



Institut des Sciences
Vétérinaires- Blida

Université Saad
Dahlab-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

**Etude *in vitro* de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de
la *Lavandula latifolia spica* et de la *Mentha viridis* sur les
entérobactériacea et les staphylococcacea responsables de
mammites cliniques**

Présenté par

Smati Yakoub

&

Tebbi Mohammed Amine

Soutenu le 25/06/2016

Devant le jury :

Président :	AKKOU M.	M.A.A	(I.S.V)
Examineur :	KHALED H.	M.C.B	(I.S.V)
Promoteur :	DJEGHBOUB S.	Ingénieur	(I.S.V)

Année : 2015-2016

Remerciements

Nous tenons à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé la volonté, et durant notre cursus .

nous remerciant aussi pour ceux qui ont contribué de près ou de loin a la réalisation de ce travail en particuliers :

Mlle. DJEGHBOUB Souad notre promotrice, pour son aide efficace, ses conseils judicieux qui ont amélioré la qualité de ce mémoire

M. AKKOU M. Maître assistant à l'ISV'B, qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence du jury de notre projet fin d'études.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à, M. KHALED H. Maître de conférence à l'ISV'B, d'avoir accepté très aimablement de juger ce travail et d'en être le rapporteur, d'autant plus que le délai accordé pour la lecture fut très limitée.

A tous ceux et celles qui nous ont prodigué leurs encouragements dans les moments les plus difficiles.

Dédicaces

Louange à Allah, maître de l'univers.

Paix et Salut sur notre Prophète Mohamed

A mes parents qui ont consenti d'énormes sacrifices pour me voir réussir, pour l'enseignement de la vie et pour l'éducation qu'ils m'ont donnée et tous les conseils et encouragements qu'ils n'ont cessé de me prodiguer durant mes études.

Je leur dois reconnaissance et gratitude.

A mes frères Halim, Mustapha, hamza et mes sœurs Amina, Khadîdja, et Houda.

Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon affection et de mon respect.

A tous mes amis

A mes camarades de promotion 2016 que j'apprécie beaucoup.

Mes enseignants et Tous ceux que j'aime

Yakoub Smati

Dédicaces

Je dédie ce travail :

À ma très chère mère qu'elle trouve ici l'hommage de ma gratitude, celle qui est si grande pour m'encadrer dans la vie, durant tout mon parcours d'étude ;

À mes sœurs et frères : Amale, Bouchera, Saad, Sami, Hamza, Merwane qui m'ont encouragé, que Dieu m'a donné sur le chemin de l'aventure ;

À tous mes amis qui m'ont soutenus ;

À l'hommage de mon grand père qui est décédé dernièrement que Dieu le compte parmi ses bien aimés ;

À toute personne qui m'a encouragé ou aidé tout au long de mes études.

Tebbi Mohammed amine

Liste des figures

	Titre des figures	Page
Figure 1 :	Mammite aigüe, Phase congestive	4
Figure 2 :	Mammite à <i>E.Coli</i>	7
Figure 3 :	Trayon infecté par <i>E.Coli</i>	7
Figure 4 :	<i>Hydrotea irritans</i>	8
Figure 5 :	Mécanisme d'action des HE au niveau de la cellule microbienne.....	22
Figure 6 :	Les différentes étapes suivies lors de la coloration de Gram.....	26
Figure 7 :	Galerie Api 20 E avant et après ensemencement.....	29
Figure 8 :	Les deux HE utilisées	30
Figure 9 :	Préparation de la gélose Muller Hinton	31
Figure 10 :	Ensemencement par écouvillonnage.....	32
Figure 11 :	Illustration de la technique d'aromatogramme utilisée	34
Figure 12 :	Effet de l'HE de menthe sur les souches testées.....	37
Figure 13 :	Effet de l'HE de lavande sur les souches testées	38
Figure 14 :	Effet du mélange de l'HE sur les souches testées	38
Figure 15 :	Effet de l'HE de menthe sur les entérobactéries isolées	39
Figure 16 :	Effet de l'HE de lavande sur les entérobactéries isolées.....	39
Figure 17 :	Effet du mélange de l'HE sur les entérobactéries isolées.....	40
Figure 18 :	Effet de l'HE de menthe sur les staphylocoques isolés	40
Figure 19 :	Effet de l'HE de lavande sur les staphylocoques isolés	41
Figure 20 :	Effet du mélange de l'HE sur les staphylocoques isolés	41
Figure 21 :	Zones d'inhibition.....	

Liste des tableaux

	Page
Tableau I : Tableau récapitulatif des diamètres d'inhibition des souches testées (mm)	35
Tableau II : Distribution des souches étudiées selon le type d'effet exercé par l'HE	37
Tableau III : Equipement de base d'un laboratoire de microbiologique	
Tableau IV : Milieux de culture, milieux d'identification et disques imprégnés	

Liste des abréviations

CCS :	le comptage des cellules somatiques
CMT :	le test de mammite Californie
CPS :	les staphylocoques à coagulase positive
HE :	huile essentielle
CPG :	chromatographie en phase gazeuse
CPG-SM :	chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
RMN :	résonance magnétique nucléaire
OX :	oxydase
GN :	Gélose nutritive
MH :	Gélose Muller-Hinton

Glossaire

Antibiogramme : C'est une méthode de travail microbiologique, utilisant un milieu gélosé spécifique en boîte de Pétri et des disques imprégnés d'antibiotiques à des concentrations déterminées. Cette méthode permet d'évaluer la sensibilité d'une bactérie pathogène vis-à-vis d'antibiotiques choisis en fonction des indications fournies et de la prévalence de la résistance acquise

Aromathérapie : Le mot « aromathérapie » est un néologisme créé dans les années 1930 par le chimiste René Maurice Gattefossé qui vient du latin *aroma*, aromate et du grec *therapeia*, traitement. Thérapeutique par les HE végétales, utilisées par voie interne ou externe, sous forme de teinture, d'extrait aromatique, d'infusion etc...

Infection : Ensemble de perturbation au sein d'un organisme postérieures au franchissement des moyens mécaniques (peau, muqueuse) et physiologiques de défense par une population de microorganismes, la porte d'entrée est variable (pique, blessure, opération, lésion.etc)

Infection aiguë : Infection récente et transitoire (inférieure à six mois), symptomatique ou asymptomatique

Infection chronique : Infection persistante (au-delà de six mois)

Inflammation : Réponse inflammatoire de l'organisme avec rougissement et gonflement (tuméfaction) de l'endroit infecté avec signes d'accompagnement (élévation locale de la température, chaleur, douleur) ; cette réaction peut nuire à l'agent pathogène et facilite le passage de liquides plasmatiques antimicrobiens à travers la paroi des capillaires locaux.....

Inoculum : Terme utilisé en microbiologie pour désigner la quantité de germes introduite dans un milieu de culture ou inoculée à un animal de laboratoire.

Micro-atmosphère : technique en phase vapeur, cette technique permet de mettre en évidence l'action des composants volatils des HE sur le développement des germes en milieu solide dans une boîte de Pétri.

Résumé

La mammite, inflammation de la glande mammaire, est la maladie la plus commune et la plus coûteuse dans l'industrie laitière. En fonction des symptômes développés par la vache infectée, la gravité de la mammite peut se définir comme clinique (aiguë, suraiguë, chronique) ou subclinique.

Pour cela, des analyses microbiologiques, ont été réalisées, au niveau du laboratoire de microbiologie de l'institut des sciences vétérinaires de Blida, sur 15 prélèvements de lait provenant de différents élevages bovins laitiers de la région de Blida et Bouira.

Nous avons pu isolé 10 souches bactériennes faisant partie des deux familles : les entérobactériacea et les staphylococcacea. 05 souches d'entérobactéries à savoir : *Salmonella arizona*, *Serratia liquéfaciens*, *Klebsiella oxytoca*, et 05 souches de staphylocoques à savoir : *S. sciuri*, *S. aureus*, *S. lentus*.

Un test qualitatif de l'effet antibactérien des huiles essentielles (aromatogramme) a été réalisé où les antibiotiques sont remplacés par les huiles essentielles de la menthe verte et de la lavande sauvage et du mélange de ces deux derniers .

Les deux huiles essentielles ont montré une certaine activité sur les souches isolées et surtout sur les staphylocoques, mais l'effet de l'huile essentielle de la menthe verte était plus important sur toutes les souches par rapport à l'huile essentielle de la lavande sauvage et au mélange des deux huiles essentielles.

D'après les résultats, l'activité des huiles essentielles pures a augmenté en augmentant la dose ce qui explique qu'elles ont une activité dose dépendante.

Mots clés: Mammite, aromatoigramme, Huiles essentielles, menthe , lavande .

ملخص

التهاب الضرع : التهاب الغدة الثديية ، هو من أكثر الأمراض شيوعا والأكثر تكلفة في صناعة الألبان. اعتمادا على

الأعراض التي تظهرها البقرة المصابة ، وشدة التهاب الضرع يمكن تعريفها بأنها السريرية (الحادة شديد ، المزمنة) أو الإكلينيكية .

لهذا تم إجراء التحليلات المخبرية الميكروبيولوجية على مستوى مخبر الميكروبيولوجيا لمعهد العلوم البيطرية بالبلدية على 15 عينة حليب مأخوذة من مختلف مزارع ماشية الألبان في منطقة البلدية والبويرة.

لقد تم عزل 10 سلالات بكتيرية تنتمي إلى عائلتين هما entérobactériacea و staphylococcacea . 05 سلالات من entérobactériacea هي Salmonella arizon و Serratia liquéfaciens و Klebsiella oxytoca , و 05 سلالات من staphylococcacea بما في ذلك : S. sciuri, S. aureus, S. lentus.

تم إجراء اختبار نوعي للتأثير مضاد للجراثيم من الزيوت الأساسية (اروماتو غرام) حيث يتم استبدال المضادات الحيوية عن طريق الزيوت الأساسية من النعناع والخزامى البرية وخليط من هذه الزيوت العطرية. وقد أظهرت كل من الزيوت العطرية بعض النشاط ضد السلالات وخاصة المكورات العنقودية ، ولكن تأثير الزيت الاساسي للنعناع كان أقوى على جميع السلالات مقارنة بالزيت الاساسي للخزامى البرية والمزيج من الزيوت الأساسية. نستخلص انه كلما نشاط الزيوت العطرية النقية يزداد بزيادة الجرعة .مما يدل على ان نشاطها المضاد للبكتيريا يعتمد على الجرعة.

كلمات البحث : التهاب الضرع ، اروماتو غرام ، الزيوت العطرية ، النعناع ، الخزامى.

Abstract

Mastitis, inflammation of the mammary gland, is one of the most common diseases and the most expensive in the dairy industry. Depending on the symptoms shown by the infected cow, and the severity of mastitis can be defined as clinical (severe acute, chronic) or clinical.

For that, microbiological analyzes, were carried out, on the level of the laboratory of microbiology of the institute of sciences veterinary surgeons of Blida , on samples of 15 taking away of milk coming from various dairy bovine breedings of the area of Blida and Bouira.

We could isolate 10 bacterial strains belonging to the two families: entérobactériacea and staphylococcacea . 05 of enterobacteries namely: *Salmonella Arizona*, *Serratia liquefacian* and *Klebsiella oxytoca*, and 05 strains of staphilococca namely *S .sciuri*, *S. aureus*, *S. lentus*

A qualitative test of the antibacterien effect of essential oils (aromatogramme) was carried out where the antibiotics are replaced by essential oils of spearmint and the wild lavender and the mixture of these two essential oils.

Two essential oils showed a certain activity on the isolated strains and especially on the staphylococcacea , but the effect of the essential oil of spearmint was more important on all the strains compared to essential oil of the wild lavender and with the mixture of two essential oils.

According to the results, the activity of pure oils essential increased by increasing the amount what explains why they have dose dependant activity.

Keywords: Mastitis, aromatogramme, essential oils, mint, lavender.

Sommaire

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Résumé	
Introduction.....	1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Généralités sur les mammites

I.1- Définition de la mammite	2
I.2. Classification	2
I.2.1. Mammité latente.....	2
I.2.2. Mammité subclinique.....	2
I.2.3. Mammité clinique.....	3
I.3.Bactériologie des mammites.....	5
I.3.1. Caractéristiques de bactéries mineures et majeures de la mammité.....	5
I.3.1.1. Bactéries majeurs	5
I.3.1.2 Bactéries mineurs	5
I.3.2. Les mammites fréquentes et les mammites peu fréquentes	6
I.3.2.1. Mammites fréquentes	6
I.3.2.2. Mammites peu fréquentes	8

Chapitre II : Diagnostic clinique des mammites

II.1. Diagnostic des mammites sub-cliniques.....	11
II.2.Diagnostic symptomatologique.....	11
II.2.1. Symptômes généraux	11
II.2.2. Symptômes locaux	12
II.2.3. Symptômes fonctionnels	13

Chapitre III : Traitement et prévention des mammites

III.1. Traitement des mammites cliniques.....	14
III .1.2. Traitements hygiéniques.....	14
III.1.3. Traitements médicaux	14
III.2. la préventions des mammites.....	16
III..2.1. L'élimination des infections existantes	16
III.2.2. Interruption des voies de contamination	16

Chapitre IV : Les huiles essentielles

IV.1. Définition.....	18
IV.2. Extraction des huiles essentielles.....	18
IV.3. Composition chimique des huiles essentielles	19
IV.4. Constituants des huiles essentielles.....	19
IV.5. Avantages	20
IV.6. Inconvénients.	20
IV.7. Comment utiliser les HE.....	21
IV. 8. Les activités antibactériennes des huiles essentielles.....	21

PARTIE PRATIQUE

Chapitre I : Matériel et méthodes

I.1. Diagnostic microbiologique.....	23
I.1.1. Matériel	23
I.1.1.1. Matériel biologique.....	23
I.1.1.2. Matériel non biologique.....	23
I.1.2. Méthodes.....	23
I.1.2.1. Prélèvement.....	23
I.1.2.2 Examen direct.....	24
I.1.2.3. Mise en culture.....	24
II.1.2.4. Identification.....	25
I.2. Étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles sur les souches bactérienne.....	29
1.2.1. Matériel.....	29

I.2.1.1. Matériel biologique.....	29
I.2.1.2. Matériel non biologique.....	30
I.2.2. Méthodes.....	30

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1. Résultats du diagnostic bactériologique.....	35
II.2. Résultats de l'aromatogramme.....	35
II.2.1. Diamètres des zones d'inhibition.....	35
II.2.2. Résultats de l'étude de l'efficacité des HE sur les 10 souches étudiées.....	36
II.2.2.1. Étude de l'effet des HE sur les 10 souches isolées.....	37
II.2.2.2. Etude de l'effet des HE sur les entérobactéries isolés.....	39
II.2.2.3. Étude de l'effet des HE sur les staphylocoques isolés.....	40
II.3. Discussion générale	42
Conclusion.....	44
Références bibliographiques.....	45

Introduction

La mammite peut se définir par l'état inflammatoire d'un ou de plusieurs quartiers de la mamelle quelle qu'en soit l'origine traumatique, chimique, physique ou biologique, le degré de gravité clinique ou subclinique, l'évolution chronique, aiguë ou suraiguë ou la terminaison c'est-à-dire la guérison apparente ou réelle ou la mort de l'animal [01].

