

## *DEDICACES*

*A ceux qui ont fait de moi ce que je suis et qui sont toujours présents pour me soutenir à tout moment.*

*A mes parents*

*A mes frères et sœurs en témoignage de leur amour et de leurs encouragements continus*

*A mes amies **Rabeh. Omar. Djillali. Mokhtar. Hamza. Mohamed. Bachir. Sahraoui. Djelloul. Abdelkader** et pour tout mes professeurs **Surtout mon encadreur** Et pour toute la promotion de 5<sup>ème</sup> Année docteur vétérinaire 2013*

*A tous ceux qui m'aiment.*

## Remerciements

*Je tiens à remercier vivement mon directeur de thèse Docteur Selles sidi Mohamed Amar pour l'encouragement et les orientations qu'il n'a pas manqués de me prodiguer lors de la réalisation de ce travail ainsi que mon cher frère Abedalemalek et ma sœur fatima pour son assistance, ses conseils, son soutien et son extrême bienveillance.*

*Et pour toute ma famille Drideche*

*Mes profondes gratitudes vont :*

*Aux membres du jury :*

*Monsieur Belhamiti Taher*

*Monsieur Ait Amrane*

*A tout mes enseignants ; surtout de cette année Mr Hammoudi SI Mohamed, Mr Belhamiti, Mr Ait Amrane, Mr Khiati, Mr Bouakaz, Mr Aissat, Mr Hammoudi A belhamidet .*

*Et enfin à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail*

# INTRODUCTION

**Chapitre I : Diarrhée  
néonatale du veau  
d'origine bactérienne**

# **Chapitre II**

## **antibiorésistance**

**Chapitre III**  
**généralité sur les**  
**huiles essentielles**

ETUDE  
BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE  
EXPIREMENTALE

Matériel et méthodes

# Discussion

Résultats

**Conclusion**

**Référence**

**bibliographique**

## Sommaire

Dédicaces

Remerciements

Sommaire

Liste des tableaux et figures

Abréviation

Résumé : - Français

- Arabe

### INTRODUCTION

Introduction générale ..... 12

### Partie Bibliographique

**CHAPITRE I : Diarrhée néonatale du veau d'origine bactérienne ..... 15**

1)-Escherichia coli ..... 16

1-1) les caractères de pathogénicité des colibacilles entérotoxigènes..... 17

1-1-1) les adhésines des E.coli..... 17

\*L'antigène K (capsulaire)..... 17

\*L'antigène somatique (O)..... 18

\*L'antigène H..... 18

\*L'antigène F (fimbriae)..... 18

1-1-2) Les entérotoxines..... 18

1-1-2-1) Les entérotoxines LT..... 18

1-1-2-2) Les entérotoxine sthermostable (ST)..... 19

1-2) ETEC..... 21

1-2-1) Pathogénie..... 21

1-2-2) Symptôme..... 23

1-2-3) Diagnostic..... 24

|   |           |
|---|-----------|
| 1-2-4) Traitement.....  | 25        |
| 1-2-5) Prophylaxie.....   | 26        |
| *Sanitaire.....   | 26        |
| *Médicale .....   | 28        |
| - Chez la mère.....   | 28        |
| - Chez le veau.....   | 29        |
| <b>CHAPITRE II : Antibiorésistance.....</b>                       | <b>30</b> |
| 1) Les antibiotiques .....  | 31        |
| 1-1) Les antibiotiques naturels et synthétiques.....              | 31        |
| 1-2) Les cibles bactériens des antibiotiques.....                 | 33        |
| 2) Les résistances aux antibiotiques.....                         | 35        |
| 2-1) La résistance naturelle.....                                 | 35        |
| 2-2) La résistance acquise.....                                   | 35        |
| <b>CHAPITRE III : Généralité sur les huiles essentielles.....</b> | <b>37</b> |
| 1) Définition.....  | 38        |
| 2) Réparation botanique.....                                      | 38        |
| 3) Composition chimique.....                                      | 38        |
| 4) Domaines d'utilisation des HE.....                             | 39        |
| 4-1) Industrie alimentaire.....                                   | 39        |
| 4-2) Parfumerie et cosmétologie.....                              | 39        |
| 4-3) Désinfections des locaux.....                                | 39        |
| 4-4) l'aromathérapie.....   | 40        |
| 4-5) Médecine dentaire.....                                       | 40        |
| 5) Pouvoir antimicrobien des HI.....                              | 40        |

## **PARTIE EXPÉRIMENTALE**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>I) Matériel et méthodes</b> .....                                      | <b>43</b> |
| 1) Animaux.....   | 44        |
| 2) Méthodes.....  | 44        |
| 2-1) Récolte des échantillons.....  | 44        |
| 2-2) Détection des agents entéropathogène.....                            | 44        |
| 2-2-1) Culture bactériologique.....                                       | 44        |
| 2-2-2) Préparation de la suspension bactérienne.....                      | 44        |
| 2-2-3) Test biochimique.....  | 44        |
| 2-2-4) Antibiogramme.....   | 45        |
| * Application.....  | 45        |
| 3) Plante.....  | 45        |
| 3-1) Classification.....  | 46        |
| 4) Extraction de l'huile essentielle.....                                 | 46        |
| 4-1)Hydrodistillation.....  | 46        |
| 5) Calcul de rendement.....   | 47        |
| 6) Tests microbiologiques.....  | 48        |
| 6-1) Microorganisme étudiés.....  | 48        |
| 6-2) Préparation des dilutions.....                                       | 48        |
| 6-3) Evaluation de l'activité antimicrobienne.....                        | 48        |
| 6-4) Détermination de l'effet antibactérienne des huile essentielles..... | 49        |
| <b>II) Résultats:</b> .....   | <b>50</b> |
| 1) Répartition des cas diarrhéiques selon sexe.....                       | 51        |
| 2) Répartition des cas diarrhéiques en fonction des tranches d'âge .....  | 52        |
| 3) Répartition des cas diarrhéiques en fonction de la race du veau.....   | 53        |
| 4) Répartition des cas diarrhéiques en fonction des saisons.....          | 54        |

|   |           |
|---|-----------|
| 5) Prévalences globales de différentes bactéries isolées.....           | 54        |
| 6) Antibiorésistance.....   | 56        |
| 7) Rendement des huiles essentielle.....                                | 57        |
| 8) Activités antimicrobienne des huiles essentielles.....               | 57        |
| 8-1) Activité bactériostatique / bactéricide.....                       | 58        |
| <b>III) Discussion :</b> .....  | <b>59</b> |
| 1) Répartition des cas selon l'âge des veaux .....                      | <b>60</b> |
| 2) Répartition selon le sexe du veau .....                              | <b>60</b> |
| 3) Répartition des cas diarrhéiques en fonction de la race du veau..... | <b>60</b> |
| 4) Répartition selon la saison de naissance du veau .....               | <b>60</b> |
| 5) Prévalences globales de différentes bactéries isolées.....           | <b>61</b> |
| 6) Antibiorésistance.....   | <b>62</b> |
| 7) Rendement en huiles essentielle.....                                 | <b>63</b> |
| 8) Activité antimicrobienne des huiles essentielles.....                | <b>63</b> |
| <b>CONCLUSION</b> .....   | <b>64</b> |
| <b>Référence bibliographique</b> .....                                  | <b>66</b> |

## I) Liste des tableaux et figures de la partie bibliographique

|   |    |
|---|----|
| -Tableau 01 : Mode d'action des principales classes d'antibiotiques.....                      | 34 |
| -Figure 01 : Cascade d'activation suite à l'attachement de STa à la guanylate cyclase-C.....  | 20 |
| -Figure 02 : Découverte et premières utilisations cliniques des principaux antibiotiques..... | 32 |
| -Figure 03 : Mode d'action des antibiotiques .....  | 33 |

## II) Liste des tableaux et figures de la partie expérimentale

|  |    |
|--|----|
| -Tableau 02 : liste des Antibiotiques à tester.....  | 45 |
| - Tableau 03 : Prévalences des agents entéropathogènes détectés chez les veaux diarrhéiques.....       | 55 |
| -Tableau 04 : Activité antibactérienne d'huile essentielle de <i>C. aromaticum</i> .....               | 58 |
| - Tableau 05: Activité bactériostatique / bactéricide d'huile essentielle de <i>C.aromaticum</i> ..... | 58 |
| -Figure 04: Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation.....                                | 47 |
| - Figure 05 : Répartition des cas diarrhéiques selon sexe.....   | 51 |
| - Figure 06 : Répartition des cas diarrhéique en fonction d'âge.....                                   | 52 |
| - Figure 07 : Répartition des cas diarrhéique en fonction de la race.....                              | 53 |
| - Figure 08 : Répartition des cas diarrhéiques en fonction des saisons.....                            | 54 |
| - Figure 09 : Prévalence des bactéries isolées des cas diarrhéiques.....                               | 55 |
| - Figure 10 : Anti-bio-résistance des souches bactériennes isolées des cas diarrhéiques.....           | 56 |
| - Figure 11 : Anti-bio-résistance des souches <i>E.coli</i> isolées des cas diarrhéiques.....          | 56 |
| - Figure 12 : Rendement en huile essentielle de cannelle.....  | 57 |

---

## Abréviation

---

### Liste des abréviations :

**E.coli** : *Escherichia coli*.

**ETEC** : *Escherichia coli*. entérotoxigène.

**STEC** : *Escherichia coli*. Sigma-like toxine produite

**NTEC** : *Escherichia coli*. nécrotoxigène

**EPEC** : *Escherichia coli*. entéro-pathogène

**EHEC** : *Escherichia coli*. entéro-hémorragique

**EAggEC** : *Escherichia coli*. entéro-aggrégative

**EIEC** : *Escherichia coli*. entéro-invasive

**EAST-1**: thermostable toxin 1

**EAST** : thermostable toxin

**LT** : thermolabile

**ST** : thermostable

**CT** : toxine de choléra

**cAMP** : acide mono phosphate cyclique

**GC-C**: guanylate cyclase-C

**cGMP** : monophosphate guanosine cyclase

**STa** : thermostable type a

**STb** : thermostable type b

**GMP** : monophosphate guanosine

**PH** : potentiel d'hydrogène

**AMP**: acide mono phosphate

**EIA** : Enzyme immunoassay

**ADN** : acide disoxy ribo-nucléaire

**ARN**: acide ribo-nucléaire

**PCR**: polymerase chain reaction

**DHP**: dihydroptéroate

---

## Abréviation

---

**Ca+2**:calcium

**Nacl** :chlorure de sodium

**CFTR** :Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator

**DHF**: dihydrofolate

**THF**: tétrahydrofolate

**NAG**: N-acétylglucosamine

**NAM** : N-acétylmuramique

**SARV** : Staphylococcus aureus résistantes à la vancomycine

**CMI** : concentration minimal inhibitrice

**STEC** : *Escherichia coli* produisant Shiga toxine

**HE** : huile essentielle

**OMS** : organisation mondiale de la santé

**R** : Rendement

**MHE**: matière de huile essentielle

**MS** : matière végétale sèche

**AC** :acide cluvunalinique

**RHE** :rendement de l huile essentielle

**h** : heure

**CM** : centimètre

**ML** : millilitre

**g** : gramme

**UFC** : unité faisant colonie

**µL**:micro litre

**MG** : Mili gram

**n°**: Numéro

**°C** : Degré Celsius

**%** : Pourcentage

---

## Abréviation

---

**V** : volume

**Mm** : milimetre

**J** : jour

---

## Résumé

---

Les diarrhées néonatales chez les veaux constituent des entités pathologiques coûteuses qui causent des pertes économiques importantes au sein du cheptel national. Notre enquête a pour but, la mise en évidence des entérobactéries associées aux diarrhées néonatales du veau âgé jusqu'à 30 jours d'une part, d'autre part évalué la sensibilité des souches isolées in-vitro envers les antibiotiques les plus couramment utilisés, et enfin déterminé in-vitro le CMI de l'huile essentielle de la cannelle envers quelques souches isolées des diarrhées néonatales du veau.

Vingt-neuf échantillons de matières fécales diarrhéiques ont été collectés au sein de la ferme Drideche, localisée dans la région de Tiaret, durant la période qui s'étale d'Avril 2012 à Mars 2013. La recherche des entéropathogènes a été réalisée sur milieu Mac Conkey, l'antibiogramme a été effectué sur la gélose Muller Hinton. L'activité antibactérienne d'huile de la cannelle a été étudiée sur deux souches *Escherichiacoli*, *Kluyvera spp* et *Klebsiella ornithinolytica*, la détermination du CMI a été opérée par la méthode d'incorporation sur gélose. L'huile essentielle a été obtenue par hydrodistillation.

Cette étude a permis d'afficher les *Escherichia. Colien* tête de liste avec 68.97 %. Suivi par *Kluyvera spp* et *Klebseilla ornithinolytica* avec 20.69 % et 3.45% respectivement.

L'antibiogramme des souches isolées montre une sensibilité élevée de la majorité des souches à la colistine. En revanche, une résistance importante de ces souches pour l'ampicilline, l'amoxicilline+ acide clavulanique et la tétracycline.

L' H.E extraite par hydrodistillation à partir de la cannelle a présenté un rendement de 1,46 %  $\pm$  0,05.

L'étude de l'activité inhibitrice in-vitro, a montré, que l'huile essentielle de la cannelle a présenté un CMI de l'ordre de 0,09 à 0,1 $\mu$ l/ml vis à vis des 4 souches d'entéropathogènes étudiées.

Ces données confirment l'étiologie complexe des diarrhées néonatales du veau, montrent une antibiorésistance accrue des souches bactériennes isolées des diarrhées néonatales du veau. Toutefois, nous avons conclu aussi dans cette étude que les huiles essentielles constitueraient une solution alternative qui pourra être utilisée dans le domaine pharmaceutique dans le but de traiter les diarrhées néonatales du veau.

**Mots clés:** Veau, diarrhée néonatale, bactéries entéropathogènes, antibiorésistance, H.E de la cannelle, CMI.

---

الإسهال عند العجول حديثي الولادة هي واحدة من الأسباب المميّنة وعلاجها مكلف على المستوى الوطني. ويهدف هذا التحقيق إلى تسليط الضوء على البكتيريا المعوية المرتبطة بالإسهال عند العجل حديث الولادة ما بين 1 و 30 يوم من جهة و من جهة أخرى تقييم حساسية بعض سلالات البكتيريا المعزولة في المختبر تجاه المضادات الحيوية الأكثر استخداما. وفي الأخير اختبار فعالية الزيت الأساسي للقرفة على عدد من السلالات المعزولة من عينات من هذا الإسهال.

تم جمع تسع وعشرون عينة من الإسهال من مزرعة دريدش التي تقع في منطقة تيارت وذلك خلال فترة تتراوح من أبريل 2012 إلى مارس 2013. وقد أجري البحث عن البكتيريا المعوية ضمن الوسط "ماكونكي"، وتمت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا ضمن الوسط "مولرهينتون أجار". تمت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا من زيت القرفة على أربع سلالات

منها : سلالتين *Kluyvera spp* , *Klepsiella ornithinolytica* ; *Escherichia. Coli*

تعرض هذه الدراسة أن البكتيريا القولونية تتصدر القائمة بنسبة 68.97%، يليها *Klepsiella ornithinolytica* بنسبة 3.45% يليها *Kluyvera spp* بنسبة 20.69%

أظهرت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا أن معظم هذه السلالات لها حساسية عالية ضد الكوليستين. ومع ذلك، فلقد ظهرت مقاومة ضد الامبيسلين، أموكسيسيلين + حمض الكلافلينيك والتتراسيكلين.

تم الحصول على الزيوت الأساسية عن طريق التقطير بالبخار. وقد سجل مردود الزيت الأساسي للقرفة المستخرج بواسطة التقطير بالبخار نسبة 1.46%  $\pm 0.05$ .

أظهرت دراسة النشاط المثبطة "في المختبر"، أن النسبة المثبطة الدنيا لهذه السلالات الأربع من البكتيريا المعوية تتراوح من 0.09 إلى 0.1 ميكرو لتر في الميليلتر الواحد.

وتؤكد هذه البيانات أن المسببات المعقدة للإسهال عند العجول حديثي الولادة تظهر زيادة المقاومة للمضادات الحيوية. و نستخلص أيضا من هذه الدراسة أن الزيوت الأساسية ستكون بديلا يمكن استخدامها في علاج الإسهال عند العجل حديث الولادة.

كلمات البحث: العجل، الإسهال عند العجل حديث الولادة، البكتيريا المعوية، المقاومة للمضادات الحيوية، القرفة، الزيت الأساسي، التركيز المثبط الأدنى

## Introduction

---

La diarrhée néonatale du veau est l'une des pathologies les plus importantes chez les veaux laitiers et de boucherie. Elle engendre des pertes économique substantielle survient à la suite de l'augmentation de la morbidité et de la mortalité, les coûts de traitement et la réduire les taux de croissance. Les entérites néonatales chez les veaux constituent un problème commun partout monde. Le syndrome diarrhéique a une étio-pathogénèse complexe, parce que divers agents infectieux seuls ou en combinaison, peuvent être associées. En outre, l'environnement, la gestion et les facteurs nutritionnels influencent la gravité et issue de la maladie. Les Rotavirus, coronavirus, *Cryptosporidium parvum* et *Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC) sont les quatre principaux pathogènes associés à néonatale diarrhée du veau dans le monde entier (De La Fuente Et Al., 1998 Et Ok Et Al., 2009). La diarrhée causée par *Escherichia coli* a été identifié comme la maladie la plus importante de jeunes bovins (Giovanna et al., 2012). Les souches *E. coli* entérotoxigène (ETEC) sont considérés comme les agents entéropathogènes majeur associé avec la diarrhée du veau nouveau-né dans le monde entier, des études récentes, montre aussi que les souches d'*E.coli* attachant/effaçant (Moxley et Smith. 2010) et les souches d'*E.coli* produisant Shiga toxine (STEC) (Pourtaghi Et Al 2013) sont également associées aux diarrhées du veau.

Toutefois d'autres bactéries peuvent être associées aux diarrhées néonatales du veau a savoir les *Salmonella*, *Citrobacter*, *Providencia stuartii* et *Chlamydia* (DEA Et ELAZHARY, 1981).

