

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE**

**PROJET DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTEUR VETERINAIRE**

SOUS LE THEME

**L'EFFET DES HUILES ESSENTIELLES DE
CLOU DE GIROFLE SUR CERTAINES
SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES DES
DIARRHEES NEONATALES DE L'AGNEAU**

PRESENTE PAR:

Mr HAMRI MOKHTAR

Mr REZKI HAMZA

ENCADRE PAR:

Dr SELLES SIDI MOHAMMED AMMAR



Dédicace

je dédie mes remerciements et souhaits bien cordiaux a mes chers professeurs.

Dr :SELLES Sidi Mohammed Ammar

Dr :AIT AMRANE Amar

Dr: BELHAMITI Tahar Belkacem

Dr :Kfiati Baghdad

Dr :Hammoudi Si Mohamed

Dr :Bouakez Abderahman

Vous avez eu tant d'amabilité pour nous pendant des mois à l'université, de ma part je saisi l'occasion de me rappeler à vos bons souvenirs et vous présenter mes vœux les plus sincères.

Quel attachement je garde de vos conseils éducatifs , dont je suis comblais , et comme je comprends mieux qu'alors la valeur de vos sacrifices et mon immense dette de gratitude ! Egalement a mes inoubliable parents , frères , sœurs et amis de leurs soutien indéfectible .

Recevez à votre tour mes meilleurs vœux pour vous, et croyiez-moi toujours votre fidèlement dévoué .

Hamri Mokhtar

Dédicace

*Avant tout nous avons à remercier le bon Dieu, les tout
puissants
et nous disons :*

الحمد لله الذي هدانا لهذا و ما كنا لنهتدي لولا أن
هدانا الله

A mes parents

A mes frères et sœurs

A toute ma famille

*ET Merci infiniment pour mes enseignants et tous mes
amis ET surtout Mokhtar et la famille Hamri*

Rezki Hamza

Remerciement

Adressé a mes chers pédagogues et professeurs .

Dr :SELLES Sidi Mohammed Ammar

Dr :AIT AMRANE Amar

Dr: BELHAMITI Tahar Belkacem

Dr :Kfiati Baghdad

Dr :Hammoudi Si Mohamed

Dr :Bouakez Abdérahman

Si ont ne veuX pas que notre lettre de remerciement soit noyée dans le flot qui vous parviendra , ils nous faut nous hâter. Car nous savons combien tous ceux qui ont eu le privilège de vous avoir pour guide en gardent un souvenir vivace et reconnaissant.

nous sommes certain pour notre part que, sans vous, on ne serais pas ce que nous sommes et que tout notre avenir dépendra, à un certain point de vue, de ce que vous nous avez donné.

Nous profitons donc pour vous rendre nos fidèles attachement et vous assurer de nos vœux nombreux et chaleureux. puisse-t-elle vous apporter de grande satisfaction et, avec les "nouveaux" qui vous sont destinés, des sujets intéressants susceptibles de profité de tout vos influences et de vos enseignements. Veuillez croire, chers professeurs, à nos sentiments de respectueuse admiration.

