

**UNIVERSITE DE BLIDA 1**  
**Institut des Sciences Vétérinaires**

# **THESE DE DOCTORAT**

en Sciences Vétérinaires

Spécialité : Microbiologie médicale des maladies zoonotiques

ETUDE COMPARATIVE ENTRE LES TRAITEMENTS ALTERNATIFS ET LES  
TRAITEMENTS CONVENTIONNELS DES MAMMAITES CHEZ LES  
RUMINANTS

Par

**Mostefa GHALLAL**

Devant le jury composé de :

R. BELLALA	MCA, Université Blida 1	Président
R. ACHEK	MCA, Université de Khemis Miliana	Examineur
A. DEBIB	MCA, Centre Universitaire de Tipaza	Examinatrice
D. MOKRANI	MCA, Université Blida 1	Examineur
A. MORSLI	MCA, Université de Boumerdes	Examineur
H. KHALED	MCA, Université Blida 1	Directeur de thèse
A. BOUYOUCEF	Professeur, Université Blida 1	Invité d'honneur

Blida, 23 juillet 2023

## RESUME

La mammite est une maladie très fréquente et parmi les plus pénalisantes et coûteuses chez les petits ruminants. Le traitement des mammites par des antibiotiques a plusieurs inconvénients, à savoir l'émergence de souches bactériennes antibiorésistantes. Pour évaluer la possibilité d'utiliser le miel et l'amidon *in vivo* dans le traitement des mammites cliniques et d'établir une comparaison entre l'efficacité de ce traitement alternatif et celle d'un traitement conventionnel, nous avons induit une mammite par une souche de référence de *S. aureus* ATCC 33862 chez 60 brebis allaitantes de race Rumbi. Les brebis ont été aléatoirement divisées en 3 groupes de 20 chacun et ont été ensuite traitées : Groupe 1 "amoxicilline/acide clavulanique", Groupe 2 "miel/amidon", Groupe 3 "témoin" n'a reçu aucun traitement. Après le début du traitement, les mamelles traitées par l'antibiotique ont eu une guérison clinique complète de 62,5 % le 4<sup>ème</sup> jour et de 100 % à partir du 6<sup>ème</sup> jour, une guérison zootechnique de 77,5 % le 4<sup>ème</sup> jour et de 100 % à partir du 6<sup>ème</sup> jour, une guérison cellulaire de 100 % à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine et une guérison bactériologique de 100 % à partir du 1<sup>er</sup> jour ; les mamelles traitées par miel/amidon ont eu une guérison clinique complète de 65 % le 3<sup>ème</sup> jour et de 95 % à partir du 5<sup>ème</sup> jour, une guérison zootechnique de 75 % le 3<sup>ème</sup> jour et de 95 % à partir du 5<sup>ème</sup> jour, une guérison bactériologique de 95 % à partir du 1<sup>er</sup> jour, mais aucune guérison cellulaire n'a été constatée à la 4<sup>ème</sup> semaine. Le traitement alternatif a donné des résultats très satisfaisants en comparaison avec l'antibiothérapie. Cependant, l'amélioration clinique et zootechnique des quartiers traités par le traitement alternatif était plus rapide que celle des quartiers traités par l'antibiotique. La formule conventionnelle a eu une légère supériorité par rapport à la formule alternative, mais étant donné que la première a beaucoup d'impacts sur la santé humaine et la deuxième n'en possède pas, cette dernière pourrait être une thérapie intéressante alternative aux antibiotiques pour le traitement des mammites cliniques des brebis.

**Mots clés :** mammite, brebis, *S. aureus*, antibiotique, miel, amidon.

## ABSTRACT

Mastitis is a very common disease and one of the most penalizing and costly in small ruminants. Mastitis treatment by antibiotics has several inconveniences, namely the emergence of antibiotic-resistant bacterial strains. To assess the possibility of using honey and starch *in vivo* in the treatment of clinical mastitis and to establish a comparison between the effectiveness of this alternative treatment and that of a conventional treatment, we induced a mastitis by a reference strain of *S. aureus* ATCC 33862 in 60 lactating ewes of the Rumbi breed. The ewes were randomly divided into 3 groups of 20 each and were then treated: Group 1 "amoxicillin/clavulanic acid", Group 2 "honey/starch", Group 3 "control" received no treatment. After the treatment beginning, the antibiotic-treated udders had a complete clinical healing of 62.5 % on the 4<sup>th</sup> day and 100 % from the 6<sup>th</sup> day, a zootechnical healing of 77.5 % on the 4<sup>th</sup> day and 100 % from the 6<sup>th</sup> day, a cellular healing of 100 % from the 3<sup>rd</sup> week and a bacteriological healing of 100 % from the 1<sup>st</sup> day; the honey/starch-treated udders had a complete clinical healing of 65 % on the 3<sup>rd</sup> day and 95 % from the 5<sup>th</sup> day, a zootechnical healing of 75 % on the 3<sup>rd</sup> day and 95 % from the 5<sup>th</sup> day, a bacteriological healing of 95 % from the 1<sup>st</sup> day, but no cellular healing was observed at the 4<sup>th</sup> week. The alternative treatment gave very satisfactory results in comparison with antibiotic therapy. However, clinical and zootechnic improvement of teats treated with the alternative treatment was faster than teats treated with the antibiotic. The conventional formula had a slight superiority over the alternative formula, but since the first has many impacts on human health and the second has virtually no, this latter could be an interesting alternative therapy to antibiotics for the treatment of clinical mastitis in ewes.

**Keywords:** mastitis, ewe, *S. aureus*, antibiotic, honey, starch.

## ملخص

التهاب الضرع هو مرض شائع جدا ومن بين الأمراض الأكثر خطورة والأكثر تكلفة. إن علاج التهاب الضرع بالمضادات الحيوية له مساوئ عديدة مثل بروز سلالات بكتيرية مقاومة للمضادات الحيوية. لتقييم إمكانية استخدام العسل والنشاء في الجسم الحي لعلاج التهاب الضرع السريري وللمقارنة بين فعالية هذا العلاج البديل وفعالية علاج كلاسيكي، قمنا بإحداث التهاب الضرع عن طريق حقن سلالة مرجعية من المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* ATCC 33862 عند 60 نعجة مرضعة من سلالة الرمبي. قسمت النعاج عشوائياً إلى 3 مجموعات كل منها 20 نعجة ثم عولجت: المجموعة 1 "أموكسيسيلين / حمض الكلافولانيك"، المجموعة 2 "عسل / نشاء"، المجموعة 3 "مجموعة التحكم أو الشاهد" لم تتلق أي علاج. بعد بدء العلاج، تماثلت الحلمات المعالجة بالمضادات الحيوية لشفاء سريري كامل بنسبة 62.5% في اليوم الرابع و 100% انطلاقاً من اليوم السادس، وشفاء خلوي بنسبة 100% انطلاقاً من الأسبوع الثالث وشفاء جرثومي بنسبة 100% انطلاقاً من اليوم الأول؛ تماثلت الحلمات المعالجة بالعسل / النشاء لشفاء سريري كامل بنسبة 65% في اليوم الثالث و 95% انطلاقاً من اليوم الخامس، وشفاء حيوان-تقني بنسبة 75% في اليوم الثالث و 95% انطلاقاً من اليوم الخامس، وشفاء ميكروبي بنسبة 95% انطلاقاً من اليوم الأول، ولكن لم يلاحظ أي شفاء خلوي في الأسبوع الرابع. أعطى العلاج البديل نتائج مرضية للغاية بالمقارنة مع العلاج بالمضادات الحيوية. إلا أن التحسن السريري والحيوان-تقني للحلمات المعالجة بالصيغة البديلة كان أسرع منه في الحلمات المعالجة بالمضاد الحيوي. كان للعلاج بالصيغة الكلاسيكية تفوق طفيف على العلاج بالصيغة البديلة، ولكن بما أن للأولى العديد من التأثيرات الجانبية على صحة الإنسان والثانية ليس لها أي تأثير، فإن هذه الأخيرة يمكن أن تشكل علاجاً بديلاً ذا أهمية قصوى عن المضادات الحيوية لعلاج التهابات الضرع عند النعاج.

**الكلمات المفتاحية:** التهاب الضرع، نعجة، مكورات عنقودية ذهبية، مضاد حيوي، عسل، نشاء.

## REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent avant tout à Allah de m'avoir tout donné pour réaliser cette thèse.

Je remercie tout d'abord Dr KHALED H. qui a accordé la direction de ma thèse, ainsi que les membres de jury : Dr BELLALA R., Dr ACHEK R., Dr MORSLI A. Dr DEBIB A. et Dr MOKRANI D., qui vont consacrer une partie de leur précieux temps pour lire cet ouvrage. Un remerciement spécial à mon ex-encadreur et l'invité d'honneur Pr BOUYOUCHEF A. d'avoir été le pilier du lancement de ma recherche.

Merci infiniment à Dr KHALED H. d'avoir toujours été à mes côtés et de la qualité de son soutien, il m'était un encadreur, un collègue et un ami.

Je tiens à remercier également tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à réaliser ce travail, plus particulièrement : Dr BENBALKACEM I. de ses conseils qu'il m'a prodigués, le docteur vétérinaire et l'éleveur de leur aide à la réalisation pratique de cette expérimentation ; qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Vif merci à toute ma famille et tout particulièrement mes très chers parents qui m'ont beaucoup soutenu.

## DEDICACES

Je dédie cette thèse à la personne qui m'a donné la vie, source d'inspiration et symbole d'endurance, ma très chère mère FATMA.

A mon très cher père MOHAMED, symbole de sagesse.

A mes frangines SAMIRA, NADIA et YOUSRA, mes frangins HAMZA et YASSINE, mes neveux ABDENNOUR, FAKHREDDINE, FIRAS, YASSIR, LOUAI, OMAR et YANIS, mes nièces AIA, MAISSA, MARIA et INES.

A la mémoire de ma grand-mère, paix à son âme, qu'Allah l'accueille dans son vaste paradis.

A ma très chère tante ZOHRA.

A la personne qui occupe mon cœur RIHAM, symbole de tendresse et d'amour.

Dédicace chaleureuse à ma collègue et sœur KATIA, mes collègues DJAAFER, LOUISA, RAMZI et CHAWKI.

Dédicace spéciale à mon très adorable ami et mon superviseur au boulot SABER, le bien-aimé qui m'inspire de l'amour et de la force.

A mon frère et mon ami NABIL, sa mère GHANIA, son père DAHMANE et sa sœur WAHIDA.

A toute ma famille : ma grand-mère, mes tantes et leurs maris, mes oncles et leurs femmes, mes cousins et mes cousines.

A tous mes amis et mes collègues que j'aime beaucoup, particulièrement : MOHAMED, MUSTAPHA, AMIROUCHE, GHAZEL et AZZEDDINE.

## TABLE DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

DEDICACES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION..... 15

CHAPITRE 1. ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA GLANDE MAMMAIRE DE LA BREBIS..... 17

1.1. Anatomie de la glande mammaire des brebis ..... 17

1.1.1. Conformation..... 17

1.1.2. Structure..... 18

1.1.2.1. Tégument ..... 19

1.1.2.2. Appareil de suspension ..... 19

1.1.2.3. Parenchyme mammaire ..... 19

1.1.2.4. Voies d'excrétion ou canaux galactophores ..... 19

1.1.2.4.1. Conduit alvéolaire ..... 20

1.1.2.4.2. Conduits intra-lobulaires ..... 20

1.1.2.4.3. Conduits inter-lobulaires (conduits supra-lobulaires) ..... 20

1.1.2.4.4. Conduits inter-lobaires ..... 20

1.1.2.4.5. Conduits lactifères ..... 20

1.1.2.4.6. Sinus lactifère ou citerne de la glande .....	21
1.1.2.4.7. Papille .....	21
1.1.3. Particularités spécifiques des mamelles de la brebis .....	21
1.2. Physiologie de la glande mammaire des brebis .....	23
1.2.1. Lactation.....	23
1.2.2. Mécanisme hormonal .....	23
CHAPITRE 2. ETUDE DES MAMMITES OVINES.....	25
2.1. Définition des mammites .....	25
2.2. Etiologie .....	25
2.3. Etude clinique.....	26
2.4. Mammites cliniques aiguës .....	27
2.4.1. Agent causal de la mammite gangreneuse .....	27
2.4.2. Symptômes de la mammite gangreneuse .....	28
2.4.3. Evolution de la mammite gangreneuse .....	29
2.4.4. Pronostic de la mammite gangreneuse .....	29
2.5. Epidémiologie analytique .....	30
2.5.1. Réservoirs de germes .....	30
2.5.2. Modalités de transmission.....	31
2.5.2.1. Mécanismes de dissémination .....	31
2.5.2.2. Modes de pénétration.....	31
2.6. Diagnostic .....	32

2.6.1. Diagnostic individuel .....	32
2.6.1.1. Détection des symptômes (diagnostic clinique) .....	32
2.6.1.2. Détection de l'inflammation .....	32
2.6.1.3. Détection de l'inflammation (CMT) .....	33
2.6.1.4. Détection de l'infection (bactériologie du lait) .....	33
2.6.2. Diagnostic collectif .....	34
2.7. Traitement des mammites .....	34
2.7.1. Traitement des mammites cliniques en lactation.....	35
2.7.1.1. Considérations générales.....	35
2.7.1.2. Applications au choix des traitements .....	36
2.7.1.3. Traitements intramammaires.....	36
2.7.1.4. Traitements par voie générale.....	37
2.7.2. Traitement des mammites subcliniques en lactation.....	39
2.7.3. Traitement des mammites subcliniques au tarissement.....	39
2.7.4. Traitement alternatif des mammites (apithérapie) .....	40
2.7.4.1. Propriétés thérapeutiques du miel.....	41
2.7.4.2. Utilisation du miel comme une arme efficace contre les infections nosocomiales .....	49
2.7.4.3. Usages vétérinaires du miel .....	49
2.7.4.4. Intérêts et limites à l'utilisation du miel .....	50
2.7.4.5. Conclusion .....	52
CHAPITRE 3. ETUDE EXPERIMENTALE .....	54

3.1. Objectifs .....	54
3.2. Matériels et méthodes .....	54
3.2.1. Lieu et animaux de l'expérimentation .....	54
3.2.2. Diagnostic de mammites .....	56
3.2.2.1. Diagnostic de mammites cliniques .....	56
3.2.2.2. Diagnostic de mammites subcliniques .....	57
3.2.2.3. Diagnostic bactériologique .....	58
3.2.3. Induction de mammite .....	59
3.2.3.1. Choix de la souche bactérienne .....	59
3.2.3.2. Préparation de la suspension bactérienne .....	60
3.2.3.3. Procédé d'induction.....	60
3.2.4. Confirmation de la mammite staphylococcique .....	61
3.2.4.1. Diagnostic clinique .....	61
3.2.4.2. CMT .....	62
3.2.4.3. Diagnostic bactériologique .....	62
3.2.5. Traitement de la mammite staphylococcique .....	63
3.2.5.1. Traitement par une formule conventionnelle .....	64
3.2.5.2. Traitement par une formule alternative.....	66
3.2.6. Appréciation de l'efficacité des traitements conventionnel et alternatif..	69
3.2.6.1. Guérison clinique.....	69
3.2.6.2. Guérison zootechnique .....	70

3.2.6.3. Guérison cellulaire.....	70
3.2.6.4. Guérison bactériologique .....	70
3.2.7. Utilisation des critères de guérison d'une mammite clinique .....	70
3.2.7.1. Guérisons clinique et cellulaire.....	71
3.2.7.2. Guérison bactériologique .....	71
3.2.8. Devenir des brebis non traitées (groupe "témoin") .....	72
3.2.9. Analyse statistique .....	72
3.3. Résultats .....	73
3.3.1. Appréciation de l'efficacité des traitements conventionnel et alternatif .	73
3.3.1.1. Appréciation clinique .....	73
3.3.1.2. Appréciation zootechnique .....	78
3.3.1.3. Appréciation cellulaire .....	80
3.3.1.4. Appréciation bactériologique .....	82
3.3.2. Utilisation des critères de guérison d'une mammite clinique .....	83
3.3.2.1. Guérisons clinique et cellulaire.....	83
3.3.2.2. Guérison bactériologique .....	84
3.3.3. Analyse statistique .....	84
3.4. Discussion.....	87
3.4.1. Appréciation de l'efficacité des traitements conventionnel et alternatif .....	87
3.4.1.1. Quartiers traités par l'antibiotique .....	87
3.4.1.2. Quartiers traités par miel/amidon .....	90
3.4.2. Utilisation des critères de guérison d'une mammite clinique .....	97

3.4.2.1. Guérisons clinique et cellulaire.....	97
3.4.2.2. Guérison bactériologique .....	98
3.4.3. Comparaison entre l'efficacité des traitements conventionnel et alternatif .....	98
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	101
APPENDICES .....	103
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	108

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

<b>Figure 3.1</b> : Organigramme général de l'étude.....	51
<b>Figure 3.2</b> : Réalisation d'un CMT .....	54
<b>Figure 3.3</b> : Induction de la mammite staphylococcique.....	56
<b>Figure 3.4</b> : Présence de pus dans le lait d'une mamelle mammitieuse.....	58
<b>Figure 3.5</b> : Résultat de l'antibiogramme de <i>S. aureus</i> ATCC 33862.....	62
<b>Figure 3.6</b> : Application du traitement antibiotique .....	64
<b>Figure 3.7</b> : Application du traitement alternatif .....	65
<b>Figure 3.8</b> : CMI du traitement alternatif.....	67
<b>Figure 3.9</b> : Evolution des taux de guérison clinique des pis mammitieux après l'administration des traitements .....	73
<b>Figure 3.10</b> : Lait liquéfié et de couleur marron constaté dans les mamelles traités par le miel .....	74
<b>Figure 3.11</b> : Evolution des taux de guérison zootechnique des pis mammitieux après l'administration des traitements .....	77
<b>Figure 3.12</b> : Evolution des taux de guérison cellulaire des pis mammitieux après l'administration des traitements .....	79
<b>Figure 3.13</b> : Evolution des taux de guérison bactériologique des pis mammitieux après l'administration des traitements .....	80

<b>Tableau 3.1</b> : Caractéristiques de la souche de référence de <i>S. aureus</i> .....	58
<b>Tableau 3.2</b> : Critères objectifs de l'efficacité des traitements des mammites cliniques .....	69
<b>Tableau 3.3</b> : Taux de guérisons des quartiers traités par Amoxicilline/ acide clavulanique .....	72
<b>Tableau 3.4</b> : Taux de guérisons des quartiers traités par miel/amidon .....	75
<b>Tableau 3.5</b> : Taux de guérisons des quartiers non traités "témoin" .....	76
<b>Tableau 3.6</b> : Critères objectifs de l'efficacité des traitements des mammites cliniques .....	82
<b>Tableau 3.7</b> : Estimations de Kaplan Meier du temps médian de guérison avec des intervalles de confiance (IC) à 95 % pour chaque paramètre dans les trois groupes de brebis atteintes de mammite .....	83
<b>Tableau 3.8</b> : Comparaisons par paires à l'aide du test Log-Rank (méthode d'ajustement de la valeur p : l'ajustement de Bonferroni).....	84

## INTRODUCTION

La glande mammaire fait depuis longtemps l'objet de nombreuses études fondamentales et appliquées chez les différentes espèces animales [1]. En élevage ovin, les performances laitières élevées des brebis assurent une production importante d'agneaux surtout dans les élevages intensifs [2]. Mais les principales contraintes à l'intensification de la production ovine sont liées à la mauvaise gestion technico-sanitaire [3].

En effet, les filières ovines sont contrariées par certaines pathologies dont les mammites qui, constituent les pathologies majeures et parmi les plus importantes en élevages. Ce sont les maladies les plus fréquentes, les plus pénalisantes et les plus coûteuses [4] ; [5] ; [6] ; [7]. Pour toutes ces raisons, le contrôle et le traitement de la mammite dans les troupeaux laitiers et la maîtrise de la qualité hygiénique du lait revêtent une très grande importance et constituent des enjeux majeurs de ces filières [5] ; [8].

En traitant les mammites, les antibiotiques sont administrés aux animaux par différentes voies. Théoriquement, toutes ces voies d'administration peuvent entraîner l'accumulation de résidus dans les aliments d'origine animale comme le lait. La contamination du lait par les résidus peut être considérée comme la conséquence du traitement des infections intramammaires. La présence des résidus d'antibiotiques dans le lait cru devient une source de préoccupation majeure, car ils présentent des risques pour la santé publique en raison des réactions allergiques qui peuvent leur être associées, de leur pouvoir cancérogène et de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques en médecine humaine. Les résidus d'antibiotiques pourraient également contrarier la transformation du lait, ils influencent défavorablement à l'aptitude du lait à sa transformation et à la qualité des produits laitiers dérivés, de ce fait, l'industrie subit un préjudice [4].

Les critères caractérisant une préparation intramammaire en lactation sont souvent contradictoires entre eux. Par exemple, l'efficacité est en partie liée à la concentration en principe actif dans la mamelle, ce qui implique généralement une

dose importante mais *a contrario* peut entraîner un délai d'attente long [8]. Les traitements nécessitent des délais d'attente synonymes de dépréciation financière [7].

Des produits naturels gagnent actuellement l'intérêt dans le domaine médical, et l'émergence des souches bactériennes antibiorésistantes a déconcerté l'utilisation courante des antibiotiques (traitements conventionnels), conduisant à la reconsidération des remèdes antérieurs (traitements alternatifs). Grâce à l'absence de délai d'attente, ces derniers limitent donc la perte économique due à une mammite [9] ; [10].

Plusieurs composés antibactériens naturels ont été testés *in vitro*, dont les produits de la ruche [11]. Le miel a toujours été utilisé comme remède à de nombreux problèmes sanitaires. Quelques usages empiriques ont traversé le temps comme le fait de prendre une cuillère de miel lorsque la gorge se fait douloureuse, mais les autres sont tombés dans l'oubli. Partant de constatations cliniques impressionnantes, des chercheurs de toutes les parties du globe travaillent afin de démontrer scientifiquement les atouts du miel [12].

Il n'y a pas une grande possibilité d'utiliser le miel comme un agent antibactérien systémique à cause de la faible concentration qui pourrait résulter une fois dilué par le volume total du corps fluide : il est probable que le miel soit plus efficace dans le traitement des infections localisées où une forte concentration peut raisonnablement être atteinte. Un seul type d'infection dans laquelle une concentration forte localisée pourrait être atteinte est la mammite [13].

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail est d'évaluer la possibilité d'utiliser l'association du miel et de l'amidon *in vivo* comme traitement antibactérien efficace des mammites cliniques et d'en établir une comparaison entre l'efficacité de ce traitement alternatif et un traitement conventionnel classique.

## CHAPITRE 1

### ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA GLANDE MAMMAIRE DE LA BREBIS

#### 1.1. Anatomie de la glande mammaire des brebis :

Les mamelles (Mammæ) sont des glandes cutanées, sudoripares modifiées, spécialisées dont la fonction est de sécréter le lait. Elles sont constituées d'un tissu épithélial tubulo-alvéolaire d'origine ectodermique et d'un stroma d'origine endodermique. Ce sont des glandes à sécrétion externe ; elles sont positionnées de façon symétrique sur la partie ventrale du corps des mammifères et constituent la plus remarquable caractéristique des mammifères [14] ; [15] ; [16].

Présentes dans les deux sexes chez l'embryon, elles restent rudimentaires, voire disparaissent chez le mâle. Chez la femelle au contraire, leur évolution est étroitement liée à celle de l'appareil génital ; elles acquièrent un développement considérable représentant le caractère sexuel secondaire le plus typique [15] ; [16]. A peine ébauchées pendant la jeunesse, elles se développent rapidement à l'âge de la puberté, prennent tout leur volume à la fin de la gestation et présentent leur maximum d'activité après la naissance des jeunes. Elles se tarissent et reviennent ensuite sur elles-mêmes quand la période d'allaitement est terminée [15].

#### 1.1.1. Conformation :

Indépendamment des variations individuelles, toujours importantes, les mamelles présentent, selon les espèces, d'importantes différences spécifiques de conformation. La mamelle montre la conformation fondamentale : une masse arrondie, hémisphérique, surbaissée ou allongée ; elle est constituée par le parenchyme glandulaire complété par une trame conjonctivo-élastique et du tissu adipeux, le tout maintenu par des enveloppes sous-cutanées et la peau : c'est le corps de la mamelle (*Corpus mammæ*). Sa partie la plus saillante porte un

prolongement cylindroïde : la papille de la mamelle (*Papilla mammæ*). Ce relief, sur lequel s'adapte la bouche du jeune lors de la tétée, contient un ou plusieurs conduits papillaires qui collectent le lait et s'ouvrent à son extrémité libre par autant d'orifices ou d'ostiums papillaires (*Ostia papillaria*). Il y a ainsi toujours des ostiums multiples sur les mamelles de type éversé et un seul ou deux quand la mamelle est de type prolifératif.

Chez les ongulés, dont le corps est plus nettement aplati d'un côté à l'autre, les mamelles droites et gauches s'adosent sur le plan médian et leur limite n'est plus marquée en surface que par une dépression longitudinale et médiane plus ou moins large et profonde : le sillon intermammaire (*Sulcus intermammarius*). Chacune des mamelles conserve évidemment sa propre papille, encore qualifiée de trayon chez les ruminants, chez lesquels, les mamelles, particulièrement volumineuses, forment sous les régions inguinales et pré-pubiennes une masse bilobée qualifiée de pis (*Uber*) [15].

On notera enfin que la conformation de glande mammaire (la taille relative et la longueur) varie en fonction de l'état fonctionnel (l'état physiologique) de la glande. Pendant la lactation, les corps des mamelles sont bien plus volumineux : leur poids peut plus que doubler, voire tripler. Leur peau est tendue, les veines sous-cutanées plus apparentes et la papille de chaque mamelle plus saillante, allongée et comme turgescente. Celle-ci est au contraire plus ou moins flasque et courte dans les périodes de tarissement [15] ; [17].

### 1.1.2. Structure :

Quel que soit leur nombre et leur disposition, les mamelles sont toujours complètement distinctes, c.à.d. anatomiquement indépendantes d'un côté à l'autre. La séparation des glandes est marquée par un septum résultant de l'union des appareils suspenseurs des glandes des deux côtés. La structure de chaque mamelle comporte une enveloppe conjonctivo-élastique constituant l'appareil suspenseur et un parenchyme associant une charpente conjonctive au tissu glandulaire et du tissu adipeux, le tout est entouré par la peau [15].