Cependant, le traitement des entérites causées par *E. coli*, l'administration des antimicrobiens par voie orale ou par voie générale est recommandé. La connaissance de la sensibilité est nécessaire pour élaboration de directives sur l'utilisation prudente des antimicrobiens (De Verdieret Al., 2012).

Vue Le problème de la résistance aux médicaments qui ne sont pas limité aux bactéries pathogènes, mais qui implique également la flore bactérienne commensal, qui peut devenir un important réservoir de souches résistantes (Erb et al., 2007).

Cette étude à pour objectif:

- Déterminer l'âge critique pour l'apparition des diarrhées néonatales pendant le premier mois de la vie,
  - Déterminer le sexe le plus sensible aux diarrhées néonatales du veau âgé de moins de 1 mois.
  - Déterminer la race le plus sensible aux diarrhées néonatales du veau.
-

# Introduction

---

- Déterminer la saison ou diarrhées néonatales du veau âgé de mois de 1 mois sont plus fréquente.
  - Déterminer les entérobactéries associées aux diarrhées néonatales du veau jusqu'à l'âge de 1mois,
  - Tester la sensibilité des souches isolées envers les différentes molécules d'antibiotiques,
  - Déterminer le CMI ainsi que l'effet bactéricide/ bactériostatique l'huile essentielle de la cannelle envers quelques souches isolées.
-

## Chapitre I : Diarrhée néonatale du veau d'origine bactérienne

---

La diarrhée néonatale du veau constitue un syndrome de grande complexité étiologique. Elle entraîne des pertes économiques, soit directement par la mortalité et les frais de traitement qu'elle engendre, soit indirectement par la faible croissance. De nombreux agents infectieux (*Rotavirus* bovin du groupe A, *coronavirus* bovine, *E. coli* entérotoxigène (ETEC), *Salmonella* et *cryptosporidium parvum*) sont capables de causer la diarrhée chez le veau nouveau-né. Ces agents peuvent être influencés par divers facteurs environnementaux, nutritionnels, physiologiques et de gestion (Herrera-Luna et al., 2009).

D'autres bactéries peuvent engendrer des diarrhées néonatales chez le veau tel que *Clostridium perfringens*, *Campylobacter*, *Proteus* et *Klebsiella* (Snodgrass et al., 1986 et Herrera-Luna et al., 2009).

### 1) *Escherichia coli* :

C'est dans la flore commensale de nourrissons qu'*Escherichia coli* a été observé pour la première fois au 19<sup>e</sup> siècle par le Dr. Escherich. Il a décrit le coliforme comme étant un habitant de la flore microbienne d'individus en bonne santé. Depuis, *E. coli* est devenu un outil indispensable à la recherche, surtout en biologie moléculaire, notamment grâce à sa culture aisée (Donnenberg and Whittam, 2001; Kaper et al., 2004).

Les *E. coli* appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des germes Gram négatifs, mobiles ou immobiles, anaérobies facultatifs, non sporulés. La plus part des variétés sont des habitants commensaux du tractus gastro-intestinal, mais quelques variétés expriment des facteurs de virulence, ce qui accroît la capacité de l'organisme à causer une variété d'infections intestinales et le syndrome diarrhéique chez les animaux néonatales de ferme ainsi que chez l'homme (Holland, 1990).

*E. coli* se caractérise par de nombreux antigènes, dont les plus importants sont : l'antigène lipopolysaccharidique ou somatique 'O', plus de 150 variantes sont connus. L'antigène protéique flagellaire 'H' dont on connaît plus de 53 sérogroupes. L'antigène de capsule anciennement connu sous 'K' est abandonné sauf ceux qui correspondent à des fimbriae (K88 et K99 désormais appelés F4 et F5) dont 80 sérogroupes sont connus (Welch ; 2006).

Les *E. coli* causent deux maladies communes des veaux nouveau-nés. La coli-septicémie, dans laquelle les bactéries envahissent la circulation systémique et les organes internes, et

# Chapitre I : Diarrhée néonatale du veau d'origine bactérienne

---

l'entérite colibacillaire dans laquelle les bactéries sont localisées au niveau de la lumière et la muqueuse de l'intestin grêle (Acres, 1985).

Les maladies diarrhéiques des animaux de ferme sont fréquemment dues à l'infection par l'un ou l'autre pathotype d'*E.coli* : Entérotoxigène (ETEC), Vero ou Sigma-like toxine produite (VETEC ou STEC), nécrotoxigène (NTEC), entérotoxigène (EPEC), entérohémorragique (EHEC), entéro-aggrégative (EAggEC) et entéro-invasive (EIEC) (Nagy and Fekete 2005). Selon ces derniers, les ETEC constituent la cause la plus importante des diarrhées néonatales du veau.

## **1-1) Les caractères de pathogénicité des *Colibacilles* entérotoxigènes :**

### **1-1-1) Les adhésines des *E. coli* :**

Les adhésines interviennent dans la première étape de l'infection par les ETEC, via l'attachement aux microvillosités du petit intestin. Les principales adhésines des ETEC sont fimbriae. Les fimbriae F4, F5, F6, F17, F18 et F41, sont présents dans les souches ETEC porcines et bovines. De plus, F42 et F165 ont été décrits chez les ETEC, mais leur implication dans la pathologie n'a pas encore été déterminée (Taillon. 2009).

Plus de 1000 types antigéniques sont dénombrés ; le typage sérologique s'appuie sur l'identification des antigènes O (somatique), K (capsulaire), H (flagellaire) et F (fimbriae)(VALLET, 2006).

#### **▪ L'antigène K (capsulaire) :**

C'est un antigène composé d'acide polysaccharide. Les antigènes K sont similaires aux glycocalyx de certaines bactéries. Ils peuvent sur certaines souches ETEC d'*E.coli*, encapsuler l'antigène somatique (O). Sur la base de leur comportement vis-à-vis des tests sérologiques : on peut distinguer 3 sous types L, A et B. Il y a approximativement 80 groupes K (HOLLAND, 1990), dont seulement onze ont été identifiés chez les ETEC du veau. La plus part d'eux sont de type A. Le rôle exact des antigènes capsulaires dans la pathogénie de la diarrhée n'est pas clair. Cependant, ils aident dans la colonisation en protégeant les bactéries contre les mécanismes immunitaires dans l'intestin et en renforçant probablement l'attachement de fimbriae à la muqueuse intestinale (Acres, 1985).

- **L'antigène somatique (O) :**

Ce sont des antigènes polysaccharidiques (Acres, 1985), l'antigène O permet la description de la souche de colibacilles (Vallet, 2006). 171 groupes O environ ont été identifiés (HOLLAND, 1990), mais seulement les groupes 8, 9, 20, 26, 101 et 141 sont communs sur les ETEC du veau. Le rôle des antigènes somatiques dans la pathogénie de la diarrhée n'est pas clair. Cependant, il est supposé que les variétés qui possèdent la particule du groupe O, offrent des avantages au plasmide qui porte le matériel génétique qui code pour l'entérotoxine et la production de fimbriae (Acres, 1985).

- **L'antigène H :**

Ils sont présents sur la flagelline, ce sont des marqueurs de pathogénicité, et sont rarement présents sur les *E. coli* entérotoxigènes des veaux (Holland, 1990).

- **L'antigène F (fimbriae) :**

Sont des structures filamenteuses présentes à la surface des bactéries Gram négatives dont *E. coli*. Ils sont au même titre que les trois autres antigènes classés en différents groupes (Vallet, 2006). Ils ont été désignés comme antigène K en premier lieu (Nagy Et Fekete, 2005).

Les *E. coli* F5 (ancien K99), Fy, F41, CS31 et F17 (NAGY et FEKETE, 2005 ; Vallet, 2006) sont les plus fréquemment associés aux diarrhées du veau (Vallet, 2006).

### **1-1-2) Les entérotoxines :**

Les entérotoxines sécrétées par les ETEC sont portées sur des plasmides, et sont classés en deux catégories, soit les toxines thermolabiles (LT) ayant un poids moléculaire élevé, soit les toxines thermostables (ST) ayant un poids moléculaire plutôt faible.

#### **1.1.2.1) L'entérotoxine LT :**

LT est produite principalement par les souches humaines et porcines ETEC (Nagy and Fekete, 2005), et est apparentée à la toxine du choléra (CT) avec 77% d'homologie au niveau nucléotidique (Fairbrother et al., 2005). Les mécanismes d'action de la toxine LT sont bien

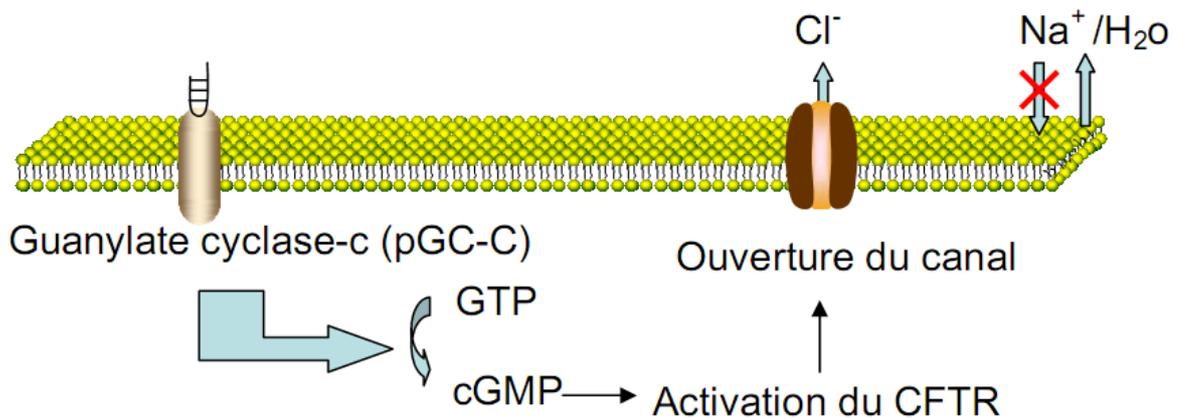
## Chapitre I : Diarrhée néonatale du veau d'origine bactérienne

---

connus et similaires à ceux de la toxine CT. Ces toxines sont composées d'un domaine A et de cinq sous-unités B, ces dernières responsables de l'attachement au récepteur ganglioside GM1 (Spangler, 1992). Le domaine A est responsable de la ribosylation de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G, menant à la constante activation de l'adénylatecyclase et ainsi à la production d'AMP cyclique (cAMP). Cette augmentation de cAMP intracellulaire va éventuellement mener à sécrétion d'ions  $\text{Cl}^-$  et d'eau dans la lumière intestinale. La particularité de la toxine LT, contrairement à la toxine CT, est qu'elle s'accumule dans l'espace périplasmique. En effet, elle est moins exportée à la surface de la bactérie que la toxine CT.

### 1.1.2.2) Les entérotoxines thermostables (ST) :

Les entérotoxines thermostables sont séparées en deux classes, soit STa et STb. La STa est un peptide de deux kDa présent chez le porc et chez le veau, soluble dans le méthanol et dans l'eau. Contrairement à la STb qui peut induire la sécrétion de fluide chez les porcs nouveau-nés et sevrés, STa agit seulement chez le porc nouveau-né (Fairbrother et al., 2005; Nagy and Fekete, 1999). STa est un analogue structural de l'hormone guanyline et s'attache à la guanylatecyclase-C (GC-C). Ceci a pour effet l'activation de la guanylatecyclase, et par le fait même, le niveau du monophosphate guanosine cyclase (cGMP) augmente à l'intérieur des entérocytes (Golin-Bisello et al., 2005). L'accumulation intracellulaire de cGMP va activer le CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) et ainsi le canal sécrètera des ions  $\text{Cl}^-$  (Golin-Bisello et al., 2005). L'absorption de l'eau et des électrolytes sera également réduite et la sécrétion de ceux-ci sera augmentée (Nagy and Fekete, 2005) (Fairbrother et al., 2005) (Figure 1).



**Figure 1** : Cascade d'activation suite à l'attachement de STa à la guanylatecyclase-C.

Le gène *estA* codant pour la toxine STa est intégré au transposon Tn1681 que l'on retrouve sur des plasmides de diverses tailles (So and McCarthy, 1980). Les entérotoxines STa sont subdivisées en deux génotypes, soit STaH et STaP, composés de 18 et 19 acides aminés respectivement (Moseley et al., 1983; Ruth et al., 2005); STaP étant uniquement présent chez le porc. STa forme trois ponts disulfures qui sont essentiels pour l'activité de la toxine (Batisson and der Vartanian, 2000).

Une autre entérotoxine démontrant une forte homologie avec l'entérotoxine STa et la guanyline est EAST1. La toxine EAST1 a d'abord été découverte chez la souche humaine EAEC 17-2 isolée d'un enfant souffrant de diarrhée (Savarino et al., 1991). Le gène codant pour l'entérotoxine EAST1 est très répandu dans les souches ETEC porcines, surtout chez les ETEC F4-positives, mais son expression dans ces souches demeure incertaine. Cette toxine est aussi largement répandue chez les autres classes d'E. coli pathogènes (Lopes et al., 2005; Paiva de Sousa and Dubreuil, 2001; Stephan and Untermann, 1999), mais est surtout associée aux souches EAEC (Nishikawa et al., 2002). Une étude de 2003 a révélé la présence du gène codant pour la toxine, *astA*, dans 31,3 % de souches isolées de porcs diarrhéiques ou atteints de la maladie de l'œdème (Choi et al., 2001). De ces souches, 44,3% ne possédaient aucun

fimbria ou gène codant pour une toxine connue. Des souches EAEC n'ayant aucun autre facteur de virulence connu, excepté EAST1, ont été associées à des épidémies et à des cas

# Chapitre I : Diarrhée néonatale du veau d'origine bactérienne

---

isolés de diarrhée (Itoh et al., 1997; Kawano et al., 1998). Par contre, astA est également retrouvé dans les souches commensales isolées de porcs sains (Chapman et al., 2006).

## 1-2) ETEC :

Les ETEC sont responsables des diarrhées sévères chez le veau nouveau-né (Nguyen et al., 2011). Cela est dû à son pouvoir pathogène. Ce pouvoir est lié à deux facteurs de virulence. Le premier s'agit de l'expression d'un antigène fimbriae qui permet à la bactérie de s'attacher aux cellules. Alors que le second est le résultat d'élaboration d'un ou plusieurs entérotoxines qui influencent la sécrétion intestinale de fluides à travers l'augmentation de la concentration cellulaire d'AMP cyclique (AMPc) ou GMP cyclique (GMPc) (Holland, 1990).

Les fimbriae des ETEC le plus communément observé chez les veaux sont F5 (K99) et le F41 (Nagy and Fekete ; 1999, Scott et al., 2004, Achá et al., 2004, Foster and Smith, 2009 et Nguyen et al., 2011). Néanmoins, les souches F17 (Nguyen et al., 2011) et F165 (Achá et al., 2004) peuvent être aussi isolées.

Les souches vérotoxino-gènes (O157:H7, O111, O26 et O130), elles, sont responsables de diarrhées hémorragiques chez le jeune veau (20, 84).

*E. coli* CS31A est incriminé dans les gastro-entérites paralysantes, aussi appelées syndrome diarrhéique avec ataxie, bien que son rôle soit aujourd'hui mis en doute dans ces diarrhées (20). Les gastro-entérites paralysantes sont caractérisées par la discrétion des signes diarrhéiques, l'absence de déshydratation et la présence signes nerveux dominés par la parésie et de l'ataxie

### 1-2-1) Pathogénie :

Les principales caractéristiques de la pathogénèse des maladies à ETEC sont :

- 1- Infection avec les ETEC ;
- 2- Attachement d'ETEC aux cellules épithéliales entraînant la colonisation de l'intestin grêle ;
- 3- Production et action des toxines thermostables type à (STa) (Acres, 1985).

## Chapitre I : Diarrhée néonatale du veau d'origine bactérienne

---

Cet enchaînement d'événements, conduit à une diarrhée aigue liquide se terminant par une déshydratation, une acidose métabolique et finalement la mort dans les cas sévères. Les veaux s'infectent par *E. coli*, pendant ou juste après la naissance, souvent par transmission fécalo-orale. L'installation rapide des *E. coli* est favorisée par plusieurs caractéristiques :

1- Un pH abomasal élevé. Le pH des fluides de l'abomasum est normalement inférieur à 4 mais augmente progressivement à 6 après l'ingestion du lait, grâce au pouvoir tampon du lait maternel. L'acidité gastrique est un mécanisme de défense contre les infections bactériennes. Elle se trouve donc neutralisée par la tétée. Cette dernière favorise en même temps l'entrée des germes.

2- La motricité intestinale lente et faible.

3- L'absence de la microflore compétitive (Acres, 1985 ; Vallet, 2006).

Les bactéries sont normalement éliminées et entraînées par le péristaltisme ; une fois les ETEC ingérés, ces derniers se multiplient et colonisent l'intestin grêle en se fixant à la muqueuse par les fimbriae (VALLET, 2006). La phase de la colonisation de la moitié postérieure de l'intestin grêle est la phase clé dans la pathogénie de la colibacillose entérique. Malgré que le processus complexe ne soit pas complètement compris, l'attachement des ETEC à la muqueuse intestinale, est le principal mécanisme, et qui permet à la bactérie de lutter contre les actions péristaltiques de l'intestin. Par conséquent, la colonisation inclut une augmentation marquée du nombre des ETEC au même titre que la portion attachée à la muqueuse. Le mécanisme précis de l'attachement à l'échelle moléculaire n'a pas été encore établi (Acres, 1985).

Le nombre des ETEC augmente, la quantité d'entérotoxines produite est suffisante pour provoquer la diarrhée (Vallet, 2006). Chez les bovins, seule l'entérotoxine thermostable type a (STa) est rencontrée (Dufasne, 2003). Ces entérotoxines se fixent à des récepteurs spécifiques sur la bordure en brosse des entérocytes (Vallet, 2006).

En fait, les entérotoxines induisent une sécrétion nette d'eau et d'électrolytes (sodium, chlorure et potassium) vers la lumière intestinale, après contact avec la muqueuse intestinale par un mécanisme indépendant des lésions intestinales (Dufasne, 2003).

Les réponses aux exotoxines sont locales, ces substances n'agissant que dans les segments inoculés et non dans les segments adjacents (Dufasne, 2003).