Les mammites sont des problèmes courants rencontrés dans les élevages qui peuvent occasionner des pertes économiques importantes. En effet, elles entraînent des pertes de production mais aussi des changements de composition et de qualité du lait, il devient plus pauvre en calcium, phosphore, protéines et matières grasses, mais plus riche en sodium et chlore. Mais elles ne sont pas une fatalité car il existe des moyens de lutte efficaces, cependant les démarches de lutte doivent être bien suivies afin de garantir une réussite du traitement.

Nous avons visé comme objectif par le présent travail, la recherche des cas des mammites cliniques sur le terrain et la réalisation de prélèvements de laits puis l'identification des bactéries responsables des mammites par un diagnostic microbiologique au laboratoire et finalement l'étude de l'effet antibactérien des huiles essentielles de la menthe verte et de la lavande sauvage sur les souches bactériennes identifiées.

Tous d'abord, nous exposerons dans une première partie une synthèse des travaux relatifs à la mammite bovine.

Dans la deuxième partie, nous présenterons le matériel utilisé et les méthodes appliquées pour le diagnostic microbiologique et l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles sur les souches bactériennes.

Enfin, nous discuterons les résultats de notre travail.

I.1. Définition de la mammite

La mammite peut se définir par l'état inflammatoire d'un ou de plusieurs quartiers de la mamelle quelle qu'en soit l'origine (traumatique, chimique, physique ou biologique), le degré de gravité (clinique ou subclinique), l'évolution chronique, aiguë ou suraiguë ou la terminaison c'est-à-dire la guérison apparente ou réelle ou la mort de l'animal. Par opposition, sera considérée comme normale, une mamelle sans signe visible d'un état pathologique avec un lait exempt d'agents pathogènes et des caractéristiques cellulaires et physico-chimiques normales [02].

I.2. Classification

Les mammites ne se ressemblent pas toutes, loin de là. Il est donc souhaitable de les classer selon leur gravité [03]. On peut classer les mammites selon les modifications de la mamelle (chaleur, douleur, rougeur, gonflement), l'aspect du lait (grumeaux, couleur) [04].

I.2.1. Mammite latente

L'expression « infection latente » est parfois utilisée pour décrire une situation où un pathogène majeur s'est établi dans un quartier alors que la vache n'a pas encore commencé à réagir à l'infection. L'apparence du lait et le CCS sont normaux [03]. L'infection est contagieuse pour les autres quartiers ou les autres vaches. Elle peut être détectée seulement par une analyse bactériologique en laboratoire. Elle peut rester latente pendant plusieurs mois, guérir spontanément ou, au contraire, continuer à se développer [03], ce type ne présente aucun signe clinique.

I.2.2. Mammite subclinique

Au stade de la mammite subclinique, la vache commence à réagir à l'infection, mais aucun signe clinique n'est perceptible [03,06], ni général, ni local, ni fonctionnel [06], le lait et le quartier semblent normaux [03]. Comme, on ne peut percevoir l'infection, il est nécessaire de faire un test pour la détecter : le CCS, CMT(le plus utilisé) [03, 06] et par la mesure de la conductivité du lait [06].

L'infection subclinique peut alors guérir spontanément ou rester à ce stade plusieurs mois. Elle peut aussi s'aggraver. Dans ce cas, des signes visibles apparaissent et on parle maintenant de mammite clinique. Selon le type de pathogène présent dans le troupeau, les cas de mammite subclinique sont de 2 à 20 fois plus fréquents que les cas de mammites cliniques [03]. La mammite subclinique est la plus grande cause de pertes économiques [07].

I.2.3. Mammite clinique

Les mammites cliniques sont caractérisées par la présence de symptômes fonctionnels (modifications macroscopiquement visibles de la quantité et de la qualité de l'aspect du lait), de symptômes locaux inflammatoires observés au niveau de la mamelle (douleur, chaleur, tuméfaction et rougeur) et de symptômes généraux (hyperthermie, anorexie, arumination). En pratique, on considère qu'il y a mammite clinique dès qu'il y a une modification de l'aspect du lait ou de la sécrétion de la mamelle (critère le plus précoce et le plus constant). Enfin, selon la gravité et la simultanéité des symptômes, on distingue, par ordre décroissant de gravité, les mammites cliniques suraiguës, aiguës et subaiguës [06].

I.2.3.1 Mammite suraigüe

Elle se caractérise par les signes d'inflammation du pis [07], un quartier tuméfié, chaud, congestionné, douloureux. Le lait passe difficilement [01], accompagnée de signes systémiques incluant la dépression, un pouls rapide, une déshydratation et une diarrhée [07]. La vache n'a pas d'appétit, frissonne et perd du poids rapidement avec une fièvre de plus de 41°C. La lactation est souvent interrompue [01]. On parle de « mammite suraigüe » pour un cas très sévère [03].

I.2.3.2 Mammite aiguë

C'est une Inflammation de la glande mammaire caractérisée par une apparition soudaine de rougeur (fig. 1), d'œdème, de durcissement et de douleur. La production laitière diminue drastiquement avec aspect anormal [07]. La fièvre dépasse les 39°C. La vache atteinte paraît parfois faible et déprimée avec un manque d'appétit.

La mammite aigue survient souvent après le vêlage et, de façon moins grave, le tarissement [01].

L'expression « mammite aiguë » s'appliquait autrefois à un cas clinique modéré ou sévère [03]. Aujourd'hui, on qualifie d'aigue seulement une mammite qui se développe très rapidement [03].

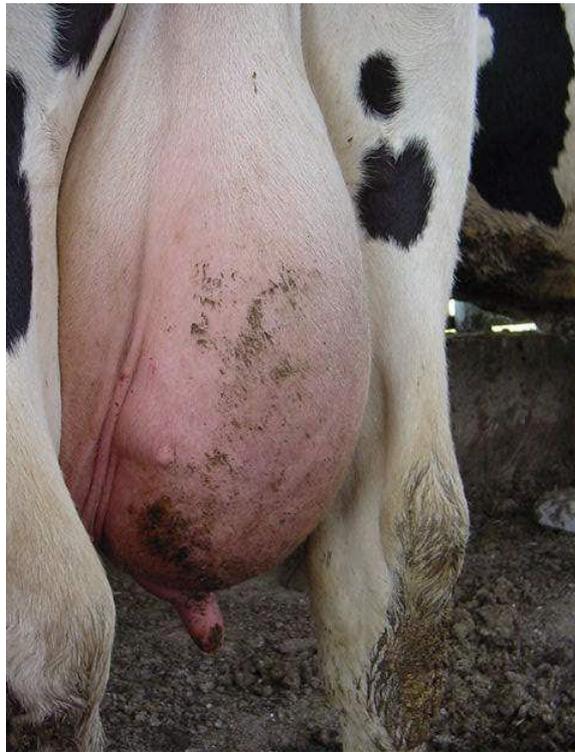


Figure 1 : Mammite aigüe, Phase congestive [08]

I.2.3.3. Mammite subaiguë

Elle se caractérise par certains signes cliniques bénins [07], sans changement apparent du pis [01], avec une présence de grumeaux dans le lait [07, 01], surtout dans les premiers jets [01]. On parle donc de « mammite subaiguë » pour des cas bénins [03].

I.2.3.4 Mammite chronique

Une mammite chronique est une inflammation de la glande mammaire qui se prolonge durant une longue période de temps [07], dure plusieurs mois, voir plusieurs lactations [03]. Elle est le plus souvent sub-clinique, avec parfois des épisodes cliniques [03], généralement sans fièvre. Le lait est grumeleux, provenant de quartiers tuméfiés [01].

Le CCS peut aussi fluctuer, ce qui nous donne parfois de faux espoirs de guérison [03]. Lorsqu'une infection est chronique, les tissus glandulaires du quartier peuvent se transformer graduellement en tissu cicatriciel [03]. Le quartier peut devenir dur ou tendu et présente des indurations [01]. La production se maintient ou baisse [03, 07], et les chances de guérison sont diminuées [03]. Les traitements antibiotiques ne donnent pas souvent de bons résultats [01]

I.3. Bactériologie des mammites

I.3.1. Caractéristiques de bactéries mineures et majeures de la mammite

I.3.1.1. Bactéries majeures

Elles peuvent causer de sévères réactions, une forte hausse du CCS, une baisse de production de lait et même la mort de la vache (*Staphylococcus aureus*, *S. uberis*, *E. coli*, *S. dysgalactiae*, *Klebsiella* spp, *Streptococcus* spp) [12].

I.3.1.2 Bactéries mineures

Causes une réaction légère, une faible hausse du CCS, une faible baisse de production de lait, parfois même une légère hausse de production (Staphylocoques à coagulase négative, *Corynebacteria* spp) [12].

I.3.2. Les mammites fréquentes et les mammites peu fréquentes

Les agents pathogènes majeurs sont bien adaptés à la glande mammaire et ils sont responsables des principaux cas de mammites. Les agents pathogènes mineurs peuvent également causer des mammites, mais les dommages sont généralement moins importants [13]. Il faut souligner qu'il est souvent impossible de relier une symptomatologie à un type de germe [09].

I.3.2.1. Mammites fréquentes

Les espèces pathogènes majeures sont potentiellement responsables de mammites cliniques et regroupent les streptocoques (*Str. uberis*, *Str. dysgalactiae subsp. dysgalactiae1*, *Str. agalactiae*), les entérocoques (*Enter. faecalis...*), CPS (*Staph. aureus subsp*), ainsi que les entérobactéries (*E. Coli*, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes...*). Ces trois familles de germes sont responsables de la majorité des mammites cliniques, à hauteur de 80% à 90% [14, 15].

a. Mammites à *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est un coque Gram positif, responsable principalement de mammites subcliniques, mais aussi de mammites cliniques et gangreneuses [16], elles peuvent évoluer sous la forme suraiguë (mammites gangréneuses), aiguë ou chronique.

Dans sa forme aiguë on observe une inflammation du quartier sans tendance à la nécrose. Sur le plan fonctionnel on constate des grumeaux, un exsudat sanieux, jaunâtre, rosé ou avec présence de caillots de sang. Elle évolue vers la guérison ou le passage à la chronicité. Dans ce cas elle se traduit par une sclérose diffuse d'abord hypertrophiant puis souvent atrophiant. Des grumeaux sont émis par intermittence. Cette forme évolue lentement vers la perte d'un quartier [02].

b. Mammites à streptocoques

Elles peuvent évoluer sous la forme aiguë ou chronique. Dans sa forme aiguë elle se traduit par un épisode fébrile. Des grumeaux peuvent s'observer. Elle guérit ou évolue vers la forme chronique dont les manifestations sont semblables à celle de la mammites à staphylocoque [02].

c. Mammites à entérobactéries

Dans sa forme suraigüe voire aigüe, c'est la mammite paraplégique. L'hyperthermie est intense et souvent précédé d'un épisode diarrhéique. Les troubles nerveux observés (abattement, paraplégie) sont dus à une intoxication. Localement on observe une importante inflammation d'un ou de plusieurs quartiers (postérieurs souvent). Des grumeaux peuvent être présents. La sécrétion est fort altérée et prend l'aspect de « bière blonde ». L'agalaxie est de règle. L'évolution peut être mortelle [02].



Figure 02: Mammite: suintement de surface et interne du aux lésions vasculaires [08]

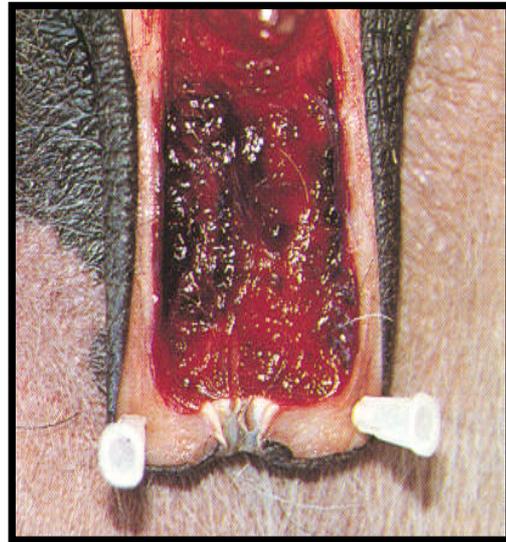


Figure 03: Trayon infecté, Signes importants d'hémorragie [08]

d. Mammite pyogène ou mammite d'été (*Arcanobacterium pyogenes*)

Elle évolue souvent sous forme aiguë. Elle est transmise par une mouche (*Hydrotea irritans*), (Fig : 04) qui se pose sur les trayons et transmet le germe aux quartiers. Ce type d'infection est également fréquent pendant la période sèche. Les symptômes généraux consistent en un épisode fébrile s'accompagnant de boiteries avec engorgements articulaires puis amaigrissement. Localement le ou les quartiers sont très enflammés dans un premier temps. Apparaissent ensuite des nodules suppurés et des abcès dans le parenchyme (mammites suppurées). Sur le plan fonctionnel l'exsudat est épais (aspect de dentifrice jaunâtre-verdâtre purulent et d'odeur nauséabonde). La guérison est rare, l'abcédation parfois multiple entraînant l'atrophie du quartier [02].