#### 1.1.2.1. Tégument :

La peau qui revêt les mamelles ressemble plus ou moins à celle du scrotum. Elle est fine, souple et adhérente à l'enveloppe fibro-élastique. Elle est pourvue de poils très fins sur tout le corps où se montre à peu près glabre. Quant à la papille proprement dite, sa peau est particulièrement mince et adhérente. Elle est toujours presque glabre et possède quelques poils très fins et courts à son extrémité distale. Dans beaucoup d'espèces, on trouve à la base de la papille ou à son voisinage des poils plus longs [15].

#### 1.1.2.2. Appareil de suspension :

L'appareil de suspension des mamelles (*Apparatus suspensorius mammarum*) est bien distinct. De chaque côté, il forme un sac conjonctivo-élastique qui enveloppe toute la glande [15].

#### 1.1.2.3. Parenchyme mammaire :

C'est le constituant principal du corps de la mamelle. Lorsque celle-ci est au repos, il a sur les coupes une teinte gris jaunâtre, parfois rosée ou ambrée. Il est nettement cloisonné et divisé en petits grains glandulaires par un conjonctif abondant, souvent infiltré de graisse. Consistant et finement granuleux au toucher dans les périodes de repos, il devient moins ferme dans les périodes de sécrétion. Il est alors dépressible, de teinte claire, jaune pâle ou rosé [15].

#### 1.1.2.4. Voies d'excrétion ou canaux galactophores :

Les voies d'excrétion du lait présentent une arborisation poussée mais ordonnée qui suit celle établie par la ramification du parenchyme. Chaque alvéole mammaire est drainé par un réseau de conduits excréteurs [15] ; [17] :

#### 1.1.2.4.1. Conduit alvéolaire :

L'alvéole mammaire est appendu d'abord à un bref conduit alvéolaire (*Ductus alveolaris lactifer*) [15] ; [17].

#### 1.1.2.4.2. Conduits intra-lobulaires :

Le conduit alvéolaire se continue à son tour par un conduit intra-lobulaire [15] ; [17].

#### 1.1.2.4.3. Conduits inter-lobulaires (conduits supra-lobulaires) :

Les conduits intra-lobulaires convergent en des conduits inter-lobulaires qui drainent les divers lobules [15] ; [17].

#### 1.1.2.4.4. Conduits inter-lobaires :

Les conduits inter-lobulaires convergent sur des conduits inter-lobaires qui s'abouchent à leur tour au niveau des conduits lactifères [15] ; [17].

#### 1.1.2.4.5. Conduits lactifères :

A la sortie de chaque lobe, le collecteur qui reçoit les précédents constitue un conduit lactifère (*Ductus lactifer*), irrégulier et de calibre plus important. Le parenchyme mammaire de la brebis donne issue à 15 ou 20 conduits lactifères principaux dont les plus larges sont latéraux [15].

#### 1.1.2.4.6. Sinus lactifère ou citerne de la glande :

Les conduits lactifères s'élargissent et présentent à la base de la papille une large dilatation anfractueuse : le sinus lactifère (*Sinus lactifer*) – anciennement « sinus galactophore » – qui semble jouer le rôle d'un réservoir d'attente pour le lait. Il n'est pas limité au corps même de la mamelle, mais s'étend en outre dans la plus grande partie du trayon. Il comporte en conséquence une partie glandulaire (*Pars glandularis*) et une partie papillaire (*Pars papillaris*) à la limite desquelles un repli annulaire existe chez les trois quarts des sujets. La partie glandulaire est vaste, très anfractueuse, et occupe toute la partie caudo-latérale de la moitié distale du pis, sinon plus. La partie papillaire, longue de 3 cm environ, ne communique avec l'extérieur que par le conduit papillaire (*Ductus papillaris*) [17].

#### 1.1.2.4.7. Papille :

Les conduits terminaux des voies d'excrétion du lait sont logés dans la papille de la mamelle. La papille est occupée sur presque toute sa longueur par la partie correspondante du sinus lactifère (partie papillaire). Le conduit papillaire prolonge la partie papillaire du sinus lactifère, il fait communiquer la papille avec l'extérieur et se termine par un orifice ou ostium papillaire. Il est unique et très court chez la brebis (6 à 10 mm de long).

La rosette de Fürstenberg peut être notée à la jonction de la citerne papillaire et le canal papillaire, elle est formée de replis muqueux [17].

#### 1.1.3. Particularités spécifiques des mamelles de la brebis :

La mamelle de la brebis est constituée par une seule paire de glandes ; c.à.d. deux glandes indépendantes, une de chaque côté. Lorsque le nombre de paires est réduit, les mamelles se développent en général à une seule extrémité de la crête mammaire. Elles sont ainsi inguinales chez les ruminants. Largement adossées sur le plan médian, ces glandes forment un pis volumineux et pendant. Le sillon inter-mammaire est large, relativement peu profond chez les jeunes, plus

net chez les sujets plus âgés. Un réseau de fibres conjonctives du stroma de la mamelle confère à celle-ci, attachée à des muscles peauciers, une structure sphérique chez les ruminants. Cependant, la forme du corps des mamelles varie beaucoup avec les races et les individus. Elle est globuleuse chez les jeunes, souvent piriforme chez l'adulte. Elle est plus élargie et moins détachées de l'abdomen, où la hauteur moyenne de la glande est de 15 à 16 cm ( $\pm 6$  cm) [15] ; [18]. Les trayons sont simples et volumineux, longs de 4 à 5 cm, traversés par un seul canal de longueur moyenne de 2 à 2,5 cm et s'ouvrant par un seul orifice (ostium papillaire) [14]. Ils sont nettement plus courts en dehors des périodes de lactation. Ils sont dirigés un peu crânialement, plus ou moins nettement divergents et plus fréquemment coniques que chez la vache. Leur implantation est souvent subterminale, c'est-à-dire placée un peu sur le côté de l'organe, au point de leur donner parfois une orientation presque horizontale.

La peau de la mamelle est velue sur tout le corps de l'organe, mais la laine y occupe une répartition très variable avec les races. Elle couvre ainsi tout le pis chez les Mérinos alors qu'elle ne revêt que sa partie caudale dans la race d'Ile de France ; dans d'autres races, le pis est dépourvu de laine, seulement couvert de poils fins et courts [15].

Tandis que le traxon est toujours presque glabre, mais on trouve à son extrémité distale des poils courts et fins implantés par groupes de deux ou trois [15]. Les trayons surnuméraires, fréquents dans l'espèce ovine, sont habituellement petits et ne semblent pas avoir de tissu glandulaire indépendant comme chez les bovins [16]. Il existe un sinus inguinal cutané (*Sinus inguinalis*) de chaque côté de la base du pis. C'est une dépression large, profonde de 3 ou 4 cm et limitée crânialement par un épais repli de la peau. Le tégument qui le revêt est mince et dépourvu de laine [15] ; [16].

L'appareil suspenseur des mamelles est en proportion plus épais et un peu moins élastique chez les ovins que chez les bovins [19] ; [20]. Sa lame médiane est large et solide ; sa partie latérale, bien plus mince, est renforcée par une expansion jaunâtre issue de la tunique abdominale [15].

## 1.2. Physiologie de la glande mammaire des brebis :

### 1.2.1. Lactation :

La lactation est la phase finale du cycle de reproduction des mammifères [21]. Le lait est synthétisé par l'acinus mammaire à partir d'éléments simples provenant du sang, il s'adapte quantitativement et qualitativement aux besoins des petits. Il est essentiel à la survie pendant une période qui dépend de la maturité à la naissance. En moyenne, la glande mammaire produit 50 à 120 ml/jour, ce qui représente environ l'équivalent de son poids en protéines, en lipides et en sucres chaque jour [14].

En général, tous les lactocytes d'un même alvéole fonctionnent à peu près en même temps et les alvéoles d'un même lobule présentent une activité sensiblement similaire. Il n'en est pas de même pour les divers lobules d'un même lobe ; certains se montrent au repos alors que leurs voisins sont en pleine phase sécrétoire et cette alternance constitue en quelque sorte une régulation de l'activité mammaire [15].

### 1.2.2. Mécanisme hormonal :

L'antéhypophyse produit, juste avant l'agnelage, de la PRL (Prolactine) qui excite l'activité des cellules sécrétoires préalablement sensibilisées par les E (Œstrogènes) ; ensuite la sécrétion est entretenue par la tétée ou la traite [15] ; [22]. Dans le schéma général, la succion ou la traite agit, par stimulation réflexe des extérocepteurs (récepteurs sensoriels) du mamelon, par un double mécanisme : d'une part, vidange de la mamelle provoquant une décharge d'hormones de l'hypophyse antérieure (réflexe endocrinien de la lactation), principalement la PRL ; d'autre part, excitations transmises suivant la voie nerveuse jusqu'à l'hypothalamus déclenchant la sécrétion de l'Ocytocine par la posthypophyse ou neurohypophyse (réflexe neuroendocrinien d'éjection du lait). Cette hormone stimule en outre la contraction des myo-épithéliocytes et par conséquent, « le lâchez-tout » (« let-down ») de l'éjection du lait au cours de la tétée ; cette contraction vide l'alvéole et entraîne une reprise de l'activité

sécrétoire. En effet, la glande mammaire est dotée d'un mécanisme rétroactif contrôlant et limitant sa propre synthèse de lait [14] ; [15] ; [21] ; [22].

## CHAPITRE 2

### ETUDE DES MAMMITES OVINES

#### 2.1. Définition des mammites :

La mammite peut se définir par l'état inflammatoire d'un ou de plusieurs quartiers de la mamelle, qu'elle qu'en soit d'origine traumatique, physique ou biologique, le degré de gravité clinique ou subclinique, l'évolution chronique, aiguë ou suraiguë ou la terminaison c.à.d. la guérison apparente ou réelle ou la mort de l'animal ; et qui entraîne une diminution ou une perte de la fonction ou de la production laitière. 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. L'origine la plus fréquente de mammites est la pénétration d'une bactérie dans un ou plusieurs quartiers par le canal du trayon [5] ; [6] ; [23].

#### 2.2. Etiologie :

Les germes les plus fréquemment en cause sont : *Staphylococcus aureus* à coagulase positive, pasteurelles, *Clostridium septicum*, *Escherichia coli*, SCN (Staphylocoques à Coagulase Négative) principalement *S. epidermidis*, *Salmonella spp.*, *Streptococcus spp.* (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*...), *Actinomyces* (*Corynebacterium*) *pyogenes*, *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Listeria monocytogenes*, *Leptospira* (*L. hardjo*) et *Mycoplasma*.

D'autres agents infectieux ont été incriminés dans les mammites ovines. Le plus souvent, il s'agit de bactéries (*Bacillus spp*, *Proteus spp*, *Histophilus ovis*, *Actinobacillus seminis*, *Pseudomonas aeruginosa*...), mais on connaît également des mammites dues au virus de la Maedi (mammite interstitielle chronique indurative) et à *Aspergillus fumigatus* [24].

### 2.3. Etude clinique :

Il existe trois grands types de formes cliniques chez les ovins (suraiguë ou aiguë, subaiguë et chronique) et, par ailleurs, des formes subcliniques.

Trois types de symptômes se présentent classiquement :

- \* Symptômes généraux : modifications de l'état général : température plus ou moins élevée, avec ou sans appétit, arrêt de rumination et, quelquefois, décubitus et un état de choc ;
- \* Symptômes locaux (mammaires) : signes classiques d'une inflammation aiguë au niveau de la mamelle : tuméfaction (gonflement), chaleur, douleur et rougeur ;
- \* Symptômes fonctionnels : se traduisant par des modifications notables au niveau de la quantité et de la qualité (aspect) du lait principalement (présence de grumeaux, pus, sang ou caillots sanguins), et/ou des changements des concentrations en germes et en cellules.

Les symptômes généraux, locaux et fonctionnels sont du même type que chez la vache. Cependant, chez les ovins, les symptômes locaux peuvent faire l'objet d'un examen clinique standardisé beaucoup plus facile que chez la vache, compte tenu du moindre volume de la mamelle et de la facilité de palpation. Ainsi, les symptômes aigus bien sûr, mais surtout les symptômes chroniques doivent être régulièrement recherchés, car ils pourront guider certaines actions d'élimination. Ces symptômes sont les suivants : déséquilibre de la mamelle (asymétrie), à observer avant la traite, indurations nodulaires ou focales, hypertrophie des nœuds lymphatiques rétro-mammaires, ces 2 derniers symptômes devant être recherchés après la traite.

Il est exceptionnel d'observer des symptômes mammaires pathognomoniques ; certains sont au plus évocateurs (mammites gangreneuses par exemple).

La mammite clinique entraîne systématiquement de signes fonctionnels, avec présence ou non de signes locaux sur la mamelle et de signes généraux [6] ; [8] ; [23] ; [24].

#### 2.4. Mammites cliniques aiguës :

La mammite clinique aiguë est une inflammation brutale mais sans impact sur l'état général de l'animal. Les symptômes sont plutôt localisés au niveau de la mamelle ou du quartier atteint avec rougeur, douleur, chaleur et gonflement. La quantité et la qualité du lait sont modifiées et l'évolution de cette mammite est moins rapide que la mammite suraiguë (quelques semaines environ) mais peut tout de même conduire, dans certains cas, à la mort de l'animal et peut survenir à tous les stades de lactation.

Il en existe une forme particulière dite mammite d'été où la sécrétion lactée a un aspect crémeux, de couleur bleu verdâtre et d'odeur nauséabonde et d'où l'inflammation est intense et l'état général gravement atteint [23].

Les cas de mammite aiguë seront surtout rencontrés avec la mammite gangreneuse [24] qui est difficilement différenciable quant aux symptômes généraux et à son évolution [6].

##### 2.4.1. Agent causal de la mammite gangreneuse :

La mammite gangreneuse peut être due à une souche gangreneuse de *Staphylococcus aureus*.

C'est une bactérie qui a une très grande tendance à l'internalisation le plus profondément dans les tissus mammaires grâce à son système enzymatique performant et très développé. En effet, c'est la bactérie la plus apte à coloniser l'ensemble de celui-ci dont son aptitude à le coloniser est particulièrement développée. On peut alors la trouver dans les différents compartiments de la mamelle. On peut la détecter non seulement dans le lait mais aussi dans les cellules, qu'il s'agisse de cellules épithéliales ou de globules blancs, ainsi que dans des micro-abcès. En effet, cette bactérie a la particularité de s'enkyster dans le tissu mammaire et se mettre à l'abri dans des micro-abcès et aussi dans les cellules, et de ne plus être excrétée dans le lait : cette situation lui permet d'échapper facilement à tous les moyens de défense, qu'ils soient naturels ou thérapeutiques ; et sa recherche dans le lait peut alors se révéler faussement

négative. Cette colonisation est très rapide et, dès le 3<sup>ème</sup> jour suivant son entrée dans un quartier, *Staphylococcus aureus* aura franchi les barrières épithéliales mammaires.

*Staphylococcus aureus* survit et persiste bien dans le cytoplasme de la cellule phagocytaire. En effet, il peut y résister à la lyse et y diviser, provoquant la mort de celle-ci : c'est alors le point de départ d'une infection.

La pérennité de ce germe dans le troupeau est aussi assurée par les nombreuses plaies que l'on peut retrouver sur le trayon et sur la mamelle. Les crevasses comme les gerçures sont les principales sources de *Staphylococcus aureus*. Celles-ci devront être l'objet de soins importants lors du post-trempeage présentant des propriétés cosmétiques. D'autres lésions plus rares, mais non exceptionnelles, pouvant potentiellement héberger *Staphylococcus aureus*.

Une à deux souches sont responsables de 80 % des infections à *Staphylococcus aureus* dans un troupeau. C'est une bactérie oligoclonale ou monoclonale nette (les caractéristiques mises en évidence sur quelques isollements bactériens de *Staphylococcus aureus* peuvent être extrapolées au reste du troupeau car 80 % des mammites provoquées par ce germe sont associées à 1 ou 2 souches seulement). Une souche monoclonale provient d'une mamelle infectée. Elle peut se transmettre d'un trayon à l'autre ou d'une mamelle à une autre mamelle. C'est toujours la même souche qui se transmet. Il s'agit d'un modèle « contagieux », les animaux se contaminant à partir d'animaux infectés pendant les opérations de traite ou à partir d'un trayon infecté.

La contamination d'un quartier par *Staphylococcus aureus* passe souvent inaperçue. Cette bactérie est souvent impliquée dans les mammites subcliniques, et est très difficile à éliminer, que ce soit après un traitement en lactation ou après un traitement au tarissement [6].

#### 2.4.2. Symptômes de la mammite gangreneuse :

Elle s'accompagne d'une hyperthermie (41 - 42 °C) avec, au début, un œdème mammaire et abdominal. Le quartier atteint est d'abord chaud,

douloureux, de volume important d'où une position avec les membres postérieurs écartés de la brebis (et une boiterie) ; 2 à 3 jours plus tard, une sensation de froid est perceptible à la surface du quartier atteint. Sa couleur vire au violet avec, au centre, la sensation de crépitements caractéristiques de la gangrène. La mamelle ressemble à une figue mûre [6] ; [24].

Le lait ressemble à de l'eau mélangée à du sang, la modification de couleur peut évoluer rapidement et elle n'a pas de valeur pronostique. Un exsudat séro-hémorragique pourra être reliée à la présence d'une souche gangreneuse de *Staphylococcus aureus* [6].

#### 2.4.3. Evolution de la mammite gangreneuse :

En l'absence d'intervention, l'évolution s'effectue vers la mort en 2 à 3 jours (le taux de mortalité est important si un traitement précoce n'est pas instauré et peut atteindre 80 % des cas non traités) ou, lors d'évolution favorable, vers une guérison qui se traduit par l'apparition, sur la mamelle, d'un sillon, appelé sillon disjoncteur, entre la zone gangrenée et la zone saine (formation du liséré). Toute la partie gangrenée se nécrose (zone de nécrose limitée), elle commence à se séparer de la partie encore saine, se détache et tombe progressivement en laissant une plaie suintante et sanieuse guérissant lentement ou évoluant vers une mammite chronique. Sinon son ablation sera envisageable dans les jours qui suivent. La gangrène est donc humide en raison de l'aspect suintant de la peau du quartier. La nécrose set parfois étendue, l'animal tombe en décubitus et sera condamné. On peut observer également une atteinte de la toison [6] ; [24].

#### 2.4.4. Pronostic de la mammite gangreneuse :

Ces mammites sont rares mais souvent mortelles, surtout si elles sont proches de la mise-bas. Lorsqu'elles surviennent suite à la mise bas, un choc toxinique associé à une prostration est fréquent. Lors de ces cas graves, la guérison est liée à une fluidothérapie précoce, massive et systématique ; le

résultat reste cependant aléatoire. L'animal peut survivre mais la lactation est perdue et il devra être réformé [6].

## 2.5. Epidémiologie analytique :

### 2.5.1. Réservoirs de germes :

Les réservoirs primaires, sources majeures et pérennes, sont principalement constitués par les mamelles infectées et les lésions infectées des trayons, pour les staphylocoques (ainsi que *Streptococcus agalactiae* et *dysgalactiae*). Cependant, les staphylocoques sont également présents sur la peau et les muqueuses non lésées et persistent dans les canalisations et lactoducs de la machine à traire, même correctement nettoyée et désinfectée [25] ; [26].

Les autres germes sont présents dans l'environnement, principalement la litière, les fourrages moisissus ou l'air (entérobactéries, entérocoques, *A. fumigatus*), et l'eau (*P. aeruginosa*).

Enfin, *S. uberis* et *Actinomyces pyogenes* sont des bactéries à réservoirs mixtes, mamelles infectées, litière, bâtiments.

Les réservoirs secondaires sont les sites occupés de façon transitoire par les germes ; il s'agit surtout du matériel de traite (manchons trayeurs usagés), voire des mains du trayeur (traite manuelle), en particulier pour les staphylocoques.

Les facteurs associés aux sources mammaires, prépondérantes compte tenu du rôle majeur des staphylocoques, constituent l'ensemble des pratiques d'élevage impliquées dans l'introduction ou la persistance des micro-organismes dans ou sur la mamelle.

Les principaux facteurs de persistance des germes dans les mamelles infectées sont liés, d'une part, à une insuffisance de la détection précoce des mammites et, d'autre part, à des défauts d'élimination (traitement, réforme).

Les principales lésions des trayons sont de nature infectieuse chez les ovins : staphylococcie cutanée, ecthyma ou papillomatose. Les lésions dues aux conditions de traite (éversions aiguës, grimpage) ou d'habitat (blessures, gerçures...) sont moins fréquentes que chez les bovins. Par ailleurs, la persistance des bactéries dans les lésions des trayons est favorisée par l'absence d'antiseptie en fin de traite.

Les facteurs associés aux sources extra-mammaires (environnement), moins importantes chez les brebis, sont, pour mémoire, principalement liés à la conception et à l'entretien du logement [8].

### 2.5.2. Modalités de transmission :

#### 2.5.2.1. Mécanismes de dissémination :

Le principal facteur de dissémination des germes est constitué par la traite. Les germes sont principalement véhiculés par les manchons trayeurs ou les mains du trayeur, phénomène aggravé en l'absence de désinfection et de renouvellement adéquats [8]. Les agneaux souffrant de lésions buccales surinfectées (ecthyma contagieux), ou passant d'une brebis porteuse de germes à une autre saine, favorisent la contamination des brebis au sein du troupeau [24].

#### 2.5.2.2. Modes de pénétration :

A l'exception des infections générales à tropisme mammaire (lentiviroses, mycoplasmoses), la pénétration du germe a lieu principalement par le canal du trayon ou à partir d'une lésion cutanée [8] ; [24]. Cependant, l'importance relative de la multiplication active (progression ascendante des bactéries) et du phénomène d'impact n'est pas connue chez les brebis. En fin de traite, la pratique de l'égouttage, largement répandue, et la technique de dépose des faisceaux trayeurs (le plus souvent sans coupure préalable du vide) provoquent de nombreuses entrées d'air à l'origine du phénomène d'impact.

Gardons cependant en mémoire que la prévalence et l'étiologie (staphylocoques) des mammites des brebis traitées manuellement ou qui allaitent ne diffère pas significativement de celles traitées à la machine.

Finalement, le principal modèle de mammite chez les brebis est représenté par les mammites « de réservoirs » ou mammites « de traite » [8].

## 2.6. Diagnostic :

### 2.6.1. Diagnostic individuel :

#### 2.6.1.1. Détection des symptômes (diagnostic clinique) :

Le diagnostic clinique repose sur la mise en évidence des symptômes généraux, locaux (inspection et palpation de la mamelle) ou fonctionnels. Ceux-ci peuvent facilement être mis en évidence en examinant les premiers jets de lait dans un bol à fond noir en début de traite.

L'examen clinique des mamelles devrait être réalisé au moins en début et en fin de campagne, car l'un des principaux problèmes du contrôle des mammites réside dans un défaut d'élimination des infections.

Rappelons que la mise en évidence des différents types de symptômes ne permet d'établir qu'un diagnostic d'affection de l'organe et non, dans le cas le plus général, la nature précise du germe en cause [8].

#### 2.6.1.2. Détection de l'inflammation :

Les CCS (Comptage des Cellules Somatiques) du lait constituent, chez les brebis, un bon outil de dépistage des infections subcliniques, c'est un marqueur de l'état inflammatoire de la mamelle [8] ; [27].

L'évaluation de la fiabilité des CCS pour la détection de l'inflammation mammaire, c'est-à-dire pour le dépistage de l'infection, nécessite de tenir compte des facteurs non infectieux de variation : par ordre d'importance décroissante, le

stade de lactation, le numéro de lactation et divers facteurs d'élevage. Toutefois, l'influence de ces facteurs reste mineure par rapport au rôle des infections mammaires [27].

Concernant les seuils de dépistage pour l'utilisation pratique des CCS, deux types d'études ont été publiés : la majorité des auteurs propose un seuil ponctuel permettant la meilleure discrimination instantanée entre les mamelles ou demi-mamelles saines et infectées. La seconde stratégie consiste à définir et proposer une règle de décision plus complexe, telle qu'elle est utilisée chez la vache laitière, distinguant 3 classes d'animaux (« sains », « douteux » et « infectés ») au vu de plusieurs valeurs de CCS réalisés mensuellement sur l'ensemble de la lactation. Cette seconde méthode semble plus pertinente, compte-tenu de la très forte prévalence des SCN, dont le pouvoir pathogène est variable et de l'existence de facteurs non infectieux de variation. Il faut donc s'interdire toute conclusion hâtive fondée sur un seul (ou deux) résultat (s) de CCS [8].

#### 2.6.1.3. Détection de l'inflammation (CMT) :

Le CMT (California Mastitis Test) permet une évaluation semi-quantitative du contenu cellulaire d'un lait, par observation de l'intensité de la floculation de l'échantillon de lait après ajout d'un détergent ; il est réalisable par le producteur [28] ; [29] ; [30] ; [31] ; [32] ; [33].

#### 2.6.1.4. Détection de l'infection (bactériologie du lait) :

Compte-tenu du coût élevé des analyses, parfois équivalent au prix d'un animal de réforme, le recours à la bactériologie lors de mammites sporadiques est exceptionnel. En revanche, lors d'épizootie de mammites, une recherche étiologique au laboratoire est indiquée, car les causes potentielles sont multiples (bactéries « classiques », mycoplasmes, champignons, levures, virus) et les symptômes exceptionnellement pathognomoniques. De plus, dans ces cas, la thérapeutique et la prophylaxie dépendent étroitement de l'agent responsable [28] ; [29] ; [30] ; [31] ; [32] ; [33].

### 2.6.2. Diagnostic collectif :

Il n'existe pas encore, chez les brebis, de méthodologie de diagnostic fondée sur l'analyse des CCS de tank et du taux de cas cliniques. Une telle approche est pourtant la solution d'avenir, dans la mesure où les grands effectifs, les cadences de traite et la valeur économique des animaux rendent difficile en routine le développement de techniques de dépistage individuel. L'attention des producteurs doit être attirée sur la nécessité d'enregistrer, en temps réel, les cas cliniques ainsi que les principaux événements ou modifications de conduite d'élevage ayant un lien éventuel avec les CCS (mise à l'herbe, modifications de la machine à traire, vaccinations, traitements, chaleurs...) [8].