## Chapitre I : Diarrhée néonatale du veau d'origine bactérienne

---

Des résultats expérimentaux convergents font penser que la toxine thermostable (ST) active un système enzymatique qui provoque l'augmentation de la guanosinemonophosphate cyclique dans les cellules de la muqueuse, et ensuite induit la sécrétion d'eau et d'ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Par ailleurs, la toxine peut agir comme un sécrétagogue, lequel se liant à la bordure en brosse des cellules épithéliales, entraîne une augmentation de Ca<sup>+2</sup> à l'intérieur des cellules. A partir d'une certaine concentration, le Ca<sup>+2</sup> forme un complexe avec la calmoduline ou « calcium-dependent-regulator ». Le complexe activé qui en résulte stimule les protéines kinases qui activent les transports membranaires d'eau et d'ions. En fait, on peut voir une fuite de Na Cl au niveau des espaces intercellulaires d'où la sécrétion. Ces mécanismes n'altèrent pas la muqueuse elle-même, mais entraînent un « dys-métabolisme hydrominéral » éventuellement mortel (Dufrasne, 2003).

Par ailleurs, dans ces diarrhées, la perte d'eau et d'électrolytes est due à un processus sécrétoire sans modification apparente de l'absorption. Ainsi, certains substrats pourraient toujours permettre l'augmentation de l'absorption (Dufrasne, 2003).

### **1-2-2) Symptômes:**

La colibacillose entérotoxigène est la forme la plus commune des colibacilloses chez le veau nouveau-né, principalement âgé de 3 à 5 jours (RADOSTITS Et Al. 1994).

Chez le veau nouveau-né, les signes cliniques peuvent être apparents dans les 24 heures après la naissance, et la pure colibacillose entérotoxigène est rarement observée chez le veau âgé de plus de 3 jours. Cependant, la présence d'autres entéropathogènes (Rotavirus, Cryptosporidium) peut prolonger la période de susceptibilité (Holland, 1990).

La diarrhée due aux ETEC est une diarrhée pâteuse à aqueuse, en même temps profuse. Les fèces sont d'odeur fétide et de couleur variable (jaune pâle à blanc), avec des bulles de gaz et parfois même des gouttes de sang. Des douleurs abdominales sont possibles (Vallet, 2006).

Les cas suraigus entraînent un abattement marqué, un décubitus, voire une hypothermie et nécessitent une prise en charge médicale parfois urgente (Vallet, 2006).

## Chapitre I : Diarrhée néonatale du veau d'origine bactérienne

---

Les cas aigus provoquent chez le veau nouveau-né une déshydratation rapide, avec une perte de 10 à 12 % de son poids corporel en moins de 6 heures. L'animal infecté manifeste comme résultat une dépression du système nerveux central, une faiblesse, une température corporelle normale à au dessous de la normale, une tachycardie ou bradycardie ; si l'animal n'est pas traité, la mort serait le résultat d'une hypovolémie (Holland, 1990).

### **1-2-3) Diagnostic:**

La confirmation que l'ETEC est l'agent causal de la diarrhée exige la démonstration de la souche d'E.coli et ces facteurs de virulences. La procédure la plus pratiquée et encore la plus fiable est de démontrer l'antigène fimbriae sur la souche isolée de fèces ou du contenu intestinal. L'identification de l'antigène fimbriae seul offre la preuve présumée que la souche d'E.coli est l'agent causal (Holland, 1990).

Après une première isolation de l'organisme, les colonies suspectes sont cultivées sur des milieux sélectifs qui permettent l'expression d'une variété d'antigène fimbriae: pour K99 le milieu E, le milieu MincaIsovitalex (Holland, 1990) ; les milieux spécifiques tels que la minimale caséine agar avec Isovitalex additionné (MINCA Is) sont exigés pour la détection de K99 in vitro (NAGY et FEKETE, 1999). Les fimbriae sont alors identifiés par l'agglutination sur lame avec des anticorps monoclonaux, antisérum fimbriaemonospécifique ou antisérum polyspécifique(Holland, 1990). Le fimbriae adhésif est plus efficacement détecté in vivo par la méthode d'immunofluorescence, en utilisant un absorbant à base d'anticorps poly ou monoclonaux anti-fimbriae (Nagy Et Fekete, 1999).

La production de K99 dans certaines souches peut être réprimée par la présence du glucose, alors que pour d'autres, le glucose peut accroître la production de K99 (Nagy Et Fekete, 1999). Cependant l'alanine, élément nutritif, communément utilisé dans les milieux bactériens, joue un rôle inhibiteur envers l'expression de fimbriae (Acres, 1985).

Enzyme immunoassay (EIA) a été développée pour la détection de l'expression de l'antigène bactérien fimbrial dans les fèces (Holland, 1990).

La technique d'anticorps fluorescents est plus performante sur frottis de tissu intestinal ; cette technique est plus fiable que celle de la démonstration de l'antigène fimbriae sur les souches

## Chapitre I : Diarrhée néonatale du veau d'origine bactérienne

---

isolées de matière fécale, car elle détecte l'antigène qui est attaché aux cellules intestinales (Holland, 1990).

Contrairement aux fimbriae, les entérotoxines produites *in vivo* sont beaucoup plus difficiles à détecter. Donc, l'étude *in vitro* des toxines produites par les ETEC est facilitée par les tests biologiques précoces: ligature du segment d'intestin grêle (pour tous les entérotoxines) ou test de souriceaux (par STa) suivi par une culture cellulaire (pour LT). Plus récemment, par le test ELISA (pour LT et ST) (Nagy Et Fekete, 1999).

Actuellement, avec l'avènement des méthodes moléculaires dans le diagnostic du laboratoire, les encombrants tests biologiques peuvent être remplacés par la soi-disant sonde génétique: hybridation d'ADN et PCR (récemment dans les formes complexes) pour détecter les gènes de différents caractères de virulences (Nagy Et Fekete, 1999).

Le test d'hybridation peut détecter simultanément l'antigène fimbriae et le gène d'entérotoxines dans les colonies bactériennes ou les matières fécales (Holland, 1990).

Le Real-Time PCR semble être une méthode rapide et sensible pour la détection des entérites pathogènes incluant les ETEC (Nagy Et Fekete, 2005).

### **1-2-4) Traitement:**

Comme les principaux effets de la diarrhée à ETEC sont : l'exsiccose (exhémie), acidose métabolique et l'hyponatrémie, un régime thérapeutique efficace inclut une hydratation orale ou intraveineuse, une antibiothérapie (Nagy Et Fekete, 1999), et la possibilité d'utiliser des anti-parasympathomimétiques et des pansements intestinaux (Radostits Et Al. 1994).

Une fluïdo-thérapie orale et/ou parentérale : la fluïdo-thérapie orale est pratiquée lorsque le veau conserve son réflexe de succion, ne présente pas d'iléus paralytique et ne souffre pas d'une acidose grave ; pour la fluïdo-thérapie parentérale, elle s'effectue lorsque le pourcentage de déshydratation dépasse les 8 % (Rollin, 2002). La fluïdothérapie a pour but de corriger la déshydratation, l'acidémie, l'hypoglycémie (NAYLOR et al. 2003), par utilisation de l'une des formules commerciales disponibles (Nagy Et Fekete, 1999).

Antibiothérapie : le choix des antibiotiques n'est pas toujours simple, d'autant que certaines souches d'*E.coli* présentent des résistances (Vallet, 2006).

## Chapitre I : Diarrhée néonatale du veau d'origine bactérienne

---

Les antibiotiques tels que la polymixine par voie orale et les quinolones ou les fluoroquinolones ont été appliqués avec succès (Nagy Et Fekete, 1999).

La donofloxacin 18 % administré par voie sous cutanée à 6 mg / kg en une ou deux prises à 48 heures d'intervalle est cliniquement sans danger chez le veau nouveau-né et hautement efficace dans le traitement des maladies entériques bovines associées avec *E.coli* (Sunderland Et Al. 2003).

Les pansements intestinaux comme le Kaolin et la pectine sont généralement utilisés dans la diarrhée (Radostits Et Al. 1994).

Le maintien ou non de l'alimentation lactée pendant la diarrhée constitue un fameux sujet de polémique. Il paraît évident d'arrêter le lait pour les mêmes raisons qui imposent le choix de la voie parentérale pour la réhydratation. Mais les arguments avancés pour stopper le lait chez des veaux diarrhéiques qui conservent un bon appétit sont discutables (Rollin, 2002).

### 1-2-5) Prophylaxie:

A cause de la nature complexe de la maladie, il est irréalisable de s'attendre à une prévention totale, et le contrôle à un niveau économique doit être le but principal. L'efficacité du contrôle de la colibacillose peut être accomplie par l'application de trois principes :

- 1- Réduire le degré d'exposition du veau nouveau-né aux agents infectieux.
- 2- Assurer le maximum de la résistance non spécifique avec un colostrum adéquat et optimiser la gestion d'animaux.
- 3- Augmenter la résistance spécifique du nouveau-né par la vaccination de la mère ou du nouveau-né (Radostits Et Al. 1994).

- **Sanitaire:**

- L'administration précoce (dès la 2<sup>ème</sup> heure après la parturition) d'une quantité suffisante d'un colostrum de qualité, riche en anticorps spécifiques, doit en conséquence être considérée comme une impérieuse nécessité.

## Chapitre I : Diarrhée néonatale du veau d'origine bactérienne

---

- Cette administration doit nécessairement être complétée par la mise en œuvre d'un ensemble de mesures destinées à améliorer l'état sanitaire de la gestante et de son veau, et à limiter les risques d'infection (Desmesttre, 1983).

- L'alimentation de la vache gestante et son tarissement revêtent une importance toute particulière :

- L'alimentation parce qu'elle conditionne, durant les deux derniers mois de gestation, l'état sanitaire de la gestante et du veau, et pour un large part la composition du colostrum.

-Le tarissement car il détermine le transfert et la concentration des

Anticorps au niveau de la mamelle.

- Une ration équilibrée mais non une suralimentation, un apport de vitamines (en particulier vitamines A et D) et des oligo-éléments (Zinc notamment), doivent en conséquence accompagner le tarissement pratiqué au 7<sup>ème</sup> mois de gestation.

- La surveillance de la mise bas, en diminuant le nombre de cas d'anorexie des nouveau-nés, et le respect d'hygiène, en limitant le risque infectieux (Desmesttre, 1983).

- Hygiène convenable des locaux et de l'alimentation.

- Eviter le surpeuplement ; l'idéal est de placer les veaux dans des loges individuelles.

- Désinfection des loges et des locaux, suivis d'un repos lorsqu'elles sont libérées de leurs occupants (Blood Et Henderson, 1976).

- Pour les veaux de boucherie:

☞ Mise en quarantaine en cas d'achats des nouveaux veaux ;

☞ Proscrire l'achat de trop jeunes veaux (Blood Et Henderson, 1976).

# Chapitre I : Diarrhée néonatale du veau d'origine bactérienne

---

- **Médicale:**

- ☞ **Chez de la mère:**

Plusieurs vaccins maternels sont disponibles sur le marché, surtout pour application parentérale chez la vache gestante. Ces vaccins contiennent des bactéries inactivés avec l'antigène protecteur (fimbriae adhésif avec ou sans entérotoxine thermolabile) ou antigène purifié, qui sont appliqués vers la fin de la gestation (Nagy Et Fekete, 2005).

On recommande classiquement de vacciner les vaches 2 à 4 semaines avant le part, de façon à stimuler la production des anticorps qui se trouveront alors présents dans le colostrum (Blood Et Henderson, 1976).

La vaccination est régulièrement suivie d'une augmentation significative du taux des anticorps spécifiques. Elevé dès la première injection, ce taux se trouve encore accru par une deuxième injection pratiquée 28 jours après la première (Desmestre, 1983).

La vaccination de la vache gestante par le pili K99 d'E.coli ou des préparations cellulaires entières qui contiennent suffisamment d'antigène K99, peut réduire significativement l'incidence de la colibacillose entérotoxigène chez le veau (Radostits Et Al. 1994).

Une excellente protection est obtenue quand la vache est vaccinée avec quatre souches d'E.coli, ou des cellules bactériennes contiennent suffisamment d'antigène K99 et d'antigène capsulaire polysaccharidique K (Radostits Et Al. 1994).

Les vaccins actuellement disponibles sont multivalents. Outre la valence Rotavirus, ils contiennent aussi la valence Coronavirus et éventuellement la valence destinée à conférer une protection contre certaines souches d'Escherichia Coli entérotoxigènes. La vache reçoit deux injections de vaccin à trois semaines d'intervalle ; la deuxième étant effectuée deux semaines avant la date prévue de parturition. L'injection de rappel annuel est administrée au même moment avant la parturition. La valeur de la protection conférée au veau dépend alors de la prise correcte du colostrum (Schelcher Et Al. 1998).

## Chapitre I : Diarrhée néonatale du veau d'origine bactérienne

---

### ☞ **Chez le veau:**

L'administration orale d'anticorps monoclonaux spécifiques K99 chez le veau durant les 12 premières heures après la naissance peut être une méthode efficace pour réduire l'incidence de la colibacillose entérotoxigène fatale, particulièrement quand un déclenchement de la maladie se produit dans les troupeaux non vaccinés (Radostits Et Al. 1994).

Les mesures immunothérapeutiques: par administration des anticorps monoclonaux, le plasma animal contient les anticorps ou le jaune d'œuf pour protéger le veau nouveau-né contre l'adhésion et la colonisation par les ETEC (Nagy Et Fekete, 2005).

### **1) Les antibiotiques :**

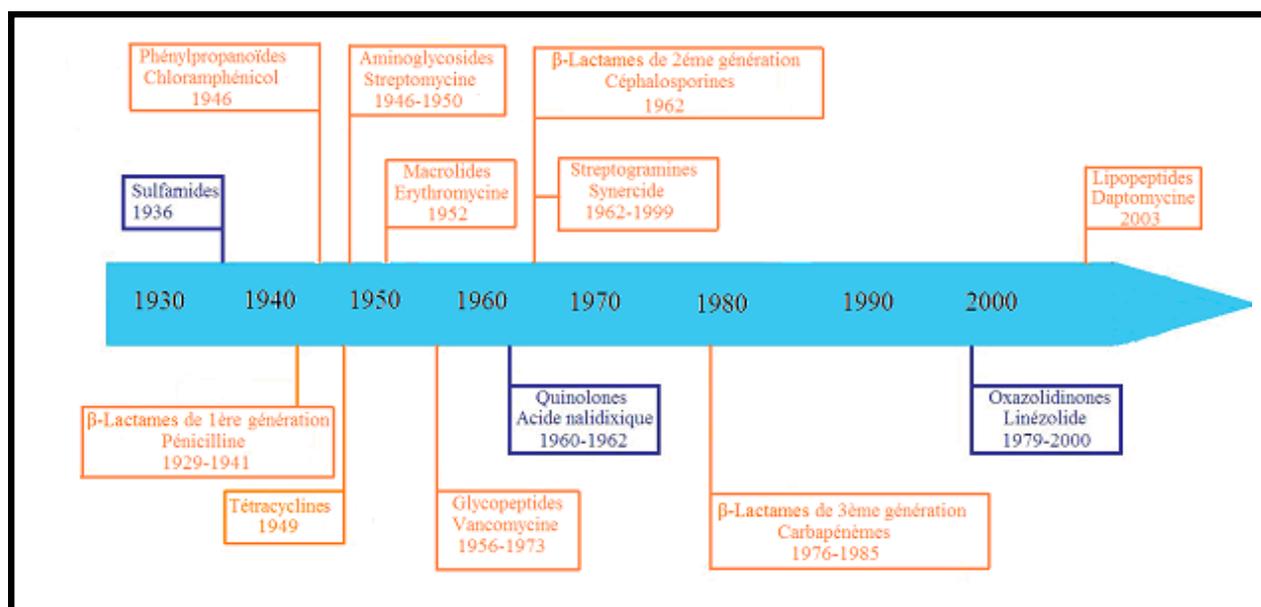
Les antibiotiques sont, par définition, « des produits microbiens, ou leurs dérivés, capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance » (Prescott et al., 1995). Leur action étant spécifique et dirigée contre les micro-organismes, ils ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes.

L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large. L'action des antibiotiques peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi, ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de «bactériostatiques» alors que ceux qui tuent les bactéries sont dits «bactéricides». L'administration d'antibiotiques bactériostatiques suffit généralement pour arrêter un processus infectieux, le système immunitaire de l'hôte se chargeant d'éliminer les bactéries restantes. Cependant, chez les sujets immunodéprimés, le recours à un antibiotique bactéricide est recommandé.

#### **1-1) Les antibiotiques naturels et synthétiques**

Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique (Newman et al., 2003 ; Singh et Barrett, 2006). Les antibiotiques synthétiques sont obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de micro-organismes. Les antibiotiques semi-synthétiques sont issus de la modification, en laboratoire, de substances produites par des micro-organismes.

Les antibiotiques sont groupés par familles ou classes en fonction de leurs propriétés structurales. Pratiquement toutes les classes d'antibiotiques ont été découvertes dans un « âge d'or », qui s'est étendu de 1936 à 1962 (figure. 2).

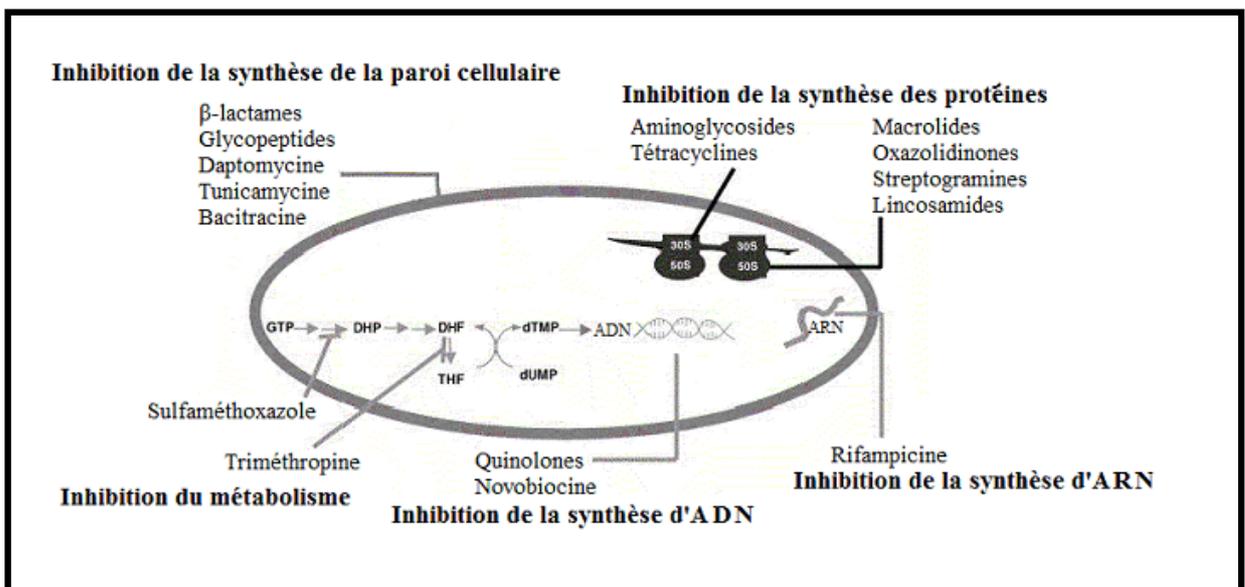


**Figure 2 :** Découverte et premières utilisations cliniques des principaux antibiotiques d'origine naturelle et d'origine synthétique ( ) (d'après Singh et Barrett, 2006).