Dédicaces

Remerciements

Sommaire

Listes des tableaux et des figures

Liste des abréviations

Résumé en Français

Résumé en Arabe

Introduction..... 12

Première partie : Partie bibliographique

Chapitre I:Diarrhée néonatale de l'agneau..... 14

1) Etiologie..... 15

1-1) Les caractères de pathogénicité des *Colibacilles* entérotoxigènes 16

1-1-1) Les adhésines des *E. coli*..... 16

- L'antigène K (capsulaire) 16

- L'antigène somatique (O) 16

- L'antigène H 17

- L'antigène F (fimbriae)..... 17

1-1-2) Les entérotoxines..... 17

1.1.2.1) L'entérotoxine thermolabile (LT)..... 17

1.1.2.2. Les entérotoxines thermostables (ST)..... 18

2) Pathogénie..... 19

3) Symptômes..... 21

3-1) Colibacillose à colibacilles entérotoxinogènes (*E.coli* K99 ou F5)..... 21

3-2) Syndrome des « agneaux baveurs » (watery mouth disease)..... 21

3-3)Le syndrome de « l'agneau mou »..... 21

4) Diagnostic..... 22

4-1) Diagnostic différentiel des diarrhées..... 22

5) Parasitaire..... 23

- Cryptosporidies..... 23

- Coccidies..... 23

- Strongyloïdes..... 23

6) Alimentaire..... 23

7) Traitement..... 23

8) Prophylaxie.....	24
8-1) Sanitaire.....	24
8-2) Médicale.....	24
Chapitre II:L a résistance aux antibiotiques.....	26
1) Les antibiotiques	27
1-1) Les antibiotiques naturels et synthétiques.....	27
1-2) Les cibles bactériennes des antibiotiques.....	28
2) La résistance aux antibiotiques.....	31
2-1) La résistance naturelle.....	31
2-2) La résistance acquise.....	31
Chapitre III: Les huiles essentielles.....	33
1) Historique.....	34
2) Définition.....	35
3) Localisation et lieu de synthèse.....	35
4) Propriétés physiques.....	36
5) Rôle physiologique.....	36
6) Composition chimique.....	37
6-1) Les terpènes.....	37
6-2) Les composés aromatiques.....	37
6-3) Les composés d'origine diverses.....	38
6-4) Notion de chémotype.....	38
7) Facteurs influençant la composition chimique.....	38
8) Activités biologiques.....	40
8-1) Activité antimicrobienne.....	40
• Activité antibactérienne.....	40
• Activité antifongique.....	40
• Activité antivirale.....	41
Deuxième partie : partie expérimentale	
Matériel et méthode.....	43
1) Animaux.....	44
2) Méthodes.....	44
2-1) Récolte des échantillons.....	44
2-2) Détection des agents entéropathogènes.....	44
2-2-1) Culture bactériologique.....	44

2-2-2) Préparation de la suspension bactérienne.....	44
2-2-3) Tests biochimiques.....	45
2-3) Antibiogramme.....	45
• Application.....	45
3) Plante.....	46
3-1) Classification.....	46
4) Extraction de l'huile essentielle.....	46
5) Hydrodistillation.....	47
6) Calcul de rendement.....	47
7) Tests microbiologiques.....	48
7-1) Microorganismes étudiés.....	48
7-2) Préparation des dilutions.....	48
7-3) Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne.....	48
7-4) Détermination de l'effet antibactérienne des huiles essentielles.....	49
Résultat.....	50
1) Répartition des cas diarrhéiques selon sexe.....	51
2) Répartition des cas diarrhéiques en fonction des tranches d'âge.....	52
3) Prévalences globales de différentes bactéries isolées.....	53
4) Antibio-résistance.....	55
5) Rendement de l'huile essentielle.....	56
6) Activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	57
7) Activité bactériostatique / bactéricide.....	58
Discussion.....	59
1) Répartition des cas diarrhéiques selon sexe.....	60
2) Répartition des cas diarrhéiques en fonction des tranches d'âge.....	60
3) Prévalences globales de différentes bactéries isolées.....	60
4) Antibio-résistance.....	61
5) Rendement de l'huile essentielle.....	62
6) Activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	62
Conclusion.....	63
Les Références bibliographiques.....	65

| Liste des tableaux et des figures

<u>Liste des tableaux</u>	Pages
<u>Tableau n°1</u> : Mode d'action des principales classes d'antibiotiques	33
<u>Tableau n°2</u> : liste des Antibiotiques à tester.....	49
<u>Tableau n°3</u> : Prévalences des agents entéropathogènes détectés chez les agneaux diarrhéiques.....	56
<u>Tableau n°4</u>: Activité antibactérienne d'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i>.....	60
<u>Tableau n°5</u>: Activité bactériostatique / bactéricide d'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i>.....	61

Liste des tableaux et des figures

Liste des figures:

<u>Figure n°1:</u> Cascade d'activation suite à l'attachement de STa à la guanylate cyclase-C.....	21
<u>Figure n°2:</u> Découverte et premières utilisations cliniques des principaux antibiotiques d'origine naturelle et d'origine synthétique (d'après Singh et Barrett, 2006).....	31
<u>Figure n°3:</u> Mode d'action des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006) Avec DHP : dihydroptéroate ; DHF : dihydrofolate ; THF : tétrahydrofolate.....	32
<u>Figure n°4:</u> Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (LUCCHESI, 2005).....	50
<u>Figure n°5:</u> Répartition des cas diarrhéiques selon sexe.....	54
<u>Figure n°6:</u> Répartition des cas diarrhéique en fonction d'âge.....	55
<u>Figure n°7:</u> Prévalence des bactéries isolées des cas diarrhéiques.....	57
<u>Figure n°8:</u> Anti-bio-résistance des souches bactériennes isolées des cas diarrhéiques.....	58
<u>Figure n°9:</u> Anti-bio-résistance des souches <i>E.coli</i> isolées des cas diarrhéiques.....	59
<u>Figure n°10:</u> rendement en huile essentielle du clou de girofle.....	60

Liste des abréviations :

E.coli : *Escherichia coli*.

ETEC : *Escherichia coli*. entérotoxigène.

CMI : concentration minimal inhibitrice

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

LT : thermolabile

ST : thermostable

CT : toxine de choléra

cAMP : acide mono phosphate cyclique

GC-C: la guanylate cyclase-C

cGMP : monophosphate guanosine cyclase

STa : thermostable type a

STb : thermostable type b

GMP : monophosphate guanosine

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator

AMP: acide mono phosphate

pH : potentiel d'hydrogène

HCO⁻³ : le bicarbonate

Ca⁺² : le calcium

Na Cl : chlorure de sodium

AMM : autorisation de la mise à la marché

IgA : immunoglobuline A

ADN : acide désoxyribonucléotide

ARN: acide ribonucléotide

OMS: l'organisation mondiale de la santé

DHP: dihydroptéroate

DHF: dihydrofolate

THF: tétrahydrofolate

NAG : N-acétylglucosamine

NAM : N-acétylmuramique

SARV : Staphylococcus aureus résistantes à la vancomycine

HE : huile essentielle

α : alpha

β : beta

R : Rendement

Kg : kilo gramme

% : pourcentage

μ l : micro litre

°c : degré celsius

cm : centimètre

ml : milli litre

m : mètre

mm : millimètre

g : gramme

HSV: virus de Herpes Simplex

RHE : rendement de l'huile essentielle

J : jour

n : numéro

v: volume

CMB : concentration minimale bactéricide

MHE: matière de huile essentielle

MS : matière végétale sèche

AC : acide cluvunalinique

h : heure

kDa: kilo dalton

cfu: colony forming unit

UFC.mL⁻¹: unité faisant colonie

الإسهال عند الحملان هي واحدة من الأسباب المميتة عند الأغنام حديثي الولادة. ويهدف هذا التحقيق إلى تسليط الضوء على البكتيريا المعوية المرتبطة بالإسهال عند الحمل حديث الولادة ما بين 1 و45 يوم من جهة و من جهة أخرى تقييم حساسية بعض سلالات هذه البكتيريا المعزولة في المختبر تجاه المضادات الحيوية الأكثر استخداما. وفي الأخير إختبار فعالية الزيت الأساسي للقرنفل على عدد من السلالات المعزولة من عينات من هذا الإسهال.

تم جمع سبعة وثلاثون عينة من " الإسهال " في مزرعتين تقعان في منطقة تيارت و ذلك خلال فترة تتراوح من يناير إلى ديسمبر 2012. وقد أجري البحث على البكتيريا المعوية ضمن الوسط " ماکونكي"، و تمت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا ضمن الوسط " مولر هينتون أجار". وقد تمت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا من زيت القرنفل على 4 سلالات: *Citrobacter braakii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia. Coli*, *Kluyvera spp*

تعرض هذه الدراسة أن البكتيريا القولونية تتصدر القائمة بنسبة 83.78%، يليها بنسبة 2.7% لكل منهما *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter braakii* يليها بنسبة 8.1% *Kluyvera*

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

تم الحصول على الزيوت الأساسية عن طريق التقطير بالبخار. وقد سجل مردود الزيت الأساسي للقرنفل المستخرج بواسطة التقطير بالبخار نسبة 11.6 ± 0.97 .