### 2.7. Traitement des mammites :

La bibliographie compte plus de recommandations générales et d'observations cliniques (sans lots témoins) que d'essais contrôlés (études cas-témoin). De plus, il n'existe pas, actuellement, de préparations commerciales de traitement intramammaire possédant une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) chez les brebis ; les éleveurs ne peuvent donc utiliser que les produits destinés à la vache, dont les délais d'attente n'ont pas été définis pour les petits ruminants.

Rappelons la nécessité de respecter une hygiène très stricte lors de la mise en œuvre des traitements intramammaires : traite complète de la demi-mamelle, désinfection soignée de l'extrémité du trayon, injection atraumatique du contenu d'une seringue par demi-mamelle, antiseptie finale du trayon par trempage ou pulvérisation.

La rentabilité économique du traitement des mammites chez la brebis doit être prise en compte. En effet, les frais à engager sont élevés par rapport à la valeur de l'animal et les chances de guérison ne sont pas garanties. Les enjeux et les modalités du traitement sont différents si l'on est face à une mammite clinique ou à une mammite subclinique [34].

### 2.7.1. Traitement des mammites cliniques en lactation :

En pratique, l'objectif est, pour les mammites aiguës ou suraiguës, d'éviter la mort et de permettre la réforme dans de bonnes conditions ; dans les cas de mammites subaiguës, on peut parfois obtenir une récupération fonctionnelle mais, le plus souvent, la réforme doit être envisagée en fin de lactation [8].

#### 2.7.1.1. Considérations générales :

Deux éléments doivent être pris en compte dans le choix du traitement d'une mammite clinique :

1. Les symptômes présentés par l'animal : les signes cliniques présentés peuvent orienter sur une étiologie éventuelle, surtout si les symptômes constatés sont graves. De toute façon, il faudra en tenir compte pour choisir de la voie d'administration des antibiotiques. Lors de simple modification de la qualité du lait, un traitement local suffira généralement. Lors de l'inflammation du quartier, le plus souvent traduite par son gonflement ou son induration, vont apparaître des obstacles à la diffusion du produit administré par voie intramammaire. En effet, la congestion du quartier va représenter une gêne à la dispersion du produit des canaux à lait dont la lumière est souvent totalement obstruée par des résidus inflammatoires (caillots de fibrine). La priorité sera alors donnée à des molécules qui peuvent traverser les endothéliums vasculaires. En revanche, l'inflammation du tissu mammaire par les phénomènes vasculaires associés va favoriser la pénétration des antibiotiques administrés par voie injectable. Lors de mammite avec atteinte du quartier, on peut utiliser soit un produit intramammaire à bonne capacité de diffusion, soit un antibiotique par voie injectable, soit encore une combinaison des deux. Enfin, dans la moitié des cas de mammites graves environ, l'agent infectieux est présent dans le sang, ce qui rend incontournable le traitement par voie injectable. Le plus important est l'intervention précoce dès l'apparition d'une hyperthermie.

2. Le degré d'ancienneté de l'infection mammaire : lors de mammite clinique, il est important de se demander si l'animal a déjà montré des signes d'infection. Les conséquences sur le traitement mis en œuvre seront alors fondamentales [6].

#### 2.7.1.2. Applications au choix des traitements :

1. Précocité du traitement : c'est un impératif absolu car la colonisation totale de la mamelle est un phénomène très rapide lors de contamination d'un quartier. La précocité du traitement est donc fondamentale à sa réussite.

2. Choix de la voie d'administration : il existe deux voies majeures d'administration du traitement antibiotique : la voie locale et la voie générale.

Ce sont les symptômes observés sur l'animal qui orientent la voie d'administration prioritaire. En règle générale, la voie locale suffit lors d'une simple modification du lait, et la voie injectable est prioritaire lors de répercussions de la mammite sur l'état général de l'animal. Lors de gonflement du quartier, on peut :

Opter pour la voie intramammaire seule, pourvu que la spécialité choisie ait de bonnes capacités de diffusion ;

Opter pour la voie injectable seule, pourvu que l'antibiotique utilisé diffuse bien du sang dans le lait ;

Choisir une combinaison des deux voies [8].

#### 2.7.1.3. Traitements intramammaires :

##### A. Traitement antibiotique ciblé :

Notons tout d'abord que les préparations antibiotiques faisant l'objet d'une AMM pour les petits ruminants sont très rares. On utilise donc des produits pour bovins [34].

Il existe 2 grandes familles de bactéries responsables d'infections mammaires, que l'on peut différencier au laboratoire par une coloration particulière dite coloration de Gram. Cette distinction sera importante à considérer quant aux choix des traitements utilisables contre ces 2 grandes familles d'agents infectieux, les antibiotiques n'étant pour la plupart réellement actifs que contre une seule de ces familles. La confirmation de germes pathogènes chez la brebis est intéressante dans le traitement des mammites [6].

En l'absence d'essai contrôlé, il n'est pas possible de montrer l'effet de ces antibiotiques en termes de guérison clinique ou bactériologique chez la brebis ; seules des observations cliniques témoignent de leur efficacité présumée et font état de « récupération », sans que les critères d'appréciation soient toujours clairement définis [8] ; [34].

#### B. Traitement anti-inflammatoire :

L'intérêt des AIS (Anti-Inflammatoires Stéroïdiens) présents dans certains injecteurs intramammaires est discuté du fait de la résorption très rapide de ces molécules du tissu mammaire dans le sang [6].

#### 2.7.1.4. Traitements par voie générale :

##### A. Traitement antibiotique :

Plusieurs études de pharmacocinétique ont été conduites permettant de proposer des protocoles thérapeutiques dont l'efficacité reste à confirmer [35]. L'administration de fortes doses de Pénicilline ou de Spiramycine [36] reste parmi les traitements les plus classiquement réalisés en pratique [34].

Les traitements antibiotiques peuvent être complétés par des traites répétées et l'administration d'anti-inflammatoires et d'Ocytocine lors de mammites cliniques plus classiques et même la réalisation de perfusions dans les cas les

plus graves [6] ; [37] ; [38]. L'intérêt économique de ces traitements devra être pris en compte [8].

### B. Anti-inflammatoires :

Ils appartiennent à 2 grandes familles : les AIS et les AINS (Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens). Les premiers sont des dérivés de la Cortisone. Leur pouvoir inflammatoire est très puissant mais ils ont des effets secondaires non négligeables, en particulier un effet négatif sur les défenses naturelles de l'organisme, un pouvoir abortif sur les femelles gestantes dans leur dernier tiers de gestation et une baisse passagère de la production lactée. Les AINS ont beaucoup moins d'effets secondaires, mis à part un pouvoir ulcérogène. Les mammites cliniques s'accompagnent assez souvent d'une inflammation forte des tissus mammaires. L'effet de ces substances se manifeste par une résolution plus rapide des signes cliniques, donc une amélioration du bien-être de la patiente (et, parfois aussi, du trayeur), ainsi que par une reprise plus rapide d'une production normalisée. Il a également été établi que l'un au moins de ces AINS (le Méloxicam) permettait une chute plus rapide et un retour accéléré des numérations cellulaires à des niveaux bas après mammitte clinique. On préférera l'usage des AINS aux AIS en raison des effets néfastes sur l'immunité de ces derniers [6].

### C. Ocytocine :

L'injection de quelques unités d'Ocytocine permet de favoriser la vidange lactée dans les minutes qui suivent son administration. L'élimination du lait avec les bactéries et, parfois, les toxines associées, est un élément indispensable dans la lutte contre les infections mammaires. Répéter les traites lors de mammitte clinique et favoriser la vidange lactée représentent des aides significatives dans la thérapie de certaines mammites, en particulier des mammites toxigènes [6].

### 2.7.2. Traitement des mammites subcliniques en lactation :

Il existe actuellement deux produits commerciaux qui ont obtenu récemment une indication concernant les mammites subcliniques en lactation chez la vache, et pour lesquels on dispose donc de données convaincantes sur leur efficacité.

D'autres produits peuvent être utilisés, voire d'autres schémas thérapeutiques selon les circonstances mais ils nécessitent d'être établis par un spécialiste disposant d'un nombre suffisant d'éléments, en particulier pour l'établissement des délais d'attente. Sans une démarche raisonnée incluant l'animal, l'historique et la cause de l'infection, un traitement d'un animal à mammite subclinique en lactation et en aveugle est quasi irrémédiablement voué à l'échec.

L'allongement de la durée d'un traitement est intéressant pour les mammites à *Staphylococcus aureus* et à *Streptococcus uberis*. Cependant, on ne peut pas décider de prolonger un traitement sans connaître les délais d'attente alors applicables. C'est pour cela que, dans la mesure du possible, il vaut mieux utiliser les protocoles développés pour ces indications [6].

### 2.7.3. Traitement des mammites subcliniques au tarissement :

Les traitements par antibiotiques au tarissement ont pour objectif la guérison bactériologique et la prévention des nouvelles infections [8].

A propos de l'efficacité du traitement intramammaire au tarissement, les pourcentages de guérison bactériologique (tous germes confondus) varient, selon les études, de 65 à 95,8 % [32] ; [39] ; [40] ; [41].

Ces résultats confirment l'intérêt des traitements au tarissement pour l'élimination des infections mammaires subcliniques chez les brebis, si on les compare aux taux d'élimination spontanée. De plus, une différence de production de 12,6 litres de lait (pour une durée de lactation standardisée de 120 jours) entre brebis traitées et brebis témoins a été rapportée [32].

Les traitements par voie intramusculaire au tarissement pourraient constituer une alternative intéressante aux traitements locaux, pour des raisons de faisabilité sur de grands effectifs et de réduction des risques de fautes d'hygiène. On ne dispose pas actuellement de résultats d'essais contrôlés [8].

#### 2.7.4. Traitement alternatif des mammites (apithérapie) :

A l'heure où la médecine moderne se trouve confrontée à divers problèmes (résistances aux antibiotiques, augmentation des dépenses de santé...), les thérapeutiques dites naturelles suscitent un regain d'intérêt.

Le miel, au vu de ses multiples propriétés, mériterait plus d'attention de la part du corps médical [12]. Il vient au secours de la médecine. Ce tueur de microbes représente une des rares alternatives à la résistance aux antibiotiques des superbactéries.

Utilisé depuis au moins 8000 ans avant J.-C., le miel est en train de conquérir ses lettres de noblesse en médecine pour ses propriétés antiseptiques et antibactériennes. Si depuis ces vingt dernières années, les recherches se multiplient, les premières observations de ses propriétés sont bien antérieures.

Dès 1955, en Grande Bretagne, le professeur BULMAN avait noté l'absence d'infection lors de l'emploi de pansements imprégnés de miel appliqués sur des plaies ouvertes non cicatrisées. Dans les années 1970, CAVANAGH utilise le miel pour cicatriser des plaies constatant qu'elles deviennent stériles en quelques jours et guérissent promptement [42].

Son coût peu élevé en fait une thérapeutique idéale tant dans les pays en voie de développement où les médicaments manquent cruellement que dans les pays développés où les économies de santé sont devenues le maître mot [12].

« Il apparaît maintenant certain que l'antique tradition ne mentait pas, le miel ne constitue pas seulement un aliment excellent, mais aussi il a une valeur thérapeutique certaine, bien que difficilement explicable dans certains cas »,

rapporte REMY CHAUVIN, chercheur de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) [42]. Il est temps de redécouvrir les vertus du miel [12].

#### 2.7.4.1. Propriétés thérapeutiques du miel :

Le miel a toujours été utilisé comme remède à de nombreux maux. Quelques usages empiriques ont traversé le temps comme le fait de prendre une cuillère de miel lorsque la gorge se fait douloureuse, mais les autres sont tombés dans l'oubli. Partant de constatations cliniques impressionnantes, des chercheurs de toutes les parties du globe travaillent afin de démontrer scientifiquement les atouts du miel [12].

#### A. Propriétés antibactériennes du miel :

##### a. Observations cliniques :

L'application de miel sur des plaies infectées aboutit à leur aseptie. A partir de ce constat de nombreux essais cliniques ont été conduits à travers le monde [12].

Au département de Chirurgie du CHU (Centre Hospitalier Universitaire) de Bujumbura au Burundi, quarante patients avec des plaies diverses et infectieuses ont été traitées avec du miel. Les prélèvements bactériologiques effectués avant le traitement ont montré la prédominance des *Staphylococcus aureus*, suivis d'*Escherichia coli* et des *Pseudomonas spp.* ; ont aussi été isolés des plaies : des *Klebsiella*, des *Enterobacter cloacae*, des *Proteus*, des *Acinetobacter*, des *Citrobacter* et des Staphylocoques autres que *S. aureus*.

Au fur et à mesure du traitement, le nombre de prélèvements bactériologiquement positifs a diminué. Au stade cicatrisation des plaies, seules quelques plaies présentaient encore des germes [43].

Le miel a aussi été testé sur des souches bactériennes présentant des résistances aux antibiotiques. COOPER *et al.* ont réalisé une étude qui démontre

l'efficacité *in vitro* du miel de manuka et du miel pasteurisé sur une souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la Méthicilline, ainsi que sur des souches d'entérocoques résistant à la Vancomycine [44].

Le miel est capable d'inhiber la croissance d'*Helicobacter pylori* qui provoque des gastrites, des ulcères gastriques et des ulcères duodénaux [45] ; [46].

Dans un contexte où de plus en plus de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques émergent, ces résultats sont encourageants ; le miel pourrait être une alternative intéressante dans la thérapeutique anti-infectieuse [12].

#### b. Données scientifiques :

Pour assister à une véritable renaissance de l'utilisation du miel à des fins thérapeutiques, encore faut-il comprendre son mécanisme d'action. Des recherches, effectuées ces trente dernières années, commencent à apporter de vrais éléments de réponse dans la compréhension des procédés complexes impliqués qui suscitent l'intérêt des universitaires [47]. Les chercheurs ont montré que c'est l'action combinée de propriétés physiques et chimiques qui confère au miel son activité antibactérienne [12] :

#### Effet osmotique :

Le miel est une solution de sucres hypersaturée puisque composée à 80 % environ de fructose et de glucose. Les sucres auraient une activité antibactérienne par leur pouvoir d'abaissement de l'activité de l'eau [48]. L'activité de l'eau (appelée aussi activité hydrique) exprime le degré de disponibilité de l'eau dans un milieu ou un produit donné. Entre les sucres du miel et les molécules d'eau, se produit une forte interaction. Par conséquent, il y a très peu d'eau disponible pour le développement de microorganismes. Cette eau libre est mesurable, son unité est « aw » (Water Activity). Dans le miel, l'eau libre est comprise entre 0,562 et

0,62. Seules quelques levures réussissent à se développer dans ces conditions [12].

Donc, du fait de son osmolarité (capacité à extraire l'eau des cellules vivantes), conséquente à sa forte teneur en sucre, le miel crée un appauvrissement de l'eau disponible pour les germes et bactéries mettant en péril leur survie. Son osmolarité entre à nouveau en jeu pour favoriser l'exsudation en générant un flux de liquides sanguin et lymphatique vers l'extérieur entraînant avec lui bactéries et débris cellulaires, assurant ainsi la défense contre l'infection et l'élimination de la nécrose [49].

Mais les propriétés antibactériennes du miel ne sont pas dues uniquement à cette haute teneur en sucres. En effet, des études scientifiques comparant les effets antibactériens du miel et du sucre ont été menées ; il en résulte que le miel a un pouvoir antibactérien supérieur à celui du sucre. Il y a donc dans le miel des composés autres que les sucres qui empêchent les microorganismes de se développer [50] ; [51].

#### Acidité :

Le pH (Potentiel d'Hydrogène) du miel est suffisamment acide (entre 3 et 6) pour inhiber le développement de nombreux microorganismes pathogènes. Le pH du miel non dilué est un facteur antibactérien significatif ; cependant, si on le dilue, le pH peut ne plus être assez bas pour limiter la prolifération des bactéries. Les fluides corporels peuvent être responsables de la dilution du miel ; c'est une donnée dont il faut tenir compte lorsque l'on est dans une démarche de soins [12].

#### Peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) :

Pour une autre partie, les propriétés antibactériennes du miel lui sont directement conférées par le monde animal et rendues possibles par le merveilleux travail de l'insecte [42]. La principale activité antibactérienne du miel est liée à la production enzymatique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui sert d'agent « stérilisant » [12].

C'est en 1962 que WHITE a mis en évidence que le glucose présent dans le miel se transforme, sous l'effet d'une enzyme, appelée glucose-oxydase, en acide gluconique libérant du  $H_2O_2$  qui n'est autre que de l'eau oxygénée. Avant son identification par WHITE en 1962, le  $H_2O_2$  était appelé inhibine [52].

C'est l'insecte qui octroie au miel sa teneur en glucose-oxydase. En effet, cette enzyme appartient à l'abeille, elle se construit dans son jabot lors de la fabrication du miel. Elle est sécrétée par les glandes hypopharyngiennes. Au moment de la récolte du nectar ou du miellat, ainsi que pendant les trophallaxies successives, cette enzyme est introduite dans le mélange sucré qui va devenir le miel [12]. Rappelons que le miel est fabriqué à partir du nectar des plantes ou des substances vivantes qui se trouvent sur elles, comme c'est le cas du miellat. Le miellat est issu des sécrétions de petits insectes piqueurs (homoptères) qui se nourrissent de la sève d'arbustes. Leurs excréments liquides sont de véritables gouttelettes sucrées riches en acides aminés que les abeilles vont également butiner. En arrivant à la ruche, le jabot rempli de nectar et de miellat, les abeilles le régurgitent sur la langue d'une de leurs sœurs. La circulation de nectars d'abeille en abeille répond au principe de la trophallaxie qui caractérise tous les insectes sociaux. Il s'agit d'un « bouche-à-bouche » au cours duquel l'un des insectes échange non seulement sa nourriture mais aussi des informations. Le nectar va ainsi circuler de jabot en jabot jusqu'à devenir miel. L'abeille va venir stocker le miel dans les alvéoles de la ruche qu'elle va operculer avec un peu de cire. C'est à ce stade que l'enzyme (glucose-oxydase) est transférée dans le miel [42].

De nombreuses études ont mis en évidence le fait que la glucose-oxydase n'est opérationnelle que lorsque le miel est dilué. En effet, son pH optimal est beaucoup plus basique que celui mesuré dans le miel non dilué.

La glucose-oxydase est une enzyme thermolabile et photosensible : les miels qui ont été stockés dans de mauvaises conditions perdent donc la capacité de produire du  $H_2O_2$  et ont une activité antibactérienne moindre.

Le  $H_2O_2$  est détruit par les catalases et notamment celles de la peau ; ceci est un inconvénient non négligeable pour l'utilisation topique de miel [12].

### Autres facteurs antibactériens :

L'activité peroxydasique n'est pas la seule responsable de l'effet antibactérien, car lorsque l'on chauffe un miel, on inactive la glucose-oxydase sans pour autant inhiber totalement les propriétés antibactériennes de ce miel. De même le pouvoir antibactérien du miel ne semble pas affecté quand on le traite avec des catalases qui détruisent le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

D'autres facteurs contribuent à faire du miel un produit antibactérien [12].

Des travaux ont montré la présence d'autres facteurs antibactériens dans des miels à l'état naturel : flavonoïdes [53], acides phénoliques... [54] ; [55].

Certains miels sont doués d'une activité qualifiée de « non peroxydasique », c.à.d. qu'ils conservent un fort pouvoir antibactérien même quand leur activité peroxydasique est neutralisée (catalase, chauffage...) ; c'est le cas notamment de miels néo-zélandais et australien issus d'arbustes *Leptospermum spp.* [47].

En utilisant une nouvelle approche de neutralisation successive des différents facteurs bactéricides individuels du miel, des chercheurs néerlandais ont identifié, très récemment, en juillet 2010, une molécule sécrétée par les abeilles et baptisée la défensine-1 qui serait responsable d'une grande partie de l'activité antibactérienne du miel. Cette protéine, fabriquée par les glandes hypopharyngiennes et mandibulaires des abeilles, conserve dans le miel ses propriétés immunitaires.

Pour le professeur à l'origine de cette découverte, le professeur A.J.Z. SEBASTIAN, chercheur du département de microbiologie médicale du centre médical académique d'Amsterdam, « le miel ou ses composants isolés pourraient être d'une grande valeur pour la prévention et le traitement des infections causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques ». En effet, dans ses expériences, quantités d'espèces testées, incluant des bactéries impliquées dans des intoxications alimentaires, *Bacillus subtilis* ou *Escherichia coli* résistantes à plusieurs antibiotiques, ou des bactéries impliquées dans des infections nosocomiales, ayant développé des résistances aux antibiotiques (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecium*), ont

toutes été tuées par une basse concentration en 10 à 20 % de miel (1 ou 2 ml de miel dans 10 ml de bactéries) [42].

### c. Variation de l'activité antibactérienne :

Ce qui a également contribué à faire avancer la recherche, ce sont les écarts d'efficacité constatés des variétés de miels sur les différentes souches bactériennes.

Les propriétés physico-chimiques du miel sont importantes mais elles ne suffisent pas, à elles seules, à expliquer son efficacité antiseptique et antimicrobienne. D'où lui viennent ses propriétés spécifiques ? Pour partie, il semblerait qu'elles soient en relation avec les plantes qui ont fourni les nectars initiaux. L'origine florale a donc une influence sur l'activité antibactérienne du miel. Ainsi, selon les plantes butinées par les abeilles, ses propriétés diffèrent. « Les composés intrinsèques de la plante et plus précisément les huiles essentielles présentes dans les nectars des fleurs influencent directement les qualités antibactériennes », précise GHISLAINE PAUTARD, infirmière aux soins intensifs du CHU de Limoges [42].

De nombreuses publications scientifiques rapportent que les miels sont plus ou moins actifs sur les souches bactériennes et que leur efficacité dépend de leur origine florale [12].

Une étude réalisée au plan international a permis de souligner l'intérêt de fleurs d'un arbrisseau originaire d'Australie, le buisson théier (*Leptospermum scoparium*), qui ne pousse qu'en Nouvelle-Zélande et duquel est produit le miel de manuka qui a la particularité de conjuguer des propriétés antibactériennes et anti-inflammatoires spécifiques, attribuée à sa teneur en une molécule : le MGO (méthylglyoxal), composant qui augmente sa puissance antibactérienne. C'est une étude menée par le professeur THOMAS HENLE du CHU de Dresde (Allemagne) qui a mis en évidence cette molécule dont la concentration dans le miel varie généralement de 1 à 10 mg par kg. Dans le miel de manuka, les concentrations en MGO atteignent jusqu'à 800 mg/kg. Cette forte concentration a pour effet

d'accentuer considérablement la puissance de l'efficacité antibactérienne. Le professeur THOMAS HENLE a ainsi montré que le MGO de niveau 100 est suffisant pour enrayer une infection causée par *Staphylococcus aureus*. Cette action sur des bactéries multirésistantes est extrêmement intéressante dans un contexte de perte d'efficacité des antibiotiques. Elle semble bien conjuguée à des propriétés anti-inflammatoires et cicatrisantes : le miel de manuka diminue les enflures, augmente la circulation sanguine et accélère la formation d'un nouveau tissu cicatriciel. Suite à ces découvertes majeures, le miel de qualité MGO a été normalisé, on trouve sur le marché des miels estampillés MGO 30 adaptés à la nutrition, MGO 100 appropriés toujours en nutrition, sur des brûlures, des coupures, MGO 250 pour les plaies et les escarres et jusqu'à MGO 550 réservés à des usages en traitement choc, en application externe pour les brûlures, plaies, escarres [42].

NADINE GUILLON a démontré l'efficacité du miel de thym et sa supériorité par rapport à d'autres miels d'origines différentes [56]. « Le miel de thym est l'un des plus intéressants du point de vue de l'activité antimicrobienne. Il est riche en essences qui sont connues pour leurs propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques... », explique GHISLAINE PAUTARD [42]. Compte tenu que cette plante (*Thymus vulgaris L.*, Lamiacées) contient une huile essentielle riche en phénols (thymol, carvacrol) dont les propriétés antibactériennes sont bien connues, il n'est pas étonnant que ce miel soit parmi les plus efficaces et présente l'une des activités antibactériennes les plus fortes [56].

« Le miel de lavande serait également bon bactéricide et particulièrement indiqué pour les applications externes en cas de brûlures, piqûres d'insectes, plaies infectées. Il est également largement cité pour les maladies infectieuses et en particulier pulmonaires », explique GHISLAINE PAUTARD [42].

La Pinocembrine, huile essentielle détectée dans le miel de tournesol, possède également une activité antimicrobienne caractérisée vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* [57].

Il y a donc transfert d'une partie des propriétés de la plante butinée au miel produit par les abeilles. Et dans ce cas, ce sont surtout les huiles essentielles qui sont impliquées [42].

Il faut noter aussi, qu'en fonction de sa concentration et de son origine botanique, un miel peut être bactéricide (c'est-à-dire qu'il peut totalement tuer les bactéries) ou être bactériostatique (les bactéries ne sont pas tuées, mais leur développement est stoppé) [12].

## B. Effet anti-inflammatoire :

### a. Observations cliniques :

Lorsqu'une agression infectieuse (bactérie, virus, levures...), chimiques (antigènes, allergènes...), ou physique (traumatismes, corps étrangers, radiations...) se produit dans notre organisme, aussitôt une réaction de défense se met en place : c'est l'inflammation.

Dans une étude menée en 2003 par AL-WAILI, des patients souffrant de psoriasis et de dermatite atopique ont été traités grâce à une mixture composée en quantités égales de miel, de cire d'abeille et d'huile d'olive. Il a montré que le miel réduit les œdèmes, les exsudats ainsi que les douleurs engendrées par les lésions cutanées [58].

### b. Données scientifiques :

Des recherches ont mis en évidence l'action du miel sur les cellules responsables du phénomène inflammatoire [12].

ABUHARFEIL *et al.* ont montré que des cultures *in vitro* de lymphocytes B et T ont une prolifération accrue en présence de miel. Ils ont aussi constaté que les phagocytes étaient activés *in vitro* par du miel [59].

TONKS *et al.* ont, eux aussi, étudié l'influence du miel sur les cellules de l'inflammation. Ils ont abouti aux résultats suivants : le miel à une concentration de 1 % stimule *in vitro* la libération par les monocytes de cytokines (tumeur necrosis alpha, interleukines 1 et 6) qui sont les acteurs de la réponse immunitaire en cas d'infection [60].