La pénicilline, premier antibiotique à large spectre, isolé des champignons du genre *Penicillium* spp, marque le début de l'ère antibiotique. Elle appartient à la classe des  $\beta$ -lactames. Sa découverte a ouvert la voie à l'identification de nombreuses autres classes d'antibiotiques d'origine naturelle, incluant les phénylpropanoïdes, les tétracyclines, les aminoglycosides, les macrolides, les glycopeptides, les streptogramines et les  $\beta$ -lactames de deuxième génération. Une troisième génération de  $\beta$ -lactames a été commercialisée à la fin des années 1970 : les carbapénèmes. Il existe seulement trois classes d'antibiotiques synthétiques. La première classe est représentée par les sulfamides, qui sont aussi les premiers antibiotiques à avoir été utilisés cliniquement (Laub, 1986). La seconde classe, les quinolones (ou fluoroquinolones), a été découverte lors de la synthèse de la chloroquine, un anti-paludéen, en 1962 (Singh et Barrett, 2006). Les oxazolidinones représentent la troisième classe d'antibiotiques synthétiques. Découverte en 1979, celle-ci a conduit au développement et à la commercialisation du linézolide en 1999. Avec les lipopeptides cycliques (daptomycine), les oxazolidinones constituent l'une des rares classes d'antibiotiques mise sur le marché au cours de ces dix dernières années.

### 1-2) Les cibles bactériennes des antibiotiques :

Les cibles des antibiotiques sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie (figure 3).



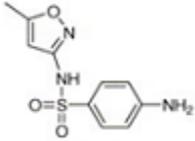
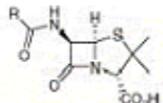
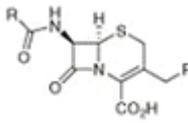
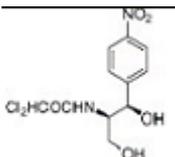
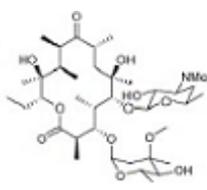
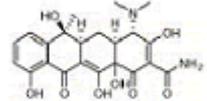
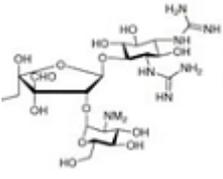
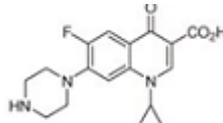
**Figure 3** : Mode d'action des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006)

Avec DHP : dihydroptéroate ; DHF : dihydrofolate ; THF : tétrahydrofolate

Les antibiotiques peuvent inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), interférer avec les voies métaboliques de synthèse de l'ADN mais leurs cibles principales sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens (tableau 1).

## Chapitre II antibiorésistance

**Tableau 1 :** Mode d'action des principales classes d'antibiotiques

| Classe   | Origine                        | Mode d'action  | Ex               | Structures chimiques  |
|--|--------------------------------|--|------------------|---|
| Sulfamides                                       | Synthétique                    | - Inhibent la synthèse de l'acide folique<br>- Entraînent une diminution de la production de bases azotées par la bactérie | Sulfaméthoxazole |    |
| $\beta$ -Lactames de 1 <sup>ère</sup> génération | Penicillium notatum            | Inhibent la synthèse du Peptidoglycane par   | pénicilline      |    |
| $\beta$ -Lactames de 2 <sup>ème</sup> génération | Cephalosporum                  | blocage de la transpeptidation   | Céphalosporine   |    |
| Phénylpropanoïdes                                | Streptomyces Venezuelae        | Se fixent sur l'ARN 23S de la sous-unité 50S du ribosome empêchant l'élongation du peptide au cours de la traduction       | Choramphénicole  |   |
| Macrolides                                       | Streptomyces erythraeus        |  | Erythromycine    |  |
| Tétracyclines                                    | Streptomyces                   | Bloquent la traduction en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome  | Tétracycline     |  |
| Aminoglycosides                                  | Streptomyces ou Micromonospora | Se fixent sur la sous-unité 30S du ribosome et bloquent en partie la traduction en engendrant des erreurs de lecture       | Streptomycine    |  |
| Quinolones et fluoroquinolones                   | Synthétique                    | Inhibent la gyrase bactérienne   | Ciprofloxacine   |  |

La complexité des motifs structuraux et la grande variabilité des groupements fonctionnels, qui entrent dans la constitution des antibiotiques, leur permettent d'établir des interactions spécifiques avec leurs cibles bactériennes. Cette haute spécificité, associée à l'exceptionnelle capacité d'adaptation des bactéries, participe, entre autres facteurs, à la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques.

### **2) La résistance aux antibiotiques**

#### **2-1) La résistance naturelle**

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. L'expression d'un caractère inné, partagé par l'ensemble de la communauté bactérienne, rend inappropriée l'utilisation de certains antibiotiques. Des particularités structurales de la paroi cellulaire, empêchant les antibiotiques d'accéder à leur cible, ou l'absence de cible sont autant de facteurs, qui conditionnent la résistance naturelle. Les bactéries du genre *Mycoplasma* spp illustrent ce dernier exemple. Le composant principal de la paroi des bactéries est le peptidoglycane, un réseau tridimensionnel d'acides aminés et de chaînes polysaccharidiques, constituées de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Dépourvus de cet élément constitutif, les mycoplasmes présentent une résistance intrinsèque aux  $\beta$ -lactames, dont le mode d'action consiste en une inhibition de la synthèse du peptidoglycane (Normak et Normak, 2002).

#### **2-2) La résistance acquise**

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes. La résistance acquise par mutation est aussi qualifiée de résistance chromosomique. Le phénomène de mutation est conditionné par l'utilisation des antibiotiques. Ces derniers ne sont pas des agents mutagènes mais ils contribuent à sélectionner, de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne. En éliminant les bactéries sensibles, les antibiotiques permettent aux mutants résistants de se multiplier plus facilement. La cause principale de l'évolution et de l'extension des résistances aux antibiotiques est leur prescription à grande échelle en thérapeutique humaine (Goossens et al., 2006). Ces prescriptions sont souvent mal ciblées, comme dans les cas d'infections virales, ou incorrectement dosées (Yagupsky,

## Chapitre II antibiorésistance

---

2006). La France, malgré une décroissance de sa consommation, peut-être liée aux campagnes publiques de sensibilisation, reste le second pays consommateur d'antibiotiques en Europe. L'utilisation d'antibiotiques, nécessitant de longues périodes de traitement ou à large spectre d'action, est aussi un facteur de risque pour la propagation des résistances (Yagupsky, 2006). La transmission d'éléments génétiques mobiles, comme les plasmides et les transposons, favorise également l'acquisition des résistances par les bactéries. Elle peut s'effectuer par transduction, conjugaison ou transformation.

La dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques peut s'effectuer au sein d'une même espèce mais aussi d'une espèce bactérienne à l'autre. Ainsi, les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la vancomycine (SARV) auraient acquis ce caractère suite au transfert plasmidique de l'opéron van A, réalisé par conjugaison avec *Enterococcus faecalis* (Noble et al., 1992 ; Alekshun et Levy, 2007).

## Chapitre III : généralité sur les huiles essentielles

---

### 1. Définition :

Les huiles essentielles (HE) sont des produits odorants obtenus à partir de plantes par entraînement à la vapeur d'eau, par hydro distillation des végétaux entiers ou en partie, ou par expression du péricarpe frais de certains agrumes. Cette définition est restrictive car elle exclut, d'une part, les produits odorants d'origine animale, et, d'autre part, les essences obtenues par d'autres procédés d'extraction (d'après les organismes de normalisation: A.F.N.O.R\* et I.S.O\*\*).

### 2. Répartition botanique :

Les HE sont largement réparties dans le règne végétal; certaines familles en sont particulièrement riches: Conifères, Rutacées, Myrtacées, Ombellifères, Composées, Labiées (Sauvage, 1974; Boulos, 1983). On peut les extraire à partir de tous les organes végétaux: sommités fleuries, écorces, racines, rhizomes, fruits, bois, etc. Au sein d'une même plante, elles peuvent être présentes à la fois dans différents organes. Leur composition peut varier d'une partie de la plante à l'autre (Paris et Urabielle, 1981)

### 3. Composition chimique :

La composition chimique d'une HE est assez complexe, on y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques: les composés terpéniques et les composés aromatiques, dérivés du phénylpropane.

Les composés terpéniques sont formés d'unités isopréniques (en C<sub>5</sub>) et comprennent les monoterpènes (C<sub>10</sub>), les sesquiterpènes (C<sub>15</sub>), les diterpènes (C<sub>20</sub>) et les tri terpènes (C<sub>30</sub>). Ces composés ont tous la même origine métabolique.

Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane ont une biogenèse différente de celle des terpènes. On peut citer l'acide et l'aldéhyde cinnamique (HE de cannelle), l'eugénol (HE de girofle), le carvacrol (HE d'origan), l'anéthol et l'aldéhyde anisique (HE de badiane, d'anis et de fenouil) qui sont les principaux membres de cette famille.

Les acides organiques, les cétones de faible poids moléculaire et les coumarines volatiles entrent également en faible proportion dans la constitution des HE

Cependant, cette complexité de la composition chimique des HE suscite plusieurs remarques:

- parmi les nombreux constituants d'une HE, l'un domine généralement, on l'appelle composé majoritaire.

## Chapitre III : généralité sur les huiles essentielles

---

- à l'intérieur d'une même espèce végétale, on observe des variations chimiques (qualitatives et quantitatives) importantes, ce qui conduit à admettre l'existence de chémotypes chimiques (exemple: Thymus à thymol, à géraniol, à carvacrol, à linalool, etc.).

La composition chimique des HE varie avec le milieu et l'époque de la végétation. Elle peut aussi se modifier au cours de l'extraction et durant la conservation.

### **4. Domaines d'utilisation des HE :**

#### **4. 1. Industrie alimentaire :**

Les HE sont utilisées dans la conservation des denrées alimentaires, elles y sont rajoutées pour rehausser le goût et pour empêcher le développement des contaminants alimentaires (Lachowicz et al., 1998; Cosentino et al., 1999; Nielson et Rios, 2000; Skandamis et Nychas, 2001).

Plusieurs travaux ont montré que les HE de thym, de cannelle, d'origan et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxigenèse de plusieurs bactéries et champignons responsables d'infections alimentaires (Montes-Belmont et Carvajal, 1998; Nielsen et Rios, 2000).

#### **4. 2. Parfumerie et cosmétologie :**

Un grand nombre d'HE (400 à 500) est utilisé dans l'élaboration de la majorité des parfums et produits de toilette. Ces essences servent à préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique tout en leur assurant une odeur agréable (Roulier, 1992). De même, certains constituants chimiques isolés à partir d'HE peuvent faire l'objet de transformations chimiques donnant naissance à de nouvelles odeurs; ainsi, à partir de l'eugénol tiré de l'essence de girofle, on aboutira à l'isogénol qui a une odeur d'œillet (Vigne, 1987).

#### **4. 3. Désinfection des locaux :**

Des essences naturelles (de citron et de lilas) à activité bactéricide, acaricide et fongistatique entrent dans la composition d'un produit, le «paragerm», solution volatile qui s'est révélé sans toxicité pour l'homme aux doses utilisées (Mallea et al., 1979).

Les HE étant volatiles, on peut envisager leur utilisation en tant qu'agents de préservation pour le contrôle de l'hygiène de l'air des systèmes de climatisation, notamment dans le milieu hospitalier, entraînant un effet bénéfique au niveau de la qualité de l'air (De Billerbeck et al., 2002). Les composés majoritaires de certaines HE (thymol et carvacrol) sont utilisés dans certains pays comme additifs aux déchets animaux afin d'empêcher leur dégradation, qui

pourrait générer de mauvaises odeurs, réduire les agents pathogènes et conserver les nutriments des déchets jusqu'à leur recyclage comme agents fertilisants (Varel, 2002).

#### **4.4. Aromathérapie :**

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie qui utilise les HE pour traiter un certain nombre de maladies. Beaucoup d'ouvrages décrivent des préparations à base d'HE diverses prescrites pour le traitement de plusieurs maladies. Cependant, ces prescriptions ne possèdent pas de bases scientifiques rigoureuses car elles sont souvent tirées de pratiques empiriques (Valnet, 1990). Actuellement, plusieurs publications scientifiques fondées utilisent les HE ou leur composés majoritaires pour tester leurs effets *in vitro* (Lima et al., 1993; Viollon et al., 1993; Viollon et Chaumont, 1994). Ces effets sont également testés *in vivo* sur des modèles animaux afin de traiter certaines infections expérimentales d'origine bactérienne provoquées par *Helicobacter pylori* chez la souris par exemple (Bergonzelli et al., 2003; Ohno et al., 2003), ou de champignons opportunistes (Surech et al., 1997; Manohar et al., 2001).

#### **4.5. Médecine dentaire :**

En médecine dentaire, l'exemple le plus couramment utilisé est la listerine: solution constituée d'HE de thymol et d'eucalyptol utilisée pour le lavage de la cavité orale et des dents et qui possède une activité bactéricide sur les microorganismes de la salive et de la plaque dentaire (Kato et al., 1990). Plusieurs HE ont donné des résultats cliniques très satisfaisants dans la désinfection de la pulpe dentaire et dans le traitement et la prévention des caries (Pellecuer et al., 1980; Sourai 1989; Schwartz et al., 1992).

Plusieurs auteurs ont rapporté les propriétés antimicrobiennes d'un certain nombre d'HE et de leurs composés majoritaires sur les bactéries de la cavité orale (Shapiro et al., 1994; Didry et al., 1994). Hammer et al. (2003). Une autre équipe de chercheurs a décrit les propriétés antifongiques de l'HE de l'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*) sur les infections oropharyngées chez les patients ayant présenté une résistance aux antifongiques classiques (Vasquez et al., 2000).

#### **5. Pouvoir antimicrobien des HE :**

L'effet antimicrobien des HE est connu depuis longtemps. En 1919, Gattefossé a montré que le bacille de Koch était détruit en 5 minutes par une émulsion à 1% d'HE de pin. Beylier-Maurel (1976) rappelle qu'en 1887, Chamberland rapporta l'activité antimicrobienne des essences de cannelle, d'origan et de girofle. Plus tard, d'autres auteurs ont montré que les HE étaient efficaces sur les germes résistants aux antibiotiques et qu'elles ont un spectre d'action

### Chapitre III : généralité sur les huiles essentielles

---

assez large puisqu'elles agissent aussi bien sur les bactéries, les levures, les moisissures que sur les virus (Valnet et al., 1978; Janssen et al., 1987, Knoblock et al., 1989 ; Tantaoui-Elaraki et al., 1993a et b; Remmal et al., 1993a et b; Remmal 1994; Siddiqui et al., 1996). Des travaux plus récents ont confirmé l'effet antimicrobien in vitro des HE sur les bactéries à Gram+ et à Gram- et les levures (Hili et al., 1997; Cox et al., 2001; Delaquis et al., 2002; Rhayour et al., 2003).

La composition de ces HE et, en particulier, la nature de leurs composés majoritaires sont responsables de cette activité antimicrobienne (Simeon De Buochberg et al., 1976). En effet, il est admis que l'activité antimicrobienne des HE se classe dans l'ordre décroissant selon la nature de leurs composés majoritaires: phénols > alcools > aldéhydes > cétones > oxydes > hydrocarbures > esters (Lee et al., 1971; Franchome, 1981 Inouye et al., 2001b). En effet, d'après Hulin et al (1998) et Ultee et al (1999), le carvacrol semble être un puissant inhibiteur de croissance de bactéries telles que *Bacillus cereus* et *Salmonella*. De même, Bagamboula et al. (2004) ont récemment montré un effet inhibiteur du carvacrol sur deux espèces de *Shigella*.

D'autre part, Viollon et Chaumont (1994) ont décrit l'effet fongitoxique du thymol et du carvacrol sur *Cryptococcus neoformans*, champignon opportuniste rencontré au cours du SIDA. Arras et Usai (2001), ont reporté l'effet fongitoxique du carvacrol, composé majoritaire de *Thymus capitatus* sur le champignon *Penicillium digitatum*. Cependant, l'effet des composés quantitativement minoritaires n'est pas forcément négligeable (Lattaoui, 1989; Tantaoui-Elaraki et al., 1993a).

## Matériel et méthodes

---

Notre étude a été réalisée sur le terrain, en collaboration avec la ferme Dridechesisedansrégion d'Oued Lili, wilaya de Tiaret.

### **1) Animaux :**

Les prélèvements ont été réalisés durant la période qui s'est étalée d'Avril 2012 à Mars 2013. Les veaux ont été consultés au cours des visites réalisées pour une entérite néonatale.

### **2) Méthodes:**

#### **2-1) Récolte des échantillons :**

Les prélèvements ont été effectués sur des veaux diarrhéiques âgés de 1 à 30 jours, nés de mères non vaccinés et n'ayant bénéficié d'aucune intervention thérapeutique. Les échantillons ont été récoltés dans des flacons en plastiques stériles. Après nettoyage de la région anale à l'aide d'un papier hygiénique et une éventuelle excitation de l'orifice anal avec l'index de la main droite ganté. Immédiatement après la récolte, les prélèvements ont été étiquetés par un stylo indélébile et acheminés dans une glacière isotherme (à environ 4 °c).