Figure 04 : *Hydroteia irritans* [04]

1.3.2.2. Mammites peu fréquentes

a. Mammite mycoplasémique (*M. bovis*, *M. bovis genitalium*)

Le syndrome fébrile caractérise sa forme aiguë plus souvent observée lorsque la pathologie apparaît la première fois dans le troupeau et concerne le plus souvent les vaches en début de lactation. Localement, les 4 quartiers sont violemment enflammés. La chute de production est brutale. Quelques jours plus tard apparaît une sécrétion aqueuse ou brun-jaunâtre avec des grumeaux. La guérison clinique est parfois observée avec un retour lent vers une production normale. La guérison bactériologique est très rare. Le passage à la chronicité est fréquent et s'accompagne de l'atrophie secondaire des quartiers [02].

b. Mammite mycosique (*Candida albicans*)

L'hyperthermie caractérise la forme aiguë. Localement les quartiers sont très enflammés et hypertrophiés. Des grumeaux sous la forme de filaments apparaissent dans les sécrétions. Cette forme évolue souvent vers la chronicité. Une guérison par des traites fréquentes peut être observée. Cependant l'excrétion des germes dure longtemps [02].

c. Mammites à *Nocardia asteroides*

Ce germe est difficile à identifier. Dans sa forme aigüe l'hyperthermie est de règle mais l'appétit est conservé. Localement, le quartier est considérablement hypertrophié. La sécrétion est aqueuse avec des grumeaux. L'évolution est toujours mortelle en quelques semaines [02].

d. Mammite tuberculeuse

La mammite tuberculeuse Elle concernerait 2 à 5 % des vaches tuberculeuses. Localement on observe une hypertrophie indolore avec induration de la mamelle (mamelle de bois) et une réaction ganglionnaire. La forme atrophiant est plus rare. Les sécrétions sont de type aqueux avec ou sans grumeaux. La mamelle est le plus souvent perdue [02, 09].

e. Mammite brucellique

Elle affecterait 5 à 10 % des vaches brucelliques. Les symptômes généraux sont absents. Localement les symptômes sont peu évidents. Ils peuvent consister en une simple excrétion de germes dans le lait. La guérison est peu probable [02, 09]. La présence des *Brucella* provoque ainsi une mammite brucellique sub-clinique [17].

f. Mammite à *Serratia marcescens*

Serratia marcescens (*Ser. marcescens*) est un Germe environnemental (le sol, les plantes et le fourrage) provoque généralement une mammite subclinique à évolution chronique. Souvent difficile à soigner [18].

g. Mammite à *Leptospires*

Elle se caractérise souvent par de une hémolactation importante : présence d'une flaque de sang sous la mamelle [02, 09].

h. Mammite à *Histophilus somni*

Histophilus somni est une bactérie qui cause divers problèmes tels : encéphalite, pneumonie, septicémie, arthrite, myocardite, [19], et la mammite [02, 09] cette dernière se caractérise principalement par une somnolence des vaches atteintes [02, 09].

i. Mammites à algues (*Prototheca zopfii*)

Les *Prototheca* sont des algues ubiquitaires présents dans les végétaux, le sol, les abreuvoirs, les eaux usées, les eaux de rivières, les déjections des bovins, porcs, chevaux, carnivores domestiques, rongeurs [02, 09].

Il s'agit de mammites chroniques sporadiques rarement épizootiques qui se transmettent entre les traites [02,09].

L'humidité est un facteur important dans l'épidémiologie (présence de mares, nappes d'eau). Il s'agit le plus souvent d'une mammite chronique sans expression clinique caractéristique (grumeaux, lait jaunâtre) [02,09].

II.1. Diagnostic des mammites subcliniques

Le diagnostic des mammites subcliniques repose d'une manière générale sur la mise en évidence des conséquences cellulaires (modifications cytologiques), chimiques, et finalement bactériologiques de l'état inflammatoire de la mamelle [21]. Il est basé sur la numération cellulaire du lait, les méthodes de dépistage chimique, l'examen bactériologique [22].

II.2. Diagnostic symptomatologique

Ce diagnostic repose sur la mise en évidence des symptômes généraux, locaux et fonctionnels, caractéristiques de l'inflammation de la mamelle [02]. Parmi ces moyens : examen des premiers jets, identification d'un changement de comportement de l'animal, palpation lors de la préparation de la glande mammaire avant la traite d'une modification de consistance d'un quartier, examen des systèmes de détection des caillots de lot éventuellement installés sur le tuyau long de lait ou plus souvent en bout de circuit (filtre) [02].

II.2.1. Symptômes généraux

Ils sont présents lors de mammites aiguës et surtout suraiguës, les signes généraux sont d'intensité variable et vont de la simple baisse d'appétit, avec ou sans fièvre, à la prostration complète, voire au coma par intoxication (due à l'exotoxine staphylococcique ou à l'endotoxine colibacillaire) et parfois à la mort. En présence d'une femelle en état d'intoxication, il est nécessaire de réaliser un examen général de l'animal qui permettra de différencier une mammite suraiguë (paraplégique ou gangreneuse) d'un coma vitulaire par exemple [02].

II.2.2. Symptômes locaux

C'est la mise en évidence des processus inflammatoires induit par l'infection mammaire. Cette inflammation est proportionnelle au caractère pathogénique du germe en cause. En effet, certains germes ont tendance à provoquer des mammites aiguës alors que d'autres germes ne provoquent que des symptômes plus frustes [23].

La mise en évidence de ces signes se fait par l'inspection et la palpation du pis et des trayons :

- **L'inspection**

L'inspection commence à distance en examinant l'attitude et la démarche de la femelle qui peuvent être modifiées, si la mamelle est douloureuse. Puis, on apprécie la couleur et le volume de la glande, le volume relatif des différents quartiers et l'existence d'éventuelles déformations ou asymétries. Enfin, on doit examiner les trayons et leurs orifices [02].

Mais en cas d'inflammation aiguë, ce volume peut augmenter notablement (jusqu'à cinq fois le volume normal lors de tuberculose ou de nocardiose mammaire). De plus, l'inflammation chronique peut induire une sclérose qui entraîne une forte diminution du quartier atteint d'où l'asymétrie facilement visible [24].

L'inspection permet de préciser la couleur de la peau de la mamelle. Elle est généralement rose. Lors d'inflammation, elle peut devenir rouge. Dans les cas de mammite gangreneuse, elle devient violacée et noire, puis se forme un sillon disjoncteur limitant la partie nécrosée [02].

- **La palpation**

La palpation est réalisée sur une mamelle vide après la traite [25]. Commence par les trayons [02]. Le canal du trayon, facile à percevoir, peut être comparé à un tube du diamètre d'une mine de crayon. Ensuite, le sinus galactophore et le parenchyme de chaque quartier sont palpés à deux mains. Les tissus étant pris dans les creux des mains, l'extrémité des doigts déprime successivement toutes les parties de la glande qui a la

consistance du caoutchouc mousse. Enfin, l'examen se termine par la palpation des ganglions lymphatiques rétromammaires qui, à l'état normal, ont la forme d'un disque vertical de 4 à 5 cm de diamètre et 1 cm d'épaisseur [02]. Cette palpation permettrait un diagnostic précoce de certaines affections et le pronostic des infections anciennes ou chroniques [25]. De même, la palpation met en évidence une douleur vive lors d'inflammation aiguë, contrairement aux inflammations chroniques qui, elles ne sont pas accompagnées de modifications de la sensibilité [24].

Enfin, il faut vérifier la perméabilité du canal du trayon. Celle-ci est augmentée lors de lésion du sphincter ou de fistule, et diminuée (traite difficile ou impossible) lors d'atrésie du canal et d'obstruction par des calculs, des papillomes ou des décollements de la muqueuse. Certains signes locaux sont assez caractéristiques d'une infection : gangrène (mammitte staphylococcique suraiguë), quartier très enflammé associé à une agalaxie (réflexe) du reste de la glande (mammites à entérobactéries), nombreux abcès contenant un pus caséux, verdâtre et nauséabond (mammitte à corynebactéries) [02].

II.2.3. Symptômes fonctionnels

Bien souvent, lorsque l'inflammation est modérée, les signes généraux et locaux sont absents et seuls sont présents les signes fonctionnels, c'est-à-dire les modifications macroscopiques visibles dans le lait. Ces modifications concernent l'aspect [02], la coloration et l'homogénéité du lait [02, 25], le goût et l'odeur (odeur d'œuf pourri en cas d'infection par les germes pyogènes), la consistance, la viscosité [25].

III.1. Traitement des mammites cliniques

L'efficacité des soins est fortement modifiée par leur précocité. Une étude allemande a établi que lorsque le traitement antibiotique était administré dans les six heures suivant les premiers symptômes, la guérison survenait dans 86% des cas contre 47% quant il intervenait plus de 24 heures.

III.1.2. Traitements hygiéniques

Dans certains cas (mammites colibacillaires, mycosiques...), seules des traites répétées (6 à 10 fois par jour) permettent d'obtenir la guérison. Ces traites s'effectuent à la main et sont parfois facilitées par l'administration d'ocytocine. L'application de pommades décongestionnantes ou antiphlogistiques sur la mamelle permettrait de diminuer l'inflammation locale et de résorber les indurations [2]

III.1.3 Traitements médicaux

1.3.1. La corticothérapie et anti-inflammatoires non stéroïdiens

La corticothérapie par voie générale est indiquée lors de mammite suraiguë afin de lutter contre le choc toxique. Elle doit néanmoins être mise en place très rapidement. Ainsi, Les doses le plus souvent préconisées : 30 mg de dexaméthasone en IV ou IM pour une vache. Ont été recommandées l'aspirine (30 g per os toutes les 8 heures ou 60 g toutes les 12 heures) et la flumixine meglumine (1 à 2 mg /kg en IV ou IM toutes les 24 heures). L'acidose métabolique parfois observée en cas de mammite colibacillaire sera corrigée au moyen d'une solution bicarbonatée à 5 %. L'endotoxine colibacillaire serait douée de propriétés hypocalcémiantes . [2].

1.3.2. La calcithérapie

L'endotoxine colibacillaire serait douée de propriétés hypocalcémiantes, cela conduit certains auteurs à proposer la calcithérapie identique à celle pratiquée lors de coma vitulaire

(70g de gluconate de calcium), dans le traitement des mammites colibacillaires survenant au vêlage.

1.3.3. La vaccinothérapie ou antigénothérapie

A l'aide de vaccins du commerce ou d'autovaccins préparés avec une souche isolée de l'exploitation, la vaccination a longtemps été préconisée ; l'efficacité d'une telle thérapeutique est aujourd'hui fortement contestée. Elle est cependant lourde, onéreuse et limitée dans le temps (adaptation des souches) et semble devoir être réservée à des cas spécifiques telle la limitation chez les jeunes animaux de mammites gangreneuses . [2]

1.3.4 Le cataplasme

Le cataplasme utilisera de l'argile blanche, verte ou grise qui sera mélangée à de l'eau ou à de l'huile d'olive ou à un mélange 50/50 des deux. Le produit final doit être assez liquide tout en adhérant fermement sur le pis. Une application sera réalisée deux à trois fois par jour [1] .

1.3.5. La phytothérapie

La phytothérapie a elle aussi été préconisée et plus particulièrement le recours à l'ail ou à des feuilles de germandrée à feuille de sauge. L'effet du varech sera davantage préventif que curatif. L'application d'aloès permet de guérir des plaies du trayon. Il peut s'injecter aussi dans le quartier infecté (20 à 60 ml d'aloès en gel ou en jus) une fois par jour[1] .

1.3.6. L'oxygénothérapie

A base d'une substance oxygénante comme le peroxyde, le glyoxilide. Le glyoxilide est vendu en ampoules de 5 cc, ce qui est la dose pour un traitement. Cette dose est injectée avec une seringue hypodermique dans le muscle du cou de la vache, parfois la croupe. Un seul traitement est administré, parfois deux, rarement trois. Le glyoxilide provoquerait des réactions en cycle de 21 jours, réactions qui s'estompent avec le temps. Il aurait une action se prolongeant sur une à deux années [1].

III.2.LA PREVENTION DES MAMMITES

2.1. L'élimination des infections existantes

La mamelle infectée de manière chronique dissémine le germe de traite jusqu'à son tarissement spontané. [1]

Lorsque la mamelle conserve le germe à l'abri des antibiotiques dans un noyau dur, l'élimination de l'animal doit être envisagée. La réforme a, dans ce cas, le double avantage d'évacuer une source de contaminants, et de diminuer immédiatement le comptage cellulaire du troupeau. De fait, des génisses à mamelles neuves remplacent des vaches malades, à concentrations cellulaires individuelles élevées. Cette décision contribue largement à récupérer de mauvaises situations sanitaires ; toutefois un taux de réforme important pèse sur les bénéfices de l'exploitation et doit demeurer une mesure temporaire

2.2 Interruption des voies de contamination

2.2.1 Procédure de traite

Il est important de veiller à la propreté dans les méthodes de traite pour éviter de propager les germes ou de les laisser se développer. L'hygiène a pour but de prévenir la transmission des microbes d'un trayon à l'autre sur la même vache ou d'une vache à l'autre[1].