Au sein du subtil mélange qu'est le miel, on trouve des flavonoïdes ; or, de nombreux travaux scientifiques ont mis en évidence l'action anti-inflammatoire des flavonoïdes [12].

#### 2.7.4.2. Utilisation du miel comme une arme efficace contre les infections nosocomiales :

Le miel pourrait apporter une contribution essentielle à un problème mondial de santé publique dans le domaine d'enrichir l'arsenal thérapeutique à notre disposition, pour lutter contre les superbactéries devenues résistantes aux antibiotiques (streptocoque, staphylocoque doré résistant à la Méthicilline, entérocoque). Le développement des infections nosocomiales et des résistances aux antibiotiques sera peut-être l'occasion de réintroduire le miel dans la pharmacopée moderne. Une utilisation judicieuse, pertinente du miel doit permettre de réduire la surconsommation d'antibiotiques, surconsommation dont on sait qu'elle favorise l'émergence de ces souches bactériennes résistantes aux traitements [42].

#### 2.7.4.3. Usages vétérinaires du miel :

##### A. Traitement des mammites chez les bovins :

Le miel s'est révélé intéressant en usage vétérinaire. L'inflammation des mamelles des vaches laitières est une pathologie courante. Classiquement, une antibiothérapie est instaurée. Mais, ce traitement présente des inconvénients : d'une part son coût élevé, et d'autre part, le lait ne peut être commercialisé avant la disparition de toute trace d'antibiotique [12].

Une étude néo-zélandaise a montré que le miel inhibe la croissance des bactéries les plus fréquemment impliquées dans les mammites comme *Actinomyces pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*... L'utilisation du miel présente un double avantage : le coût du traitement est relativement faible et le lait n'est pas « pollué » comme avec les antibiotiques [13]. Le miel apparaît donc comme une alternative intéressante à l'antibiothérapie pour traiter les mammites [12].

## B. Traitement de plaies :

Du fait de ses qualités cicatrisantes, le miel intéresse aussi les vétérinaires. SIMON *et al.* rapportent le cas d'une génisse Prim Holstein âgée d'un an et qui a été soignée par du miel. L'animal présentait trois plaies profondes suite à un chevauchement de barrière. Au bout de deux mois de traitement, les vétérinaires ont obtenu une cicatrisation totale des lésions [61].

### 2.7.4.4. Intérêts et limites à l'utilisation du miel :

#### A. Intérêts :

##### a. Facilité de production, de conservation et d'utilisation :

Les abeilles peuplent une grande partie de la planète à l'exception des zones polaires.

L'apiculture est possible dans la majeure partie des régions du globe. L'élevage des abeilles est relativement simple et ne nécessite pas un équipement coûteux. La récolte du miel est facile et ne nécessite pas de transformations compliquées. Le miel est une denrée qui se conserve bien si elle a été extraite dans de bonnes conditions.

Enfin, rien de plus simple que son utilisation thérapeutique qui ne nécessite aucune formation ni infrastructure particulières. Toutes ces qualités font du miel un produit utilisable partout, par tous et pour tous. De plus, le miel est une substance

facile à produire qui ne nécessite pas de transformations majeures pour être utilisable [12].

#### b. Coût :

Le miel présente l'avantage d'être un produit peu onéreux. A l'heure où les économies en matière de santé sont le maître mot dans les pays développés, cet aspect joue indéniablement en faveur d'une utilisation élargie du miel.

Pour les pays en voie de développement le faible coût des traitements mellifères est un atout majeur. Enfin, le miel peut être produit sur place ce qui permet une indépendance totale [12].

#### c. Innocuité :

Le miel présente très peu d'effets indésirables. Le lait provenant des animaux traités par le miel lors de mammites n'est pas « pollué » comme avec les antibiotiques. Il est intéressant de souligner qu'il n'existe aucune interaction entre le miel et les médicaments [12].

### B. Limites :

#### a. Réticences du corps médical :

Avec l'avènement des molécules de synthèse, la chimie moderne a supplanté les médecines « naturelles » et aujourd'hui pour une grande partie du corps médical, le miel fait figure de « remède de grand-mère ». Malgré des publications scientifiques sérieuses, il faudra encore du temps pour faire accepter l'idée que le miel est une thérapeutique efficace. Le retour à des thérapeutiques « naturelles » est une tendance en forte croissance qui pourrait être favorable aux thérapeutiques mellifères [12].

### b. Etudes scientifiques :

Il reste encore beaucoup de points d'interrogation quant aux principes actifs du miel.

Et tant qu'ils subsisteront, ils seront comme autant d'arguments pour les détracteurs de cette thérapeutique. Il faudra encore beaucoup de recherches pour élucider ces points d'ombre. Il y a aussi le problème des recherches menées entre autres par les pays de l'Est et qui sont décriées par les occidentaux car considérées comme non fiables [12].

#### 2.7.4.5. Conclusion :

Fruit de la rencontre entre les végétaux et les abeilles, le miel est un cadeau de Dieu. Utilisé depuis toujours par les hommes, les thérapeutiques mellifères ont empiriquement traversé les siècles. Des études internationales viennent aujourd'hui confirmer ce que les anciens savaient déjà : le miel possède de nombreuses propriétés thérapeutiques.

Même si tous les mystères du miel n'ont pas encore été élucidés, ces données scientifiques sont nécessaires pour faire accepter l'idée que c'est un remède efficace et qu'il offre de formidables perspectives [12]. Plus les recherches s'approfondissent sur le miel, plus elles révèlent la complexité de ce merveilleux produit vivant naturel qui suscite humilité et émerveillement. Toutes les interactions entre les différents bactéricides présents dans le miel n'ont certainement pas encore été élucidées. Il n'est donc pas aisé de quantifier la contribution des différents facteurs qui interviennent car ils peuvent être mutuellement dépendants, ou avoir une activité additive ou synergique selon l'espèce bactérienne ciblée [42].

Force est de constater que malgré toutes ses qualités ce produit n'est que très peu intégré dans les protocoles de soins actuels [12].

Compte tenu de son très grand champ d'application, à la fois préventif et curatif, antiseptique et antibiotique et de sa grande efficacité dans de nombreuses

indications, de sa facilité de mise en œuvre, de sa parfaite innocuité et de l'absence d'effets secondaires, contre-indications ou incompatibilité, l'utilisation du miel représente une possibilité thérapeutique de premier plan qui ne demande qu'à être mieux connue. Le miel trouvera, dans un avenir proche, à n'en pas douter, une place importante dans l'arsenal thérapeutique médical [42].

Dans les pays développés, le miel serait une alternative envisageable pour des traitements coûteux (escarres, plaies postopératoires...) ou devenus inefficaces (résistances bactériennes aux antibiotiques). Pour les pays en voie de développement, il pourrait être une solution thérapeutique intéressante d'autant qu'il peut être produit de façon indépendante [12].

Toutefois, il est urgent d'agir et de protéger les cultures dont les abeilles se nourrissent. Il ne faudrait pas attendre que les abeilles aient disparues pour se rendre compte à quel point le miel est précieux [42].

## CHAPITRE 3

### ETUDE EXPERIMENTALE

#### 3.1. Objectifs :

Les principaux objectifs de notre étude sont :

- l'évaluation de la possibilité d'utiliser l'association du miel et de l'amidon *in vivo* comme traitement antibactérien efficace des mammites cliniques ;
- l'établissement d'une comparaison entre l'efficacité de ce traitement alternatif et un traitement conventionnel classique local à base d'antibiotique largement utilisé (Amoxicilline/Acide clavulanique).

#### 3.2. Matériels et méthodes :

##### 3.2.1. Lieu et animaux de l'expérimentation :

Soixante (60) brebis ont été sélectionnées en remplissant des critères requis et pertinents à l'objectif de l'étude : jeunes brebis allaitantes de race Rumbi et en pleine activité laitière ayant mis bas depuis environ 2 mois. Les brebis étaient âgées entre un et deux ans.

Les brebis ont été identifiées par la mise en place des boucles d'oreilles portant un numéro d'identification.

L'étude a été menée dans une ferme dans la région de Tiaret, en période printanière s'écoulant de mars à avril 2021.

Pendant le déroulement de l'étude, les brebis prenaient le même régime alimentaire et étaient logées à l'écart de leurs agneaux qui étaient ensuite artificiellement allaités, puis sevrés.

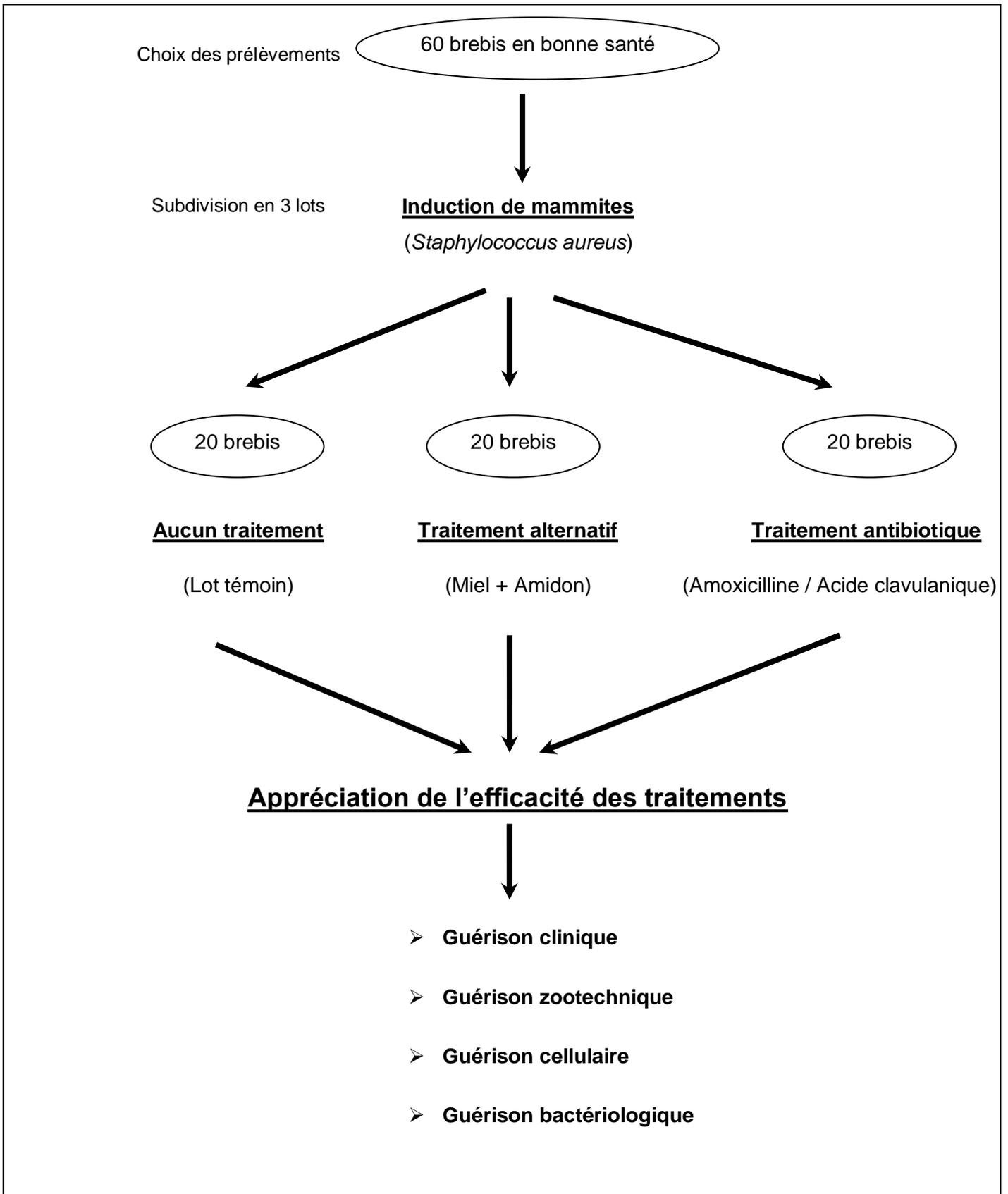


Figure 3.1 : Organigramme général de l'étude.

### 3.2.2. Diagnostic de mammites :

Un diagnostic a été établi pour s'assurer de l'indemnité des mamelles de toute mammite.

#### 3.2.2.1. Diagnostic de mammites cliniques :

##### A. Examen clinique :

##### a. Examen de la mamelle :

L'examen de la glande mammaire est effectué avant et après la traite. Il se fait en plusieurs étapes [6] ; [8] ; [34] :

- Inspection de la mamelle à distance : avant la traite, en se plaçant derrière puis aux côtés de la brebis en question à un pas de distance ;
- Palpation profonde de la glande : après la traite, en se mettant derrière l'animal, nous palpons simultanément les deux quartiers de haut en bas. Prenant soin de palper toute la glande, cette action se réalise en saisissant les quartiers à pleines mains, les pouces mis en arrière et les autres doigts vers l'avant en exerçant une certaine pression ;
- Palpation des nœuds lymphatiques rétro-mammaires : également après la traite, nous palpons les ganglions lymphatiques entre le pouce et l'index au-dessous de l'attache de la mamelle ;
- Examen des trayons : nous encerclons le trayon avec la main en le serrant avec examen visuel de son corps et de son extrémité.

Toutes les brebis présentaient des mamelles apparemment saines, équilibrées, avec absence de toute lésion ou plaie visible sur le corps de la mamelle et le trayon et absence de signes évocateurs d'une inflammation aiguë (rougeur, chaleur, douleur et œdème) ou chronique (abcès, induration...). Les ganglions lymphatiques rétro-mammaires n'étaient pas réactionnels.

### b. Examen général

Tous les animaux ont subi un examen clinique général routinier pour détecter une moindre altération de l'état de santé.

Ils étaient en bonne santé sans aucune altération de l'état général.

### B. Examen macroscopique du lait et mesure de sa quantité :

Le lait de chaque quartier a été prélevé dans un récipient à fond noir et a été examiné pour apprécier sa qualité et ses caractères physiques. La quantité de la sécrétion laitière des brebis a été déterminée par pesée suite aux traites manuelles effectuées avant l'induction de la mammité.

Le lait de nos brebis ne présentait aucune anomalie visible et sa quantité était considérée comme normale.

### 3.2.2.2. Diagnostic de mammites subcliniques :

Un CMT était réalisé immédiatement après l'élimination des premiers jets, selon le CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) [62], le NMC (National Mastitis Council) [63] et ZEEDAN et ses collaborateurs [64]. Une plaque munie de 2 cupules, correspondant aux 2 quartiers, a été utilisée, sur chacune des 2 cupules une quantité de 2 ml de lait du quartier correspondant a été récupérée, en lui ajoutant 2 ml d'un réactif (le Teepol). La palette a été agitée et la lecture a été effectuée dans les 20 secondes sous une source de lumière (figure 3.2).

Le score « négatif » était enregistré pour les différents quartiers des mamelles, avec l'absence de tout précipité dans le lait prélevé.



**Figure 3.2 :** Réalisation d'un CMT (Photo personnelle).

### 3.2.2.3. Diagnostic bactériologique :

#### A. Prélèvement :

Les échantillons de lait ont été prélevés de chaque quartier selon les procédures recommandées par le NMC [63] et les procédures standard de l'IDF (International Dairy Federation) [65]. Le trayon a été soigneusement lavé à l'eau savonneuse et a été complètement séché avec une serviette. L'extrémité du trayon a été désinfectée à l'aide d'une serviette désinfectante à usage unique imprégnée de l'alcool (Isopropanol à 70 %), puis était laissée pour sécher. Les premiers jets étaient éliminés puis environ 1 ml de lait était rapidement recueilli dans un pot stérile en veillant à garder le pot de prélèvement avec son bouchon le plus horizontal possible près du trayon.

Les pots étaient ensuite identifiés, en y inscrivant le numéro d'identification de l'animal et le quartier prélevé.

Les prélèvements ont été rapidement acheminés au laboratoire dans une glacière munie de poches de glace pour entamer l'examen bactériologique.

### B. Examen bactériologique :

L'isolement bactérien a été effectué en suivant les procédures aseptiques telles que décrites par le NMC [63]. Les prélèvements de lait ont étéensemencés sur GN (Gélose Nutritive), BN (Bouillon Nutritif) et gélose au sang. Les cultures sur GN et BN étaient incubées en aérobiose, tandis que les cultures sur la gélose au sang étaient incubées en anaérobiose (jarre anaérobie) ; dans les conditions standards d'incubation (37 °C / 24 h) avec prolongation de l'incubation si nécessaire 24 heures plus tard.

Aucune pousse bactérienne n'a été constatée sur les milieux de culture.

### 3.2.3. Induction de mammite :

#### 3.2.3.1. Choix de la souche bactérienne :

Nous avons induit une mammite par une souche de référence de *Staphylococcus aureus*.

**Tableau 3.1 :** Caractéristiques de la souche de référence de *S. aureus*.

<b>N° collection</b>	ATCC 33862
<b>Souche</b>	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>
<b>Caractères microscopiques (caractères morphologiques)</b>	Coccus ; Gram + ; immobile ; asporulée ; capsulée
<b>Caractères macroscopiques (caractères culturels)</b>	colonies crémeuses, opaques, mésophiles, neutrophiles, halophiles ; pigmentation jaune d'or
<b>Caractères biochimiques</b>	catalase + ; oxydase - ; mannitol + ; coagulase + ; aérobies

### 3.2.3.2. Préparation de la suspension bactérienne :

La veille de l'induction, nous avons repiqué la souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 sur GN, la culture a été incubée dans les conditions standards d'incubation. Le lendemain, nous avons préparé une suspension bactérienne dans de l'eau physiologique stérile selon le standard 0,5 McFarland, dont on a ajusté sa DO (Densité Optique) entre 0,08 et 0,1 à l'aide d'un spectrophotomètre en choisissant la longueur d'onde de 625 nm.



**Figure 3.3 :** Induction de la mammite staphylococcique (Photo personnelle).

### 3.2.3.3. Procédé d'induction :

Une fois la suspension bactérienne préparée, elle était directement acheminée à la ferme dans une glacière contenant de poches de glace. Nous avons désinfecté les trayons par des serviettes désinfectantes à usage unique et nous avons inoculé, à l'aide de micropipettes stériles, 0,5 ml de la suspension bactérienne dans chaque quartier (figure 3.3).

### 3.2.4. Confirmation de la mammite staphylococcique :

#### 3.2.4.1. Diagnostic clinique :

##### A. Examen clinique :

###### a. Examen de la mamelle :

Vingt-quatre heures après l'induction de la mammite staphylococcique, nous n'avons pas perçu des signes évocateurs d'une mammite clinique. Vingt-quatre heures plus tard, nous avons constaté des symptômes de mammite clinique aiguë chez toutes les brebis infectées. Les différents symptômes observés étaient essentiellement les signes cardinaux d'une inflammation aiguë (quartiers enflés, rouges à violacés et chauds, avec présence de douleur à la palpation) et une réaction des ganglions lymphatiques supra-mammaires (hypertrophie, chaleur et douleur).

Le jour suivant, une palpation d'une formation dure, évoquant un abcès, au sein du parenchyme mammaire a été signalée chez plusieurs brebis.

###### b. Examen général :

Les symptômes généraux (fièvre et inappétence) ont été constatés chez certains sujets 48 heures avec l'induction de la mammite.

##### B. Examen macroscopique du lait et mesure de sa quantité :

Vingt-quatre heures après l'induction de la mammite staphylococcique, il n'y avait pas un changement franc des caractères des laits et de leurs quantités, pouvant évoquer une mammite. Mais le jour suivant, une diminution de la sécrétion laitière et une présence de pus et de grumeaux dans le lait ont été observées (figure 3.4), tous quartiers concernés ; le lait était donc purulent et de couleur jaunâtre. Il faut aussi signaler que le pus était en abondance dans les quartiers présentant des abcès.



**Figure 3.4 :** Présence de pus dans le lait d'une mamelle mammiteuse (Photo personnelle).

#### 3.2.4.2. CMT :

Le CMT réalisé sur tous les quartiers infectés par le staphylocoque doré 48 heures après l'induction de la mammite était positif, dont de nets précipités ont été observés dans les récipients, marquant ainsi un score « positif ».

#### 3.2.4.3. Diagnostic bactériologique :

Vingt-quatre heures après l'induction de la mammite staphylococcique, nous avons réalisé des prélèvements de lait. Ces derniers ont étéensemencés sur le milieu Chapman et sur GN, puis incubés en aérobiose dans des conditions standards d'incubation (37 °C/24 - 48 h).

Après une étape de purification des colonies obtenues, nous avons réalisé une coloration de Gram, un test de catalase et un test de coagulase.

Pour finir, une galerie API (Analytical Profile Index ou Appareils et Procédés d'Identification) dédiée pour les staphylocoques, selon les instructions du fabricant et selon les méthodes décrites par TAPONEN *et al.* [66] et LOPEZ-MALO *et al.* [67], a aussi été réalisée. Les résultats de la galerie API-Staph (**bioMérieux, France**) ont été lus par un logiciel API 20 Staph V 4.1.

Les prélèvements de lait ont donné des cultures nettement positives sur la GN (figure 3.6) et sur le milieu Chapman après 24 heures d'incubation, avec des caractéristiques macroscopiques culturelles typiques de *Staphylococcus aureus* : colonies jaune doré, brillantes, convexes, d'environ 2 mm de diamètre et à bords réguliers, avec jaunissement du milieu Chapman (mannitol +) (figure 3.5).

En microscopie, après coloration de Gram, ces bactéries étaient des cocci à Gram positif, isolées, en paires (diplocoques) ou en tétrades, mais le plus souvent des amas ressemblant à des grappes.

Toutes les bactéries isolées étaient à catalase (+) : dégagement de bulles de gaz en contact avec l'eau oxygénée ; et à coagulase (+) : formation d'un coagulum avec le plasma humain dans 4 heures à 37 °C.

Le logiciel API 20 Staph V 4.1 a identifié les souches bactériennes présomptives comme étant *S. aureus* avec une probabilité de 99 %.

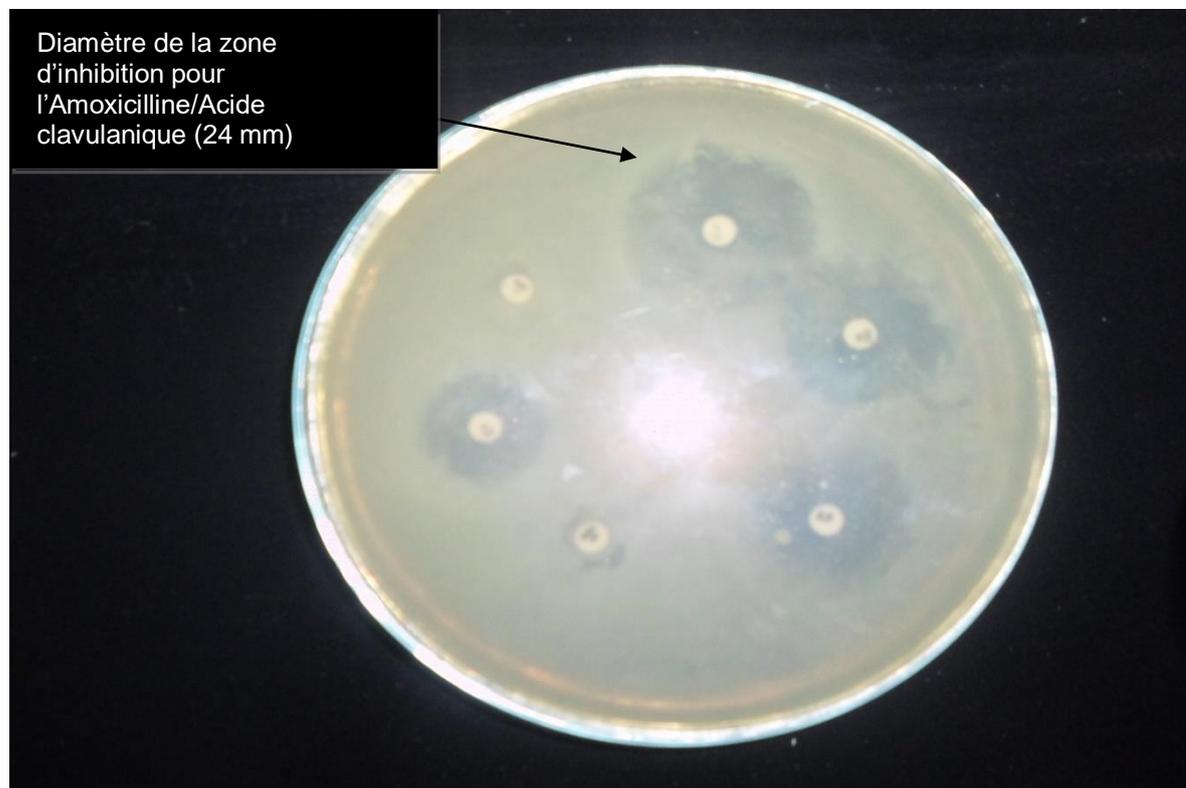
#### 3.2.5. Traitement de la mammite staphylococcique :

Les 60 brebis ont été aléatoirement réparties en 3 lots, 20 têtes pour chacun : le premier lot était traité par un traitement conventionnel classique, le second lot par un traitement alternatif à base de miel, tandis que le 3<sup>ème</sup> lot a constitué un lot « témoin » et qui n'a donc pas été traité. Le traitement a été entamé 48 heures après l'inoculation du germe.

### 3.2.5.1. Traitement par une formule conventionnelle :

#### A. Choix du traitement :

Nous avons testé la sensibilité *in vitro* de *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 vis-à-vis de l'association "amoxicilline / acide clavulanique", une préparation intramammaire disponible sur le marché algérien utilisant un seul antibiotique (**SYNULOX INTRAMAMMAIRE® ; Haupt Pharma Latina S.r.l. ; Italie ; 200 mg-50 mg/1 injecteur de 3 g**). L'antibiogramme a été réalisé selon le standard McFarland en utilisant la méthode de diffusion de disques, selon Kirby-Bauer. La suspension bactérienne standard était prélevée par un écouvillon stérile tout en éliminant l'excès sur la paroi du tube, ensuite elle étaitensemencée sur une gélose MH (Mueller Hinton) en parcourant la totalité de la surface de celle-ci. Le disque d'antibiotique "Amoxicilline (20 µg) /acide clavulanique (10 µg)" (**Biomaxima S.A. ul. Veterrów 5, 20-277 Lublin, Poland**) y était déposé. Le milieu MH était incubé à 35 - 37 °C pendant 18 - 24 heures.