#### **2-2) Détection des agents entéropathogènes:**

##### **2-2-1) Culture bactériologique:**

Une culture bactériologique a été réalisée en vue de mettre en évidence des entérobactéries associées aux diarrhées néonatales du veau.

Immédiatement après réception au niveau du laboratoire de microbiologie, les échantillons ont étéensemencés à l'aide d'un écouvillon stérile sur le milieu Mac Conkey (Biochem, lot : B2240500-0611-011) et incubés pendant 18 à 24 h à 37 °C.

##### **2-2-2) Préparation de la suspension bactérienne :**

Une suspension bactérienne de densité équivalente au standard 0,5 de Mac Farland ( $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) est préparée à partir de chaque isolement.

##### **2-2-3) Tests biochimiques :**

Les tests biochimiques pour chaque prélèvement ont été réalisés à l'aide d'une galerie Api 20 E (BioMérieux, Réf. 20160). A partir de la suspension bactérienne préalablement préparé, les cupules de la galerie Api 20 E ont été remplis selon les recommandations du fabricant, puis incubés à 37°C pendant 24h.

La lecture s'effectue après notation (+ ou -) en fonction du virement de couleur. Cependant l'identification du genre, voire l'espèce à été réalisé à l'aide d'un logiciel Api web.

### 2-2-4) Antibiogramme :

Les méthodes de diffusion ou antibiogrammes standards sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic. Des disques de papier buvard, imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture (Guérin-Faublée et Carret, 1999).

#### \* Application :

Dans des boîtes de 16 cm de diamètre contenant  $10^6$  à  $10^8$  cfu de culture bactérienne effectuée à la surface de 20 ml de gélose Muller Hinton 2 (bioMérieux, lot : 1000487960), des disques imprégnés d'antibiotique de dose connues sont appliqués à la surface et à des distances déterminés (4 disques/boîte) (voir tableau 2). Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures. La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autour de chaque disque où aucune croissance n'est observée. Les valeurs sont comparées avec celles établies par la commission de standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire (OMS, 2008)

**Tableau 2 :** liste des Antibiotiques à tester.

| Nom d'antibiotique   | Dose     |
|--|----------|
| Ampicilline (Bioanalyse, lot : 101123)                       | 10 mg    |
| Amoxicilline + acide clavulanique (Bioanalyse, lot : 101124) | 20/10 mg |
| Tétracycline (Bioanalyse, lot : 101108)                      | 30 mg    |
| Colistin (Bioanalyse, lot : 100506)                          | 10 mg    |

**3) Plante :** dans notre ont a utilisé *Cinnamomum aromaticum* vue d'évaluer l'effet de son huile essentielle sur certaines souches bactériennes associées aux diarrhées néonatales du veau.

### **3-1) Classification:** d'après (Benzeggouta 2005).

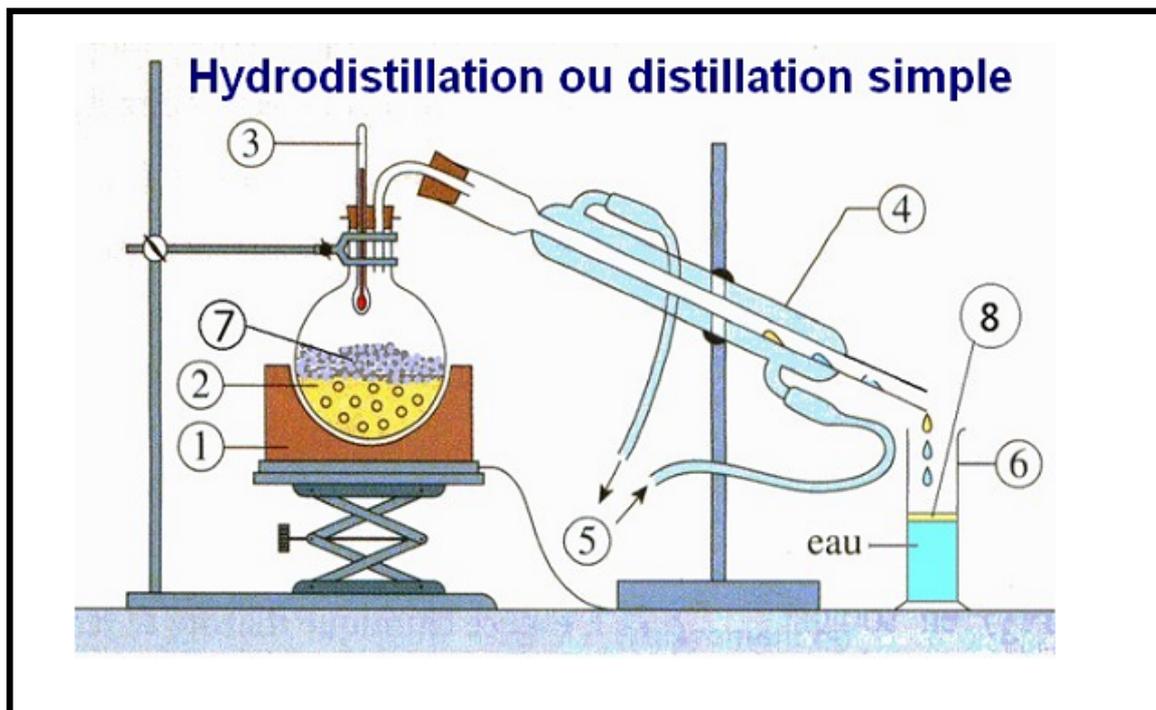
|                      |  |
|----------------------|--|
| Royaume :            | Plante   |
| Sous royaume :       | Trachéohyte = plantes vasculaires                  |
| Embranchement :      | Spermatophytes ou Phanérogames = plantes à graines |
| Sous embranchement : | Angiospermes = plantes à fleurs                    |
| Classe :             | Dicotyledonae                                      |
| Sous classe :        | Magnoliidae  |
| Ordre :              | Magnoliales  |
| Famille :            | Lauraceae  |
| Genre :              | <i>Cinnamomum</i>                                  |
| Espèce :             | <i>Cinnamomum</i> spp                              |

### **4) Extraction de l'huile essentielle :**

Dans cette étude, la méthode d'hydrodistillation a été utilisée pour l'extraction de l'huile essentielle de la cannelle au niveau du laboratoire de microbiologie de l'institut des sciences vétérinaire de Tiaret.

#### **4-1) Hydrodistillation :**

50 g de la cannelle concassé est introduite dans un ballon de un litre, imprégné de 500 ml d'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition pendant une heure et demi à deux heures. Les vapeurs chargées d'huile essentielle; en traversant un réfrigérant se condensent et chutent dans une ampoule à décanter (Figure.04), l'eau et l'huile se séparent par différence de densité.



**Figure 04:** Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation(Lucchesi,2005).

1- Chauffe ballon 5 - Entrée et sortie d'eau

2- Ballon

6 -Erlenmeyer

3- Thermomètre 7 - Matière à extraire l'essence

4- Réfrigérant

8 - La couche d'H.E

### 5) Calcul de rendement :

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal à traité.

$$\text{RHE}(\%) = \text{MHE} / \text{MS} .100$$

**R** : Rendement en extraits fixes en g/100g de matière sèche ;

**MHE**: Quantité d'extrait récupérée exprimée en g;

**MS** : Quantité de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction exprimée en g.

Les huiles essentielles sont recueillies et conservées au réfrigérateur à 4°C dans des bouteilles sombres pour les préserver de la chaleur.

### **6) Tests microbiologiques :**

Les tests microbiologiques ont été réalisés au laboratoire de microbiologie de l'institut des sciences vétérinaire de Tiaret.

#### **6-1) Microorganismes étudiés :**

Quatre bactéries (deux souches *Escherichia coli*[1 et 2], *KluyverasppetKlebsiellaornithinolytica*) ont été choisis pour leur fréquence élevée à résisté aux antibiotiques testés (résistance à au moins trois antibiotiques).

#### **6-2) Préparation des dilutions :**

Du fait de la non-miscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc au milieu de culture, une mise en émulsion a été réalisée grâce au Tween 20 (Sigma-Aldrich lot: STBB 3609), préalablement diluer au 1/10<sup>e</sup> avec l'eau distillée stérile. Elle permet d'obtenir dans le milieu une répartition homogène des huiles essentielles et d'augmenter au maximum le contact germe/composé. Des dilutions sont préparées au 1/10<sup>e</sup>, 1/20<sup>e</sup>, 1/30<sup>e</sup>, 1/40<sup>e</sup>, 1/50<sup>e</sup>, 1/60<sup>e</sup>, 1/70<sup>e</sup>, 1/80<sup>e</sup>, 1/90<sup>e</sup> jusqu'au 1/240<sup>e</sup> (v/v) dans cette solution de Tween 20 diluée.

#### **6-3) Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne :**

La technique que nous avons utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne de notre huile essentielle est la méthode de Morel et Rochaix. Il s'agit d'une méthode de dilution où les huiles essentielles à tester sont directement mélangées en concentration connue au milieu de culture (exige la dispersion homogène par un émulsifiant).

Dans des tubes à essai contenant chacun 4,5 ml du milieu Muller Hinton préalablement stérilisés à l'autoclave pendant 20 min à 121 °C et refroidis à 45 °C, on ajoute aseptiquement 0,5 ml de chacune des dilutions de façon à obtenir des concentrations finales de 1/100<sup>e</sup>, 1/200<sup>e</sup>, 1/300<sup>e</sup>, 1/400<sup>e</sup>, 1/500<sup>e</sup>, 1/600<sup>e</sup>, 1/700<sup>e</sup>, 1/800<sup>e</sup>, 1/900<sup>e</sup> jusqu'au 1/2400<sup>e</sup> (v/v). On agite convenablement les tubes afin de bien disperser l'huile essentielle dans le milieu de culture avant de les verser dans les boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre. Des témoins, contenant le milieu de culture et 0,5 ml de Tween 20 dilué seule, sont également préparés.

L'ensemencement se fait par stries à l'aide d'un écouvillon stérile à partir d'une suspension bactérienne contenant 10<sup>8</sup>UFC. ML<sup>-1</sup>.Après incubation, on note la présence ou l'absence des colonies.

### **6-4) Détermination de l'effet antibactérienne des huiles essentielles :**

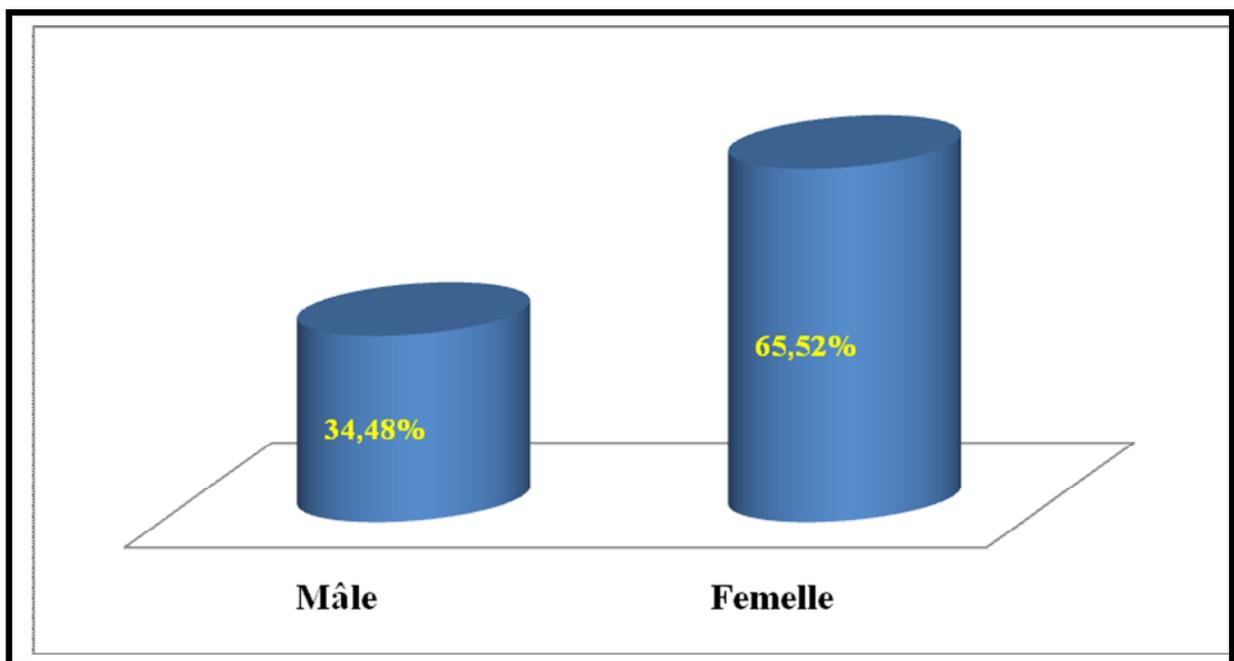
Dans le but de déterminer l'effet bactéricide ou bactériostatique de l'huile essentielle de cannelle. Un raclage de la boîte de culture, dans laquelle la concentration de l'huile essentielle la plus faible qui a permis l'inhibition du développement des bactéries, à l'aide d'un écouvillon stérile puis ensemence sur une gélose nutritive (Himedia, lot : 0000104115).

## Résultats

---

Une recherche microbiologique a été effectuée sur 29 échantillons de matières fécales des veaux diarrhéiques, provenant d'une ferme de bovins laitiers appartenant au propriétaire Drideche sise dans la région d'Oued Lili, wilaya de Tiaret. Cette analyse a été effectuée dans le but de détecter les bactéries entéropathogènes associées aux diarrhées néonatales du veau dans cette ferme.

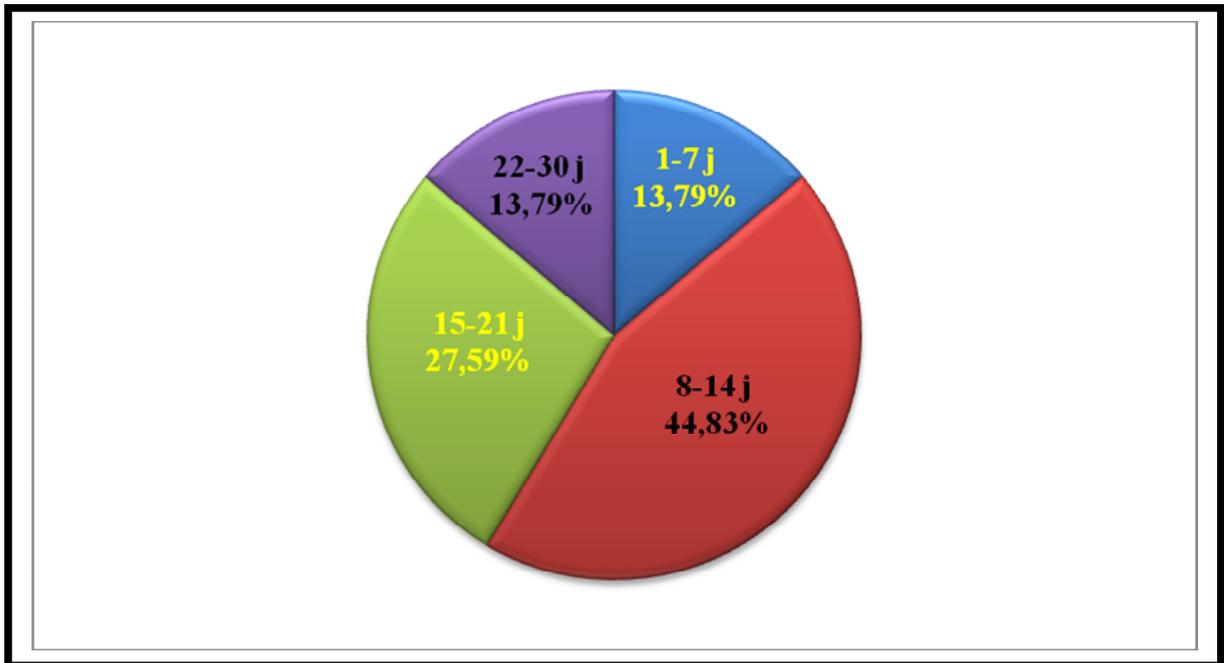
### 1-Répartition des cas diarrhéiques selon sexe :



**Figure 05** : Répartition des cas diarrhéiques selon sexe.

Il ressort de cette figure que le nombre de cas de diarrhée chez les femelles est supérieur à celui des mâles.

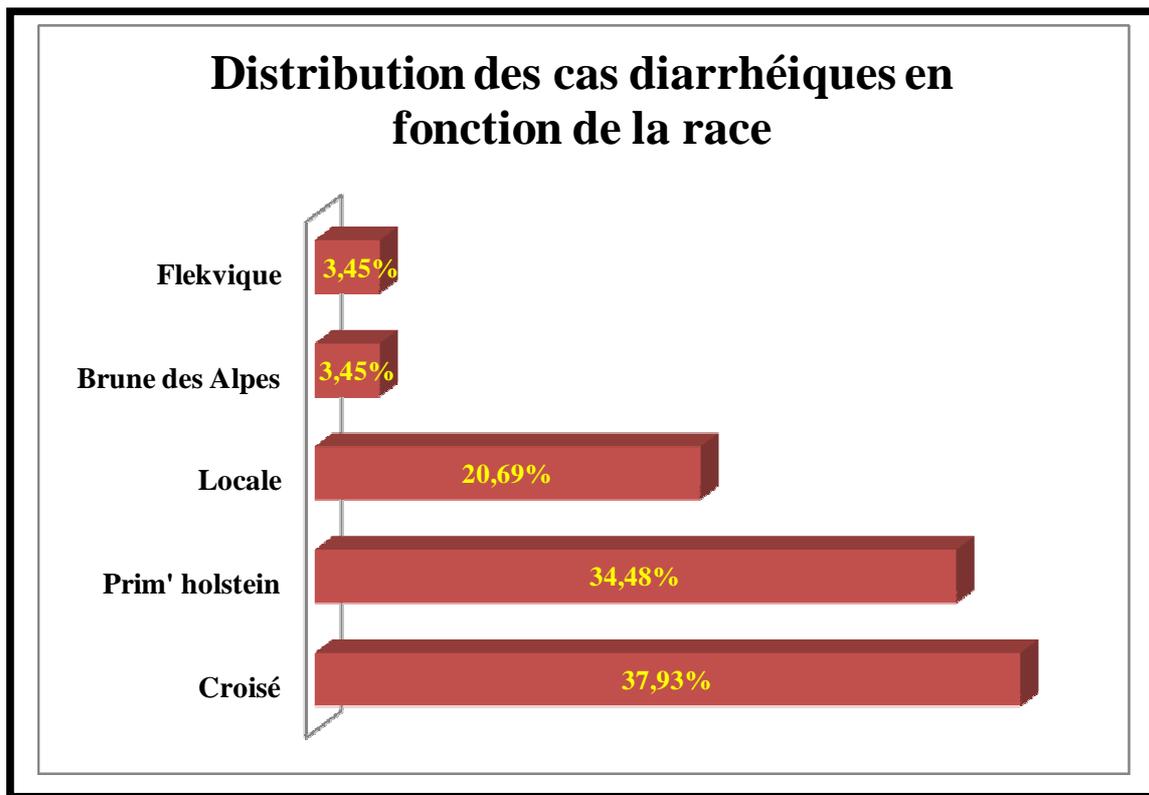
### 2- Répartition des cas diarrhéiques en fonction des tranches d'âge :



**Figure 06 :** Répartition des cas diarrhéique en fonction d'âge.

Cette figure montre que la deuxième tranche d'âge affiche le taux le plus élevée des cas diarrhéique avec un pourcentage de 44.83% suivie par la troisième tranche d'âge avec un taux de 27.59%. Cependant, la première et la dernière tranche d'âge ont montré untaux moins élevé qui est de l'ordre de 13.79%.