2.2.2 Observation

Il faut observer le pis pour détecter la présence de rougeurs ou de gonflements, signes d'inflammation. Un quartier enflammé est chaud et douloureux au toucher [1] .

2.2.3. Lavage du pis

Le lavage du pis a un but hygiénique et un effet stimuloire sur la montée laitière. Un lavage adéquat est important surtout pour prévenir les mammites environnementales, celles causées par les coliformes et autres microbes des environnements contaminés. Un lavage de pis mal fait contribue à transmettre les microbes plutôt qu'à les détruire.

2.2.4. Pré-traite

Tirer un peu de lait à la main avant la traite mécanique permet de stimuler la montée laitière et de prélever le lait avec un haut compte microbien. On utilise une tasse-filtre pour détecter le lait d'apparence anormale (grumeaux, etc.) [1]

2.2.5. Ordre de traite

Il est important de traire les vaches qu'on sait infectées en dernier. Si possible, on traite dans l'ordre: les vaches de première lactation, les vaches normales, les vaches avec un haut comptage cellulaire et les vaches infectées [1]

2.2.6. Bain de trayon d'après-traite

Le bain de trayon désinfectant après chaque traite est une mesure qui permet de diminuer d'environ 50% les risques d'infection par des microorganismes contagieux comme *Streptococcus agalactiae* et les staphylocoques dorés. [1]

2.2.7. Nettoyage de l'équipement de traite

Il est bien sûr important de nettoyer et désinfecter l'équipement à chaque traite. Le vinaigre de cidre ou de maïs et le peroxyde sont utilisés par certains producteurs comme alternatives à l'acide phosphorique et au chlore [1].

La machine à traite doit être nettoyée après chaque usage. Une machine à traire propre est indispensable pour conserver la saveur naturelle du lait et maintenir sa stabilité jusqu'à sa consommation.

IV.1. Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatiles, isolées des plantes par hydrodistillation ou par expression mécanique [26]

Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, de brindilles, d'herbes, d'écorces, de bois, de racines ou de fruits [28], mais également à partir des gommés qui s'écoulent du tronc des arbres.

L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. La matière première végétale peut être fraîche, flétrie, sèche, entière, contusée ou pulvérisée, à l'exception des fruits du genre citrus qui sont toujours traités à l'état frais [27].

Selon la *pharmacopée européenne*, les HE peuvent subir un traitement ultérieur approprié ; elles peuvent être commercialement dénommées comme étant déterpénées, désesquiterpénées, rectifiées, ou privées d'un composant spécifique [27].

IV.2. Extraction des huiles essentielles

Distillation

La plupart des composés odorants contenus dans les végétaux sont entraînés à la vapeur d'eau. Le flux de vapeur d'eau et les composés organiques volatils sont entraînés par distillation azéotropique, et, après condensation par refroidissement dans un réfrigérant, se séparent par différence de densité. L'huile essentielle, la plupart du temps plus légère que l'eau, surnage et peut être récupérée dans des séparateurs, dont le fameux « vase florentin ». on distingue deux types de distillation des plantes :

- **Hydrodistillation** : le végétal est immergé dans l'eau portée à ébullition ;
- **Entraînement vapeur**, où seule la vapeur d'eau traverse la masse végétale, avec deux variantes selon que la vapeur est humide ou sèche [29].

IV.3. Composition chimique des huiles essentielles

La composition de nombreuses huiles essentielles a été décrite dans la littérature. Elle varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte [30]. [31]. [28]. L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par CPG et par CPG-SM [32]. La RMN peut également être utilisée pour identifier les constituants des huiles essentielles [33].

IV.4. Constituants des huiles essentielles

Les constituants des huiles essentielles possèdent un squelette hydrocarboné qui peut être linéaire, cyclique ou encore aromatique. Ils peuvent posséder toutes les grandes fonctions de la chimie organique : alcools, composés carbonylés (principalement aldéhydes et cétones), esters, phénols et, dans une moindre mesure, dérivés azotés et soufrés (tableau). Néanmoins, les terpènes (hydrocarbures en C₁₀ ou C₁₅) et trapénoïdes (terpènes fonctionnalisés) sont de loin les plus abondants [29].

Les constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux classes en fonction de leur voie de biosynthèse : les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes [34].

La classe des terpénoïdes est la plus variée au niveau structural. Les terpénoïdes, dont 25000 sont connus comme métabolites secondaires, dérivent du précurseur isoprénique à cinq carbones, l'isopenténylpyrophosphate. Les plus petits terpénoïdes sont les hémiterpénoïdes (C₅), qui sont formés d'une seule unité isoprénique. Les autres molécules, appartenant à cette classe, résultent de la condensation de plusieurs isoprènes. Ainsi, les monoterpénoïdes (C₁₀) sont constitués de deux unités isopréniques alors que les sesqui-terpénoïdes (C₁₅) sont formés par l'association de trois isoprènes. Les mono- et les sesquiterpénoïdes sont les plus représentés dans les huiles essentielles.

Les phénylpropanoïdes, ou composés phénoliques, sont biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle.

Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés antibactériennes. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements

fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées.

Une liste, visant à classer les constituants des huiles essentielles en fonction de l'intensité de leur activité, a d'ailleurs été établie[35]. Les composés phénoliques, comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol, sont, du fait du caractère acide de leur substituant hydroxyle, les plus actifs. Aussi, il n'est pas étonnant de constater que les huiles essentielles riches en phénols, comme les huiles de thym, d'origan et de clou de girofle, démontrent les plus hautes activités antibactériennes.

IV.5. Avantages :

Les huiles essentielles sont des produits très actifs car elles représentent un concentré par rapport aux principes aromatiques contenus dans la plante. Mais contenant pas les constituants non volatils de la plante, elles ont une activité thérapeutique propre qui n'est pas entièrement superposable à celles des plantes dont elles sont issues [27].

Plusieurs huiles essentielles confèrent une activité antimicrobienne en endommageant la paroi cellulaire et la membrane, menant à la lyse de cellules, à la fuite du contenu de cellules, et à l'inhibition de la force motrice de proton[28]. En outre, évidemment elles tuent effectivement des bactéries sans favoriser l'acquisition de la résistance [36] . [37].

IV.6. Inconvénients :

Ils procèdent de leur activité thérapeutique élevée à l'origine d'une toxicologie spécifique qui impose des règles d'utilisation précises des huiles essentielles. [27].

La toxicité des HE ne doit pas être sous-estimée en cas de mauvaise utilisation. Elle est directement liée à leur composition chimique : les risques dépendent des familles biochimiques auxquelles ces composés appartiennent et de leur concentration dans l'HE[27].

IV.7. Comment utiliser les HE ?

Il existe quatre voies principales d'administration des HE : orale, cutanée, respiratoire et rectale. Le choix de l'une ou de l'autre dépend de l'HE elle-même, de l'objectif thérapeutique, de l'âge du patient et de sa sensibilité [27].

IV. 8. Les activités antibactériennes des huiles essentielles

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix[38]. Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes [28].

Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre [35]. Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire [28]. Il existe cependant quelques exceptions. Les bactéries Gram négatives

Aeromonas hydrophila [39]. et *Campylobacter jejuni* [40].

ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles. La bactérie reconnue comme la moins sensible à leurs effets reste néanmoins la bactérie Gram négatif *P. aeruginosa* [41].

Les recherches ont montré que la fonction antimicrobienne s'exerce de deux manières selon les types de micro-organismes et de biomolécules :

-activité inhibitrice ou microbiostatique : blocage de la multiplication des cellules microbienne ;

-activité létale ou microbicide : mort des cellules microbiennes [29].

Il est très probable que chacun des constituants des HE ait son propre mécanisme d'action. D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases : (Figure 5)

-attaque de la paroi bactérienne par l'HE, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires ;

- acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire (ATP) due à la perte d'ions et la réduction du potentiel membranaire ;
- destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie [29] .

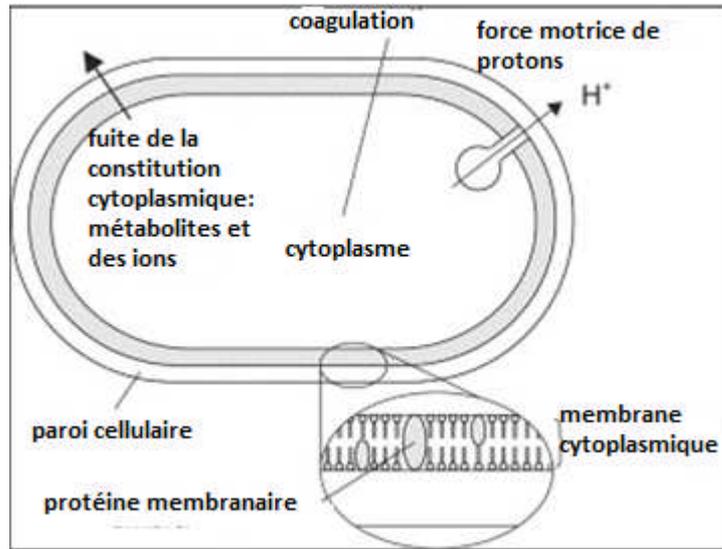


Figure 5 : Mécanisme d'action des HE au niveau de la cellule microbienne [28].

Notre étude a pour objectifs de

-identifier les bactéries responsables de mammites cliniques chez la vache.

-étudier la sensibilité in vitro de ces derniers vis-à-vis dans huiles essentielles de la menthe et de la lavande .

I.1. Diagnostic microbiologique

I.1.1. Matériel

I.1.1.1. Matériel biologique

Notre étude a été réalisée quand 15 prélèvements de lait provenant de des élevages bovins laitiers de la région de Blida et Bouira.

I.1.1.2. Matériel non biologique (Annexe 01)

I.1.2. Méthodes

I.1.2.1. Prélèvement

a. Technique de prélèvement

Le prélèvement est relativement simple, mais il doit être précis et rapide afin de ne pas le contaminer. La première étape est de nettoyer correctement le trayon avec de l'eau tiède et du savon et une lavette. On essuie ensuite avec du papier absorbant et on renouvelle l'opération jusqu'à ce que le papier soit propre. Après avoir enfilé des gants on procédera à la désinfection du trayon, surtout le bout, avec un coton imbibé d'alcool à 70 °. Puis, on prend un flacon stérile entre le pouce et l'index et on oriente le bouchon vers le bas, on dévisse celui-ci avec la main droite. Le bouchon est placé immédiatement entre le pouce et l'index de la main gauche, protégeant l'ouverture du pot.

On approche le flacon à l'horizontale du trayon, on élimine les premiers jets en principe dans un récipient puis on dirige 3 à 4 jets vers le récipient, on rebouche celui-ci immédiatement. On identifie le pot avec le numéro de la vache, le quartier et la date du prélèvement. Ce dernier est ensuite placé dans une glacière.

une culture doit se faire dans les 48 heures en frais, sinon il y a mise en congélation. Celle-ci permet de garder les prélèvements sur une longue durée, mais il peut y avoir une fragilisation de certains germes avec une chute du nombre de bactéries présentes et donc une augmentation de cultures négatives.

a. Conditions de prélèvement

-Avant toute antibiothérapie, si celle-ci est déjà entamée, effectuer une fenêtre thérapeutique d'au moins 48h avant le prélèvement.

-Respect des conditions d'asepsie.

b. Transport

Le prélèvement de lait doit être acheminé rapidement, dans une glacière à 4 C° , au laboratoire.

c. Fiche de renseignements

Le prélèvement doit être accompagné d'une fiche de renseignement comportant :

- numéro de la vache
- quartiers atteints
- stade de lactation
- nature de la mammite : 1ere mammite, rechute, taux cellulaires élevés
- si rechute, nature des traitements antérieurs, leurs durées et les résultats.

I.1.2.2 Examen direct

Il s'agit de l'examen du prélèvement à l'œil nu.

I.1.2.3. Mise en culture

Pour déterminer l'espèce bactérienne du germe infectant, il est indispensable d'isoler le microorganisme à étudier et d'en faire une culture pure à partir du prélèvement et l'ensemencer sur les milieux spécifiques.

a. Technique

-On dépose à l'aide d'une anse de platine une goutte 0.01 ml du lait prélevé sur la gélose (Gélose nutritive, Gélose hektoen, Gélose Chapman) à l'extrémité de la boîte pétri.

-On ensemence ensuite avec l'anse de platine en stries serrées selon la méthode des quadrants toute en respectant les précautions d'asepsie.

b. Incubation

les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24-48h.

I.1.2.4. Identification

L'identification des souches bactériennes se fait selon les étapes suivantes :

a. Examen macroscopique

Il repose sur l'observation des colonies bactériennes (taille, couleur, formes...).

b. Examen microscopique**❖Coloration de Gram**

Cette coloration permet la différenciation entre deux groupes bactériens : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif ainsi que l'observation de la forme des bactéries (bacilles, cocci, cocobacilles) ce qui permet l'orientation du diagnostic. Cette coloration différentielle repose sur l'aptitude ou non de la paroi bactérienne à s'opposer à la décoloration par l'alcool

Technique (Figure 6)

-Recouvrir le frottis avec le violet de Gentiane, laisser agir 30 à 60 secondes (Étape 1).

-Recouvrir le frottis avec le lugol 0,5 % pendant 15secondes (Étape 2).

-Verser goutte à goutte l'alcool à 95% jusqu'à ce qu'il n'entraîne plus de colorant ; laver rapidement à l'eau (Étape 3).