**Figure 3.5 :** Résultat de l'antibiogramme de *S. aureus* ATCC 33862 (Photo personnelle).

La lecture était effectuée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en comparant le résultat obtenu aux valeurs des diamètres critiques figurant dans une table de lecture dédiée, selon le NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standards) [68]. La souche de *S. aureus* était sensible à l'antibiotique testé en présentant une zone d'inhibition de 24 mm (figure 3.7).

#### B. Posologie et durée du traitement :

Les animaux ont été traités par un demi-injecteur destiné aux bovins pour chaque quartier, soit 1,5 g de la spécialité, sachant que le contenu de l'injecteur est de 3 g.

La suspension intramammaire était administrée à raison d'une application par quartier toutes les 12 heures, dont le traitement complet comprend 3 applications, selon les indications du fabricant.

Une fois la mammite staphylococcique confirmée, nous avons entamé le traitement. Nous avons donc infusé, d'une façon atraumatique, la spécialité antibiotique à travers le canal du trayon dans chaque quartier, immédiatement après la traite complète de la demi-mamelle. Après insertion de la préparation d'antibiotique dans le trayon, nous effectuons un massage du pis en allant du bas en haut pour que le médicament s'infusât bien dans la totalité du quartier ; entre temps, nous pincions le trayon empêchant le médicament de refluer dehors. Rappelons toujours la nécessité de respecter les mesures habituelles d'asepsie (hygiène très stricte) lors de la mise en œuvre du traitement intramammaire : nettoyage et désinfection soignée de l'orifice et toute l'extrémité du trayon avant l'administration du produit, puis antiseptie finale du trayon après l'administration de ce dernier [8] (figure 3.8).



**Figure 3.6 :** Application du traitement antibiotique (Photo personnelle).

### 3.2.5.2. Traitement par une formule alternative :

#### A. Choix du traitement :

La formule alternative utilisée pour traiter la mammite était à base de miel (75 %) et d'une solution d'amidon à 25 % (25 %).

Le miel utilisé lors de notre étude s'agissait d'un miel de fenouil (miel pur) obtenu auprès d'un apiculteur dans la région de Tiaret, au nord-ouest de l'Algérie. Le miel a été récolté en 2020, stocké dans un flacon noir stérile et conservé au réfrigérateur à 4° C jusqu'à son utilisation.

Le miel a subi des tests microbiologiques pour la recherche des résidus d'antibiotiques. Notre échantillon s'est avéré exempt de ceux-ci.

### B. Posologie et durée du traitement :

Nous avons introduit 5 ml de la formule alternative par quartier toutes les 12 heures pendant 3 jours successivement.

Nous appliquons le traitement alternatif en suivant le même procédé que pour le traitement conventionnel. Nous remplissons une seringue stérile par le produit à administrer, nous l'introduisons par voie intramammaire à travers le canal du trayon à l'aide d'une sonde intramammaire, en prenant soin à respecter les précautions habituelles d'asepsie. Entre chaque application et une autre, en partant d'un quartier à un autre, la sonde intramammaire était lavée et nettoyée dans une solution antiseptique (figure 3.9).

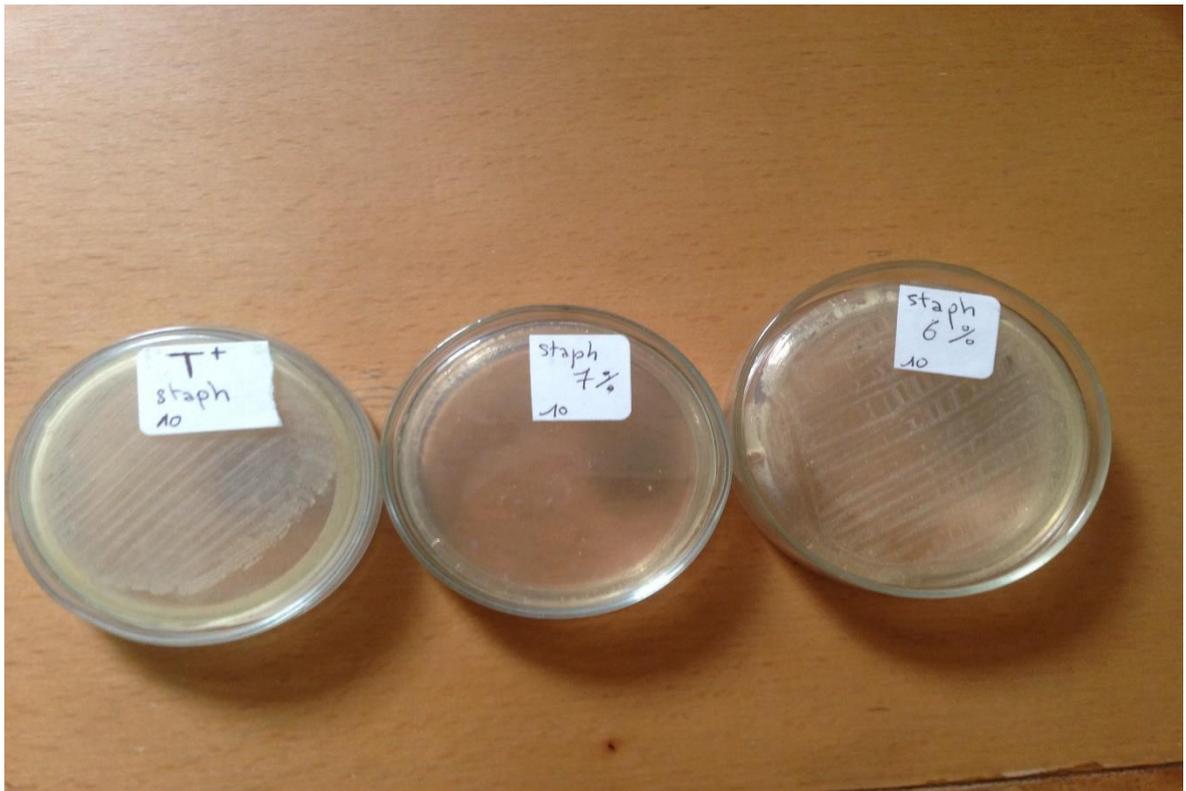


**Figure 3.7 :** Application du traitement alternatif (Photo personnelle).

### C. Evaluation *in vitro* de la préparation alternative :

La CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) de la préparation alternative était déterminée en utilisant la méthode d'incorporation sur gélose MH selon la méthode de HEGAZI [69] et du NCCLS [68].

La méthode consiste à réaliser une série de milieux gélosés de MH à concentrations croissantes en préparation alternative allant de 5 à 10 %. Nous incorporons la préparation alternative au milieu MH, dont le volume total du mélange dans chaque boîte de Petri était de 5 ml [70] ; [71]. Les boîtes étaientensemencées par un inoculum standard de la souche de référence de *Staphylococcus aureus* ATCC 33862. Les ensemencements réalisés sont ensuite étuvés à 37 °C pendant 24 heures. Pour valider le résultat, un témoin a été réalisé en ensemencant un milieu MH sans y mettre la préparation à tester dont la culture devra être nettement positive. La CMI était déterminée selon la méthode décrite par le CLSI [72], elle correspond à la concentration la plus faible qui inhibera totalement la croissance bactérienne. La CMI de la formule alternative était de 7 % (figure 3.10).



**Figure 3.8** : CMI du traitement alternatif (Photo personnelle).

### 3.2.6. Appréciation de l'efficacité des traitements conventionnel et alternatif :

La glande mammaire met 2 à 4 semaines pour récupérer totalement des suites d'une mammite clinique. La guérison doit être considérée à différents niveaux (4 critères de guérison) [6] :

#### 3.2.6.1. Guérison clinique :

C'est l'évolution progressive et le retour à la normale au niveau de la mamelle dans les 7 jours suivant la mise en route d'un traitement : une sécrétion mammaire qui redevient d'aspect normal (consistance et couleur normales et absence de pus et de grumeaux) et disparition complète des signes généraux et locaux de mammite (signes inflammatoires, réaction ganglionnaire et abcès), sans aucune rechute clinique un mois après [6].

Les brebis ont été soumises à un examen clinique quotidien pendant les 7 premiers jours [6] ; [73] et un mois plus tard [6].

#### 3.2.6.2. Guérison zootechnique :

C'est la reprise progressive de la lactation au niveau où elle était avant la mammite clinique dans les 7 jours après le début d'un traitement [6]. La production de lait a été mesurée quotidiennement et a été comparée à celle enregistrée avant l'induction de la mammite staphylococcique.

#### 3.2.6.3. Guérison cellulaire :

C'est le retour à la normale des CCS dans un délai plus ou moins long après le début d'un traitement, le CMT est employé dans ce cas avec l'objectif de suivi du devenir de la mammite dans les semaines qui suivent son traitement, il a une importance fondamentale pour évaluer une guérison cellulaire [6].

Des échantillons de lait ont été prélevés toutes les semaines pendant un mois après le début du traitement, et ont été soumis à un CMT.

#### 3.2.6.4. Guérison bactériologique :

C'est la disparition du germe en cause au niveau du lait dans les 7 jours après le début d'un traitement [6]. Des échantillons de lait ont été prélevés quotidiennement et ont subi un examen bactériologique usuel.

#### 3.2.7. Utilisation des critères de guérison d'une mammite clinique :

Il est fondamental de pouvoir juger les résultats des traitements mis en œuvre. En effet, seule une appréciation raisonnée et objective permettra de juger l'efficacité réelle des protocoles thérapeutiques utilisés [6].

### 3.2.7.1. Guérisons clinique et cellulaire :

Deux paramètres peuvent être utilisés (tableau 3.1) [6] :

1. Absence d'échecs cliniques ou de rechutes suite au traitement : un échec clinique d'un traitement est défini par une absence de guérison clinique au bout de 5 jours ou une aggravation de la mammite 48 heures après le début de ce traitement. La rechute peut se définir par une nouvelle mammite clinique affectant le même quartier dans le mois qui suit l'apparition de la première mammite.
2. Résultats de guérison cellulaire : comme le critère de guérison cellulaire renseigne sur l'état infectieux de la mamelle, l'échec d'un traitement est défini par la persistance des CCS élevés après un délai plus ou moins long.

**Tableau 3.2 :** Critères objectifs de l'efficacité des traitements des mammites cliniques [6].

	<b>Taux d'échecs et de rechutes</b>	<b>Niveau de guérison cellulaire</b>
<b>Objectifs</b>	$\leq 15 \%$	$\geq 70 \%$

### 3.2.7.2. Guérison bactériologique :

C'est le critère qui revêt le plus une importance primordiale, il est le plus objectif et est considéré comme le plus pertinent actuellement pour juger de l'efficacité d'un traitement. L'échec d'un traitement est défini par la persistance du germe causal de la mammite au bout de 7 jours [6].

En résumé, la guérison clinique a une importance fondamentale mais elle ne traduit pas l'élimination de l'agent infectieux initial. En effet, une femelle sans signes cliniques mais avec des numérations cellulaires constamment élevées (CMT positifs) par la suite n'est pas guérie.

Alors qu'une femelle avec un CMT négatif et un lait contenant encore quelques grumeaux a éliminé le germe. La guérison cellulaire et la guérison bactériologique sont les seuls vrais critères de guérison et seront beaucoup plus fiables pour juger de l'élimination du germe responsable de mammite clinique [6].

#### 3.2.8. Devenir des brebis non traitées (groupe "témoin") :

A la fin du suivi de l'efficacité des traitements (une semaine), nous avons entamé un traitement massif pour toutes les brebis du groupe "témoin" et même les brebis non guéries, en mettant en œuvre une antibiothérapie et une corticothérapie par voie locale et générale. Une fois les brebis guéries, en respectant le délai d'attente des médicaments prescrits, elles étaient reformées et destinées à l'abattage.

#### 3.2.9. Analyse statistique :

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées par le logiciel R (version 3.2.3 ; base R ; Vienne ; Autriche) en employant les paquets statistiques "Survival". Le suivi de la guérison a été établi à partir d'une analyse de survie avec ou sans événement par la méthode de Kaplan-Meier.

La comparaison des variables qualitatives a été faite par le test du Log-Rank. Une comparaison entre les groupes deux par deux a été réalisée par l'ajustement de Bonferroni.

Le test de Chi-2 a été réalisé pour ressortir l'effet du traitement au 7<sup>ème</sup> jour. Une comparaison entre les variables était considérée comme significative quand la valeur de p était inférieure à 0,05.

### 3.3. Résultats :

#### 3.3.1. Appréciation de l'efficacité des traitements conventionnel et alternatif :

##### 3.3.1.1. Appréciation clinique :

###### A. Quartiers traités par l'antibiotique :

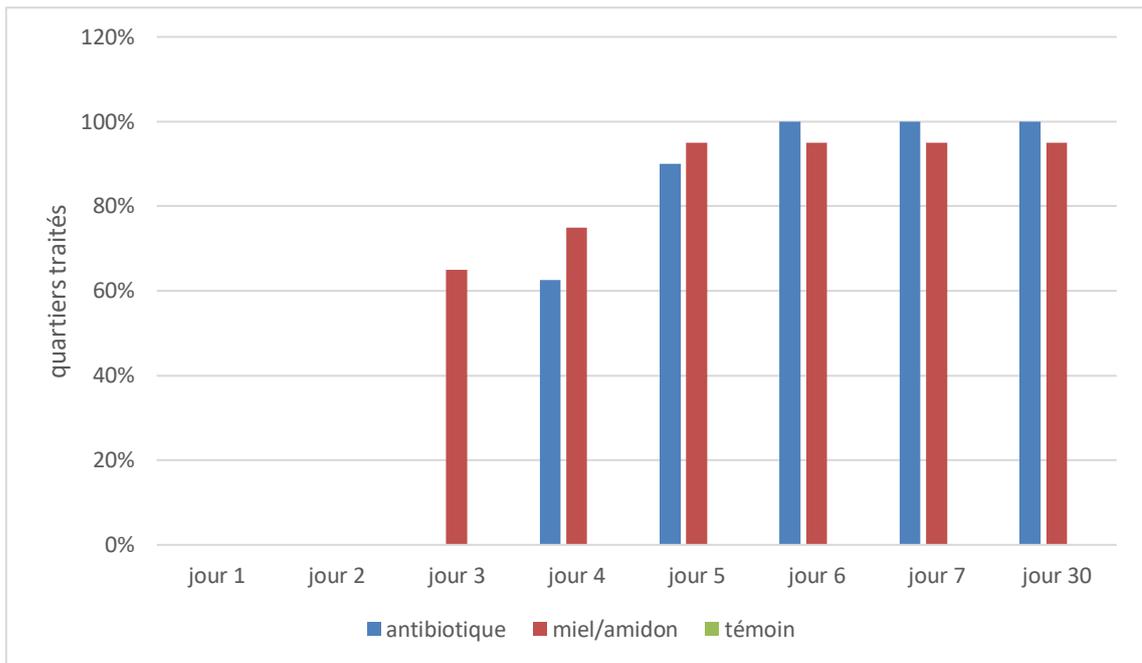
Les 3 premiers jours après le début du traitement, aucun quartier n'est complètement guéri. Le 4<sup>ème</sup> jour, les signes cliniques de la mammite ont totalement disparu chez 62.5 % des quartiers. A partir du 6<sup>ème</sup> jour, aucun signe n'a été observé chez 100 % des quartiers (tableau 3.2).

Les mêmes résultats étaient enregistrés un mois après (tableau 3.2).

**Tableau 3.3 :** Taux de guérisons des quartiers traités par Amoxicilline/acide clavulanique.

	Signes inflammatoires	Pus et grumeaux	Changement dans la consistance et la couleur du lait	Abcès	Guérison clinique	Production de lait (guérison zootechnique)	Culture bactérienne (guérison bactériologique)	CMT (guérison cellulaire)
<b>Jour 1</b>	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	100 %	/
<b>Jour 2</b>	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	100 %	/
<b>Jour 3</b>	75 %	80 %	82.5 %	00 %	00 %	00 %	100 %	/
<b>Jour 4</b>	85 %	97.5 %	90 %	62.5 %	62.5 %	77.5 %	100 %	/
<b>Jour 5</b>	100 %	100 %	100 %	90 %	90 %	87.5 %	100 %	/
<b>Jour 6</b>	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	/
<b>Jour 7</b>	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	00 %
<b>Semaine 2</b>	/	/	/	/	/	/	/	00 %
<b>Semaine 3</b>	/	/	/	/	/	/	/	100 %
<b>Semaine 4</b>	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	/	/	100 %

La figure 3.11 représente l'évolution du taux de guérison clinique des différents quartiers après la mise en œuvre des traitements.



**Figure 3.9 :** Evolution des taux de guérison clinique des pis mammiteux après l'administration des traitements.

### B. Quartiers traités par miel/amidon :

Les 2 premiers jours après le début du traitement, aucun quartier n'est complètement guéri, le lait était liquéfié et de couleur marron (figure 3.12). Le 3<sup>ème</sup> jour, les signes cliniques de la mammite ont totalement disparu chez 65 % des quartiers. A partir du 5<sup>ème</sup> jour, soit 48 heures après l'arrêt du traitement, aucun signe n'a été observé chez 95 % des quartiers, et le lait est retourné à sa consistance et sa couleur initiale (tableau 3.3 ; figure 3.11).

Les mêmes résultats étaient enregistrés un mois plus tard (tableau 3.3 ; figure 3.11).



**Figure 3.10 :** Lait liquéfié et de couleur marron constaté dans les mamelles traitées par le miel (Photo personnelle).

**Tableau 3.4** : Taux de guérisons des quartiers traités par miel/amidon.

	Signes inflammatoires	Pus et grumeaux	Changement dans la consistance et la couleur du lait	Abcès	Guérison clinique	Production de lait (guérison zootechnique)	Culture bactérienne (guérison bactériologique)	CMT (guérison cellulaire)
<b>Jour 1</b>	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	95 %	/
<b>Jour 2</b>	70 %	75 %	77.5 %	00 %	00 %	00 %	95 %	/
<b>Jour 3</b>	80 %	85 %	90 %	65 %	65 %	75 %	95 %	/
<b>Jour 4</b>	100 %	95 %	100 %	75 %	75 %	82.5 %	95 %	/
<b>Jour 5</b>	100 %	95 %	100 %	95 %	95 %	95 %	95 %	/
<b>Jour 6</b>	100 %	95 %	100 %	95 %	95 %	95 %	95 %	/
<b>Jour 7</b>	100 %	95 %	100 %	95 %	95 %	95 %	95 %	00 %
<b>Semaine 2</b>	/	/	/	/	/	/	/	00 %
<b>Semaine 3</b>	/	/	/	/	/	/	/	00 %
<b>Semaine 4</b>	100 %	95 %	100 %	95 %	95 %	/	/	00 %

Un échec de traitement de 5 % a donc été rapporté, dont les mamelles non guéries ont conservé leurs abcès avec présence de pus et de grumeaux au 7<sup>ème</sup> jour (tableau 3.3 ; figure 3.11).

### C. Quartiers non traités (lot "témoin") :

Le 7<sup>ème</sup> jour après l'induction de la mammite, les signes de l'inflammation ont disparu chez 15 % des quartiers, néanmoins aucun quartier n'est complètement guéri (taux de guérison clinique de 0 %) (tableau 3.4 ; figure 3.11).

**Tableau 3.5** : Taux de guérisons des quartiers non traités "témoin".

	Signes inflammatoires	Pus et grumeaux	Changement dans la consistance et la couleur du lait	Abcès	Guérison clinique	Production de lait (guérison zootecnique)	Culture bactérienne (guérison bactériologique)	CMT (guérison cellulaire)
<b>Jour 1</b>	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	/
<b>Jour 2</b>	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	/
<b>Jour 3</b>	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	/
<b>Jour 4</b>	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	/
<b>Jour 5</b>	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	/
<b>Jour 6</b>	10 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	/
<b>Jour 7</b>	15 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %
<b>Semaine 2</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Semaine 3</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Semaine 4</b>	/	/	/	/	/	/	/	/

Il s'est avéré que l'amélioration clinique des quartiers traités par le traitement alternatif était nettement plus précoce que celle constatée au niveau des quartiers traités par l'antibiotique (figure 3.11).

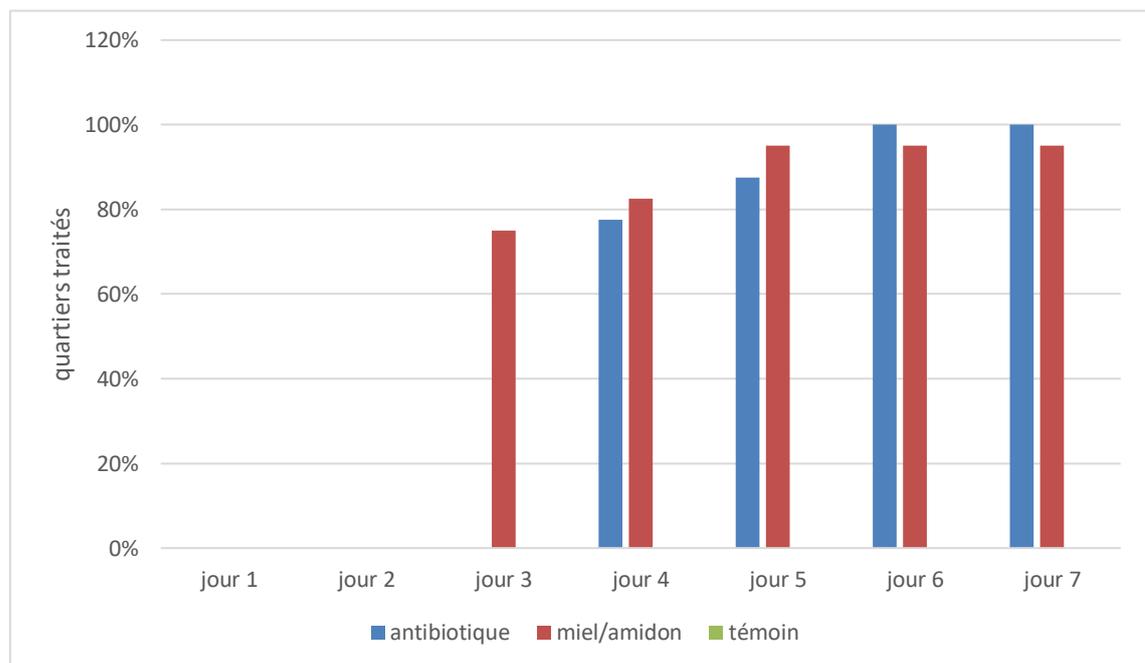
### 3.3.1.2. Appréciation zootecnique :

#### A. Quartiers traités par l'antibiotique :

Jusqu'au 3<sup>ème</sup> jour après le début du traitement, toutes les mamelles présentait une sécrétion lactée diminuée. A partir du 4<sup>ème</sup> jour, la production

laitière normale a repris chez 77,5 % des mamelles. Dès le 6<sup>ème</sup> jour, 100 % des mamelles ont retrouvé une production laitière normale équivalente à celle mesurée avant l'induction de la mammite (tableau 3.2).

La figure 3.13 montre l'évolution du taux de guérison zootechnique des différents pis après la mise en route des traitements.



**Figure 3.11 :** Evolution des taux de guérison zootechnique des pis mammitieux après l'administration des traitements.

### B. Quartiers traités par miel/amidon :

Les 2 premiers jours après le début du traitement, tous les quartiers avaient une production de lait approximativement normale, équivalente vraisemblablement à une quantité diminuée (biais de l'effet osmotique du miel). A partir du 3<sup>ème</sup> jour, une augmentation de la production laitière a été observée chez 75 % des quartiers, équivalente vraisemblablement à une quantité normale (biais de l'effet osmotique du miel). Dès le 5<sup>ème</sup> jour, soit 48 heures après l'arrêt du traitement, 95

% des quartiers ont repris leur production laitière normale (tableau 3.3 ; figure 3.13).

Il a donc été enregistré que 5 % des mamelles, qui ne sont cliniquement pas guéries, avaient une production laitière diminuée au 7<sup>ème</sup> jour (tableau 3.3 ; figure 3.13).

### C. Quartiers non traités (lot "témoin") :

Nous avons constaté que, 7 jours après l'induction de la mammite, les mamelles n'ont pas retrouvé leur production laitière initiale (taux de guérison zootechnique de 0 %) (tableau 3.4 ; figure 3.13).

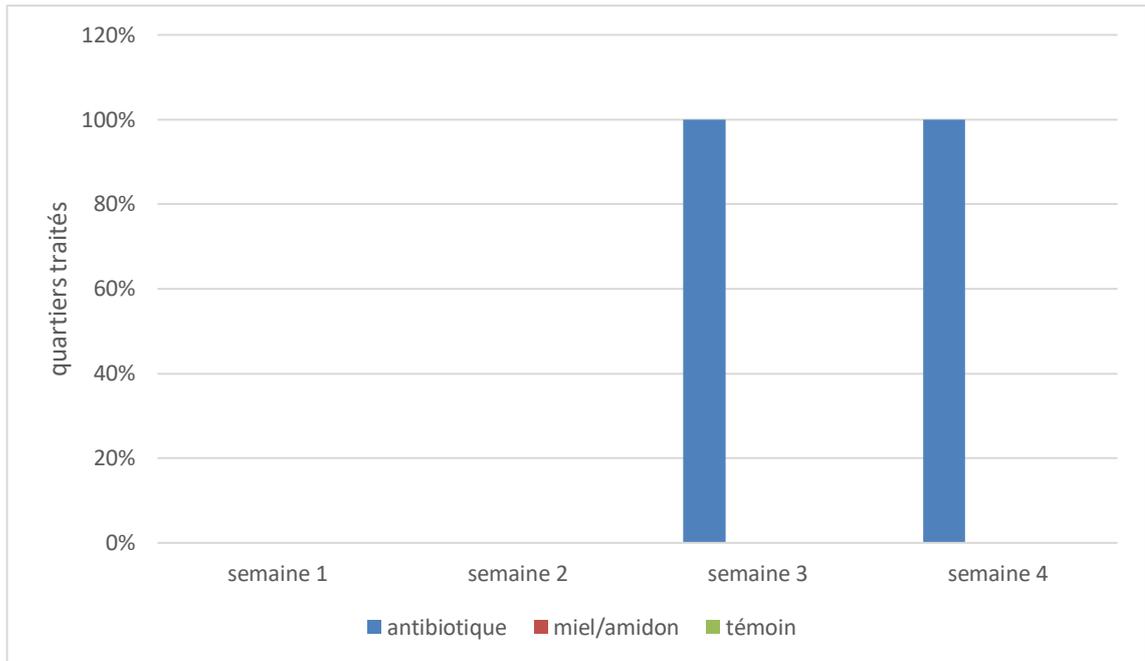
Nous avons également noté que la reprise d'une production laitière normale chez les quartiers traités par la formule alternative était plus rapide que celle enregistrée chez les quartiers traités par la formule conventionnelle (figure 3.13).