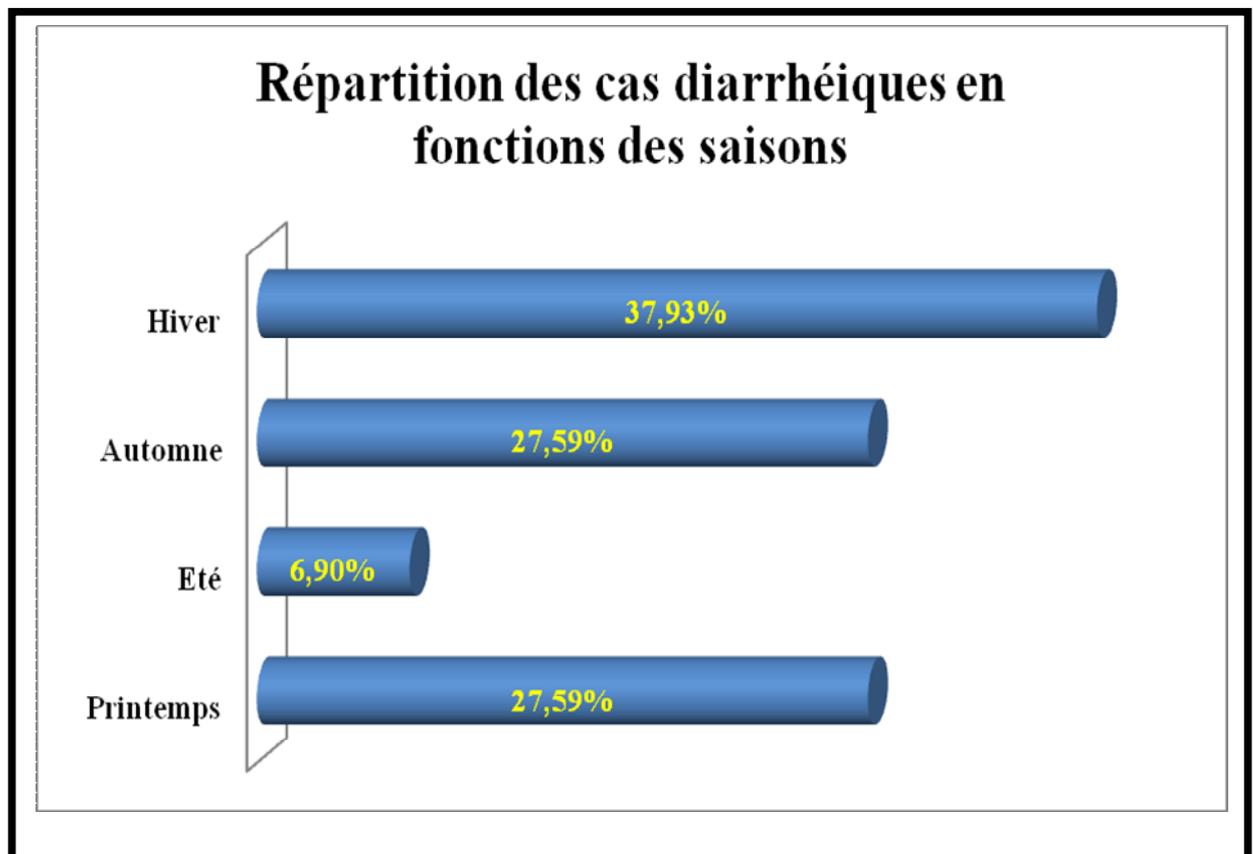
### 3- Répartition des cas diarrhéiques en fonction de la race du veau :



**Figure 07 :** Répartition des cas diarrhéique en fonction de la race.

Cette barre montre que les veaux issus des croisements sont les plus prédisposés aux diarrhées néonatales avec un pourcentage de 37.93%, suivi par ceux qui appartient à la race Prim' Holstein et la race locale avec des taux de 34.48% et 20.69% respectivement.

### 4- Répartition des cas diarrhéiques en fonction des saisons :



**Figure 08 : Répartition des cas diarrhéiques en fonction des saisons.**

Il en ressort de cette figure que l'hiver est la saison qui se caractérise par le taux le plus élevée des cas de diarrhées chez le veau. Cependant l'été est la saison où les veaux sont moins touchés par le syndrome diarrhéique.

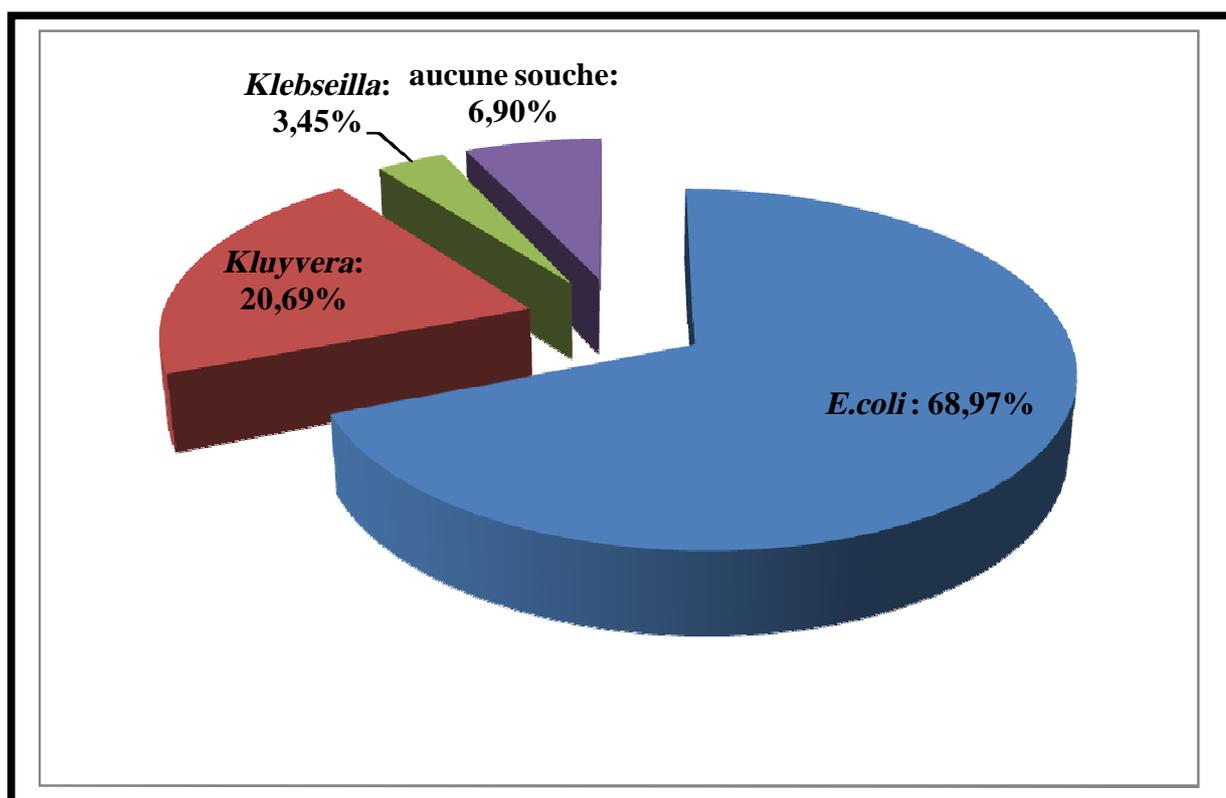
### 5- Prévalences globales de différentes bactéries isolées :

## Résultats

**Tableau 03** : Prévalences des agents entéropathogènes détectés chez les veaux diarrhéiques.

| Bactéries isolées                | Veaux (n = 29) |        |
|----------------------------------|----------------|--------|
|                                  | Nombre         | %      |
| <i>Echerichia coli</i>           | 20             | 68,97% |
| <i>Kluyveraspp</i>               | 6              | 20,69% |
| <i>Klebseillaornithinolytica</i> | 1              | 3,45%  |
| Aucunesouche                     | 2              | 6,90%  |

Ce tableau résume les différentes prévalences des bactéries isolées. Ils ont permis de déduire que l'*Echerichiacoli* est la bactérie la plus isolée avec un pourcentage de 68.97 %. Cependant *Kluyveraspp* a été détectée chez 20.69 %, suivie par *Klebseillaornithinolytica* avec un taux d'isolement de 3.45%. Toutefois deux prélèvements (6.90%) sont avérés négatifs



**Figure 09** : Prévalence des bactéries isolées des cas diarrhéiques.

## Résultats

Cette distribution montre clairement que *E.coli* est la bactérie le plus répandu, suivi en deuxième rang par *Kluyveraspp*, et à moindre degré *Klebseillaornithinolytica*

### 6-Antibio-résistance :

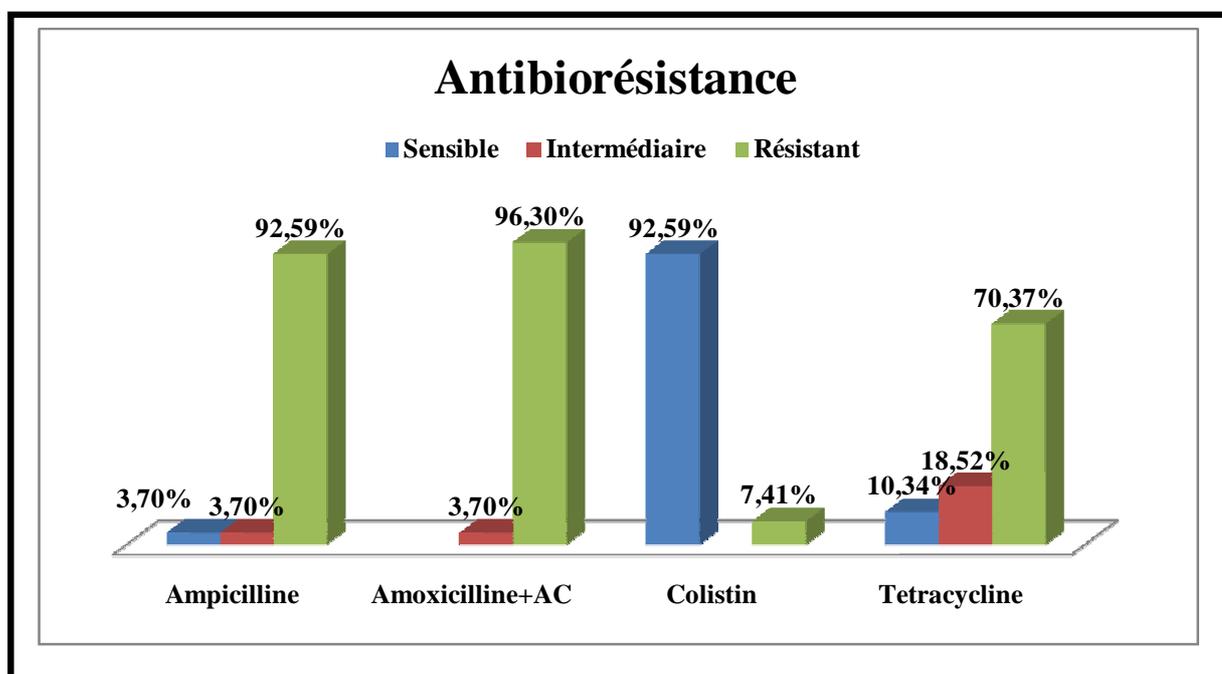


Figure 10 : Anti-bio-résistance des souches bactériennes isolées des cas diarrhéiques

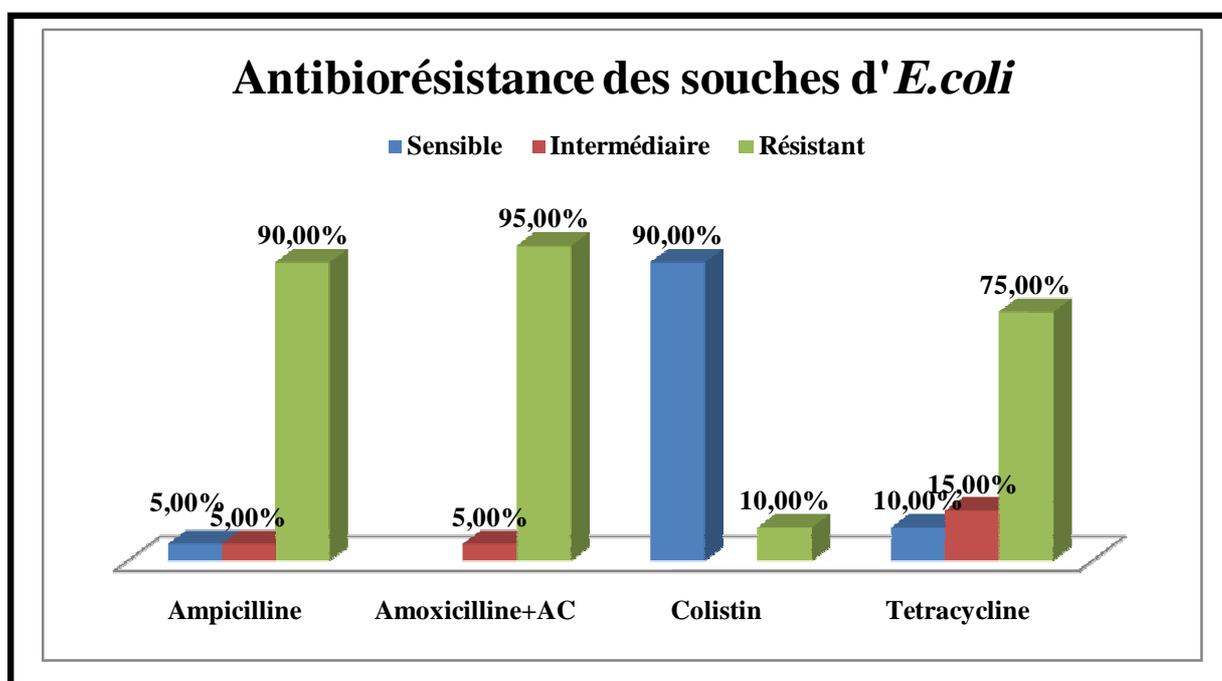


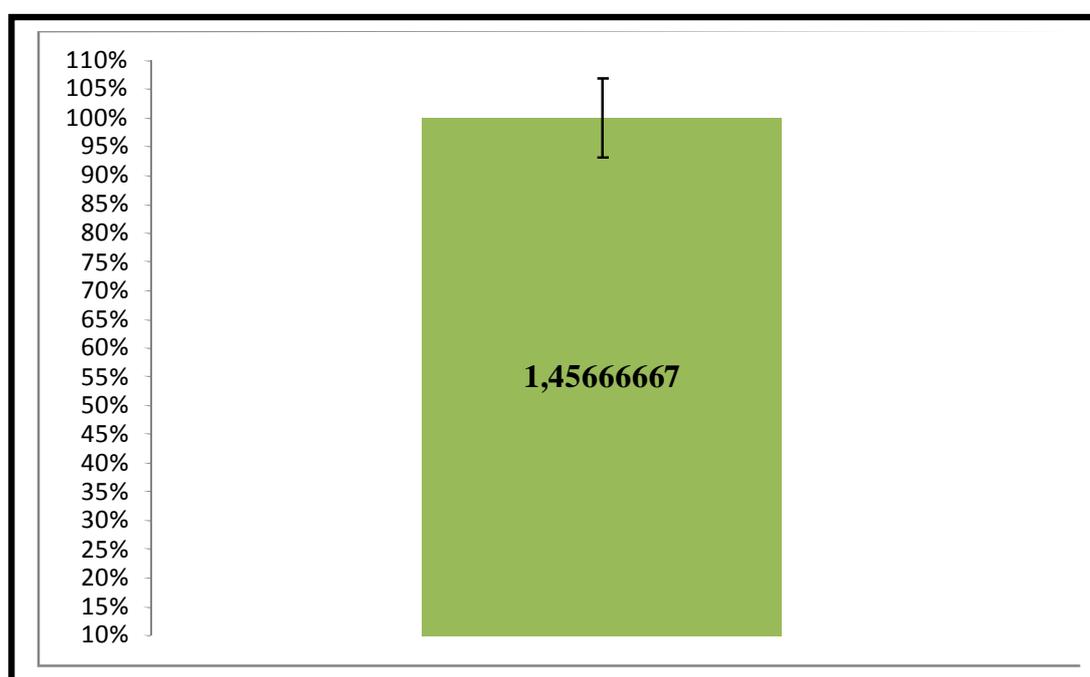
Figure 11 : Anti-bio-résistance des souches *E.coli* isolées des cas diarrhéiques

## Résultats

L'étude de l'antibio-résistance des souches isolées montre une sensibilité élevée de la majorité des souches à la colistine. En revanche, une résistance est relevée pour l'ampicilline, l'amoxicilline+ acide clavulanique et la tétracycline. En outre, les souches d'*E.coli* sont montrées résistantes pour l'ampicilline, l'amoxicilline+ acide clavulanique et la tétracycline. Cependant, ces souches sont sensibles à la colistine (voir figure. 07 et 08).