-Recolorer par la Fuschine diluée au 1/10^{ème} pendant 20 secondes (Étape 4).

-Rincer à l'eau distillée et sécher (Étape 5).

-Examiner au microscope à l'huile d'immersion à (l'objectif x 100) (Étape 6).

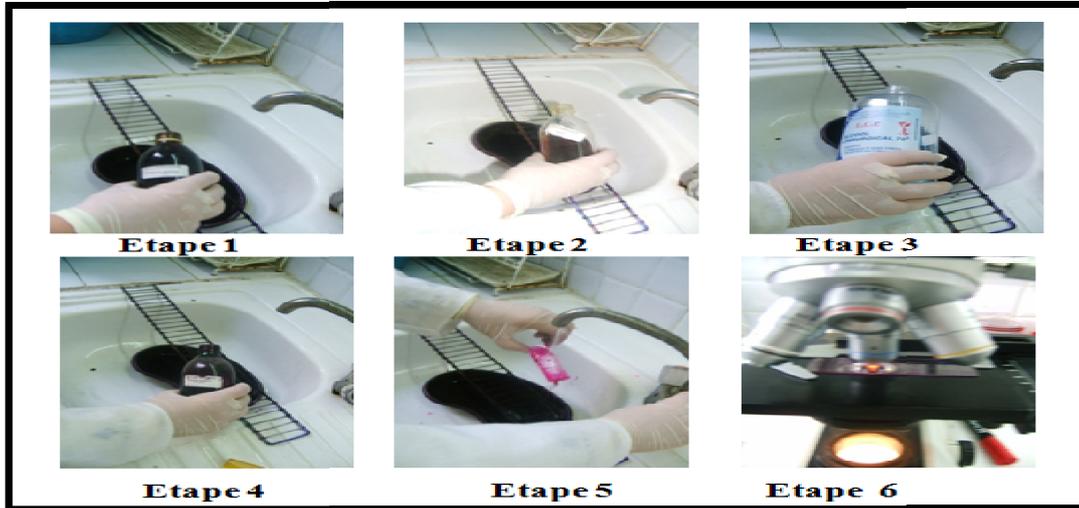


Figure 6 : Les différentes étapes suivies lors de la coloration de Gram.

Lecture

On observe des bacilles GRAM - (bactéries en bâtonnets violette), des coques GRAM+ (bactéries sphériques violettes) et des bacilles GRAM-.

❖ Etat frais

Cette méthode permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leurs : morphologies, de leurs modes de groupement, de leurs taille et de leur mobilité éventuelle.

Technique :

Sur une lame propre stérile, on dépose à l'aide d'une pipette Pasteur une goutte d'eau physiologique et on ajoute une colonie bactérienne. On recouvre la lame avec une lamelle et on observe au microscope optique (G : $\times 400$).

c. Identification biochimique

❖ Test de l'oxydase

Principe

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes [43].

La présence de cette enzyme permet de différencier entre *P. aeruginosa* (oxydase+) et les bactéries dépourvues d'Oxydase (ex. les entérobactéries)

Technique

On dépose une goutte d'eau distillée sur le disque «ox» et à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, on étale une partie de la colonie à identifier sur le disque [43].

Lecture

-Une réaction positive (oxydase+) se traduit par une coloration violette immédiatement ou dans 10 secondes [42].

❖ Test de la catalase

Principe

La catalase est une enzyme qui catalyse la décomposition de l'eau oxygénée (H₂O₂) en eau et en oxygène selon la réaction suivante [43].



La recherche de cette enzyme est utile pour différencier entre les bactéries par exemple: *Micrococcus*, *Staphylococcus* (catalase+) et *Streptococcus* (catalase-)

Technique

A l'aide d'une pipette pasteur, on étale une colonie à étudier dans une goutte d'eau oxygénée sur une boîte de pétrie vide.

Lecture

- Dégagement des bulles de gaz : catalase +
- Absence de bulles de gaz : catalase -

Remarque:

pour les colonies poussées sur gélose au sang, il faut faire attention de prélever les érythrocytes (globules rouges) avec l'échantillon, puisque ceux-ci contiennent de la catalase et peuvent donc fausser l'interprétation de résultat [42].

❖ Galerie biochimique API 20 E, API 20 STAPH ;

Le système API est une galerie en plastique comportant un certain nombre de micro tubes qui contiennent chacun un milieu déshydraté différent (Fig.7). Ce système permet d'effectuer simultanément toute une série de tests biochimiques d'identification de routine sur un organisme donné; ce qui permet d'économiser le temps, espace et le matériel.

Technique

- Pour préparer la suspension bactérienne, on ajoute quelques colonies à étudiées dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%.
- À l'aide d'une pipette Pasteur muni d'une poire, on inocule les micros tubes de galerie par les suspensions préparées.
- On ajoute l'huile de vaseline (pour éviter tout contact avec l'air) dans les micros tubes où c'est nécessaire.
- On incube la plaque à 37°C pendant 18-24 heures
- Après 24h, on ajoute les réactifs appropriés là où ils sont nécessaires.

Lecture

Une réaction positive se traduit par un virage de la coloration des milieux (Figure), et la lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau. Les résultats obtenus sont enregistrés sur un chéquier correspondant à chaque galerie; un profil numérique à **x** chiffres est obtenu. (Selon le type de galerie)

L'identification du germe est basée sur la traduction du profil numérique à l'aide d'un catalogue analytique de la galerie ou bien d'un logiciel d'identification API web.



Figure 7 : Galerie Api 20 E avant et après ensemencement

I.2. Étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles sur les souches bactériennes

Il existe plusieurs méthodes employées pour mettre en évidence les activités antimicrobiennes des HE classées selon la nature du contact de l'HE avec le germe (Aromatogramme, Micro-atmosphère, méthode de dilution à partir des disques, méthode des puits ainsi que les méthodes sur milieu liquide ...etc.), mais dans notre étude nous avons choisi la méthode des disques baptisé aromatogramme.

I.2.1. Matériels

I.2.1.1. Matériel biologique

a. Huiles essentielles

Les deux huiles essentielles testées dans ce travail sont extraites de deux plantes faisant partie de la famille des *Lamiaceae* : l'HE de la menthe verte (*Mentha viridis*) et l'HE de la lavande (*Lavandula latifolia spica*) (figure 8), elles sont fournies par l'entreprise : NATURE FORM INSTITUT (Boumerdes-Algérie). Elles sont obtenues par distillation en utilisant l'entraînement à la vapeur d'eau (Fiche technique en annexe).

Les HE ont été conservées dans des flacons stériles et enveloppés à 4°C et à l'abri de l'air et de la lumière, pendant toute la durée de notre travail, pour éviter d'éventuels phénomènes d'oxydation ou de contamination.



Figure 8: Les deux huiles essentielles utilisées (Original, 2016)

b. Souches cliniques

Les isolats cliniques ont été obtenus lors de notre travail (décrits ci-dessus), Nous avons isolé dix souches bactériennes, 05 entérobactéries et 05 staphylocoques, puis nous les avons conservé dans des milieux de conservation à température ambiante.

I.2.1.2. Matériel non biologique (Annexe 01)

I.2.2. Méthodes : Aromatogramme (test qualitatif)

La méthode de diffusion sur gélose appelée aromatogramme est l'équivalent de l'antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par les huiles essentielles.

Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée d'huile essentielle.

Cette méthode utilisée par certains auteurs [45], [46], [47],[48],[49],[50],[52],[53],[54],[55]est la technique que nous avons utilisée pour évaluer

dans un premier temps les huiles essentielles sélectionnées dans la littérature pour leur activité antimicrobienne.

La technique d'aromatogramme s'effectue selon les étapes suivantes :

a. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est gélose Muller-Hinton, qui doit être fondue et coulée en boîte de Pétri sur une épaisseur de 4 mm et puis laissée se solidifier.

Les géloses doivent être séchées avant l'emploi pour éliminer toute trace d'humidité qui favorise l'envahissement (Fig.9).



Figure 9 : Préparation de la gélose Muller Hinton

b. Préparation de l'inoculum

- A partir du milieu de conservation contenant la souche conservée et à l'aide d'une pipette Pasteur, ensemercer une boîte Pétri contenant une gélose nutritive puis incuber (24h, 37°C).
- A partir d'une culture pure sur milieu d'isolement et à l'aide d'une anse de platine, racler quelques colonies identiques
- Préparer une suspension bactérienne en déchargeant l'anse de platine dans l'eau physiologique stérile 0.9%, homogénéiser (vortex).

- Une opacité équivalente à 0.5 Mc Farland ($\sim 10^8$ UFC/ml) en utilisant un densitomètre.

c. Ensemencement

- Tremper un écouvillon propre et stérile dans la suspension et l'essorer sur les bords.
- Frotter délicatement l'écouvillon sur la gélose et tourner la boîte de 60° de façon à croiser les stries (Fig.10).



Figure 10 : Ensemencement par écouvillonnage

d. Application des disques

Des disques de papier Wattman n°3 de 9 mm de diamètre, stérilisés précédemment à la chaleur sèche sont imprégnés par 50 μ l ou 100 μ l par disque (Figure 11), ceci a été fait dans le but d'apprécier l'action "dose-dépendante" de l'HE sur la croissance bactérienne. Et là on distingue deux cas à savoir le disque est imprégné par une :

❖ **Huile essentielle pure**

Dans ce cas le disque est imprégné par 50 ou 100 μ l de l'huile essentielle pure que ce soit l'huile de Menthe ou de Lavande.

❖ Association des deux huiles essentielles

Dans ce cas le disque est imprégné par 50 µl ou 100 µl de l'association de deux huiles essentielles et chacune des deux HE représente 50% de l'association.

Après avoir imprégné les disques, déposer ces derniers sur la gélose déjàensemencée par l'inoculum avec une répétition, c.à.d. que chaque boîte doit contenir deux disques imprégnés tout les deux du même produit (répétition).

Incubation : Incuber les boîtes à 35-37°C pendant 18-24 heures.

f. Lecture

À l'aide d'un pied à coulisse métallique (ou d'une règle) on mesure les diamètres des zones d'inhibition (zone circulaire stérile autour du disque), et puis on calcule la moyenne des diamètres d'inhibition de chaque deux disques identique (répétition), c.à.d. pour chaque produit on calcule la moyenne des deux diamètres d'inhibition correspondant aux deux premiers disques imprégnés par 50 µl ainsi que celle des deux diamètres d'inhibition correspondant aux deux autres disques imprégnés par 100 µl et en se basant sur ces deux valeurs, la souche étudiée est alors classée.

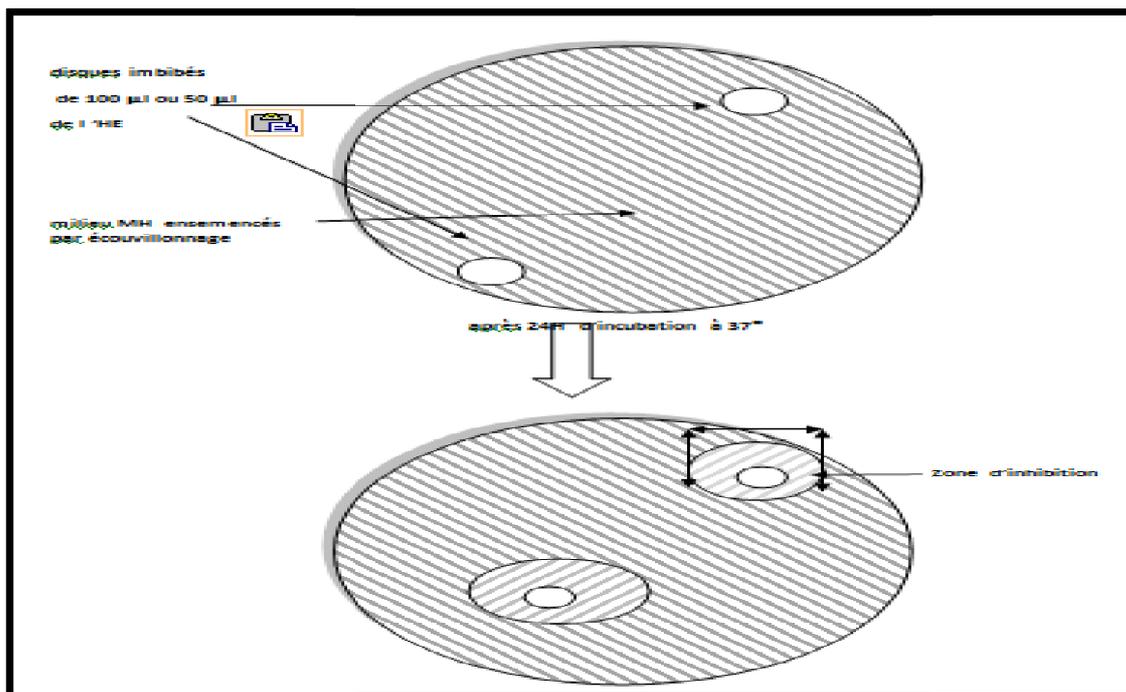


figure 11 : Illustration de la technique d'aromatogramme utilisée

les résultats sont présentés dans ce chapitre réalisées sur 15 échantillons de lait prélevés de vaches qui souffrent d'une mammite clinique au niveau de la région de Bouira et Blida, ainsi que les résultats de l'étude de l'effet antibactérien des HE de la lavande sauvage et de la menthe verte effectuée sur les 10 souches isolées.

II.1. Résultats du diagnostic bactériologique

Nous avons pu isoler 10 souches bactériennes faisant partie des deux familles : les entérobactéries et les staphylocoques.