### 3.3.1.3. Appréciation cellulaire :

#### A. Quartiers traités par l'antibiotique :

Tous les prélèvements du lait des 2 premières semaines après le début du traitement ont réagi positivement au CMT avec des fluctuations de floculation d'un quartier à l'autre. Néanmoins, à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine, 100 % des quartiers ont donné un résultat négatif (tableau 3.2).

La figure 3.14 illustre l'évolution du taux de guérison cellulaire des différentes mamelles après l'administration des traitements.



**Figure 3.12 :** Evolution des taux de guérison cellulaire des pis mammiteux après l'administration des traitements.

#### B. Quartiers traités par miel/amidon :

Pour les 4 semaines après le début du traitement, 100 % des quartiers avaient un CMT positif (taux de guérison cellulaire de 0 %) (tableau 3.3 ; figure 3.14).

#### C. Quartiers non traités (lot "témoin") :

Aucun quartier n'a donné un CMT négatif à la première semaine (taux de guérison cellulaire de 0 %) (tableau 3.4 ; figure 3.14).

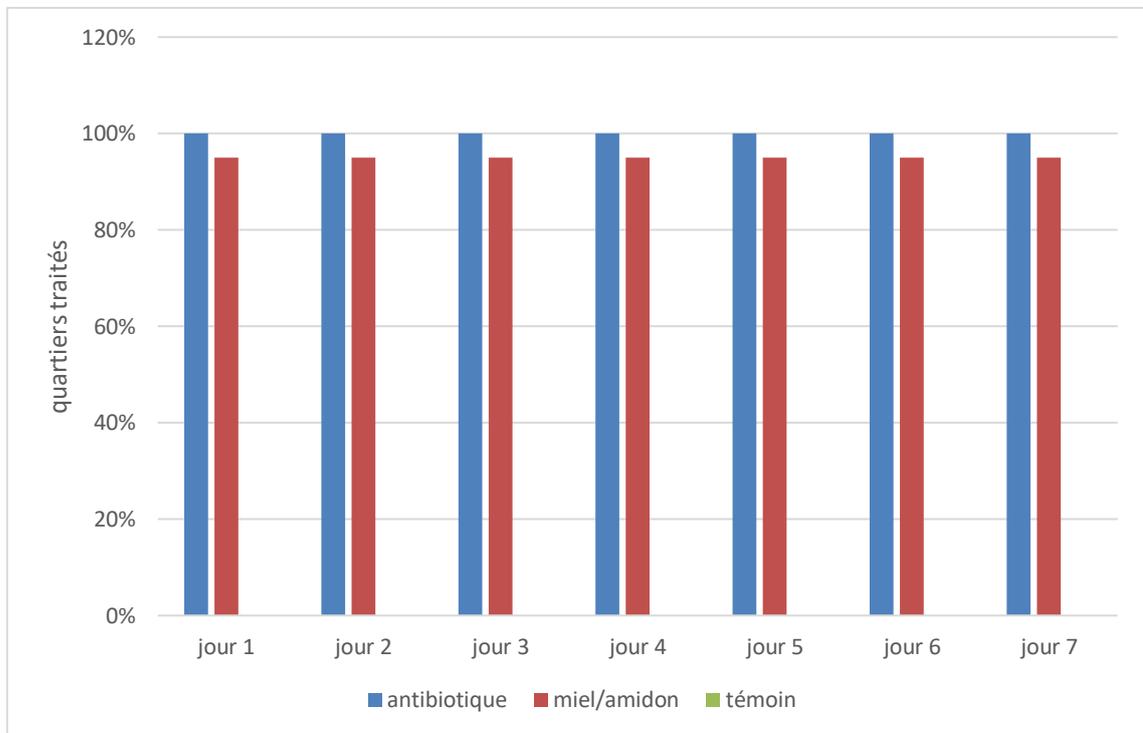
Les brebis du groupe "témoin" non guéries ont été ensuite écartées de l'expérimentation pour être traitées.

### 3.3.1.4. Appréciation bactériologique :

#### A. Quartiers traités par l'antibiotique :

Le 1<sup>er</sup> jour et jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour après le début du traitement, 100 % des prélèvements de lait donnaient des cultures bactériologiques négatives (tableau 3.2).

La figure 3.15 démontre l'évolution du taux de guérison bactériologique chez les différents quartiers mammaires après l'utilisation des traitements.



**Figure 3.13 :** Evolution des taux de guérison bactériologique des pis mammaires après l'administration des traitements.

#### B. Quartiers traités par miel/amidon :

Le 1<sup>er</sup> jour et jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour après le début du traitement, 95 % des prélèvements de lait étaient négatifs à la culture bactériologique (tableau 3.3 ; figure 3.15).

Nous avons donc signalé que 5 % des quartiers, qui ne sont cliniquement pas guéris, avaient des cultures bactériologiques positives même au 7<sup>ème</sup> jour (tableau 3.3 ; figure 3.15).

### C. Quartiers non traités (lot "témoin") :

Le 7<sup>ème</sup> jour après l'induction de la mammite, aucun quartier n'a eu une culture bactériologique négative (taux de guérison bactériologique de 0 %) (tableau 3.4 ; figure 3.15).

### 3.3.2. Utilisation des critères de guérison d'une mammite clinique :

#### 3.3.2.1. Guérisons clinique et cellulaire :

1. Absence d'échecs cliniques ou de rechutes suite au traitement : le suivi de la guérison clinique a montré que 100 % des quartiers traités par la formule conventionnelle et 95 % des quartiers traités par la formule alternative se sont cliniquement rétablis sans aucune aggravation clinique et avec reprise de la production lactée initiale au bout de 6 jours après la mise en route des traitements (tableau 3.5).

Un mois plus tard, aucun signe clinique local ou fonctionnel évoquant une mammite clinique n'a été signalé (absence de récurrences) (tableau 3.5).

2. Résultats de guérison cellulaire : les CMT étaient négatifs chez 100 % des quartiers traités par le traitement antibiotique à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine après le début du traitement (absence de mammite subclinique), tandis qu'ils étaient positifs chez 100 % des quartiers traités par la formule alternative (taux cellulaire élevé renseignant ainsi sur la présence de mammite subclinique) (tableau 3.5).

**Tableau 3.6** : Critères objectifs de l'efficacité des traitements des mammites cliniques.

	<b>Taux d'échecs et de rechutes</b>	<b>Niveau de guérison cellulaire</b>
<b>Formule conventionnelle</b>	0 %	100 %
<b>Formule alternative</b>	5 %	0 %

#### 3.3.2.2. Guérison bactériologique :

Au bout du suivi bactériologique, nous avons enregistré que 100 % des quartiers traités par la formule antibiotique et 95 % des quartiers traités par le traitement naturel étaient bactériologiquement négatifs dès le 1<sup>er</sup> jour et jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour après le début des traitements.

A la lumière de ces résultats, le protocole thérapeutique conventionnel était efficace chez 100 % des quartiers traités, et le protocole thérapeutique alternatif était cliniquement et bactériologiquement efficace chez 95 % des quartiers traités, mais avec persistance éventuelle de mammite subclinique.

#### 3.3.3. Analyse statistique :

Une différence très significative ( $p < 0,0001$ ) a été trouvée entre les trois groupes d'animaux : "antibiotique", "miel/amidon" et "témoin" (tableau 3.6), entre le groupe "antibiotique" et le groupe "témoin", et entre le groupe "miel/amidon" et le groupe "témoin" (tableau 3.7) ; concernant l'évolution des critères de guérison : clinique, zootechnique et bactériologique au cours des 7 jours après le début du traitement.

**Tableau 3.7** : Estimations de Kaplan Meier du temps médian de guérison avec des IC (Intervalles de Confiance) à 95 % pour chaque paramètre dans les trois groupes de brebis atteintes de mammite.

Paramètres	Groupes	n	Événement (récupération)	Médiane (temps de récupération)	0.95LCL	0.95UCL	Valeur P
<b>Guérison bactériologique</b>	Témoin	40	0	NA	NA	NA	< 0,0001
	Antibiotique	40	40	1	NA	NA	
	Miel	40	38	1	1	1	
<b>Guérison zooteknique</b>	Témoin	40	0	NA	NA	NA	< 0,0001
	Antibiotique	40	40	4	4	4	
	Miel	40	38	3	3	3	
<b>Guérison clinique</b>	Témoin	40	0	NA	NA	NA	< 0,0001
	Antibiotique	40	40	4	4	5	
	Miel	40	38	3	3	4	

Il y avait une différence significative entre le groupe "antibiotique" et le groupe "miel/amidon" concernant la guérison clinique ( $p = 0,01$ ) et la guérison zooteknique ( $p = 0,00035$ ) au cours des 7 jours après le début du traitement, mais aucune différence significative ( $p = 0,46$ ) n'y a été trouvée entre ces deux groupes à propos de la guérison bactériologique (tableau 3.7).

**Tableau 3.8** : Comparaisons par paires à l'aide du test Log-Rank (méthode d'ajustement de la valeur p : l'ajustement de Bonferroni).

<b>Paramètres</b>	<b>Groupes</b>	<b>Témoïn</b>	<b>Miel</b>
<b>Guérison bactériologique</b>	Miel	p < 0,0001	-
	Antibiotique	p < 0,0001	p = 0,46
<b>Guérison zootechnique</b>	Miel	p < 0,0001	-
	Antibiotique	p < 0,0001	p = 0.00035
<b>Guérison clinique</b>	Miel	p < 0,0001	-
	Antibiotique	p < 0,0001	p = 0.01

Le 7<sup>ème</sup> jour, nous avons constaté une différence significative ( $p < 0,0001$ ) entre les 3 groupes, concernant les différents critères de guérison : clinique, zootechnique et bactériologique. Néanmoins, aucune différence significative n'a été constatée entre le groupe "antibiotique" et le groupe "miel/amidon", renseignant sur une efficacité similaire des 2 traitements mis en œuvre.

### 3.4. Discussion :

#### 3.4.1. Appréciation de l'efficacité des traitements conventionnel et alternatif :

##### 3.4.1.1. Quartiers traités par l'antibiotique :

###### A. Appréciation clinique et zootechnique :

Tous les quartiers traités par l'antibiotique ont démontré une guérison clinique et zootechnique, soit un taux de guérison de 100 % ; ils sont cliniquement guéris et ont repris leur sécrétion laitière initiale.

La bibliographie compte plus de recommandations générales et d'observations cliniques (sans lots témoins) que d'essais contrôlés (études cas-témoin). En l'absence d'essai contrôlé, il n'est pas possible de présenter de résultats de guérison clinique ou même bactériologique chez la brebis ; des observations cliniques font état de « récupération », sans que les critères d'appréciation soient toujours clairement définis [8], et seules des observations cliniques qui témoignent de l'efficacité présumée des antibiotiques (destinés aux bovins) chez les brebis [34].

*In vivo*, nos résultats étaient plus ou moins conformes à ceux trouvés par ALEKISH *et al.* qui ont traité 5 brebis atteintes d'une mammite subclinique (CMT positif et CCS élevé) par un injecteur intramammaire de 3 ml d'Amoxicilline (**Synulox<sup>®</sup>, Pfizer Animal Health, UK**), une injection toutes les 12 heures pendant 3 jours successivement. Ils ont constaté, 24 heures et 48 heures après l'arrêt du traitement, chez 100 % des brebis traitées une diminution significative des cellules somatiques du lait, indiquant des effets thérapeutiques potentiels de l'Amoxicilline contre la mammite ovine, ils ont aussi constaté une augmentation significative des pourcentages de la matière grasse et du lactose dans le lait, indiquant une amélioration de la santé du pis et de la qualité du lait [74].

A l'opposé, notre résultat n'était pas concordant avec celui de MONSALLIER et THOMASSON, dont leur étude a démontré un taux de guérison à 7 jours d'une mammite bovine aiguë à *S. aureus*, traitée par la combinaison Amoxicilline / acide clavulanique / Prednisolone (**Synulox Intramammaire<sup>®</sup>, Haupt Pharma Latina S.r.l. ; Italie**), de 86 % [75].

Cette différence de résultats pourrait être due à la différence de plusieurs paramètres : le protocole thérapeutique (dose, durée et utilisation de l'Amoxicilline en monothérapie ou en association avec d'autres principes actifs), l'espèce animale atteinte de mammite (ovine ou bovine), l'effectif d'animaux d'expérimentation, type de mammite (aiguë ou subclinique) et l'espèce et la souche des bactéries incriminées dans la mammite.

#### B. Appréciation cellulaire :

Tous les quartiers traités par l'antibiotique ont donné des CMT négatifs, soit un taux de guérison de 100 %. La guérison cellulaire a été tardive, soit la 3<sup>ème</sup> semaine après le début du traitement, et 2 semaines après la guérison clinique, zootechnique et bactériologique.

En effet, le CMT doit être répété en prenant garde de respecter un délai pour le réaliser, car les cellules diminuent tardivement après la guérison clinique [6].

#### C. Appréciation bactériologique :

Tous les quartiers traités par l'antibiotique ont démontré une guérison bactériologique, soit un taux de guérison de 100 %.

La souche de *S. aureus* qui a été utilisée dans notre expérimentation était donc sensible au traitement antibiotique choisi. Les  $\beta$ -lactamines sont fréquemment utilisés pour le traitement des mammites [76]. Une telle sensibilité de *S. aureus* responsable de mammites ovine [77] ; [78], bovine [78] ; [79] et caprine [76] ; [80] ; [81] aux  $\beta$ -lactamines a été rapportée.

La guérison bactériologique de tous les quartiers était précoce, soit 24 heures après le début du traitement :

Cela s'avère raisonnable vu la rapidité et la puissance de l'effet bactéricide du traitement [75] et sa diffusion rendue facile dans tous les tissus par la présence

d'un corticoïde qui provoque une résorption très rapide de l'antibiotique du tissu mammaire vers le sang [6] ; [75]. Nous avons choisi une préparation pourvue d'un anti-inflammatoire (Prednisolone), car le miel est doué également d'une propriété anti-inflammatoire [12] ; [58] ; [59] ; [60] ; souhaitant avoir équivalence et similarité d'action des deux traitements conventionnel et alternatif mis en œuvre.

Dans un cas de mammite clinique impliquant un gonflement important de la mamelle, un traitement concomitant avec un agent anti-inflammatoire pour favoriser une meilleure pénétration du traitement dans toute la mamelle serait utile [82].

L'installation précoce du traitement joue un rôle important dans son efficacité, dont il a été administré 48 heures après l'induction de la mammite. La précocité du traitement est un impératif absolu car la colonisation totale de la mamelle est un phénomène très rapide lors de la contamination d'un quartier. Pour *S. aureus*, sa présence a été montrée dans le tissu profond mammaire dès le 3<sup>ème</sup> jour après le début de l'infection [6].

Le traitement antibiotique administré qui est probablement massif pourrait aussi être à l'origine de ce résultat. En effet, il n'existe pas, actuellement, de préparations commerciales de traitement intramammaire possédant une AMM chez les petits ruminants [8], les préparations antibiotiques intramammaires faisant l'objet d'une AMM pour les petits ruminants sont très rares, voire inexistantes [34] ; les éleveurs ne peuvent donc utiliser que des produits destinés à la vache [8].

Par ailleurs, l'antibiogramme réalisé a aussi démontré une grande sensibilité du *S. aureus* au traitement antibiotique utilisé, dont le diamètre de la zone d'inhibition était de 24 mm. MONSALLIER et THOMASSON ont montré, dans une étude menée sur 339 souches de *Staphylococcus aureus*, un taux de sensibilité à **SYNULOX INTRAMAMMAIRE**<sup>®</sup> de 100 % [75].

### 3.4.1.2. Quartiers traités par miel/amidon :

#### A. Appréciation clinique et zootechnique :

Nous avons enregistré un taux de guérison clinique et zootechnique de 95 % des quartiers traités par la formule alternative, dont ils sont cliniquement guéris et ont repris leur sécrétion laitière initiale.

La mammite staphylococcique induite a bien répondu à notre traitement alternatif à base de miel. Il paraît que la mammite clinique répond bien plus probablement au miel lorsque les bactéries impliquées ne sont pas particulièrement invasives des tissus (œdème et rougeur mammaires non significatifs), comme le cas de certains staphylocoques [82].

L'application réussie du miel dans le traitement de certaines infections est confirmée par les rapports publiés de nombreux chercheurs [83] ; [84] ; [85] ; [86] ; [87], et son application sur des plaies infectées par *Staphylococcus aureus* et d'autres staphylocoques aboutit à leur aseptie en quelques jours et guérissent promptement [12] ; [42] ; [43] ; [71].

*In vivo*, notre résultat n'était pas en accord avec ceux trouvés par d'autres auteurs qui ont traité des vaches atteintes de mammites subcliniques par le miel. THATCHER et ses collaborateurs ont injecté 5 ml de miel de manuka une fois par jour pendant 4 à 6 jours successivement chez 11 vaches en tarissement. Une guérison cellulaire initiale de 72.72 % a été enregistrée dans les 10 jours suivant le traitement. Un retour de CCS élevés chez 62.5 % de ces vaches a été constaté plus tard dans la saison indiquant que la réponse était uniquement temporaire, enregistrant ainsi une guérison cellulaire finale de 27.27 % [82].

Il semblait que le type de mammite (clinique et subclinique) le plus susceptible de bien répondre au miel de manuka était celui impliquant des organismes qui n'étaient pas particulièrement invasifs de tissu. La plupart des souches de *Streptococcus uberis* et certains staphylocoques entraient dans cette catégorie. Cependant, les taux de guérison étaient encore relativement faibles. Cette étude avait de résultats décevants, indiquant que l'action du miel dans la mamelle était probablement de durée assez courte [82].

NAHED *et al.* ont injecté 10 ml de miel de fenouil à 10 % chez 10 vaches une fois par jour pendant 3 jours successivement, et chez 15 vaches jour par jour pour 3 doses successives avec une administration intramusculaire d'un antihistaminique. Tous les prélèvements du lait ont eu une diminution du nombre total de bactéries le 3<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour, et le pourcentage de réduction était de 99.6 et 99.8 %, respectivement ; mais, en se basant sur d'autres critères de guérison (cytologie du lait, production laitière...), ils ont conclu que le 2<sup>ème</sup> protocole pourrait être utilisé pour traiter la mammite subclinique bovine [88].

BENHANIFIA et ses collaborateurs ont traité 3 vaches atteintes de mammites subcliniques à *S. aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, en injectant 5 ml de miel multifloral pur (non dilué) une fois par jour pendant 2 jours consécutifs. Ils ont constaté que 2 vaches (66.6 %) sont guéries le 7<sup>ème</sup> jour après le début du traitement et 3 vaches (100 %) le 21<sup>ème</sup> jour pour *S. aureus* ; 2 vaches (66.6 %) le 21<sup>ème</sup> jour pour *Pseudomonas aeruginosa* [89].

ABDELHAFEEZ *et al.* ont démontré une diminution significative du nombre total de bactéries et une augmentation très significative de la production laitière suite à une infusion intramammaire par le miel de fenouil [90].

Ces résultats hautement variables pourraient être dus à la différence de plusieurs facteurs à savoir le protocole thérapeutique (dose, concentration, durée et utilisation du miel en monothérapie ou en combinaison avec d'autres substances), l'origine botanique du miel utilisé, l'espèce et la souche des bactéries incriminées dans la mammite, type de mammite (aiguë ou subclinique), l'espèce animale atteinte de mammite (ovine ou bovine) et l'effectif d'animaux d'expérimentation.

Le 1<sup>er</sup> jour après le début du traitement alternatif, le lait était liquéfié et de couleur marron (couleur du miel) et n'a repris ses qualités initiales que 48 heures après l'arrêt du traitement. Cela pourrait être imputé à l'effet osmotique exercé localement par le miel au niveau de la mamelle, qui est vraisemblablement à l'origine de la liquéfaction et la coloration marron du lait. En effet, son osmolarité (capacité à extraire l'eau des cellules vivantes), conséquente à sa forte teneur en sucre, favorise l'exsudation en générant un flux de liquides sanguin et lymphatique vers l'extérieur [12] ; [48] ; [49].

Le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> jour après le début du traitement alternatif, tous les quartiers avaient une sécrétion laitière de quantité approximativement normale, elle était donc équivalente à une quantité diminuée (biais de l'effet osmotique du miel) ; à partir du 3<sup>ème</sup> jour, une augmentation légère de la production laitière par rapport à la production initiale a été constatée chez 75 % des quartiers, équivalant alors à une quantité normale (biais de l'effet osmotique du miel). A partir du 5<sup>ème</sup> jour, soit 48 heures après l'arrêt du traitement, 95 % des quartiers ont repris leur production laitière normale. Ceci pourrait s'expliquer également par l'effet osmotique du miel. L'exsudation qu'il génère au niveau de la mamelle serait à l'origine de l'augmentation de la production laitière [12] ; [48] ; [49]. Une telle augmentation de la production laitière suite à l'application intramammaire du miel a été constatée par NAHED *et al.* [88] et ABDEL-HAFEEZ *et al.* [90].

#### B. Appréciation cellulaire :

Aucun quartier traité par le traitement alternatif n'a eu une guérison cellulaire même un mois après la mise en œuvre du traitement. Les CMT réalisés pour les quartiers traités par le traitement alternatif étaient positifs la 4<sup>ème</sup> semaine après le début du traitement, soit 3 semaines après la guérison clinique, zootechnique et bactériologique.

Ces réactions ne peuvent pas être tenues en compte, puisque le CMT donne des résultats extrêmement faux par excès [88] ; [91] ; [92]. Il a été prouvé que le miel était un agent immuno-modulateur, ce qui est dû à la présence de certains composants biologiques et antioxydants [93] ; [94]. Notre résultat était en accord avec ceux de NAHED *et al.* qui ont réalisé un CMT chez toutes les vaches avant le traitement des mammites par le miel, des scores allant du T (trace) aux ++ve ont été retenus, alors que, après le traitement, des réactions extrêmement positives (+++ve) ont été observées. Ces résultats ont été considérés comme réactions faussement positives, car l'infusion du miel est associée à une augmentation significative du pourcentage de lymphocytes [88]. Les mêmes résultats ont été enregistrés par ABDEL-HAFEEZ *et al.* et ont persisté pour 3 mois après l'infusion intramammaire du miel [90].

### C. Appréciation bactériologique :

Notre étude a montré que tous les quartiers traités par la formule alternative sont bactériologiquement guéris, soit un taux de guérison de 95 %.

Les résultats discutés dans le présent document indiquent clairement que le miel testé était sûr et efficace, et avait un fort effet antibactérien contre *S. aureus*. Nos résultats étaient en accord avec ceux rapportés par ABDALHAMED *et al.* [95].

Les propriétés antiseptiques et antibactériennes du miel sont connues depuis les temps immémoriaux [12] ; [42] ; [43] ; [71]. Une étude néozélandaise a montré que le miel inhibe la croissance des bactéries les plus fréquemment impliquées dans les mammites bovines, y compris *S. aureus* [12] ; [13]. Il est documenté et prouvé que *S. aureus* est l'espèce la plus sensible à l'activité antimicrobienne du miel, toutes les souches bactériennes étudiées [96] ; [97].

Plusieurs auteurs ont étudié l'activité antibactérienne *in vitro* de différents types de miel et ont trouvé que *S. aureus* était bien inhibé [48] ; [98] ; [99] ; [100]. Le miel a une puissante activité *in vitro* contre les bactéries [44] ; [86]. COOPER *et al.* ont réalisé une étude qui avait démontré l'efficacité *in vitro* du miel de manuka et du miel pasteurisé sur une souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la Méthicilline [99]. MULLAI et MENON ont évalué l'activité antibactérienne de différents types de miel (miel de manuka, miel de bruyère et miel indien commercialisé localement) et ont découvert que le miel local (Khadikraft) produisait la meilleure activité contre *P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. aureus* [71].

Le miel égyptien a un certain effet sur les micro-organismes isolés de la mammite clinique des moutons à différentes concentrations, dont *S. aureus* était le microbe le plus touché [95]. ALANDEJANI *et al.* ont aussi démontré que le miel était efficace pour tuer les biofilms bactériens de *Staphylococcus aureus* [101].

La guérison bactériologique de tous les quartiers était rapide, soit 24 heures après le début du traitement :

La précocité de l'installation du traitement [6] et la diffusion très rapide du miel due à son effet anti-inflammatoire [12] ; [58] ; [59] ; [60] sont à prendre en considération pour expliquer ce résultat spectaculaire.

Le traitement alternatif utilisé pourrait également être massif et de durée largement suffisante. Les protocoles thérapeutiques standardisés pour notre formule alternative étaient quasi absents. Cependant, certains chercheurs ont proposé des protocoles thérapeutiques par le miel en monothérapie pour le traitement des mammites subcliniques chez la vache [82] ; [88] ; [89].

L'effet synergique efficace *in vitro* de l'amidon et du miel contre *Staphylococcus aureus* a été déjà révélé [11]. Plusieurs autres études ont démontré *in vitro* une activité additive et synergique du miel et de l'amidon contre *Candida albicans*, *Aspergillus niger* et *Pseudomonas aeruginosa* [102] ; [103] ; [104], du miel et de la gelée royale contre *S. aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* [105] ; [106], de l'amidon et de la gelée royale contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* [9]. En plus, l'activité antimicrobienne du miel de fenouil pourrait être maximisée par l'ajout de 10 % de poudre de propolis [107].

Dans la présente étude, nous avons remarqué que la formule alternative testée présentait une forte activité antimicrobienne. En effet, la croissance de *S. aureus* en était complètement inhibée à une concentration de 7 % (v/v). Le résultat de notre étude était en accord avec d'autres auteurs [69] ; [89] ; [95] ; [105] ; [108] ; [109] ; [110] ; [111] ; [112].