### 7-Rendement de l'huile essentielle:

Le rendement en huile essentielle est exprimé par la quantité d'huile (en ml) obtenue pour 100g de matière végétale sèche.



**Figure 12 :** Rendement en huile essentielle de cannelle de chine

### 8- Activité antimicrobienne des huiles essentielles:

Le tableau 4 récapitule les résultats de l'activité antibactérienne d'huile essentielle *Cinnamomum* spp. On note que cette huile exerce une forte activité antibactérienne. La concentration de 1/2000 v/v était suffisante pour inhiber la croissance d'*E. coli* 1. Alors que *E. coli* 2 et *Kluyveraspp* étaient plus sensibles avec une concentration d'inhibition de 1/2100 v/v. Tandis que *Klebsiella ornithinolytica* était la plus sensible avec une concentration d'inhibition de 1/2200 v/v.

## Résultats

**Tableau 04 :** Activité antibactérienne d'huile essentielle de *C. aromaticum*.

| Bactéries | Dilution v/v |       |       |       |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|-----------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|           | 1/100        | 1/200 | 1/300 | 1/400 | 1/500 | 1/600 | 1/700 | 1/800 | 1/900 | 1/1000 | 1/1100 | 1/1200 | 1/1400 | 1/1500 | 1/1600 | 1/1700 | 1/1800 | 1/1900 | 1/2000 | 1/2100 | 1/2200 | 1/2300 | 1/2400 | Témoïn |
| <i>A</i>  | -            | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | +      | +      | +      | +      | +      |
| <i>B</i>  | -            | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | +      | +      | +      | +      |
| <i>C</i>  | -            | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | +      | +      | +      | +      |
| <i>D</i>  | -            | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | +      | +      | +      |

*A: Escherichia coli 1; B: Escherichia coli 2; C: Kluyveraspp; D: Klebsiellaornithinolytica*

### 1) Activité bactériostatique / bactéricide:

Le tableau 5 résume les résultats de l'activité bactériostatique / bactéricide d'huile essentielle *Cinnamomum spp.* On note que cette huile exercé une activité bactériostatique envers les quatre souches étudiées.

**Tableau 05:** Activité bactériostatique / bactéricide d'huile essentielle de *C. aromaticum*.

| Bactéries                        | CMI µl/ml | Effet            |
|----------------------------------|-----------|------------------|
| <i>Escherichia coli1</i>         | 0,1       | Bactériostatique |
| <i>Escherichia coli1</i>         | 0,095     | Bactériostatique |
| <i>Kluyveraspp</i>               | 0,095     | Bactériostatique |
| <i>Klebsiellaornithinolytica</i> | 0,09      | Bactériostatique |

## Discussion

---

A la lumière des résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons tirer déjà quelques renseignements quant à répartition des cas selon l'âge du veau, le sexe, la race, la saison de naissance, la prévalence de différentes bactéries isolées, leur sensibilité envers quelques antibiotiques usuelles ainsi que la sensibilité de quelques souches isolées envers la cannelle.

### **1) Répartition des cas selon l'âge du veau :**

En ce qui concerne l'âge, la fréquence d'infection est de l'ordre de 44.83 % en deuxième tranche d'âge, suivi par la troisième tranche d'âge avec 27.59%. Ces deux dernières apparaissent comme des périodes favorables à l'apparition des diarrhées, puisque l'infection s'installe après élimination des immunoglobulines colostrales.

Nos résultats relatifs à la répartition de la diarrhée en fonction de l'âge sont proches de ceux décrits par (Fassi-Fehri et al.,1988,Wells et al.,1996etAlferi et al.,2006)qui ont constatés un pic des diarrhées néonatales à la 2<sup>ème</sup> semaine.

### **2) Répartition selon le sexe du veau :**

D'après les présents résultats, le nombre des sujets femelles atteints de diarrhée néonatale est supérieur à celui des mâles. Ce résultat n'est pas en accord avec ceux décrits en littérature puisque la majorité des auteurs déclarent que les mâles semblent deux fois plus sensibles aux diarrhées néonatales que les femelles (Clement et al.1995).

### **3) Répartition des cas diarrhéiques en fonction de la race du veau :**

Parmi les cinq races de veaux étudiées (croisée, Prim' Holstein, locale, brune des alpes et la Flekviqie), il semble que les veaux de race croisée sont plus prédisposés aux diarrhées néonatales par rapport aux veaux d'autres races.

La différence de la richesse du colostrum en immunoglobulines entre les races, mentionnée par un grand nombre d'auteurs, pourrait expliquer ce phénomène (Tyler et al.,1999, Boussemna etSfaksi,2009).

### **4) Répartition selon la saison de naissance du veau :**

D'une façon générale, les auteurs s'accordent sur le fait que la morbidité et la mortalité des veaux sont plus élevées en hiver qu'en été (Bendali, 1998).Dans notre étude, nous avons couvert une seule saison de vêlage, ce qui nous a permis d'estimer l'effet du mois de naissance plutôt que la saison.

## Discussion

---

Nos résultats indiquent que l'évolution de l'incidence au cours du temps a mis en évidence deux pics, le premier durant le mois de décembre et janvier (20.69%), et le second moins important au mois d'avril et mai (13.79%). Ce résultat est différent de ceux obtenus par (Bendali et al., 1999) ainsi que (Lorino et al., 2005) ; qui ont montré que le mois de mars est le mois plus favorable pour l'apparition des diarrhées néonatales. Cependant, (Bendali et al., 1999) ont aussi cité le mois de décembre comme étant un mois à haut risque concernant les entérites néonatales. (Bendali et al., 1999)

ont expliqué cela par, la surpopulation des veaux, le climat, les conditions météorologiques, et à une forte charge de l'infection dans la saison de vêlage tardif (qui pourrait être le résultat de l'accumulation du fumier et de la litière contaminée) pour le mois de mars. Tandis que pour le mois de décembre, ils ont justifié cela par les intempéries, mais également la présence des agents pathogènes environnementaux tel qu'*E. Coli*.

### 5) Prévalences globales de différentes bactéries isolées :

Dans les enquêtes microbiologiques sur les diarrhées néonatales du veau ainsi que ceux en bonne santé, les infections mixtes ont été beaucoup plus fréquemment détectées chez les veaux diarrhéiques que chez les veaux sains. (Reynolds et al. 1986) ont suggéré que la présence de plus d'un entéropathogène peut être l'un des facteurs déterminants dans le cas d'infection clinique ou sub-clinique. Rotavirus, coronavirus, cryptosporidium spp. et ETEC sont les quatre principaux pathogènes associés néonatal le veau diarrhée dans le monde entier (Reynolds et al, 1986 ; Klingenberg et Svensson, 1998; de la Fuente et al, 1998; Bell et al., 2002). Dans cette étude, nous avons détecté *E. coli*, *Kluyvera* spp. *Klebsella ornithinolytica*., dans les selles prélevées sur les veaux diarrhéiques.

L'*E.coli* a été l'agent pathogène le plus dominant dans notre étude, avec une fréquence d'isolement de 68.97 %. Des taux inférieurs ont été rapportés par (Herrera-Luna et al., 2009) ainsi que Ok et al., 2009 avec 18.9% et 45.12% respectivement.

Au contraire d'*E.coli*, les *Kluyvera* ssp. sont moins fréquemment détectés, avec un taux de 20.69 %. Cette bactérie n'a pas été mise en évidence dans d'autres travaux. Néanmoins, certains travaux incriminent cette bactérie dans les infections du tractus gastro-intestinal (Sarria et al., 2001).

*Klebsella ornithinolytica* n'a été détectée que dans un seul cas parmi les échantillons fécaux soumis à l'analyse, ce qui a permis de donner une prévalence de 3.45 %. Cette prévalence est proche de celles rapportées par (Herrera-Luna et al., 2009) avec un taux de 3.3%.

## Discussion

---

Au cours de cette étude, nous n'avons pas mis en évidence les *Salmonelles* sur cultures bactériologiques. Un résultat similaire a été cité par (Snodgrass et al. 1986, Abraham et al. 1992 et Herrera-Luna et al., 2009). Cependant, des pourcentages minimes de prévalence ont été enregistrés par (Perez et al. 1998 avec 2 %, Acha et al. 2004 avec 2 % et Ok et al., 2009 avec 1.21%.)

Les cas négatifs ont affiché un pourcentage de 6.9 %, ce taux est inférieurs a celui donnée par (Ok et al., 2009) avec 26.82%.

Ce taux négatif peut être expliqué par :

- Certains cas de diarrhée peuvent être non associés à des agents entéropathogènes (la diarrhée n'est pas d'origine infectieuse stricte, mais peut être due au lieu de cela à des facteurs nutritionnels ou de gestion).

- Les prélèvements ont été effectués à un moment où l'agent pathogène n'était pas présent dans les fèces.

- L'implication d'autres agents entéropathogènes non visés par cette étude dans le déclenchement de la diarrhée, tel que certaines bactéries (*Clostridium*, *Campylobacter*,...etc.), des virus (*Rotavirus*, *Coronavirus*, *Calicivirus*, *Torovirus*,...etc.) et les parasites (*Cryptosporidium*,... etc.).

### 6) Antibio-résistance :

Cette étude a mis en évidence une résistance des souches isolées pour l'ampicilline, l'amoxicilline +acide clavunalinique et la tétracycline à des taux de 92.59%, 96.3% et 70.37% respectivement. Cependant ces souches montrent une sensibilité élevée à la colistine (92.59%). Egalement, les souches d'*E.coli*, ont manifestées des taux élevés de résistance à l'ampicilline (90%), l'amoxicilline +acide clavunalinique (95%) et la tétracycline (75%). Tandis qu'ils sont sensibles à la colistine avec à un pourcentage de 90%.

Les résultats de l'antibiorésistance des souches d'*E. coli* présentent de nombreux points communs avec ceux rapportés par (Akam et al., 2007). Des taux faibles de résistance des souches sont annoncés par (de Verdier et al., 2012) avec 27.4% pour l'ampicilline et 31.6% pour la tétracycline. De même, (Ordenet al., 2000) a mentionné un taux de 49.2% des souches d'*E. coli* résistante à l'ampicilline. Alors que ces auteurs ont affichés un taux similaire de résistance des souches d'*E. Coli* à la tétracycline avec 68.2%.

### **7) Rendement en huile essentielle :**

Les rendements moyens en huiles essentielles ont été calculés en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante. Les échantillons de la cannelle fourni un taux d'environ 1,46 %  $\pm$  0,05. Ce dernier taux est plus faible par rapport à celui rapporté dans la bibliographie 20ml/kg (Bruneton, 2009).

### **8) Activité antimicrobienne des huiles essentielles:**

Des tests de l'activité antimicrobien de 45 huiles essentielles sur les bactéries, les champignons et les levures ont permis de constater que l'huile d'écorce de cannelle possède des propriétés antimicrobiennes à large spectre (Lu et al., 2011).

Dans notre étude, l'huile essentielle de la cannelle présentait une forte activité contre les souches bactériennes sélectionnées. Elle a affiché un CMI qui a varié de 0,09 à 0,1 $\mu$ l/ml vis à vis des 4 souches d'entéropathogènes choisi par cette étude. Plusieurs études (Aureli et al. 1992, Matan et al. 2006 ; et Prabuseenivasan et al. 2006) ont montré que les huiles de cannelle, clou de girofle et le romarinontfort et des effets inhibiteurs cohérentes contre divers agents pathogènes .Des résultats similaires ont été cité par (Lu et al., 2011) avec un CMI de 0.1 à 0.4  $\mu$ L.mL<sup>-1</sup>.

## Conclusion

---

### Conclusion :

Les résultats de cette étude, réalisée dans la région de Tiaret a permis de ressortir l'implication de quelques entérobactéries associés à la diarrhée néonatale du veau âgé de 1 à 30 jours, à savoir *E. coli*, *Kluyvera spp* et *Klebseillaornithinolytica*.

Même si les prévalences sont variables, les *Escherichia. Coli* s'affichent en tête de liste des agents diarrhéiques. Ils sont suivis par *Kluyvera spp* et *Klebseillaspp* respectivement.

Les résultats de l'antibiogramme montrent une antibiorésistance des différentes souches isolées aux antibiotiques couramment utilisés. Néanmoins, il est recommandé de faire un suivi de l'évolution de l'antibiorésistance des souches en appliquant les techniques standardisées permettant de surveiller les éventuelles montées d'une antibiorésistance et d'instaurer un plan thérapeutique approprié, afin de réduire autant que possible l'incidence de cette pathologie chez les veaux nouveau-nés sur le terrain.

Cette étude nous a permis aussi de prouver l'efficacité d'huile essentielle de la cannelle contre les souches étudiées. Ceci montre que la flore naturelle peut constituer une réserve importante d'espèces végétales intéressantes, dont les principes actifs peuvent être employés dans plusieurs domaines tels que les industries agroalimentaire et pharmaceutique.

(2008) selon les recommandations de l' OMS , ED 4 .

102. **Taillon C., Nadeau E., Mourez M. And Dubreuil J. D. (2008)** Heterogeneity of *Escherichia coli* stb enterotoxin isolated from diseased pigs. *J Med Microbio* 157, 887-90.
1. **Abraham G; Roeder P. L And Roman Zewdu. (1992)** Agents associated with neonatal diarrhoea in Ethiopian dairy calves. *Trop. Anim. Hith Prod.* 24: 74-80
2. **Achas.J; Kühn I; Jonsson P; Mbazima G; Katouli M; And Mölby R. (2004).** Studies on calf diarrhoea in Mozambique: Prevalence of bacterial pathogens. *Acta. Vet. Scand.* 45: 27-36.
3. **ACRESS.D. (1985);** Entérotogénic *Escherichia Coli* infection in new born calves: A review.*J. Dairy.Science.* 68: 229-256.
4. **Akam A., Tali-Mamaar H., Rahal Kh., Tahrat H., Chirilă F., Khelef D., Kaidi R., Lafri M., And Cozma V.,2004,** Fréquence d'isolement des souches d'*Escherichia coli* K99 chez les veaux dans six fermes laitières de la Mitidja d'Algérie., *Bul. USAMV,* 61, 10-15.
5. **Alekshun MN, AND Levy SB (2007)** Molecular mechanism of antibacterial multidrug resistance. *Cell.*128: 1037-1050
6. **Alferi A.A., Parazzi M.E., Takiuchi E., Medici K.C.,AND Aferi A.F. (2006):** Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2000 *Tropical Animal Health and Production,* 38, 521–52
7. **Arras G. Andusai M.(2001)** Fungitoxic activity of essential oils against four post-harvest citrus pathogens. chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *J. Food. Prot.* 64:1025-1029.
8. **Bagamboula C.F., Uyttendaele M. And Debevere J. (2004)** Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene toward *Shigella sonnei* and *S. Flexneri*. *Food.Microbiol.* 21: 33-42.
9. **Baker LJ, Cars O, AND Davey PG (2006)** National campaigns to improve antibiotic use. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*
10. **Batissou I. And der Vartanian M. (2000)** Extracellular dsba-insensitive folding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin *stx* in vitro. *J Biol Chem.* 275, 10582-9.
11. **Bell, D. J., D. A. Finlay, H. J. Clarke, M. J. Taylor, and H. J. Ball, 2002:** Development of a sandwich ELISA and comparison with PCR for detection of F11

## Référence bibliographique

---

- and F165 fimbriated *Escherichia coli* isolates from septicemic disease in farm animals. *Vet. Microbiol.* 85, 251–257.
12. **Bendali F., Bichet H., Sanaa M., AND Schelcher F. (1999).** Risk factors associated with diarrhea in new born calves. *Veterinary Research.* (In press).
  13. **Bendali F., Bichet H., Schelcher F., AND Sanaa M. (1997).** Factors associated with diarrhea incidence in beef calves from birth to 30 days of life in the French Midi-Pyrénées region. *Epidémiologie et santé animale.* 5-10 : 1-3
  14. **Benzeggouta (2005).** Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments
  15. **Bergonzelli G.E., Donnicola D., Porta N. And Cortesy-Theulaz I.E. (2003)** Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3240-46.
  16. **Beylier-Maurel M.F. (1976)** Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana E.P.P.O.S.* 58:283-286.
  17. **Blood D.C; And Henderson J.A. (1976).** *Médecine vétérinaire.* Vigotfrères
  18. **Boulos L. (1983)** Medicinal plants of North Africa. Ed Reference Publications Inc Michigan. S.
  19. **Boussena ; and A. Sfaksi (2000)** Département des sciences vétérinaires-Faculté des sciences de la nature et de la vie- Université Mentouri de Constantine, Algérie. Laboratoire régional vétérinaire El khroub- Constantine, Algérie
  20. **Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. ED Lavoisier
  21. **C. Herrera-Luna, D. Klein, G. Lapan, S. Revilla-fernandezb. Haschek, I. Sommerfeld-Stur, K. Moestl, W. And Baumgartner 2009** *1 veterinarnimedicina*, 54, (1): 1–11 Characterization of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy calves in Austria shedding various enteropathogenic agents
  22. **Chapman T. A., Wu X. Y., Barchia I., Bettelheim K. A., Driesen S., Trott D., Wilson M. And Chin J. J. (2006)** Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl Environ Microbiol* 72, 4782-95.
  23. **Choi C., Kwon D. And Chae C. (2001)** Prevalence of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin genes in *E. Coli* isolated from diarrheic piglets. *J Vet Diagn Invest* 13, 26-9.