Nous avons 05 souches d'entérobactéries à savoir : *Salmonella arizona*, *Serratia liquéfaciens*, *Klebsiella oxytoca*, et 05 souches de staphylocoques à savoir : *S. sciuri*, *S. aureus*, *S. lentus*

II.2. Résultats de l'aromatogramme

II.2.1. Diamètres des zones d'inhibition

Le tableau ci-dessous représente tous les résultats obtenus lors de notre étude, *in vitro*, de l'effet antibactérien des huiles essentielles sur les dix souches isolées

Tableau I : tableau récapitulatif des diamètres d'inhibition des souches testées (mm)

HE	Lavande		Menthe		Mélange	
	100 µl	50 µl	100 µl	50 µl	100 µl	50 µl
1	15	10	18	17	18	12
2	10	14	15	12	15	14
3	11	<9	22	14	<9	13
4	15	<9	13	<9	11	<9
5	20	11	30	22	40	15
6	22	15	20	19	20	13
7	22	16	15	15	16	15
8	25	15	29	20	22	30
9	35	24	37	30	25	20
10	27	22	50	35	35	30

Le tableau I représente la moyenne de deux diamètres (répétition) des zones d'inhibition (D) en millimètre (mm) observés autour des disques imprégnés des HE pures ou associées, selon les doses dont le disque est imbibé (50 µl ou 100 µl), après 24 heures d'incubation à 37°C.

Les diamètres d'inhibition par l'HE de lavande varient entre 11mm et 35 mm avec une dose de 100 µl et entre 10 mm et 24 mm en plus de deux zones de diamètre <9 mm avec une dose de 50 µl

Les diamètres d'inhibition par l'HE de menthe varient entre 13 mm et 50 mm avec des disques imbibés de 100 µl et entre 12 mm 35 mm plus une zone de diamètre <9 mm avec 50 µl.

Les disques imbibés de 100 µl du mélange des deux HE ont des diamètres d'inhibition qui varient entre 11 mm et 40 mm et ceux avec 50 µl ont des diamètres d'inhibition qui varient entre 12 mm et 30 mm, les deux doses ont donné deux diamètres inférieurs à 9 mm.

II.2.2. Résultats de l'étude de l'efficacité des HE sur les 10 souches étudiées

Les résultats de notre étude suivent l'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne élaborée par **Mutai et al., (2009)** qui ont scindé les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne en 5 classes :

- Très fortement inhibitrice : **$D \geq 30$ mm**
- Fortement inhibitrice : **$21 \text{ mm} \leq D \leq 29$ mm**
- Modérément inhibitrice : **$16 \text{ mm} \leq D \leq 20$ mm**
- Légèrement inhibitrice : **$11 \text{ mm} \leq D \leq 16$ mm**
- Non inhibitrice : **≤ 10 mm**

Le tableau ci-dessous représente les pourcentages des souches correspondant à chacune des classes :

Tableau II : distribution des souches étudiées selon le type d'effet exercé par l'HE

Classe		Très fortement inhibitrice		Fortement inhibitrice		Modérément inhibitrice		Légèrement inhibitrice		Non inhibitrice		Total	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Menthe	50µl	2	20	1	10	3	30	3	30	1	10	10	100
	100µl	3	30	2	20	2	20	3	30	0	0	10	100
Lavande	50µl	0	0	2	20	1	10	4	40	3	30	10	100
	100µl	1	10	4	40	1	10	3	30	1	10	10	100
mélange	50µl	2	20	0	0	1	10	6	60	1	10	10	100
	100µl	2	20	2	20	3	30	2	20	1	10	10	100

N : Nombre de souches. % : pourcentages des souches dans la classe correspondante

Les résultats du tableau II sont illustrés par les figures ci-dessous :

II.2.2.1. Étude de l'effet des HE sur les 10 souches isolées

a. Action de l'huile essentielle de Menthe

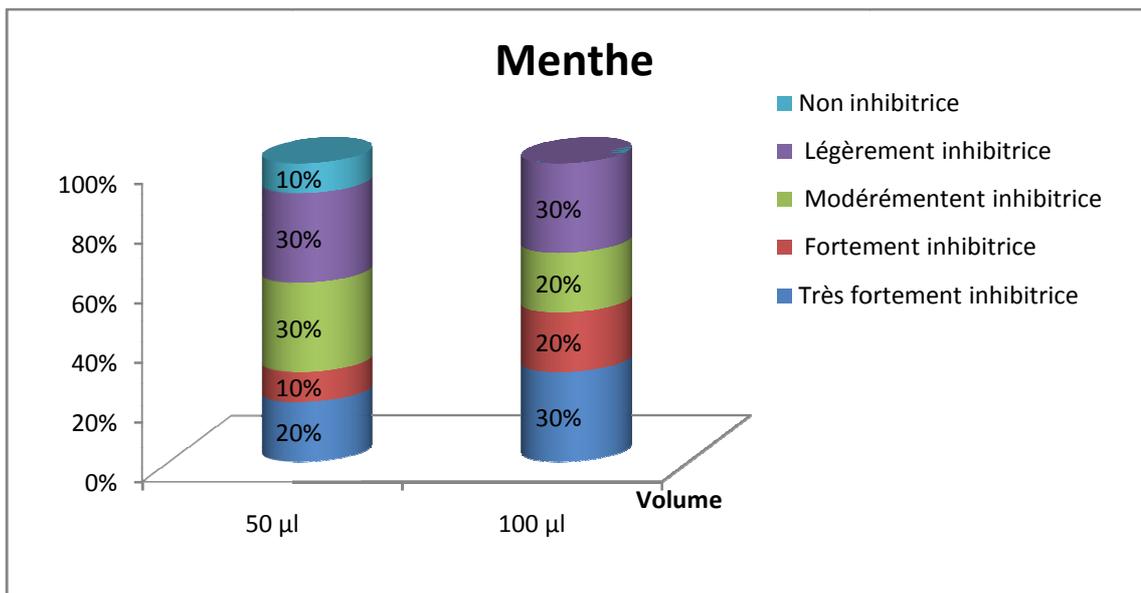


Figure 12: Effet de l'HE de menthe sur les souches testées

D'après la figure 12, l'HE de menthe est très fortement inhibitrice sur 20% des souches isolées avec une dose de 50µl et sur 30% des souches avec une dose de 100 µl, ce qui prouve qu'elle a une activité dose dépendante.

b. Action de l'huile essentielle de Lavande

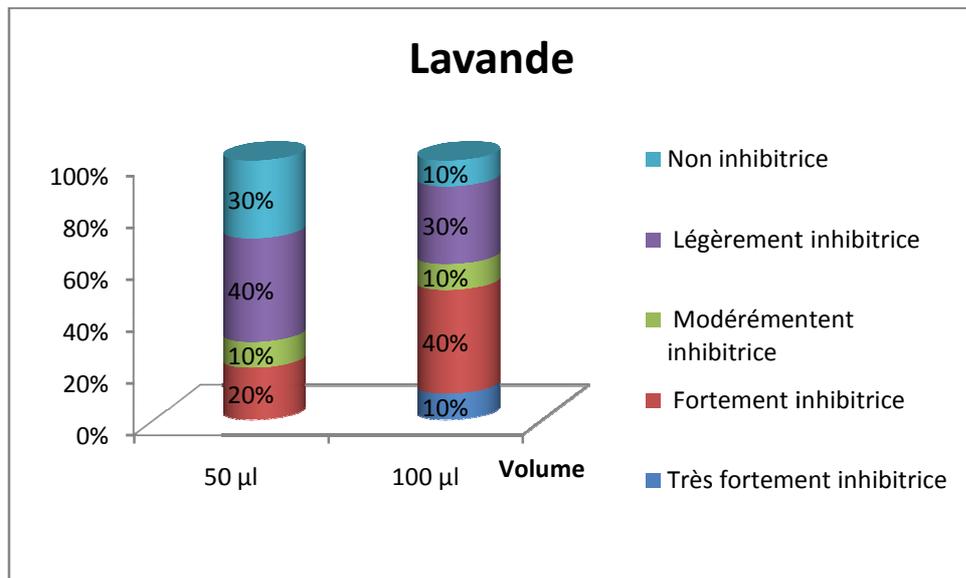


Figure 13: Effet de l'HE de lavande sur les souches testées

On remarque que l'HE de lavande est fortement inhibitrice sur 20% des souches avec 50 µl , tandis qu'elle l'est sur 40% des souches avec 100 µl et très fortement inhibitrice sur 10% des souches avec la même dose.

c. Action du mélange de l'HE de menthe et de lavande

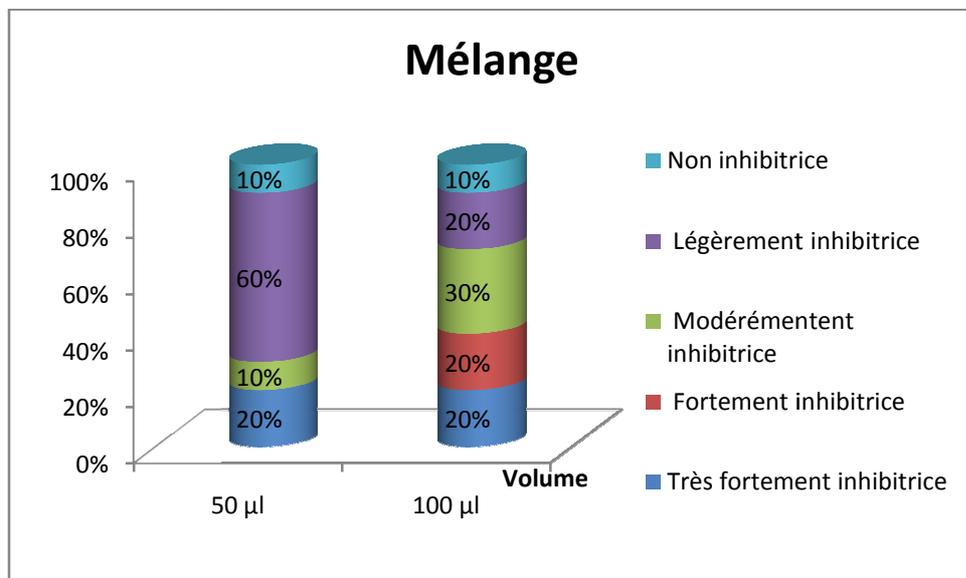


Figure 14: Effet du mélange de l'HE de menthe et de lavande sur les souches testées

On observe que le mélange des HE de menthe et de lavande est très fortement inhibiteur sur 20% des souches avec 50 µl et le même pourcentage des souches avec 100 µl.

II.2.2.2. Etude de l'effet des HE sur les entérobactéries isolés

a. Action de l'huile essentielle de Menthe

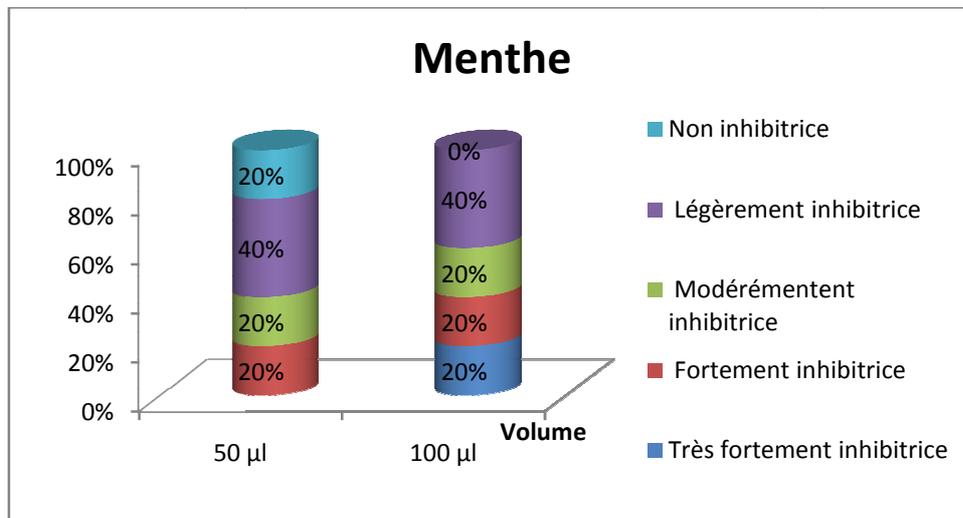


Figure 15: Effet de l'HE de menthe sur les entérobactéries isolées

On remarque que l'HE de menthe est fortement inhibitrice sur 20% des entérobactéries testés avec les deux doses (50 µl et 100 µl) et très fortement inhibitrice sur 20% des souches avec une dose de 100 µl

b. Action de l'huile essentielle de Lavande

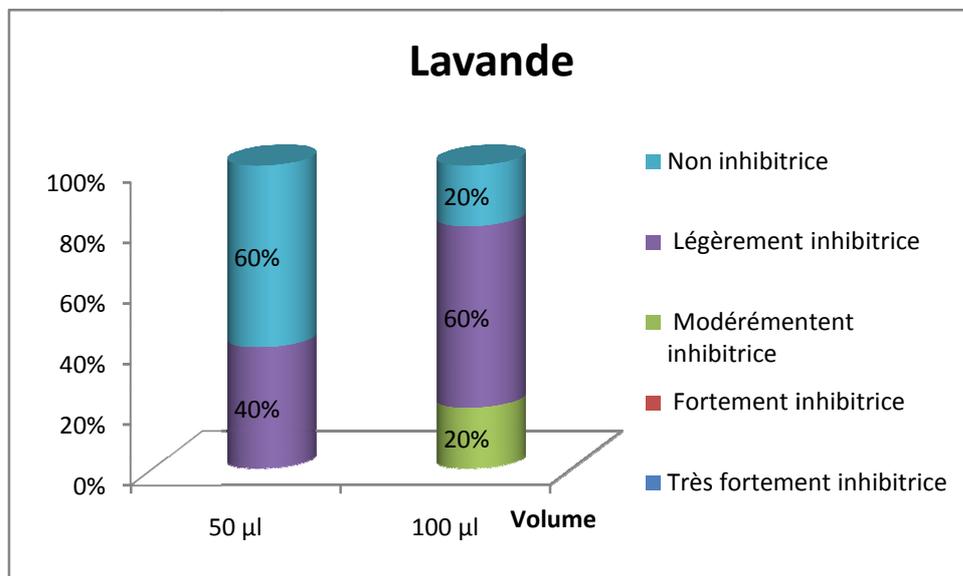


Figure 16: Effet de l'HE de lavande sur les entérobactéries isolées

D'après la figure 16 on observe que l'HE de lavande est légèrement inhibitrice sur 40% des entérobactéries avec une dose 50 µl et sur 60% des souches avec une dose

de 100µl et elle est modérément inhibitrice sur 20% des souches avec la même dose.