L'activité antibactérienne du miel testé est plus significative que celle d'autres variétés de miels testés en monothérapie : 10 % (miel à activité antibactérienne peroxydasique) [13] ; [48] ; [112] ; [113], 10 - 20 % [42], 12,5 % (miel égyptien) [90], 13,3 % (miel de fenouil) [107], de 20,83 % (miel de trèfle) à 33,33 % (miel de fenouil) dont plusieurs variétés de miels ont été testées [114], 25 - 30 % [100], 40 % ou plus [115], 8 - 50 % ou plus (miels de différentes origines botaniques et géographiques) [69] ; [109] ; [110] ; [114], 20 - 80 % [85], 25 - 50 % [114], 8 - 11 % [111] ; [112] et plus de 10 % (miel artificiel vis-à-vis de *S. aureus*) [13] ; [113]. Bourabah et co-auteurs ont constaté que le miel algérien (récolté à Tiaret) était efficace contre différents agents pathogènes isolés de la mammite

subclinique de chèvre, à une concentration variant de 11 à 14 %. Ce miel a montré une activité plus élevée contre *S. aureus* ( $13,25 \pm 0,95$  %) [80].

L'activité antibactérienne du miel algérien testé reste moins significative que celle d'autres variétés de miels utilisés en monothérapie : moins de 1,8 % à 6 % [111] ; [112], 3 - 6 % voire moins (miels de différentes origines botaniques et géographiques) [69] ; [109] ; [110] ; [114], 4 - 5 % [116], 5 % (miel malais) [117], 5 % (miel à activité antibactérienne peroxydasique et miel de manuka à activité antibactérienne non-peroxydasique) [13] ; [48] ; [112] ; [113], 6 % (miel de manuka de RU) [118], 6,25 % (miel éthiopien) [119] et 1 - 5 % (miel de manuka et miel à activité antibactérienne peroxydasique vis-à-vis de *S. aureus*) [13] ; [113].

De nombreux rapports de la littérature et études ont révélé que les miels provenant de différentes zones géographiques (pays et régions) présentaient une grande variabilité de leurs activités antimicrobiennes [69] ; [109] ; [110]. En effet, le miel est produit à partir de différentes sources et son efficacité contre les microbes dépend de ses types, ses sources et sa concentration [120]. Cela pourrait être attribué aux matières premières utilisées par les abeilles pour préparer leur précieux miel [69].

Le miel a une activité antibactérienne de nature multifactorielle [47], qui pourrait être due à l'action combinée de propriétés physiques et chimiques [12]. En effet, elle pourrait être due à plusieurs facteurs comprenant l'effet osmotique du miel [12] ; [47] ; [48] ; [49] ; [50] ; [51] ; [121] et la présence du  $H_2O_2$  [12] ; [42] ; [47] ; [48] ; [52] ; [120] ; [122]. Selon MOLAN, le  $H_2O_2$  et la haute osmolarité sont les seuls facteurs antibactériens caractérisés dans le miel [47]. En fait, ses teneurs élevées en sucre (environ 80 %) créent une pression osmotique élevée qui est défavorable à la croissance et à la prolifération bactériennes [47] ; [123].

L'acidité du miel est aussi incriminée [12] ; [123]. Le miel a un pH acide, allant de 4,31 à 6,02, qui joue un rôle dans l'inhibition microbienne [123].

L'action antibactérienne du miel est également liée à la présence de substances non peroxydasiques [47] ; [122], d'autres facteurs antibactériens comme la propolis qui contient des flavonoïdes [50] ; [69], les acides phénoliques [54], la défensine-1 [42], l'acide gluconique qui provient de la dissolution du sucre

par la gluco-oxydase du miel [120], certains composants biologiques et antioxydants (agents immuno-modulateurs) [93] ; [94] et certaines huiles essentielles extraites des plantes butinées par les abeilles [42].

Le miel égyptien a un effet inhibiteur qui pourrait être dû à sa composition complexe comprenant le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'enzyme glucose oxydase dérivée d'abeille qui a un effet bactéricide et des composés actifs tels que les alcaloïdes et les flavones [95]. Ceci est en accord avec NELSON *et al.* [124] et SAAD *et al.* [125]. Le miel égyptien est composé d'oligosaccharides, de glycopeptides, de phénol, d'acides gras, de lipides, d'amylases, d'acide ascorbique, de peroxydases et de fructose, tous ces éléments se potentialisent mutuellement en tant qu'agents antimicrobiens [69].

L'effet antibactérien du miel néo-zélandais est très fort bien qu'il ne contienne pas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou de gluco-oxydase [126]. Une étude récente a rapporté que le composé du miel responsable d'une activité antibactérienne plus élevée est le MGO dont des concentrations élevées ont été trouvées [126] ; [127] ; [128]. Le MGO est efficace contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, avec un effet inhibiteur allant de 85,7 % à 100 % [126]. Enfin, le miel a une valeur thérapeutique certaine, bien que difficilement explicable dans certains cas [42].

#### D. Echec du traitement alternatif :

Nous avons enregistré un taux d'échec du traitement alternatif de 5 %, dont les quartiers concernés ne sont pas guéris présentant toujours des abcès, du pus et des grumeaux, ainsi qu'une production laitière diminuée et une culture bactériologique positive au 7<sup>ème</sup> jour après le début du traitement.

*Staphylococcus aureus* est un agent pathogène contagieux [129] qui pourrait persister dans les glandes mammaires et les canaux des trayons des animaux infectés [130]. Il possède des mécanismes adaptatifs qui lui permettent d'être excrété dans la mamelle et provoquent des infections intramammaires [129]. En plus, il a des facteurs de virulence qui peuvent l'aider à s'échapper aux

défenses immunitaires de l'hôte, à résister aux traitements antibiotiques et à augmenter la gravité de ces infections [131] ; [132].

Cette bactérie a une très grande tendance à l'internalisation le plus profondément dans les tissus mammaires grâce à son système enzymatique performant et très développé [6]. En effet, elle a la particularité de s'enkyster dans le tissu mammaire et former de fibrose, des biofilms et des micro-abcès, à l'origine de mammites chroniques [6] ; [8] ; [24] ; [133] ; [134]. Elle a la capacité d'être entourée de la paroi du tissu cicatriciel, d'y être abritée [82], aussi de se mettre à l'abri et de se soustraire dans des micro-abcès et dans les cellules du système immunitaire. Nous pouvons alors la détecter non seulement dans le lait mais également dans les cellules, qu'il s'agisse de cellules épithéliales ou de globules blancs, ainsi que dans des micro-abcès. Cette situation lui permet d'échapper facilement à tous les moyens de défense, qu'ils soient naturels ou thérapeutiques, et est parfois très difficile à être éliminée après un traitement en lactation [6] ; [8] ; [24] ; [82].

Pour toutes ces raisons, certaines mammites chroniques pourraient ne pas bien répondre aux antibiotiques [82]. En plus, les bactéries associées aux biofilms pourraient présenter une résistance innée aux antibiotiques et aux désinfectants par les mécanismes de défense de l'hôte, ce qui est considéré comme un contributeur potentiel à la mauvaise réponse de *S. aureus* chronique au traitement antibactérien [135] et peut persister pour toute la vie de l'animal [131].

En présence d'abcès dans les quartiers non guéris, il s'avère raisonnable de supposer que l'activité du miel pourrait être limitée par les mêmes facteurs qui limitent l'efficacité des antibiotiques dans ces cas [82].

### 3.4.2. Utilisation des critères de guérison d'une mammite clinique :

#### 3.4.2.1. Guérisons clinique et cellulaire :

1. Absence d'échecs cliniques ou de rechutes suite au traitement : la guérison clinique qui a significativement été constatée chez 100 % des quartiers traités par le traitement conventionnel et 95 % des quartiers traités par le traitement alternatif

(taux d'échec < 15 %) sans aggravation renseigne sur l'efficacité des traitements utilisés. Un autre élément qui vient de confirmer le succès de ceux-ci est l'absence de rechute un mois plus tard [6].

2. Résultats de guérison cellulaire : la négativité des CMT des quartiers traités par le traitement conventionnel à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine après le début du traitement renseigne sur l'absence de mammite subclinique et étaye l'efficacité du traitement. Les CMT des quartiers traités par le traitement alternatif étaient positifs (taux de guérison cellulaire < 70 %), néanmoins ces résultats ne seront pas pris en considération car ils pourraient être des faux positifs [88] ; [90] ; [91] ; [92].

#### 3.4.2.2. Guérison bactériologique :

L'efficacité de nos traitements est corroborée par la guérison bactériologique de tous les quartiers qui ont déjà éprouvé une guérison clinique et cellulaire.

#### 3.4.3. Comparaison entre l'efficacité des traitements conventionnel et alternatif :

Notre étude montre un taux de guérison de 100 % et de 95 % des quartiers traités par le traitement conventionnel et le traitement alternatif, respectivement. De point de vue expérimental, la formule conventionnelle vient à bout de la mammite staphylococcique aiguë et l'emporte sur la formule alternative, elle en a donc le dessus ; néanmoins, d'après notre étude, le traitement alternatif a aussi donné de bons résultats qui étaient globalement satisfaisants. En effet, il a montré une guérison clinique et zootechnique plus rapide, plus précoce et donc plus satisfaisante que celle du traitement conventionnel.

Le traitement antibiotique présente des inconvénients : d'une part son coût élevé, et d'autre part, le lait ne peut pas être commercialisé avant la disparition de toute trace d'antibiotique, car cela favoriserait le développement de souches bactériennes antibiorésistantes [12] ; par contre, l'utilisation du miel présente un

double avantage : le miel est peu onéreux et le lait n'est pas pollué par des résidus thérapeutiques [12] ; [13].

La rentabilité économique du traitement des mammites chez la brebis doit être prise en compte [8] ; [34]. En effet, les frais à engager sont parfois élevés par rapport à la valeur de l'animal et les chances de guérison ne sont pas garanties [34]. Le miel peut être produit sur place, ce qui permet une indépendance totale. Il est caractérisé par la facilité de production, de conservation et d'utilisation. Il s'agit d'une substance facile à produire dont l'élevage des abeilles est relativement simple ne nécessitant pas un équipement coûteux, et sa récolte est facile ne nécessitant pas de transformations compliquées.

C'est une denrée qui se conserve bien si elle a été extraite dans de bonnes conditions. Son utilisation thérapeutique est simple ne nécessitant pas de transformations majeures pour être utilisable (aucune formation ni infrastructure particulières). Toutes ces qualités font du miel un produit utilisable partout, par tous et pour tous, en faisant une thérapeutique idéale aussi bien dans les pays en voie de développement où le manque cruel des médicaments et le faible coût des traitements mellifères constitue un atout majeur, que dans les pays développés où les économies en matière de santé sont devenues le maître mot [12] ; [13].

L'intérêt économique le plus clair de l'infusion intramammaire alternative est son innocuité quasi parfaite, car le miel présente très peu d'effets indésirables. Le lait provenant des animaux traités par le miel lors de mammites ne contient pas de résidus indésirables comme avec les antibiotiques, il n'y a donc pas un temps d'attente [12] ; [88] ; [89], sachant que le mérite économique le plus évident de l'infusion intramammaire de miel est qu'il n'y a aucun rejet de lait [88]. En effet, le lait doit être jeté pendant 5 à 8 jours [136] ou 5 à 9 jours [137] en raison du risque de la présence de résidus chimiques [88]. De plus, son utilisation récurrente n'engendre aucune résistance microbienne, il pourrait donc être un bon choix pour le traitement des mammites [89] et il représente une des rares alternatives et vient au premier plan de celles-ci pour lutter contre les bactéries antibiorésistantes, y compris *Staphylococcus aureus*, qui émergent de plus en plus au fil du temps [42] ; [43] ; [99].

De surcroît, le miel est inoffensif aux tissus [89] et il est intéressant de souligner qu'il n'existe aucune interaction entre le miel et les médicaments [12] ; [88]. Le miel a l'avantage de ne provoquer aucun effet indésirable grave. Les allergies et les intolérances sont extrêmement rares [138].

Quoi que le traitement conventionnel ait prouvé son efficacité et ait eu le dessus sur le traitement alternatif ; en reconsidérant les effets indésirables des antibiotiques, notamment leur impact sur la santé publique en favorisant l'apparition des bactéries antibiorésistantes qui est un problème mondial et en tenant compte de très grand champ d'application du miel, à la fois préventif et curatif, antiseptique et antibiotique, de sa grande efficacité dans de nombreuses indications, de sa facilité de mise en œuvre, de son coût relativement faible, de sa parfaite innocuité et de l'absence d'effets secondaires (temps d'attente, présence de résidus dans le lait et apparition d'antibiorésistances bactériennes), contre-indications ou incompatibilité ; cet aspect joue indéniablement en faveur d'une utilisation élargie du miel [13] qui, avec ses superbes avantages, représente une possibilité thérapeutique de premier plan et apparaît donc comme une alternative intéressante à l'antibiothérapie pour traiter les mammites [12].

Il nous semble donc rationnel de conclure que le traitement alternatif aurait l'avantage et une nette supériorité sur le traitement conventionnel, et que son utilisation serait réactualisée dans des délais ultérieurs.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre expérimentation est une association d'une étude *in vitro* associée à une étude *in vivo* qui cherche à valoriser l'effet synergique *in vitro* du miel et de l'amidon vis-à-vis de *S. aureus*, et à trouver la possibilité d'utiliser cette combinaison comme un traitement antibactérien des mammites cliniques staphylococciques *in vivo* ; l'objectif de cette étude est aussi d'établir une comparaison entre l'efficacité de ce traitement alternatif et celle d'un traitement antibiotique conventionnel.

Le traitement alternatif (miel/amidon) testé a donné des résultats très satisfaisants, il a montré une guérison clinique, zootechnique et bactériologique des mamelles avec un pourcentage élevé d'efficacité. A noter que l'amélioration clinique et zootechnique des quartiers traités par le traitement alternatif était plus rapide que celle des quartiers traités par l'antibiotique. Le miel est un traitement naturel peu onéreux et n'a pas de délais d'attente, car il ne laisse pas des résidus dans le lait. En plus, il n'engendre pas de résistances bactériennes.

Il apparaît maintenant que le miel ne constitue pas seulement un aliment excellent, mais il a aussi une valeur thérapeutique certaine et pourrait apporter une contribution essentielle à un problème mondial de santé animale et humaine dans le domaine d'enrichir l'arsenal thérapeutique à notre disposition.

Le miel pourrait être donc une alternative intéressante à l'antibiothérapie dans la thérapeutique des mammites cliniques des brebis.

Même si tous les mystères du miel n'ont pas encore été élucidés, nos résultats sont encourageants pour accepter l'idée que c'est un remède efficace et qu'il offre de formidables perspectives.

Les résultats de notre étude seront des arguments consistants pour les détracteurs de cette thérapeutique. Il faudrait beaucoup d'études ultérieures pour prouver encore son efficacité.

Nos résultats prometteurs devraient inciter à entreprendre d'autres recherches plus approfondies, à savoir :

- L'étude *in vivo* de l'efficacité de cette formule alternative dans le traitement des mammites staphylococciques chez les bovins ;
- L'étude *in vivo* de l'efficacité de cette formule alternative dans le traitement des mammites dues à d'autres agents pathogènes chez les ovins et chez les bovins.

Toutefois, il est urgent d'agir et de protéger les cultures dont les abeilles se nourrissent. Il ne faudrait pas attendre que les abeilles disparaissent pour regretter les vertus du miel.

**APPENDICES****LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS**

<b>AINS</b>	: Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
<b>AIS</b>	: Anti-Inflammatoires Stéroïdiens
<b>AMM</b>	: Autorisation de Mise sur le Marché
<b>API</b>	: Analytical Profile Index ou Appareils et Procédés d'Identification
<b>ATCC</b>	: American Type Culture Collection
<b>BN</b>	: Bouillon Nutritif
<b>CCS</b>	: Comptage des Cellules Somatiques
<b>CHU</b>	: Centre Hospitalier Universitaire
<b>CLSI</b>	: Clinical and Laboratory Standard Institute
<b>CMI</b>	: Concentration Minimale Inhibitrice
<b>CMT</b>	: California Mastitis Test
<b>DO</b>	: Densité Optique
<b>E</b>	: Œstrogène
<b>GN</b>	: Gélose Nutritive
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Peroxyde d'hydrogène
<b>IC</b>	: Intervalle de Confiance
<b>IDF</b>	: International Dairy Federation
<b>INRA</b>	: Institut National de la Recherche Agronomique

<b>MGO</b>	: Méthylglyoxal
<b>MH</b>	: Mueller Hinton
<b>NCCLS</b>	: National Committee of Clinical Laboratory Standards
<b>NMC</b>	: National Mastitis Council
<b>PRL</b>	: Prolactine
<b>SCN</b>	: Staphylocoque à Coagulase Négative
<b>aw</b>	: Water Activity
<b>h</b>	: Heure
<b>pH</b>	: Potentiel d'Hydrogène
<b>spp.</b>	: <i>Species Plurimae</i>
<b>v/v</b>	: Volume/Volume

**EVOLUTION DE LA PRODUCTION LAITIERE (g) CHEZ LES BREBIS  
TRAITEES PAR AMOXICILLINE/ACIDE CLAVULANIQUE**

<b>N° brebis</b>	<b>Pré-ind</b>	<b>Post-ind</b>	<b>1<sup>er</sup> jr post-trt</b>	<b>2<sup>ème</sup> jr post-trt</b>	<b>3<sup>ème</sup> jr post-trt</b>	<b>4<sup>ème</sup> jr post-trt</b>	<b>5<sup>ème</sup> jr post-trt</b>	<b>6<sup>ème</sup> jr post-trt</b>	<b>7<sup>ème</sup> jr post-trt</b>
<b>1</b>	780	691	712	734	767	<b>780</b>	780	780	780
<b>2</b>	799	714	731	732	754	773	<b>799</b>	799	799
<b>3</b>	520	411	434	483	501	<b>520</b>	520	520	520
<b>4</b>	612	553	574	581	599	<b>612</b>	612	612	612
<b>5</b>	678	601	620	627	659	<b>678</b>	678	678	678
<b>6</b>	701	602	625	644	653	682	<b>701</b>	701	701
<b>7</b>	719	533	598	655	683	<b>719</b>	719	719	719
<b>8</b>	690	588	603	645	674	<b>690</b>	690	690	690
<b>9</b>	689	612	618	654	672	<b>689</b>	689	689	689
<b>10</b>	769	652	658	685	709	750	761	<b>769</b>	769
<b>11</b>	781	699	711	757	779	<b>781</b>	781	781	781
<b>12</b>	541	501	502	534	538	<b>541</b>	541	541	541
<b>13</b>	540	488	495	501	533	<b>540</b>	540	540	540
<b>14</b>	613	512	531	574	598	<b>613</b>	613	613	613
<b>15</b>	650	599	603	640	647	<b>650</b>	650	650	650
<b>16</b>	719	604	624	684	688	698	717	<b>719</b>	719
<b>17</b>	680	606	621	645	674	<b>680</b>	680	680	680
<b>18</b>	682	612	633	646	679	<b>682</b>	682	682	682
<b>19</b>	686	582	601	631	669	<b>686</b>	686	686	686
<b>20</b>	561	431	476	511	544	<b>561</b>	561	561	561

**Pré-ind** : Pré-induction = avant induction de mammites

**Post-ind** : Post-induction : après induction de mammites

**Post-trt** : Post-traitement = après traitement de mammites

**EVOLUTION DE LA PRODUCTION LAITIERE (g) CHEZ LES BREBIS  
TRAITEES PAR MIEL/AMIDON**

N° brebis	Pré-ind	Post-ind	1 <sup>er</sup> jr post-trt	2 <sup>ème</sup> jr post-trt	3 <sup>ème</sup> jr post-trt	4 <sup>ème</sup> jr post-trt	5 <sup>ème</sup> jr post-trt	6 <sup>ème</sup> jr post-trt	7 <sup>ème</sup> jr post-trt
1	702	634	642	666	687	<b>702</b>	702	702	702
2	688	621	651	662	<b>688</b>	688	688	688	688
3	589	523	534	561	<b>589</b>	589	589	589	589
4	715	662	671	678	691	699	<b>715</b>	715	715
5	687	611	650	651	<b>687</b>	687	687	687	687
6	591	522	546	580	<b>591</b>	591	591	591	591
7	714	634	643	671	<b>714</b>	714	714	714	714
8	710	655	679	699	<b>710</b>	710	710	710	710
9	749	688	692	698	706	715	723	727	731
10	713	684	696	703	<b>713</b>	713	713	713	713
11	679	611	645	656	<b>679</b>	679	679	679	679
12	701	645	656	671	<b>701</b>	701	701	701	701
13	699	612	659	682	<b>699</b>	699	699	699	699
14	698	613	661	673	<b>698</b>	698	698	698	698
15	601	509	565	590	<b>601</b>	601	601	601	601
16	597	521	534	579	<b>597</b>	597	597	597	597
17	560	421	452	489	511	533	<b>560</b>	560	560
18	714	666	684	698	<b>714</b>	714	714	714	714
19	721	667	683	697	706	<b>721</b>	721	721	721
20	701	632	677	697	<b>701</b>	701	701	701	701

**Pré-ind** : Pré-induction = avant induction de mammites

**Post-ind** : Post-induction : après induction de mammites

**Post-trt** : Post-traitement = après traitement de mammites

**EVOLUTION DE LA PRODUCTION LAITIERE (g) CHEZ LES BREBIS NON  
TRAITEES " TEMOIN "**

N° brebis	Pré-ind	Post-ind	1 <sup>er</sup> jr post-trt	2 <sup>ème</sup> jr post-trt	3 <sup>ème</sup> jr post-trt	4 <sup>ème</sup> jr post-trt	5 <sup>ème</sup> jr post-trt	6 <sup>ème</sup> jr post-trt	7 <sup>ème</sup> jr post-trt
1	791	703	685	611	567	511	451	322	321
2	665	555	502	480	422	399	382	314	299
3	699	601	566	523	482	421	354	324	281
4	598	487	460	424	398	360	311	315	323
5	716	601	555	497	452	401	377	317	283
6	720	688	591	553	488	457	401	400	366
7	667	591	535	494	465	401	322	304	267
8	650	549	535	513	487	411	312	309	301
9	591	554	482	433	371	344	289	290	301
10	732	633	598	544	462	454	411	399	365
11	633	544	503	478	465	442	345	289	211
12	710	601	521	491	434	397	366	315	302
13	712	645	531	501	496	457	425	391	385
14	701	685	560	482	425	360	313	287	261
15	678	602	541	499	451	406	380	323	310
16	665	612	591	567	511	451	398	377	350
17	588	433	389	356	317	293	267	281	290
18	716	611	523	495	449	410	311	255	216
19	760	623	533	481	447	409	345	320	318
20	751	703	610	517	467	394	362	333	321

**Pré-ind** : Pré-induction = avant induction de mammites

**Post-ind** : Post-induction : après induction de mammites

**Post-trt** : Post-traitement = après traitement de mammites

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Houdebine, L.M., "Biologie de la lactation, Gynécologie/Obstétrique", Encycl. Méd. Chir. (Elsevier, Paris), 5-008-A-30, (2007), 22.
2. Cottle, D.J., "International sheep and wool handbook", Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom, (2010).
3. Belkacem, L., "Approche de la biopsie écho-guidée de la glande mammaire chez la brebis", Thèse de Magistère, Université El-Hadj Lakhdar Batna, Algérie, (2012), 3 - 30.
4. Ghazi, K., "Investigation des mammites subcliniques et suivi de la qualité hygiénique et sanitaire du lait cru de vache dans la région de Tiaret", Thèse de Doctorat, Université d'Oran, Algérie, (2009), 148 - 149.
5. Francoz, D. et Couture, Y., "Manuel de médecine des bovins", Editions Med'Com, Paris, France, (2014), 489.
6. Remy, D., Bousquet, G., Gourreau, J.N., Guiouillier, L., Labbe, J.F., Salat, O., Schmitt-Van De Leemput, E. et Vin, H., "Les mammites", Groupe France Agricole, Paris, France, (2010).
7. Gilibert, S., "Les affections cutanées de la mamelle et du trayon chez la vache", Thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, Université Claude-Bernard - Lyon I, France, (2008).
8. Bergonier, D., Blanc, M.C., Fleury, B., Lagriffoul, G., Barillet, F. et Berthelot, X., "Les mammites des ovins et des caprins laitiers : étiologie, épidémiologie, contrôle", Renc. Rech. Ruminants, V. 4, (1997), 251 - 260.

9. Boukraa, L., Meslem, A., Benhanifia, M. and Hammoudi, S.M., "Synergistic effect of starch and royal jelly against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*", *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, V. 15, n° 7, (2009), 755 - 757.
10. Boukraa, L., "Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to olive-tree parts", *Acta Hortic.*, V. 826, (April 2009), 21 - 24.
11. Boukraa, L. and Amara, K., "Synergistic effect of starch on the antibacterial activity of honey", *Journal of Medicinal Food*, V. 11, n° 1, (Mars 2008), 195 - 198.
12. Hoyet, C., "Le miel : de la source à la thérapeutique", Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Université Henri Poincaré – Nancy 1, France, (2005).
13. Allen, K.L. and Molan, P.C., "The sensitivity of mastitis-causing bacteria to the antibacterial activity of honey", *New Zealand Journal of Agricultural Research*, V. 40, n° 4, (1997), 537 - 540.
14. Gayard, V., "La lactation", Cours sur le net, (2007), Adress URL : <http://physiologie.envt.fr/spip.php?article47>, Page consultée le 2 mai 2020.
15. Barone, R., "Anatomie comparée des mammifères domestiques", Editions Vigot Frères, Paris, France, (2001), 512 - 543.
16. Frandson, R.D., Wilke, W.L. and Fails, A.D., "Anatomy and physiology of farm animals", Wiley-Blackwell (Blackwell Publishing), Oxford, England, (2009), 449 - 461.
17. König, H.E. and Liebich, H.-G., "Veterinary anatomy of domestic mammals", Schattauer GmbH, Stuttgart, Germany, (2004), 595 - 603.