## Référence bibliographique

---

24. **Clement J. C., King M. E., Salman M. D., Wittum T. E., Casper H. H., AND Odde K. G. (1995).** Use of epidemiologic principles to identify risk factors associated with the development of diarrhea in calves in five beef herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207 (10) : 1334-1338
25. **Cosentino S., Tuberoso C.I., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. And Palmas F. (1999)** In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Lett. Appl. Microbiol.* 29:130-35.
26. **Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Gustafson J.E., Warmington J.R. and Wyllie S.G. (2001).**Determining the antimicrobial actions of Tea tree oil. *Molecules.* 6: 87-91
27. **De Billerbeck V. G., Roques C., Vanière P. ET Marquier P. (2002)** Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes.X* (3) : 248-251.
28. **De la Fuente, R., A. Garcí ́a, J. A. Ruiz-Santa-Quiteria, M.Luzo ́n, D. Cid, S. Carcia, J. A. Orden, and M,AND Go ́mez-Bau-tista, 1998:** Proportional morbidity rates of enteropathogensamong diarrheic dairy calves in central Spain. *Prev. Vet.Med.* 36, 145–152.
29. **Delaquis P.J., Stanich K., Girard B. And Mazza G. (2002).**Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food. Microbiol.* 74: 101-109
30. **Desmesttre P.H. (1983).** Prophylaxie des entérites collibacillaires du veau nouveau-né. *Rec. Méd. Vét.* 1: 329-334.
31. **Didry N., Dubreuil L, and Pinkas M. (1994)** Activity of thymol, carvacrol, cinamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharm. Acta.Helv.* 69: 25-28.
32. **Donnenberg M. S. And Whittam T. S. (2001)** Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli. *J Clin Invest* 107, 539-48
33. **Dufrasne V. (2003).**Diarhhée néonatale des veaux et réhydratation par voie orale. Thésedoctoratvétérinaire.ENV.Alfort.
34. **Erb.A.,T. Stürmer . R. Marre ; and H. Brenner (2007)** Prevalence of antibiotic resistance in Escherichia coverview of geographical, temporal, and methodological variations *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26:83–90 DOI 10.1007/s10096-006-0248-2

## Référence bibliographique

---

35. **Fairbrother J. M., Nadeau E. And Gyles C. L. (2005)** Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* 6, 17-39.
36. **Fassi-Fehri M. M., Johnson D. W., Taoudi A., and Berrada J. (1988).** Epidémiologie des diarrhées à Escherichia coli et à Rotavirus chez le veau et l'agneau au Maroc. *Ann. Rech. Vet.* 19 : 59-64
37. **Foster .D.M et smith.gw.(2009)** . Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet clin food anim.* 25:13-36
38. **Giovanna I. Andrade , Fernanda M. Coura , Ethiene L. S. Santos , Marina G. Ferreira, Grazielle C. F. Galinari , Elias J. Facury Filho , Antônio U. De Carvalho, Andrey P. Lage , and Marcos B. Heinemann .(2012)** Identification of virulence factors by multiplex PCR in Escherichia coli isolated from calves in Minas Gerais, Brazil *Trop Anim Health Prod* (2012) 44:1783–1790 DOI 10.1007/s11250-012-0139-8
39. **Golin-Bisello F., Bradbury N. And Ameen N. (2005)** sta and cgmp stimulate CFTR translocation to the surface of villus enterocytes in rat jejunum and is regulated by protein kinase G. *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C708-16.
40. **Goossens H, Guillemot D, Ferech M, Schlemmer B, Costers M, and van Breda M, 62: 373-379**  
**Hadi Pourtaghi, Vahid Dahpahlavan ,and.Hassan Momtaz. (2013).** Virulence genes in Escherichia coli isolated from calves with diarrhoea in Iran. *Comp Clin Pathol.* 22 (3) : 513-515.
41. **Hammer K A. Dry L., Johnson M., michalake.M.,Carson C.F and Riley T.V. (2003)** Susceptibility of oral bacteria to Melaleuca alternifolia (tea tree) oil in vitro. *Oral.Microbiol.Immunol.* 18: 389-392.
42. **Hili P., Evans C.S. and Veness R.G. (1997)** Antimicrobial action of essential oils: The effect of dimethylsulfoxid on the activity of cinnamon oil. *Lett.Appl.Microbiol.*24: 269-75.
43. **Holland: R.E. (1990).**Some infectious causes of diarehea in young farm animals.Areview. *Clini. Microbiol.* 3(4): 3483-40
44. **Hulin V., Mathot A., Mafart P. And Dufossé L. (1998)** Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sci. Aliments* 18: 563-582.

## Référence bibliographique

---

45. **Inouye S., Yamaguchi H. And Takizawa T. (2001b)** Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *J. Infects. Chemother.* 7: (4) 251-254.
46. **Itoh Y., Nagano I., Kunishima M. And Ezaki T. (1997)** Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *J clinmicrobiol* 35, 2546-50.
47. **Janssen A.M., Scheffer J.J.C. and baerheimsvendsen A. (1987)** Antimicrobial activity of essential oils: a 1976–86 literature review. Aspects of the test methods. *Planta. Med.* 53: 395-398.
48. **Kaper J. B., Nataro J. P. And Mobley H. L. (2004)** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 12
49. **Kato T., Lijima H., Ishihara K., kanetot., Hirai K, Naito Y. And Okuda K. (1990)** Antibacterial effect listerine on oral bacteria. *Bull. Tokyo. Dent. Coll.* 31(4): 301-307.
50. **Kawano K., Yamada T., Yagi T. And Ito K. (1998)** [Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* from sporadic diarrhea patients]. *kansenshogakuzasshi* 72, 1275-82.
51. **Kerstin de Verdier, Ann Nyman, Christina Greko and Björn (2012)** bengtsson antimicrobial resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from Swedish dairy calves. *Veterinaria Scandinavica* 2012, 54:2
52. **Knoblock K., Pauli A., Iberl., N. Et al. (1989)** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Essent. Oil. Res.* 1: 119-128.
53. **Lachowicz K.J., Jones G.P., Briggs D.R., Bienvenu F.E., Wan J., Wilcok A. And Coventry M.J. (1998)** The synergetic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum*) against acid tolerant food microflora. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 209-214
54. **Lattaoui N. (1989)** Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de 3 espèces de Thym à profils chimiques différents ; Thèse de 3ème cycle, option Microbiologie, E.N.S Takadoum Rabat.
55. **Laub GR (1986)** Discovery of the sulfa drugs. *South Med. J.* 79: 782
56. **Lee K.H., Huang E.S., Pagana J.S. and Geissman T.A. (1971)** Cytotoxicity of
57. **Lima E.O., Gompertz O.F., Giesbrecht A.M. and Paulo M.O. (1993)** In vitro antifungal activity of essential oils obtained from plants against dermatophytes. *Mycoses.* 36: 333-336.

## Référence bibliographique

---

58. **Lopes L. M., Fabbriotti S. H., Ferreira A. J., Kato M. A., Michalski J. And Scaletsky I. C. (2005)** Heterogeneity among strains of diffusely adherent *Escherichia coli* isolated in Brazil. *J Clin Microbiol* 43, 1968-72.
59. **Lu Feil, Ding Yi-cheng<sup>1</sup>, YE Xing-qian<sup>2</sup> and DING Yu-ting<sup>1</sup>(2011)** Antibacterial Effect of Cinnamon Oil Combined with Thyme or Clove Oil *Agricultural Sciences in China* 2011, 10(9): 1482-1487.
60. **Lucchesi M.E. (2005)**. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences, discipline: Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies.
61. **M. Ok,L.Gu" ler, K. Turgut,U.Ok,I.S, en,I.K.Gu" ndu" z, M. F. Birdaneand H. And Gu" zelbektes,2009** 1Zoonoses and Public healththe Studies on the Aetiology of Diarrhoea in neonatalcalves and Determination of Virulence Gene markersofescherichia coli Strains by Multiplex PCR
62. **Mallea M., Soler M., Anfosso F. And Charpin J. (1979)** Activité antifongique d'essences aromatiques. *Pathol. Biol.* 27: 597-60
63. **Manohar V., Ingram C., Gray J.D., Talpur N.A., Echard B.W., Bagchi D. And Preuss H.G. (2001)**. Antifungal activities of *origanum* oil against *Candida albicans*. *Mol. Cel. Biochem.* 228: 111-117.
64. **Montes-Belmont R. ET Carvajal M. (1998)** Control of *Aspergillusflavus* in maiz with plant essential oils and their components. *J. Food. Prot.* 61: 616-619.
65. **Moseley S. L., Samadpour-Motalebi M. And Falkow S. (1983)** Plasmid association and nucleotide sequence relationships of two genes encoding heat-stable enterotoxin production in *Escherichia coli* H-10407. *J Bacteriol* 156, 441-3.
66. **Nagy B. And Fekete P. Z. (1999)**Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet Res* 30, 259-84.
67. **Nagy B. And Fekete P. Z. (2005)** Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* 295, 443-54.
68. **Nagy B; and Fekete P.Z. (1999)**,Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* 30: 259-284
69. **Nagy B; and Fekete P.Z. (2005)**.Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine.*Int. J. Medical. Microbio.* 295: 443-454.
70. **Naylore J.M; Ewaschuk J.B; and ZELLO G.A. (2003)**.La fluidothérapie intraveineuse chez les veaux diarrhéiques. In *The rounds of the partement of large*

## Référence bibliographique

---

- animal clinical science of the Western college of veterinary medicine. University of Saskatchewan. Vol 3:3
71. **Newman DJ, Cragg GM, and snaderkm (2003)** Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66: 1022-1037
  72. **Nielsen P.V. and Rios R. (2000)** Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *Int. J. Food. Microbiol.* 60: 219-229.
  73. **Nishikawa Y., Zhou Z., Hase A., Ogasawara J., Kitase T., Abe N., Nakamura H., Wada T., Ishii E. And Haruki K. (2002)** Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of sporadic cases of diarrheal illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000: prevalence of enteroaggregative *E. Coli* heat-stable enterotoxin 1 gene-possessing *E. Coli*. *Jpn J Infect Dis* 55, 183-90.
  74. **Noble WC, Virani Z, and Cree RG (1992)** Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol.Lett.* 72: 195-198
  75. **Normak HB, and Normak S (2002)** Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.* 252: 91-106
  76. **Ohno T., Kita M, Yamaoka Y., Imamura S., Yamamoto T., Mitsufuji S., Kodama T., Kashima K. And Imanishi J. (2003)** Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 8: 207
  77. **Orden J.A., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., Garcia S., Cid D., and De La fuente R. (2000):** In vitro susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic dairy calves to 15 antimicrobials agents. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 47, 329–335.
  78. **Paiva de Sousa C. And Dubreuil J. D. (2001)** Distribution and expression of the *astA* gene (*EAST1* toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol* 291, 15-20.
  79. **Paris M. Et Hurabielle. (1981)** Abrégés de matière médicale. Pharmacognosie Tome 1. Ed Masson. Paris. France.
  80. **Pellecuer J., Jacob M., and Simeon De Bouchberg M. (1980)** Essais d'utilisation d'huiles essentielles de plantes aromatiques méditerranéennes en odontologie conservatrice. *Plant. Med. Phytother.* 14: 83-98.
  81. **Prescott LM, Harley JP, and Klein DA (1995)** Microbiologie. De Boeck ed. P 1014

## Référence bibliographique

---

82. **Radostite O.M; Blood D.C; and GAY C.C. (1994).** Veterinary medicine. A text book of diseases of cattle, sheep, goats and horses. 9<sup>ème</sup> édition. Volume I. P: 703-745.
83. **Remmal A. (1994)** Activités antibactériennes et antivirales des huiles essentielles d'origan, de girofle et de thym. Thèse de doctorat d'état ès-sciences naturelles. Faculté des sciences Dhar El Mehraz. Fés-
84. **Remmal A., Bouchikhi T., Tantaoui-Elaraki A. And Ettayebi M. (1993b)** J. Essent. Oil. Res. Inhibition of antibacterial activity of essential oils by tween 80 and ethanol in liquid medium. J. Pharm. Belg. 48: 352-356.
85. **Reynolds D. J., 444Mongan J. H., and Chanter N. (1986).** Microbiology of calf diarrhea in southern Britain. Vet. Rec. 119 : 34-39
86. **Rhayour K., Bouchikhi T., tantaoui-Elaraki A., Sendide K. And Remmal A. (2003)** The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. J. Essent. Oil. Res. 15:286-292.
87. **ROLLIN F. (2002).** Réhydratation orale raisonnée du veau atteint de gastro-entérite néonatale. Proceedings of Veterinary Sciences Congress: 79-94.
88. **Roulier G. (1992).** Les huiles essentielles pour votre santé; Traité pratique d'aromathérapie: Propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes. Ed Dangles. France.
89. **Ruth N., Mainil J., Roupie V., Frere J. M., Galleni M. And Huygen K. (2005)** DNA vaccination for the priming of neutralizing antibodies against non-immunogenic *Stx* enterotoxin from enterotoxigenic *Escherichia coli*. Vaccine 23, 3618-27.
90. **Sarria ; Juan C., Ana M. Vidal, and Robert C. Kimbrough III (2001)** Infections Caused by *Kluyvera* Species in Humans . Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Texas Tech University Health Sciences Center, Lubbock, Texas.
91. **Sauvage C. (1974)** l'état actuel de nos connaissances sur la flore du Maroc. Colloque du CNRS n° 235, la flore du bassin Méditerranéen. Paris.
92. **Savarino S. J., Fasano A., Robertson D. C. And Levine M. M. (1991)** Enterotoxigenic *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. J Clin Invest 87, 1450-5.
93. **Schelcher F; and Bichet H; VALARCHER J.F; FOUCRAS G; BOUISSET S. (1999).** Les vaccinations contre les gastro-entérites diarrhéiques du veau nouveau-né: Que peut-on en attendre?. Point.Vét. 29: 127-134.

## Référence bibliographique

---

94. **Schwartz R., Davi R. And Hilton T.J. (1992)** Effect of temporary cements on the bond strength of a resin cement. *Am. J. Dent.* 5: 147-150. sesquiterpenes lactones. *Cancer. Res.* 31: 1649-1654.
95. **Shapiro S., Meier A. And Guggenheim B. (1994)** The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral.Microbiol.Immunol.* 9: 202-208.
96. **Siddiqui Y.M., Ettayebi M., Haddad A.M. and Al-Ahdal M.N. (1996)** Effect of essential oils on the enveloped viruses: antiviral activity of oregano and clove oils on herpes simplex virus type 1 and Newcastle disease virus. *Med. Sci. Res.* 24: 185-186.
97. **Simeon de Buochberg M. (1976)** Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et de ses constituants. Thèse de doctorat d'Etat és Sciences Pharmaceutiques. Montpellier.
98. **Singh SB, Barrett JF (2006)** Empirical antibacterial drug discovery foundation in natural products. *Biochem.Pharmacol.* 71: 1006-1015
99. **Skandamis P.N. and Nychas G.J.E. (2001)** Effect of oregano essential oil on microbiological and physicochemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *J. Appl. Microbiol.* 91: 1011-22.
100. **Snodgrass D.R; Tezolo H.R; Sherwood D; Campbell I; Menzies J.D; and Synge B.A. (1986).** Aetiology of diarrhoea in young calves. *Veterinary.Record.* 119: 31-34.
101. **So M. And mccarthy B. J. (1980)** Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 4011-5.
102. **Sourai P.G. (1989).** Antimicrobial action of dental materials used in operative dentistry: a review. *Odontostomatol.Proodos.* 43(5): 399-408.
103. **Spangler B. D. (1992)** Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 56, 622-47.
104. **Standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire a l'échelle nationale.**
105. **Suresh B., Sriram S., Dhanaraj S.A., Elango K. Et chinnaswamay K. (1997)** Anticandidosique activity of Santolinachamaecyparissus volatile oil. *J. Ethnopharmacol.* 55:151-159.
106. **Tantaoui-Elaraki A., Ferhout H. And Errifi A. (1993b)** Inhibition of the fungal asexual reproduction stages by three Moroccan essential oils. *J. Essent. Oil. Res.* 5: 535-545.

## Référence bibliographique

---

107. **Tantaoui-Elaraki A., Lattaoui N. And Errifi A. (1993a)** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus broussonetti*, *T. Zygis* and *T. Satureioides*. *J. Essent. Oil. Res.* 5: 45-53.
108. **Tyler J.W; Steevens B.J; Holstetler D.E; Holle J.M; and Denbigh J.L. (1999).** Colostral immunoglobulin concentrations in Holstein and Guernsey cows. *Ann. J. Vet. Res.* 60: 1136-1139.
109. **Ultee A., Kets E.P.W. and Smid E.J. (1999)** Mechanism of action of carvacrol on the food-born pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4606-4610.
110. **Vallet D. (2006).** Evaluation d'un protocole de terrain d'aide au diagnostic et à la thérapeutique du veau diarrhéique de 0 à 4 semaines. Thèse. Doctorat vétérinaire. ENV Alfort
111. **Valnet J (1990)** Aromathérapie: traitement des maladies par les essences des plantes. 11 Maloinédition. Paris
112. **Valnet J., Duraffourd C.H., Duraffourd P. Et Cilapraz J. (1978)** l'aromatogramme:nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. *Plant. Med. Phytother.* 1: 43-52.1992
113. **Varel V.H (2002)** Livestock manure odor abatement with plant derived oils and nitrogen conservation with urease inhibitors: A review 1. *J. Anim. Sci.* 80: E1-E7.
114. **Vazquez J.A., Arganoza M.T., Boikov D., Vaishampayan J.K. and Akins R.A. (2000).**In vitro susceptibilities of *Candida* and *Aspergillus* species to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *reviberoam. Micol.* 17: 60-63.
115. **Vigne P. (1987)** La France et ses productions aromatiques végétales actuelles. *Parfums, Cosmetiques, Arômes.* 78: 97-103.
116. **Viollon C. And Chaumont J.P. (1994)** Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia.* 128: 151-153.
117. **Viollon C., Leger D. Et Chaumont J.P. (1993)** Activités antagonistes in vitro de certains composés volatils naturels vis-à-vis de germes de la flore vaginale. *Plant. Med. Phytother.* 26: 17-22.
118. **Welch Rodeny A. ; 2006 .** De genus *Escherichia* prokaryotes6:60-71
119. **Wells' S. J., Garber L. P., and Hill G. W. (1996).**Health status of preweaned dairy heifers in the United States. *Prev. Vet. Med.* 29: 185-199.
120. **Yagupsky P (2006)** Selection of antibiotic-resistant pathogens in the community. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 25: 974-976

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET

INSTITUE DES SCIENCES VETERINAIRES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE

SOUS LE THEME

**L'effet d'huile essentielle de la cannelle sur certaines  
souches bactériennes isolées des diarrhées néonatales  
du veau Agé de 1 à 30 jours**

**PRESENTE PAR : - DRIDECHE MOULAY**

**- HAJD DAOUD HADJA SADIA**

**ENCADRE PAR : SELLES SIDI MOHAMED AMAR**

**ANNEE 2012-2013**

