R** (1978). Biosynthesis of aromatic monoterpenes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 187(2), pp. 307-314.
- Pozzatti P et al.** (2010). Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. *Mycoses*, 53(1), pp. 12-15.
- Puyt J-D, Guérin-Faublée V, Arcangioli M-A, Prouillac C.** *Vade-mecum d'antibiothérapie bovine.* 2013. Éditions Med'Com, Paris, France. 190 p.

Q

- Quezel P., Santa S., 1963** - *Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales.* Paris, CNRS, Tome 1 et 2, 1170p.

R

Rainard, P., and C. Riollet. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37(3):369-400.

Rechten ? voorbehouden.Auteursrecht © 2000-2019 *Dreamstime*. Public Domain Images Licensed Under the Creative Commons Zero (CC0) License.

Remy D., (2010). *Les mammites.* (Groupe France Agricole). Edition Fevrier 2010. ISBN 978-2-85557-171-3. p20.

Richard H., 1992 - *Epices et aromates.* Ed. dec et doc Lavoisier, *collection science et techniques alimentaires*, Paris, 339 p.

Riollet, C., P. Rainard, and B. Poutrel. 2000. Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480:247-258.

Roberson J., Fox L., Hancock D., Gay J., Besser T. *Ecology of Staphylococcus aureus isolated from various sites on dairy farms.* *J. Dairy Sci.*, 1994, 77, 3354- 3364.

Rosato A.E., Kreiwirth B.N. and Craing W.A. et al. (2003). *mec A-bla Z corepressors in clinical Staphylococcus aureus isolates.* *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 1460-1463.

S

Sagar A , 2018 Last updated: June 11, 2018 *Catalase Test- Principle, Uses, Procedure, Result Interpretation with Precautions.*

Santurio D et al. (2004). *Antimicrobial activity of the essential oil of thyme and of thymol against escherichia coli strains.* *Acta Sci. Vet.*, 42(1), pp. 1234-1238.

Serieys F. Le traitement ciblé des mammites : enjeux et faisabilité. *Le Point Vétérinaire*, 2004, 35(246) : 54-59.

Sienkiewicz M, Lysakowska M, Denys P et Kowalczyk E (2012). *The Antimicrobial Activity of Thyme Essential Oil Against Multidrug Resistant Clinical Bacterial Strains.* *Microb. Drug Resist.*, 18(2), pp. 137-148.

Smith B (2014). *Large animal internal medicine*, 5e éd. Elsevier Health Sciences USA, 1712p.

Société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF). Recommandations de pratique clinique Infections ostéo-articulaires sur matériel (prothèse, implant, ostéosynthèse). *Médecine et maladies infectieuses.* 39 (2009) 815–863.

Sotiropoulou, D.E., Karamanos, A.J., 2010. *Field studies of nitrogen application on growth and yield of Greek oregano (Origanum vulgare ssp. hirtum (Link) Ietswaart). Industrial Crops and Products*, 32(3): 450-457.

Spicer W.J. (2003). *Pratique clinique en bactériologie mycologie et parasitologie Flammarion Médecine-Sciences*, Paris. 28-29.

Sui X, Liu T, Ma C, Yang L, Zu Y, Zhang L et Wang H. (2012) .Microwave irradiation to pretreat rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) for maintaining antioxidant content during storage and to extract essential oils imultaneously. *Food Chemistry*. 131, 1399–1405.

Sutra L., Poutrel B. (1994), Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 40, 79-89.

Sutra, L., Federighi, M and Jouve, J. L. (1998). *Manuel de Bactériologie Alimentaire*. Ed. Polytechnica, p. 53-81.

Sylvain Giroux & Ginette Tremblay, *Méthodologie des sciences humaines*. La recherche en action, St-Laurent (Québec), ERPI, 2009, 324 p., p. 43.

T

Teuscher, Anton R, Lobstein A., 2005 - *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Paris, Lavoisier, 522p.

Tohidpour A et al. (2010). Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*, 7(2), pp. 142-145.

V

Van Metre D et al. (2008). *Rebhund's diseases of dairy cattle - Infectious diseases of the intestinal tracts*, 2e éd., Saunders Elsevier USA, 200-294 p.

Vaux S, Haus Cheymol R, La ruche G, Rabaud C. **Rapport Institut de Veille Sanitaire (INVS) : Surveillance de la consommation et de la résistance aux antibiotiques**. France; 2012 nov p. 471- 493. Report No.: 42- 43.

Vieira R C, Delprete P G, Leitão S G, et Leitão G G . (2001). Anatomical and Chemical Analyses of Leaf Secretary Cavities of *Rustia formosa* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*. 88 (12), 2151–2156.

W

Wadström T. (1983). *Biological effects of cell demmaging toxins*. In “*staphylococci and staphylococcal in infections*” CSF Easmon and C. Adlam (ed), Vol.2, Academic Press, London. 671-704.

Wellnitz O, Kerr DE. 2004. *Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection*. *Vet Immunol Immunopathol.* 101(3-4):191-20.

WHO(2011). *Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective*.

Woerther P.L, Andremont A. Comment expliquer la résistance aux antibiotiques? *Revue du praticien.* 2012;62(7):967- 971.

Wu Y, et al. (2013) Novel phosphorylation sites in the *S. cerevisiae* Cdc13 protein reveal new targets for telomere length regulation. *J Proteome Res*12(1):316-27.

Y

Yala D., Merad A.S., Mohamedi D et Ouar Korich M.N. 2001. Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb* n°91.

Z

Zaouali Y, Chograni H, Trimech R et Boussaid M. (2013). Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var *.Typicus Batt.*organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Industrial corps and Products.* 43, 412-419.