أظهرت دراسة النشاط المثبطة "في المختبر"، أن النسبة المثبطة الدنيا نحو هذه السلالات الأربعة من البكتيريا المعوية تتراوح من 0.67 إلى 1 ميكرو لتر في الميليلتر الواحد.

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

كلمات مفتاحية: الحمل، الإسهال عند الحمل حديث الولادة، البكتيريا المعوية، المقاومة للمضادات الحيوية، القرنفل، الزيت الأساسي، التركيز المثبط الأدنى.

Résumé

Les diarrhées des agneaux sont l'une des causes de mortalité néonatale des ovins. Notre enquête a pour but, la mise en évidence des entérobactéries associées aux diarrhées néonatales d'agneau âgé jusqu'à 45 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 du clou de girofle envers quelques souches isolées des diarrhées néonatales d'agneau.

Trente-sept échantillons de matières fécales diarrhéiques ont été collectés au sein de deux fermes privées, localisée dans la région de Tiaret, durant la période s'étalant de Janvier à Décembre 2012. La recherche d'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 clou de girofle a été étudiée sur deux souches *Escherichia coli*, *Kluyvera spp*, *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter braakii*, 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. coli* en tête de liste avec 83.78%. Suivi par *Kluyvera spp* avec 8.1 % et *Klebsella spp* ainsi que *Citrobacter braakii* avec 2.7% pour chacune d'eux.

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

L' H.E extraite par hydrodistillation à partir de clou de girofle a présenté un rendement de 11,6 % ± 0,97.

L'étude de l'activité inhibitrice « in vitro », a montré, que l'huile essentielle de clou de girofle a présenté un CMI de l'ordre de 0,67 à 1µl/ml vis à vis des 4 souches d'entéropathogènes étudiées.

Ces données confirment l'étiologie complexe des diarrhées néonatales d'agneau, montrent une antibiorésistance accrue des souches bactériennes isolées des diarrhées néonatales d'agneau. Nous avons conclu aussi dans cette étude que les huiles essentielles constitueraient une solution alternative qui pourra être utilisé dans le domaine pharmaceutique dans le traitement des diarrhées néonatales d'agneau.

Mots clés: Agneau, diarrhée néonatale, bactéries entéropathogènes, antibiorésistance, H.E, clou de girofle, CMI.

INTRODUCTION

Introduction

Les diarrhées des agneaux sont l'une des causes de mortalité néonatale des ovins. D'où son importance économique considérable pour l'industrie du mouton dans de nombreux pays (**Ahmed et al., 2010**). Elles s'agissent d'un syndrome complexe et multifactoriel impliquant l'animal, l'environnement, la nutrition et les agents infectieux (**Khafagi et al., 2010 et Ahmed et al., 2010**).

Le syndrome diarrhéique est d'une étiologie assez complexe. Il fait intervenir de nombreux agents infectieux de nature bactérienne, virale et protozoaire (**Wani et al., 2004**). Les *rotavirus*, *Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC) et *Cryptosporidium parvum* sont considérées parmi les organismes les plus fréquemment associés aux diarrhées néonatales (**Muñoz et al., 1996**). *Salmonella* et *Clostridium perfringens* peuvent aussi jouer un rôle dans le déclenchement des diarrhées néonatales (**Muñoz et al., 1996 et Ahmed et al., 2010**).

Toutefois, le traitement des entérites causées par *E. coli* est basé sur l'administration des antimicrobiens par voie orale et/ou par voie générale. La connaissance de la sensibilité est nécessaire pour l'élaboration de directives sur l'utilisation prudente des antimicrobiens (**de Verdier et 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 45 jours de la vie de l'agneau,
- Déterminer le sexe le plus sensible aux diarrhées néonatales d'agneau âgé de moins de 45 jours.
- Déterminer les entérobactéries associées aux diarrhées néonatales d'agneau jusqu'à l'âge de 45 jours,
- 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 clou de girofle envers quelques souches isolées.