c. Action du mélange de l'HE de menthe et de lavande

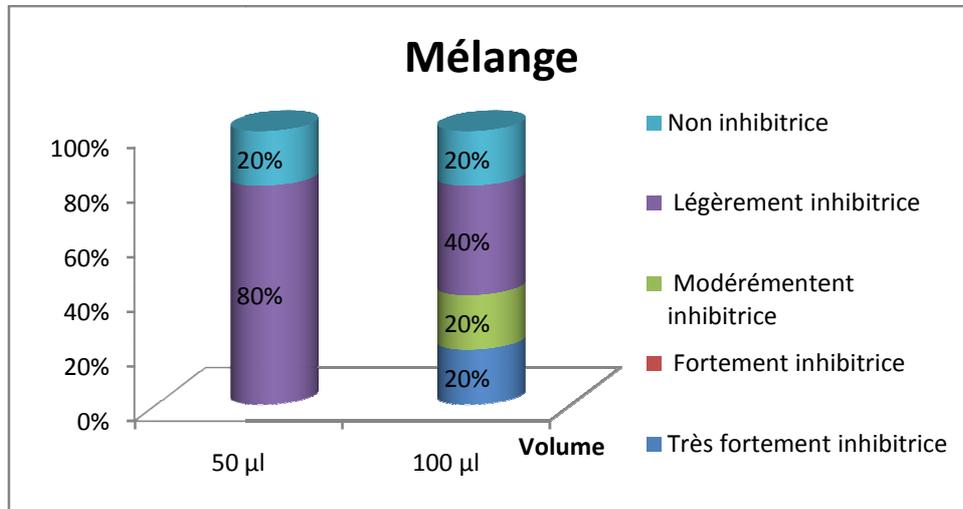


Figure 17: Effet du mélange du l'HE de menthe et de lavande sur les entérobactéries isolées

On remarque que le mélange de l'HE de menthe et de lavande est légèrement inhibiteur sur 80% des souches d'entérobactéries avec une dose de 50 µl et sur 40% avec une dose de 100 µl et très fortement inhibiteur sur 20% des souches avec la même dose.

II.2.2.3. Étude de l'effet des HE sur les staphylocoques isolés

a. Action de l'huile essentielle de Menthe

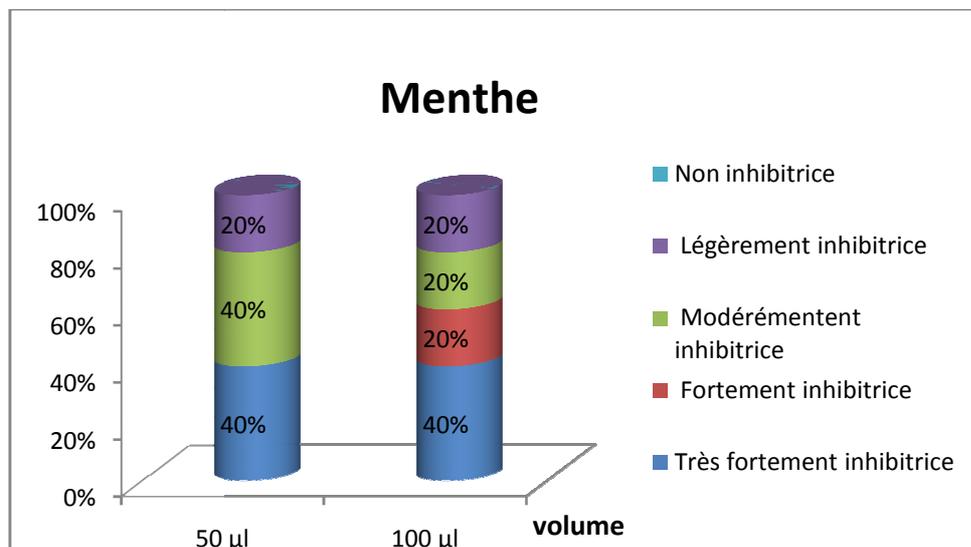


Figure 18: Effet de l'HE de menthe sur les staphylocoques isolés

On observe que l'HE de menthe est très fortement inhibitrice sur 40% des souches de staphylocoques est avec les deux dose (50 µl et 100 µl) et fortement inhibitrice sur 20% des souches avec une dose de 100 µl

b. Action de l'huile essentielle de Lavande

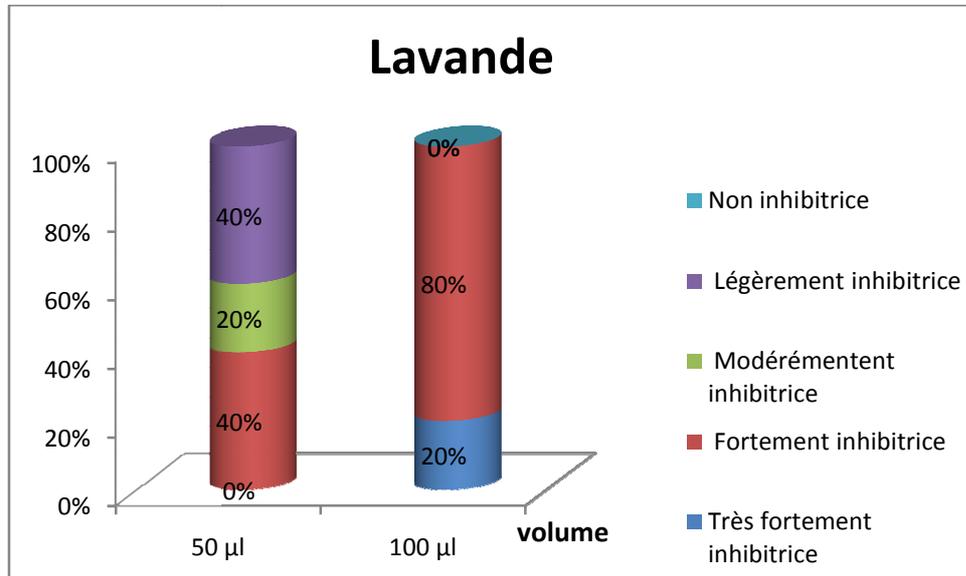


Figure 19: Effet de l'HE de lavande sur les staphylocoques isolées

On remarque que l'HE de lavande est fortement inhibitrice sur 40% des souches de staphylocoques avec une dose de 50 µl et sur 80% des souches avec une dose de 100 µl

c. Action du mélange de l'HE de menthe et de lavande

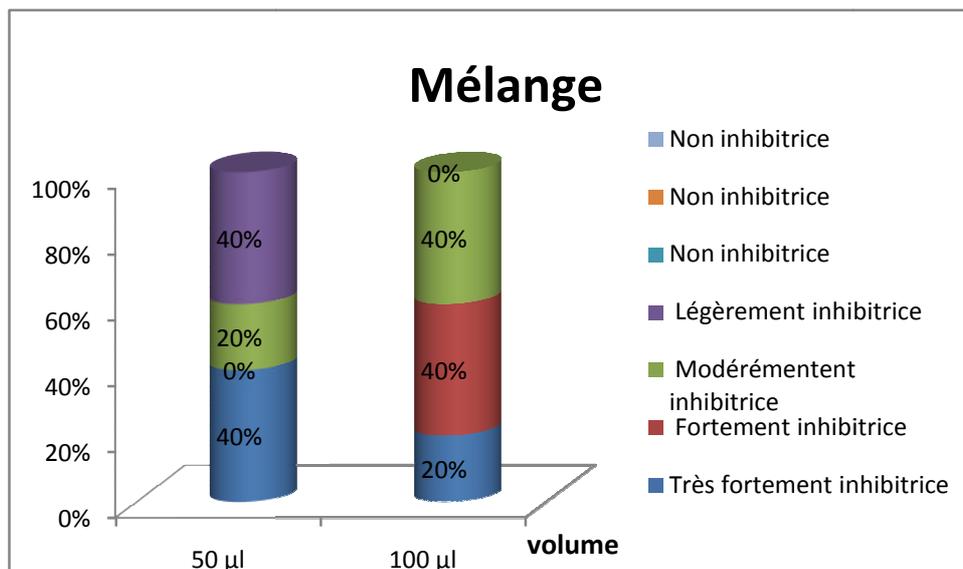


Figure 20: Effet du mélange de l'HE de menthe et de lavande sur les staphylocoques isolées

D'après la figure 20 on remarque que le mélange de l'HE de menthe et de lavande est très fortement inhibiteur sur 40% des souches de staphylocoques avec une dose de 50 µl et sur 20% des souches avec une dose de 100 µl.

Discussion générale

Le principal facteur modifiant l'activité antimicrobienne des HE est le type et la structure moléculaire des composants actifs présents dans les HE. Ainsi *in vitro*, une activité antimicrobienne plus élevée des terpènes oxygénés en comparaison avec des terpènes hydrocarbures a été observée. La caractéristique lipophile du squelette hydrocarboné ainsi que la propriété hydrophile des groupes fonctionnels sont déterminantes vis-à-vis de l'activité antimicrobienne des terpénoides [56].

D'après les résultats de notre étude, nous avons remarqué que l'HE de la menthe avait une activité inhibitrice importante sur les entérobactéries par rapport à l'HE de la lavande qui a montré une activité moyenne qui n'a pas dépassé le stade de légèrement inhibitrice à la dose de 50 µl et modérément inhibitrice avec seulement un pourcentage de 20% à la dose de 100 µl, ce qui peut être expliqué par la paroi des entérobactéries (Gram -) qui semble être résistante vis-à-vis des huiles essentielle comme les antibiotique.

L'effet antibactérien de l'HE de la lavande a considérablement augmenté avec les staphylocoques et il est arrivé au stade de fortement inhibitrice sur 40% des souches à une dose de 50 µl et jusqu'au stade très fortement inhibitrice à une dose de 100 µl parce que la paroi des staphylocoques est plus accessible au extrait naturels y compris les HE.

De même l'HE de la menthe et malgré qu'elle a montré une certaine activité sur les entérobactéries, mais sur les staphylocoques son activité était plus remarquable et elle était très fortement inhibitrice sur 40% des souches avec les deux doses.

Le mélange des deux HE avait un effet différent de celui des deux HE testés séparément, mais bien qu'il avait un effet plus important que celui de l'HE de la lavande, son effet était comparable avec celui de l'HE de la menthe.

L'activité dose dépendante était remarquable dans cette étude puisque l'activité des HE a augmenté en augmentant la dose sauf dans le cas de l'HE de la menthe avec les

staphylocoques qui a gardé pratiquement le même effet et le mélange qui a montré une activité plus faible sur les staphylocoques en augmentant la dose.

Conclusion

Cette étude nous a permis dans un premier temps d'isoler et identifier les souches bactériennes responsables des mammites cliniques. Le deuxième point essentiel est l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles sur les souches bactériennes isolées, dans notre étude nous avons choisi la méthode des disques baptisé aromatogramme et les deux huiles essentielles testées dans ce travail sont : l'HE de la menthe verte et l'HE de la lavande sauvage et nous avons utilisé également le mélange des deux HE.

La méthode de diffusion sur gélose appelée aromatogramme est l'équivalent de l'antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par les huiles essentielles, elle a été effectuée pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la menthe verte et de la lavande sauvage sur les entérobactéries et les staphylocoques isolés dans cette étude.

Il a été ainsi démontré que les huiles essentielles de la menthe verte et de la lavande sauvage et du mélange possèdent une activité antimicrobienne très importante contre les entérobactéries et les staphylocoques, et peuvent se substituer avec succès aux antibiotiques qui montrent leurs inefficacités à l'encontre des microorganismes.

Mais cette étude doit être poursuivie afin d'établir un protocole adéquat qui répond à la nécessité de minimiser l'usage des antibiotiques afin de prévenir l'apparition de souches multi résistantes sans nuire à la vache traitée et cela sera possible en réalisant des essais complémentaires *in vivo* afin de choisir les meilleurs huiles essentielles et de déterminer la dose tolérée et la voie d'administration de l'huile essentielle ainsi que la durée de traitement par l'aromathérapie et cela pour mettre en place une stratégie de lutte contre les mammites cliniques et pour contrôler les mammites subcliniques et cela va contribuer sans doute dans l'amélioration du bien être des vaches laitières et donc la stabilisation du taux de la production laitière .