18. Delouis, C., Houdebine, L.M. et Richard, P., "La lactation", In "La reproduction chez les mammifères et l'homme", Thibault, C. et Levasseur, M.C., INRA Editions / Editions Ellipses, Paris, France, (2001), 580 - 610.
19. Schatten, H. and Constantinescu, G.M., "Comparative reproductive biology", Wiley-Blackwell (Blackwell Publishing), Oxford, England, (2007), 17 - 19.
20. Solaiman, S.G., "Goat science and production", Wiley-Blackwell (Blackwell Publishing), Oxford, England, (2010), 126 - 128.
21. Hanzen, C., "Propédeutique de la glande mammaire : sémiologie et diagnostic individuel et de troupeau", Cours de 1<sup>ère</sup> année doctorat en médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique, (2009).
22. Denamur, R. et Martinet, J., "Effets de l'ovariectomie chez la brebis pendant la gestation", C. R. Soc. Biol., (1955), V. 149, 2105 - 2107.
23. Hanzen, C., "Lait et production laitière", Cours de 1<sup>ère</sup> année doctorat en médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique, (2004).
24. Brugère-Picoux, J., "Maladies des moutons", Editions France Agricole, France, (1994), 175 - 177.
25. Jones, J.E.T., "An investigation of mastitis in sheep: preliminary phase", Proceedings of the Sheep Veterinary Society, V. 10, (1985), 48 - 51.
26. Poutrel, B., "Mastitis of dairy ewes: etiology, detection and control", Rec. Med. Vet., V. 161, (1985), 497 - 511.
27. Bergonier, D., Lagriffoul, G., Berthelot, X. et Barillet, F., "Facteurs de variation non infectieux des comptages de cellules somatiques chez les ovins et les caprins laitiers", In Rubino, R. (Editor), "Proceedings of somatic"

- cells and milk of small ruminants", International Symposium, Bella, Italy, Wageningen Pers, The Netherlands, (1996), 113 - 135.
28. Ziv, G., Shacked, A. and Risenberg-Tirer, R., "The effectiveness of the California mastitis test as a measure of somatic cell counts of ewe's milk", *Refuah Vet.*, V. 25, (1968), 179 - 184.
29. Deutz, A., Pernthaner, A., Schlerka, G. and Baumgartner, W., "Clinical mastitis in ewes: bacteriology, epidemiology and clinical features", *Wien. Tierärztl. Mschr.*, V. 77, (1990), 70 - 77.
30. Regi, G., Honegger, R., Büchi, S., Segesse-Mann, V. and Rüschi, P., "Mastitis of dairy ewes: etiology, detection and control", *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, V. 133, (1991), 75 - 80.
31. Baumgartner, W., Pernthaner, A. and Eibl, G., "The effect of the lactation period on the cell content of sheep milk", *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.*, V. 99, (1992), 213 - 216.
32. Marco, J.C., "Mastitis en la oveja Latxa: epidemiología, diagnóstico y control", Tesis Doctoral en Medicina Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España, (1994).
33. Gonzalez-Rodriguez, M.C. and Carmenes Diez, P., "Mastitis of dairy ewes: etiology, detection and control", *Small Ruminant Research*, V. 21, (1996), 245 - 250.
34. Khelouia, A., "Contribution à une étude épidémiologique des mammites cliniques chez la brebis dans la région de Ksar Elboukhari", Thèse de Magistère, Université Saad Dahleb de Blida, Algérie, (2009).
35. Ziv, G. and Soback, S., "Pharmacotherapeutics of newer antibacterial agents in lactating ewes and goats: a review", *Proceeding of the 4<sup>th</sup>*

- International Symposium on Machine Milking of Small Ruminants, Tel Aviv, (1989), 408 - 423.
36. Ziv, G., "Profil pharmacocinétique de la spiramycine chez les brebis et les vaches laitières", Cah. Méd. Vét., V. 43, (1974), 371 - 390.
37. Smith, M.C. and Roguinsky, M., "*Staphylococcus spp.* as mastitis-related pathogens in goat milk", J. Am. Vet. Med. Assoc., V. 171, (1977), 1241 - 1248.
38. East, N.E. and Birnie, E.F., "Disease of the udder", Symposium on sheep and goat medicine, Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract., V. 5, (1983), 591 - 600.
39. Hueston, W.D., Boner, G.J. and Baertsche, S.T., "Intramammary antibiotic treatment at the end of lactation for prophylaxis and treatment of intramammary infections in ewes", J. Am. Vet. Med. Assoc., V. 194, (1989), 1041 - 1044.
40. Ahmed, G., Timms, L.L., Morrill, D.G. and Brac-Kelsberg, P.O., "Ovine subclinical mastitis efficacy of dry treatment", Sheep Res. J., V. 8, (1992), 25 - 33.
41. Longo, F., Beguin, J.C., Monsallier, G., Delas, P. and Consalvi, P.J., "Efficacy of spiramycin and neomycin combination in control of cell counts and udder pathogens in the dry ewe", In Rubino, R. (Editor), "Proceedings of somatic cells and milk of small ruminants", International Symposium, Bella, Italy, Wageningen Pers, The Netherlands, (1996), 49 - 52.
42. Petit, N., "Le miel au secours de la médecine conventionnelle", Sacrée Planète, V. 52, (Juin-Juillet 2012), 13 - 17.

43. Ndayisaba, G., Bazira, L. et Habonimana, E., "Traitement des plaies par le miel, 40 observations", *La Presse Médicale*, V. 21, n° 32, (Octobre 1992), 151 - 158.
44. Cooper, R.A., Halas, E. and Molan, P.C., "The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns", *J. Burn Care Rehabil.*, V. 23, (2002), 366 - 370.
45. Osato, M., Reddy, S.G. and Graham, D.Y., "Osmotic effect of honey on growth and viability of *Helicobacter pylori*", *Digestive Diseases and Sciences*, V. 14, n° 4, (Mars 1999), 462.
46. Al Somai, N., Coley, K., Molan, P.C. and Hancock, B.M., "Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of manuka honey", *Journal of the Royal Society of Medicine*, V. 87, (January 1994), 9 - 12.
47. Molan, P.C., "Why honey is effective as a medicine", *Bee World*, V. 82, n° 1, (2001), 22 - 40.
48. Molan, P.C., "The antibacterial activity of honey", *Bee World*, V. 73, n° 1, (1992), 5 - 28.
49. Descottes, B., "Cicatrisation par le miel : l'expérience de 25 années", *Phytothér.*, V. 7, n° 2, (2009), 112 - 116.
50. Bose, B., "Honey or sugar in treatment of infected wounds?", *The Lancet*, V. 319, n° 8278, (April 1982), 963.
51. Drouet, N., "L'utilisation du sucre et du miel dans le traitement des plaies infectées", *La Presse Médicale*, V. 12, n° 38, (Octobre 1983), 2355.
52. White, J.W., Subers, M.H. and Scepartz, A.L., "The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a

- honey glucose oxidase system", *Biochim. Biophys. Acta*, V. 73, (1963), 57 - 70.
53. Taormina, P.J., Niemira, B.A. and Beuchat, L.R., "Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power", *International Journal of Food Microbiology*, V. 69, (Mars 2001), 217 - 225.
54. Dimitrova, B., Gevrenova, R. and Ankiam, E., "Aromatic and arylaliphatic carboxylic acids as markers for the floral origin of heather honey", *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, V. 28, (January 2003), 44.
55. Wahdan, H.A., "Causes of the antimicrobial activity of honey", *Infection*, V. 26, (January 1998), 26 - 31.
56. Guillon, N., "Etude de l'activité antibactérienne du miel", Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Faculté de pharmacie de Limoges, France, (1996).
57. Rossant, A., "Le miel, un composé complexe aux propriétés surprenantes", Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Faculté de pharmacie de Limoges, France, (2011).
58. Al-Waili, N.S., "Identification of nitric oxide metabolites in various honeys, effects of honey on plasma and urinary nitrite/nitrate concentration", *J. Med. Food*, V. 6, (2003), 359 - 364.
59. Abuharfeil, N., Al-Oran, R. and Abo-Shehada, M., "The effect of bee honey on the proliferative activity of human B and T lymphocyte and the activity of phagocytes", *Food Agric. Immunol.*, V. 11, (1999), 169 - 177.

60. Tonks, A., Cooper, R.A., Price, A.J., Molan, P.C. and Jones, K.P.,  
“Stimulation of TNF-alpha release in monocytes by honey”, *Cytokine*, V. 14,  
n° 2, (April 2001), 240.
61. Simon, A., Le Goic, D. et Drouart, A., “Utilisation du sucre et du miel dans le  
traitement des plaies : à propos d'un cas clinique”, *Bulletin des GTV*, V. 3,  
(Septembre 1997), 73 - 77.
62. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), “Performance standards  
for antimicrobial susceptibility testing”, 21<sup>st</sup> informational supplement, CLSI  
document M100-S21, Wayne, PA, USA, (2011).
63. NMC (National Mastitis Council), “Microbiological procedures for the  
diagnosis of bovine udder infection and determining milk quality”, 3<sup>rd</sup> edition,  
Arlington, (2004).
64. Zeedan, G.S.G., Abdalhamed, A.M., Ottai, M.E., Abdelshafy, S. and  
Abdeen, E., “Antimicrobial, antiviral activity and GC-MS analysis of  
essential oil extracted from *Achillea fragrantissima* plant growing in Sinai  
Peninsula, Egypt”, *J. Microb. Biochem. Technol.*, S. 8, (2014).
65. IDF (International Dairy Federation), “Suggested interpretation of mastitis  
terminology”, *Bulletin of IDF*, 338, Brussels, Belgium, (2011), 3 - 20.
66. Taponen, S., Simojoki, H., Haveri, M., Larsen, H.D. and Pyorala, S.,  
“Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by  
different species of coagulase-negative *Staphylococci* identified with API or  
AFLP”, *Vet. Microbiol.*, V. 115, n° 1-3, (2006), 199 - 207.
67. López-Malo, A., Vigil, E., Palou, M.E. and Parish, P.M., “Methods for activity  
assay and evaluation of results”, *In* Davidson, P.M., Sofos, N.J. and  
Branen, A.L. (Editors), “Antimicrobials in food”, 3<sup>rd</sup> edition, Taylor and  
Francis Group, Boca Raton, FL, USA, (2005), 659 - 680.

68. NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standards), "Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests -approved standards", NCCLS document M2-A6, Wayne, PA, USA, (1997).
69. Hegazi, A.G., "Antimicrobial activity of different Egyptian honeys as comparison of Saudi Arabia honey", Res. J. Microbiol., V. 6, (May 2011), 488 - 495.
70. Tan, H.T., Rahman, R.A., Gan, S.H., Halim, A.S., Sulaiman, S.A. and Kirnpal-Kaur, B., "The antibacterial properties of Malaysian Tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey", BMC Complement. Altern. Med., V. 9, n° 1, (2009), 1 - 8.
71. Mullai, V. and Menon, T., "Bactericidal activity of different types of honey against clinical and environment isolates of *Pseudomonas aeruginosa*", J. Altern. Complement. Med., V. 13, (2007), 439 - 441.
72. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), "Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals, Approved guideline", CLSI document M49-A, Wayne, PA, USA, (2006).
73. De La Fuente, R., Ruiz Santa Quiteria, J.A., Cid, D., Domingo, M. and Suarez, G., "Experimental intramammary infection of ewes with *Staphylococcus aureus subsp anaerobius*", Research in Veterinary Science, V. 54, (1993), 221 - 226.
74. Alekish, M.O., Ismail, Z.B., Awawdeh, M.S. and Shatnawi, S., "Effects of intramammary infusion of sage (*Salvia officinalis*) essential oil on milk somatic cell count, milk composition parameters and selected hematology and serum biochemical parameters in Awassi sheep with subclinical mastitis", Veterinary World, V. 10, n° 8, (2017), 895 - 900.

75. Monsallier, G. et Thomasson, C., "Traitement des mammites bovines en lactation par une infusion unique de cefapérozone : essais cliniques", Rev. Méd. Vét., V. 137, n° 1, (1986), 15 - 22.
76. Moroni, P., Vellere, F., Antonini, M., Pisoni, G., Ruffo, G. and Carli, S., "Characterization of *S. aureus* isolated from chronically infected dairy goats", Int. J. Antimicrob. Agents, V. 23, (2004), 637 - 640.
77. Fthenakis, G.C., "Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in ewes of Southern Greece", Small Rum. Res., V. 13, (1994), 293 - 300.
78. Pengov, A. and Ceru, S., "Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and ovine mammary glands", J. Dairy Sci., V. 10, (2003), 3157 - 3163.
79. Turutoglu, H., Ercilik, S. and Ozturk, D., "Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine mastitis", Bull. Vet. Inst. Pulawy, V. 50, (2006), 41 - 45.
80. Bourabah, A., Ayad, A., Hammoudi, S.M., Boukraa, L. and Benbarek, H., "Antimicrobial activity of Algerian honey on subclinical mastitis pathogens isolated from goat's milk", Veterinary World, V. 7, n° 4, (2014), 248 - 252.
81. Tras, B., Yazar, E. and Elmas, M., "Practical and rational drug use in veterinary profession", Olgun Press, Konya, Turkey, (2007), 29 - 89.
82. Thatcher, A., Paz Martin, N. and Petrovski, K.R., "A study of subclinical mastitis in two herds, one managed organically, the other conventionally, and the effect of different management strategies", Organic Agriculture, V. 4, n° 4, (2014), 1 - 5.
83. Ibaruren, C., Raya, R.R., Maria, C., Pella, A. and Carina Audisio, M., "*Enterococcus faecium* isolated from honey synthesized bacteriocin-like

- substances active against different *Listeria monocytogenes* strains”, J. Microbiol., V. 48, n° 1, (2010), 44 - 52.
84. Al-Waili, N., Al-Ghamdi, A., Ansari, M.J., Al-Attalm, Y. and Salom, K., “Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant and *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures”, Int. J. Med. Sci., V. 9, n° 9, (2012), 793 - 800.
85. Chute, R.K., Deogade, N.G. and Kawale, M., “Antimicrobial activity of Indian honey against clinical isolates”, Asiatic J. Biotech. Res., V. 1, (2010), 35 - 38.
86. Lehtopolku, M., Nakari, U.M., Kotilainen, P., Huovinen, P., Siitonen, A. and Hakanen, A.J., “Antimicrobial susceptibilities of multidrug-resistant *Campylobacter jejuni* and *C. coli* strains: *in vitro* activities of 20 antimicrobial agents”, Antimicrob. Agents Chemother., V. 54, n° 3, (2010), 1232 - 1236.
87. Elmenoufy, G.A.M., “Bee honey dose-dependently ameliorates lead acetate-mediated hepatorenal toxicity in rats”, Life Sci. J., V. 9, n° 4, (2012), 780 - 788.
88. Nahed, M.W., Neveen, A.E.N., Sayed, S.M., Abdallah, M.R., Abdel-Hafeez, M.M. and Amer, A.A., “Intramammary honey infusion: a new trend in the management of bovine subclinical mastitis”, Journal of Animal and Veterinary Advances, V. 10, n° 20, (2011), 2740 - 2744.
89. Benhanifia, M., Ayad, A. and Mohamed, W., “Intramammary honey preparation for treatment of subclinical bovine mastitis: a preliminary study”, Org. Agr., V. 10, (Mars 2020), 1 - 8.
90. Abdel-Hafeez, M.M., Ali, M.M., Abdel-Rahman, M.F. and Nahed-Wahba, M., “Antibacterial activity of honey for treatment of subclinical bovine mastitis: intramammary infusion as a tool to manage non responding

antibiotic cases”, Proceedings of the 8<sup>th</sup> Scientific Congress Egyptian Society for Cattle Disease, V. 11, n° 13, (December 2005), 147 - 151.

91. Kelly, A.L., Tiernan, D., O'sullivan, C. and Toyce, P., “Correlation between bovine milk somatic cell count and polymorphnuclear leukocyte level for samples of bulk milk and milk from individual cows”, J. Dairy Sci., V. 83, (2000), 300 - 304.
92. Redelman, D., Butler, S., Robison, J. and Garner, D., “Identification of inflammatory cells in bovine milk by flow cytometry”, Cytometry, V. 9, (1988), 463 - 468.
93. Al-Waili, N.S. and Haq, A., “Effect of honey antibody production against thymus-dependent and thymus-independent antigens in primary and secondary immune responses”, J. Med. Food, V. 7, (2004), 491 - 494.
94. Neveen, A.E.N., Abdel-Rahman, M.F., El-Ella, G.A.A., Sayed, S.M., Wahba, N.M. *et al.*, “Immunomodulatory response of apitherapy, I: Bioassay of some apiproducs and their influence on haemo-immuodynamics in rats”, Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Forum on Apitherapy, Apimedica and Apiquality, Villa Mondragone, Rome, Italy, (June 2008).
95. Abdalhamed, A.M., Zeedan, G.S.G. and Abou Zeina H.A.A., “Isolation and identification of bacteria causing mastitis in small ruminants and their susceptibility to antibiotics, honey, essential oils, and plant extracts”, Veterinary World, V. 11, n° 3, (2018), 355 - 362.
96. Jenkis, R. and Cooper, R., “Improving antibiotic activity against wound pathogens with manuka honey *in vitro*”, PLoS One, V. 7, (September 2012).
97. Sayed, S.M., Abou El-Ella, G.A., Wahba, N.M., El Nisr, N.A., Raddad, K., Abd El Rahman M.F., Abd El Hafeez, M.M. and Aamer, A.A.E, “Immune defense of rats immunized with fennel honey, propolis, and bee venom

- against induced staphylococcal infection”, J. Med. Food, V. 12, n° 3, (June, 2009), 569 - 575.
98. Kwakman, P.H.S., Johannes, P.C., Vanden Akker, A.G., Aslami, H., Binnekade, J.M., Leonie De Boer, L., Boszhard, L., Paulus, F., Middelhoej, P., Te Velde, A.A., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Schultz, M.J. and Zaat, S.A.J., “Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria *in vitro* and eradicates skin colonization”, Clin. Infect. Dis., V. 46, (November 2008), 1677 - 1682.
99. Cooper, R.A., Molan, P.C. and Harding, K.G., “The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds”, Journal of Applied Microbiology, V. 93, (2002), 857 - 863.
100. Hassanein, S.M., Gebreel, H.M. and Hassan, A.A., “Honey compared with some antibiotics against bacteria isolated from burnwound infections of patients in Ain Shams University hospital”, J. American Sci., V. 6, (October 2010), 301 - 320.
101. Alandejani, T., Marsan, J., Ferris, W., Slinger, R. and Chan, F., “Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms”, Otolaryngol. Head Neck Surg., V. 141, n° 1, (2009), 114 - 118.
102. Boukraa, L., “Additive action of honey and starch against *Candida albicans* and *Aspergillus niger*”, Rev. Iberoam. Micol., V. 24, (2007), 305 - 307.
103. Boukraa, L., Benbarek, H. and Aissat S., “Synergistic action of starch and honey against *Pseudomonas aeruginosa* in correlation with diastase number”, The Journal of Alternative and Complementary Medicine, V. 14, n° 2, (2008), 181 - 184.

104. Boukraa, L., Benbarek, H. and Moussa, A., "Synergistic action of starch and honey against *Candida albicans* in correlation with diastase number", *Brazilian Journal of Microbiology*, V. 39, (2008), 40 - 43.
105. Boukraa, L., Niar, A., Benbarek, H. and Benhanifia, M., "Additive action of royal jelly and honey against *Staphylococcus aureus*", *J. Med. Food*, V. 11, n° 1, (2008), 190 - 192.
106. Boukraa, L., "Additive activity of royal jelly and honey against *Pseudomonas aeruginosa*", *Alternative Medicine Review*, V. 13, n° 4, (2008).
107. Aamer, A.A., Abdul-Hafeez, M.M. and Sayed, S.M., "Minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC et MBC) of honey and bee propolis against multidrug resistant (MDR) *Staphylococcus sp.* isolated from bovine clinical mastitis", *Global Journal of Science Frontier Research*, V. 15, n° 2, (2015), 20 - 28.
108. Olaitan, P.B., Adeleke, E.O. and Lyabo, O.O., "Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes", *Afr. Health Sci.*, V. 7, (2007), 159 - 165.
109. Lusby, P.E., Combes, A.L. and Wilkinson, J.M., "Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria", *Arch. Med. Res.*, V. 36, (2005), 464 - 467.
110. French, V.M., Cooper, R.A. and Molan, P.C., "The antibacterial activity of honey against coagulase-negative *Staphylococci*", *J. Antimicrob. Chemother.*, V. 56, (2005), 228 - 231.
111. Wilkinson, J.M. and Cavanagh, H.M., "Antibacterial activity of 13 honeys against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*", *J. Med. Food*, V. 8, (2005), 100 - 103.

112. Willis, D.J., Molan, P.C. and Harfoot, C.G., "A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey", *Journal of Applied Bacteriology*, V. 73, (1992), 388 - 394.
113. Allen, K.L., Molan, P.C. and Reid, G.M., "A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, V. 43, (1991), 817 - 822.
114. Basson, N.J. and Grobler, S.R., "Antimicrobial activity of two South African honeys produced from indigenous *Leucospermum cordifolium* and *Erica species* on selected micro-organisms", *BMC Complem. Alternative Med.*, V. 8, (2008), 41 - 45.
115. Jeddar, A., Kharsany, A., Ramsaroop, U.G., Bhamjee, A., Haffejee, I.E. and Moosa, A., "The antibacterial action of honey: an *in vitro* study", *S. Afr. Med. J.*, V. 67, (1985), 257 - 258.
116. Omoya, F.O. and Akharaiyi, F.C.A., "Pasture honey for antibacterial potency on some selected pathogenic bacteria", *J. Nat. Prod.*, V. 3, (2010), 5 - 11.
117. Ruiz, V.L., Porto, A.V.G., Al-Habsi, N., Vera, S., San Andrés, M.P. and Jauregi, P., "Antioxidant, antibacterial and ACE-inhibitory activity of fourmonofloral honeys in relation to their chemical composition", *Food Funct.*, V. 4, n° 11, (August 2013), 1617 - 1624.
118. Monsallier, D., "Comparative evaluation of the antibacterial efficacy of honey *in vitro* and antiplaque efficacy in a 4-day plaque regrowth model *in vivo*: preliminary results", *J. Periodontol.*, V. 83, n° 11, (September 2000), 16 - 21.
119. Moussa, A., Nouredine, D., Hammoudi, S.M., Saad, A., Bourabeh, A. and Houari, H., "Additive potential of ginger starch on antifungal potency

of honey against *Candida albicans*", Asian Pac. J. Trop. Biomed., V. 2, n° 4, (April 2012), 253 - 255.

120. Almasaudi, S.B., Al-Nahari, A.A.M., Abd El-Ghany, E.S.M., Barbour, E., Al Muhayawi, S.M., Al-Jaouni, S., Azhar, E., Qari, M., Qari, Y.A. and Harakeh, S., "Antimicrobial effect of different types of honey on *Staphylococcus aureus*", Saudi J. Biol. Sci., V. 24, (2017), 1255 - 1261.
121. Listner, W., "Water relations of food", Academic Press, London, (1975), 309 - 323.
122. Radwan, S.S., El-Essawy, M. and Sharhan, M., "Experimental evidence for the occurrence in honey of specific substances active against micro-organisms", Zentralblatt Mikrobiol., V. 139, (1984), 249 - 255.
123. Pascual-Maté, A., Osés, S.M., Fernández-Muiño, M.A. and Sancho, M.T., "Methods of analysis of honey", J. Apicult. Res., V. 57, (2018), 38 - 74.
124. Nelson, C.A., Reginald, A.O., Okoro, N. and Janet, K., "Antibacterial activity of *Allium cepa* (onions) and *Zingiber officinale* (ginger) on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from high vaginal swab", Int. J. Trop. Med., V. 3, (2007), 1 - 5.
125. Saad, B., AL Masaudi, M.O. and Bureikan, A., "Antimicrobial activity of garlic juice (*Allium sativum*), honey, and garlic-honey mixture on some sensitive and multi-resistant microorganisms", J. Biol. Life Sci., V. 10, (2013), 2429 - 2435.
126. Lu, J., Dee, A., Turnbull, C.L., Rosendale, D., Hedderley, D., Stephens, J., Gannabathula, S.G.S., Schlothauer, R.C., Witchurch, C.B. and Harry, E.J., "The effect of New Zealand kanuka, manuka and clover honeys on bacterial growth dynamics and cellular morphology varies according to the species", PLoS One, V. 8, n° 2, (February 2013), e55898.

127. Adam, C.J., Boulton, C.H., Deadman, B.J., Farr, J.M., Grainger, M.N., Manley-Harris, M. and Snow, M.J., "Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey", *Carbohydr. Res.*, V. 343, (2008), 651 - 659.
128. Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G. and Henle, T., "Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of manuka honey from New Zealand", *Mol. Nutr. Food Res.*, V. 52, n° 4, (2008), 483 - 489.
129. Radostitis, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. and Constable, P.D., "Veterinary medicine: a textbook of the disease of cattle, horses, sheep, pigs and goats", 10<sup>th</sup> edition, Elsevier Ltd, London, (2007).
130. Peton, V. and Le Loir, Y., "*Staphylococcus aureus* in veterinary medicine", *Infect. Genet. Evol.*, V. 21, (2014), 602 - 615.
131. Sutra, L. and Poutrel, B., "Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*", *J. Med. Microbiol.*, V. 40, n° 2, (1994), 79 - 89.
132. Scali, F., Camussone, C., Calvino, L.F., Cipolla, M. and Zecconi, A., "Which are important targets in development of *S. aureus* mastitis vaccine?", *Res. Vet. Sci.*, V. 100, (2015), 88 - 99.
133. Erskine, R.J., Wagner, S. and DeGraves, F.J., "Mastitis therapy and pharmacology", *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, V. 19, n° 1, (2003), 109 - 138.
134. Fitzgerald, J.R., "Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat", *Trends Microbiol.*, V. 20, n° 4, (2012), 192 - 198.

135. Melchior, M.B., Vaarkamp, H. and Fink-Gremmels, J., "Biofilms: a role in recurrent mastitis infections?", *Vet. J.*, V. 171, n° 3, (2006), 398 - 407.
  
136. Østerås, O., "The cost of mastitis-an opportunity to gain more money", *Proceedings of the British Mastitis Conference*, Shepton Mallet, United Kingdom, (October, 2000), 67 - 77.
  
137. Ruegg, P.L., "Investigation of mastitis problems on farms", *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, V. 19, n° 1, (March 2003), 47 - 73.
  
138. Kiistala, R., Hannuksela, M., Makinen-Kiuunen, S., Niinim, A. and Haahtela, T., "Honey allergy is rare in patients sensitive to pollens", *Allergy*, V. 50, n° 10, (1995), 844 - 847.