Partie bibliographique

Chapitre I:

Diarrhée néonatale de l'agneau

Chapitre I: Diarrhée néonatale de l'agneau

Les diarrhées des agneaux sont l'une des causes de mortalité néonatale des ovins. D'où son importance économique considérable pour l'industrie du mouton dans de nombreux pays (Ahmed et al., 2010). Elles s'agissent d'un syndrome complexe et multifactoriel impliquant l'animal, l'environnement, la nutrition et les agents infectieux (Khafagi et al., 2010 et Ahmed et al., 2010).

Le syndrome diarrhéique est d'une étiologie assez complexe. Il fait intervenir de nombreux agents infectieux de nature bactérienne, virale et protozoaire (Wani et al., 2004). Les *rotavirus*, *Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC) et *Cryptosporidium parvum* sont considérées parmi les organismes les plus fréquemment associés aux diarrhées néonatales (Muños et al., 1996). *Salmonella* et *Clostridium perfringens* peuvent aussi jouer un rôle dans le déclenchement des diarrhées néonatales (Muños et al., 1996 et Ahmed et al., 2010).

1)Étiologie :

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 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 Sigha-like toxine produite (VETEC ou STEC), nécrotoxigène (NTEC), entéro-pathogène (EPEC), entéro-hémorragique (EHEC), entéro-aggrégative (EAggEC) et entéro-invasive (EIEC) (Nagy and Fekete 2005).

Chez l'agneau quatre pathotype *E.coli* sont associés aux diarrhées néonatales : Entérotoxigène (ETEC), entéro-pathogène (EPEC), entéro-hémorragique (EHEC) et entéro-invasive (EIEC) (Wani et al. 2004).

Chapitre I: Diarrhée néonatale de l'agneau

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 fimbriaire (**Taillon, 2009**). Les fimbriae F5 et F41, sont présents dans les souches ETEC ovine. De plus, de nombreux autres facteurs bactériens participent indirectement à la colonisation intestinale telles les capsules (antigène K28, K30, CS31A dont le rôle est encore discuté) et d'autres adhésines de type fimbriaire (F17=FY, F1). Les facteurs d'attachements isolés chez le veau peuvent être retrouvés chez les petits ruminants. Les souches les plus importantes chez l'agneau seraient F5+ et F17 (**Le Moine, 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**). 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 (**Acrés, 1985**).

- **L'antigène somatique (O) :**

Ce sont des antigènes polysaccharidiques (**Acrés, 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 séro-groupes O2, O4, O26, O80 O91 isolé d'*E. coli* attaching effacing sont associés aux diarrhées des agneaux **Cid et al. (2001)**. Le rôle des antigènes somatiques dans la pathogénie de la diarrhée n'est pas clair. Cependant, il est

Chapitre I: Diarrhée néonatale de l'agneau

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 (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).

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 thermolabile (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 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 α de la protéine G, menant à la constante activation de l'adénylate cyclase et ainsi à la production d'AMP cyclique (cAMP). Cette augmentation de cAMP intracellulaire va éventuellement mener à sécrétion d'ions 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 peu induire la sécrétion de fluide chez les porcs nouveau-nés et sevrés, STa agit seulement chez le porc nouveau-né (Nagy and Fekete, 1999; Fairbrother et al., 2005). STa est un analogue structural de l'hormone guanyline et s'attache à la guanylate cyclase-C (GC-C). Ceci a pour effet l'activation de la guanylate cyclase, 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 sécrétera des ions 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).