Références bibliographiques

- [1] **DUVAL, J., 1995** .Soigner la mammite sans antibiotiques, Ecological Agriculture Projects, McGill, AGRO-BIO, University (Macdonald Campus).
- [2] **HANZEN, CH., 2014**, Physio-anatomie et propédeutique de la glande mammaire Symptomatologie, étiologie et thérapeutiques. Approches individuelles et de troupeau des mammites, Service de Thériogenologie des animaux de production, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège,
- [03] **:LEVESQUE, P., 2006**. La classification des mammites, qualité, Le Producteur du lait Québécois, Réseau canadien de recherche sur la mammite bovine et la qualité du lait, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.
- [04] **BLOOD, D, C., HENDERSON, J, A., 1976**. Médecine vétérinaire.Vigot Frères Ed., Paris 6e, ,294-331
- [05] **MALADIES DES BOVINS (4ÈME ÉDITION) 2008**, édition France agricole, institue de l'élevage, ISBN : 009782855571492,800 p.
- [06] **POUTREL, B., 1985**. Généralités sur les mammites de la vache laitière : processus infectieux, épidémiologie, diagnostic, méthodes de contrôle. Rec. Méd. Vét., 161 (6-7), P (497-511).
- [07] **ANONYME., 2010**. Dictionnaire de la mammite, Réseau canadien de recherche sur la mammite bovine et la qualité du lait, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,
- [08] **HANZEN, CH., 2014**. Les mammites, Définition et conséquences, Symptomatologie individuelle, Diagnostic individuel et de troupeau, Service de Thériogenologie des animaux de production, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège.
- [09] **GUERIN, P.,2007**. LES MAMMITES DE LA VACHE LAITIÈRE, Cours de pathologie mammaire des ruminants, Ecole nationale vétérinaire de Lyon.
- [10] **WEISEN, J.D., 1974**. La prophylaxie des mammites. Edition Vigot Frères Paris, pp 53, 54,55.
- [11] **THOMELIN, ROSELYNE., BENSOIS, ANGERS., DECEMBRE 2009**. Les mammites et les cellules, Charte des bonnes pratiques d'élevage, Réalisation chambre régionale d'agriculture des pays de la Loire pour le GIE Elevage.

- [12] **REYHER, K., DOHOO, I., SCHOLL, D., 2010.** Les bactéries de la mammite “ Un mariage complexe, SANTÉ ANIMALE, Le Producteur du lait Québécois, Réseau canadien de recherche sur la mammite bovine et la qualité du lait.
- [13] **BAILLARGEON, J., CHRISTEN, A-M., 2008.** La recherche sur la mammite, – Quoi de neuf, Réseau canadien de recherche sur la mammite bovine et la qualité du lait, Faculté de médecine vétérinaire. Université de Montréal ,16p.
- [14] **ARGENTE, G., LARDOUX, S., LE BERRE, K., LABBE, J-F., 2005.** Valeur de l’observation clinique de symptômes simples de mammite pour prédire les bactéries en cause. Bull. Group. Tech. Vét., 32, 39-46.
- [15] **FABRE J-M., MORVAN H., LEBREUX B., HOUFFSCHMITT PH., BERTHELOT, X., 1997.** Estimation de la fréquence des différents germes responsables de mammites en France, partie 1 : mammites cliniques Bull. Group. Tech. Vét., 3-B, 17-23,
- [16] **DJABRI, B., BAREILLE, N., BEAUDEAU, F., SEEGER, H., 2002.** Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis, Vet. Res., 33: p 335-357
- [17] **ROGUINSKY, R., FENSTERBANK, R., PHILIPPON, A., VERGER, Jacqueline., Nicole, BOSSERAY., DUCELLIEZ, M., BORDE, R., 1972.** Influence de l’infection Brucellique de la mamelle sur la teneur en cellules du lait, Station de Pathologie de la Reproduction, Centre de Recherches de Tours, 1. N. R. A, 37 – Nouzilly, Ann. Rech. Vet, 449-457
- [18] **ANONYME., 2013.** MID Identification des agents de mammites par PCR, au moyen des échantillons du contrôle laitier, SuisseLab.
- [19] **ANONYME., 2014.** Infection à *Histophilus somni* (anciennement *Haemophilus somnus*), Fédération des producteurs de bovins du Québec.
- [20] **JODI, WALAGE., 2007.** Diagnostiquer la mammite, Le producteur du lait Québécois, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.
- [21] **RADOSTITIS, O. M., BLOOD, D. C. ET GAY, C. C., A., 1997.** texte book of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses Veterinary medicine 15,576. Eighth Edition Saunders.
- [22] **LEE, CS, WOODING, FB, KEMP, P., 1980.** Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows, Journal of Dairy Research, Feb;47(1):39-50.
- [23] **POUTREL, B., 2002.** Actualités sur les méthodes de diagnostic des mammites. Journées nationales GTV, INRA. Tours : 157-162.
- [24] **GUSTAVE, R., 1977.** Examen clinique des bovins, les éditions du point vétérinaire.

- [25] **DUREL, L., FAROULT, B. ; LEPOUTRE, D., BROUILLET, P., LEPAGE., P.,** Mammites des bovins (cliniques et subcliniques) : La dépêche : démarches diagnostiques et thérapeutiques (Supplément technique n° 87) du 20 décembre 2003 au 2 janvier 2004.
- [26] **KALEMBA D, KUNICKA A., 2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **10**: 813-829
- [27] **OLLIER, C. 2011.** Le conseil en phytothérapie. 2ème édition. PRO-OFFICINA. 178p
- [28] **BURT, S., 2004.** Huiles essentielles : leurs propriétés antibactériennes et applications potentielles dans la revue de foods—a-un. International. J. Microbiologie de nourriture. **94:223 – 253**
- [29] **FERNANDEZ, X., CHEMAT, F. ET AL., 2012.** La chimie des huiles essentielles : Tradition et innovation. Edition Vuibert. Paris. 273 p.
- [30] **DELAQUIS PJ, STANICH K, GIRARD B, MAZZA G., 2002.** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* **74**: 101-109
- [31] **GONNY M, BRADESI P, CASANOVA J., 2004.** Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using ¹³C-NMR spectroscopy. *Flavour Fragr. J.* **19**: 424-433
- [32] **SALZER UJ., 1977.** The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings – a critical review. *C.R.C Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **9**: 345-373
- [33] **TOMI F, BRADESI P, BIGHELLI A, CASANOVA J., 1995.** Computer-aided identification of individual components of essential oils using Carbon-13 NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson. Anal.* **1**: 25-34
- [34] **BUCHANAN BB, GRUISSEM W, JONES RL., 2000.** *Biochemistry & Molecular Biology of Plants.* American Society of Plant Physiologists: Rockville, MA, p 1367
- [35] **KALEMBA D, KUNICKA A., 2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **10**: 813-829
- [36] **ALI S, ET AL., 2005.** Activités antimicrobiennes d'eugénol et de cinnamaldéhyde contre les *pylores* gastriques humains de *Helicobacter de* microbe pathogène. *Année Clin. Microbiologie. Antimicrob.*
- [37] **OHNO T, ET AUTRES, 2003.** Activité antimicrobienne d'huiles essentielles contre *Helicobacter pylori.* **8:207 de Helicobacter - 2 15.**
- [38] **BOYLE W., 1955.** Spices and essential oils as preservatives. *Am. Perfurmer Essent. Oil Rev.* **66**: 25-28
- [39] **WAN J, WILCOCK A, COVENTRY M-J., 1998.** The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens.* *J. Appl. Microbiol.* **84**: 152-158
- [40] **WANNISSORN B, JARIKASEM S, SIRIWANGCHAI T, THUBTHIMTHED S., 2005.** Antibacterial prperties,of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia.* **76**: 233-236

- [41] **DORMAN, H. J. D. ET DEANS, S. G., 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88- 2: (308-316).
- [42] **SINGLETON P., 1999** - Bactériologie. 4^{ème} édition Masson. Paris. 415 pages
- [43] **FAUCHÈRE J.L., 1997** - Bactériofiches : techniques en bactériologie cliniques. Edition Ellipses
- [44] **SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE, 2007**
- [45] **DEANS, S. G. ET RITCHIE, G., 1987.** "Antibacterial properties of plant essential oils"
- [46] **ZAÏKA, L. L., 1988.** Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its determination. *Journal of Food Safety* 9- 2: (97-118).
- [47] **CARSON, C. F. ET. RILEY T. V., 1995.** "Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Malaleuca alternifolia*" *Journal of Applied Bacteriology* 78-(264-269).
- [48] **PATTNAIK, S., V. R. SUBRAMANYAM, ET AL., 1996.** "Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro" *Microbios* 86- (237-246).
- [49] **SIVROPOULOU, A., E. PAPANIKOLAOU, ET AL., 1996.** Antimicrobial and cytotoxic activities of *origanum* essential oils. *Journal of Food Chemistry* 44- (1202-1205).
- [50] **SMITH-PALMER, A., J. STEWART, ET AL., 1998.** Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol* 26- 2: (118-122).
- [51] **STEWART, P. S., FRANKLIN, M.J., 2008.** Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 6 : 199-210.
- [52] **LIS-BALCHIN, M., S. L. HART, ET AL. 2000.** "Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils, originating in Australia and New Zealand" *Phytotherapy Research* 14- (623-629).
- [53] **BURT, S. A. ET REINDERS, R. D., 2003.** "Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7" *Letters in Applied Microbiology* 36- 3: (162-167).
- [54] **FALEIRO, M. L., M. G. MIGUEL, ET AL., 2003.** Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Lett Appl Microbiol* 36- 1: (35-40).
- [55] **KUNLE, O., J. OKOGUN, ET AL., 2003.** Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine* 10- (59-61).
- [56] **DORMAN, H. J. D. ET DEANS, S. G., 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88- 2: (308-316).
- [57] **BEKHECHI C., ATIK-BEKKARA F., ABDELOUAHID D.E. 2008.** Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie-Phytothérapie ; Vol. 6 ; pp 153-159

[58] **OURAINI D., AGOUMI A., ALAOUI M.I., ALAOUI K., CHERRAH Y., ALAOUI M.A., BELABBAS M.A., 2007.** Antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L. , comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques- Phytothérapie ; Vol. 1 ; pp 6-14.

Annexe 01
Matériel non biologique

Tableau III- Equipement de base d'un laboratoire de microbiologique

Appareillage et verrerie	Réactifs et solutions
Densitomètre.	Eau physiologique stérile à 0.9%
Etuve à 37°C	Eau distillée stérile
Etuve à 30 °C	Eau de javel
Réfrigérateur à 4°C	Eau oxygénée
Microscope optique	Alcool
Agitateur	Bleu de méthylène
Bec bunsen	Huile de vaseline
Lames et lamelles	Huile à immersion
Pipettes Pasteur stériles	Antiseptique
Anse de platine	Réactifs : VP 1,VP2, RM, NR1, NR2, TDA, ZYM
Pinces métalliques	A, ZYM B, COVACS.
Ecouvillons stériles	colorants
Boite de Pétri	
Tubes à essai stériles	
Portoir	
Poire	
Distributeur d'antibiotiques	
Gants jetables	
La gaze, Ciseaux	
Blouse de laboratoire	
Liquide désinfectant	
Conteneur pour élimination des déchets	
Etiquettes, Marqueurs, Registres	
Règles graduée ou pied à coulisse	
Jarre Co2 (avec bougie)	
Seringues en plastique	
Fiche de renseignements	

Tableau IV-Milieus de culture, milieux d'identification et disques imprégnés

Milieus d'isolement	Milieus pour antibiogramme	Disques imprégnés
BGT	Gélose Muller-Hinton (MH)	Disques d'oxydase
Gélose nutritive (GN)		Disques d'antibiotiques
Gélose hektoen		Disques vierges
Gélose Chapman		
Milieu de conservation		

Annexe 02

Résultats de l'aromatogramme

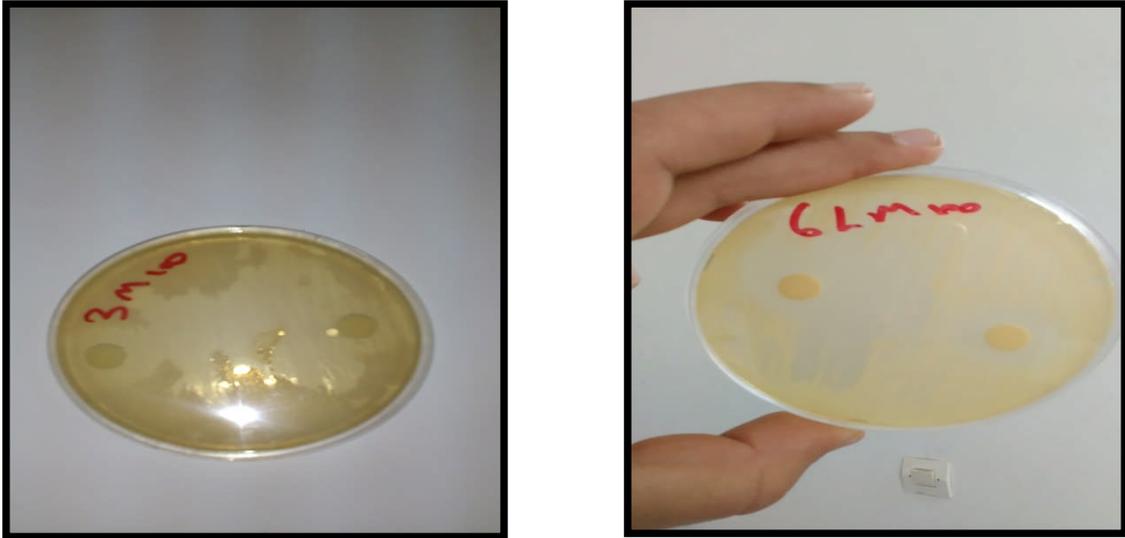


Figure 21 : Zones d'inhibition

INTRODUCTION

CHAPITRE I
GENERALITES
SUR LES
MAMMITES

CHAPITRE II

DIAGNOSTIC DES MAMMITES

CHAPITRE III

TRAITEMENTS ET PREVENTION

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

ANNEXES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CONCLUSION

CHAPITRE IV

LES HUILES ESSENTIELLES

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II

RESULTATS ET DISCUSSION

PARTIE PRATIQUE