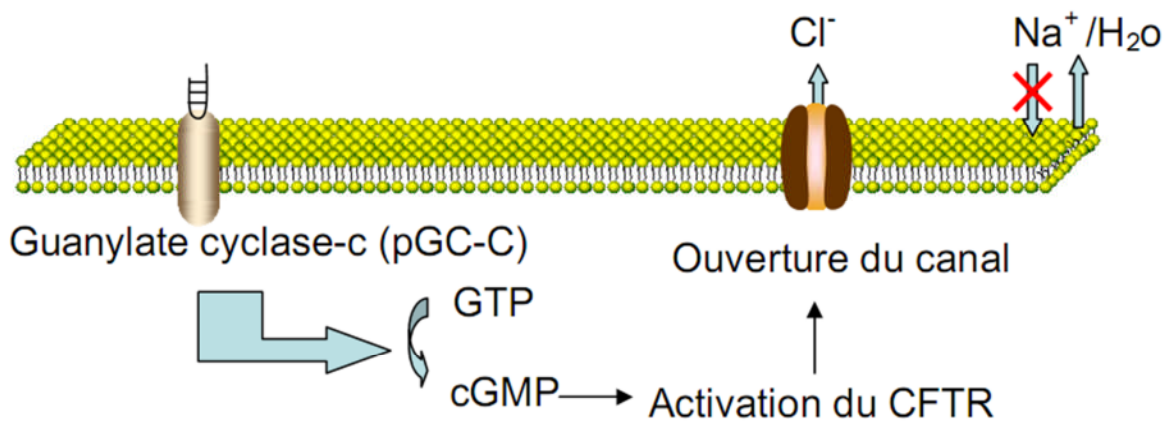


Figure 1 : Cascade d'activation suite à l'attachement de STa à la guanylate cyclase-C.

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

Chapitre I: Diarrhée néonatale de l'agneau

chez le porc. STa forme trois ponts disulfures qui sont essentiels pour l'activité de la toxine (**Batissou 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 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**).

2) Pathogénie :

Les souches *E. coli* peuvent soit coloniser l'intestin dès la naissance grâce à la présence d'adhésines de type fimbriaire (K99, F41) et sécrètent une entérotoxine thermostable responsable d'une hypersécrétion d'eau et d'électrolytes dans l'intestin (**Le Moine, 2009**). D'où un mécanisme physiopathologique identique à celui du veau.

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**).

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

Chapitre I: Diarrhée néonatale de l'agneau

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 (**Agres, 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 (**Agres, 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**).

Des résultats expérimentaux convergents font penser que la toxine thermostable (ST) active un système enzymatique qui provoque l'augmentation de la guanosine monophosphate cyclique dans les cellules de la muqueuse, et ensuite induit la sécrétion d'eau et d'ions

HCO^{-3} . 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^{+2} à l'intérieur des cellules. A partir d'une certaine concentration, le Ca^{+2} 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

Chapitre I: Diarrhée néonatale de l'agneau

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**).

3) Symptômes:

Chez l'agneau, les colibacillooses donnent surtout lieu à des septicémies mortelles plutôt qu'à un syndrome diarrhéique (contrairement au veau) (**Le Moine, 2009**). On constate trois formes de la colibacilliose chez l'agneau :

3-1) Colibacilliose à colibacilles entérotoxigènes (E.coli K99 ou F5) : Elle touche les jeunes agneaux surtout avant 3 jours. (**Millemann et al., 2003**)

Elle se caractérise par une mort brutale dans certaines formes septicémiques. Alors que dans d'autres formes elle se manifeste par une diarrhée plus ou moins prononcée avec déshydratation et répercussion plus ou moins importante sur l'état général. Elle a une évolution en 2 à 4 jours vers la mort ou la guérison (**Poncelet, 2004**).

3-2) Syndrome des « agneaux baveurs » (watery mouth disease) :

Connu depuis les années 80. Il se manifeste chez les agneaux 12 à 72 heures après la naissance. Elle est due à la libération d'endotoxines par les colibacilles (**Millemann et al., 2003**). Sur le plan symptomatique elle se caractérise par un ptyalisme (**Poncelet, 2004 et Le Moine, 2009**). La sialorrhée est due à l'hypoglycémie (**Millemann et al., 2003, Mondoly et al .2007 et Le Moine, 2009**). Il existe aussi des formes où les agneaux suent et ont soif (agneaux sueurs) (**Poncelet, 2004**).

3-3) Le syndrome de "l'agneau mou" :

Il se rapproche de la gastro-entérite paralysante du veau. Le rôle de colibacilles CS31A et ColIV à l'origine d'une acidose métabolique est fortement soupçonné. Il atteint des agneaux de 8-10 jours (**Millemann et al., 2003, Mondoly et al .2007 et Le Moine, 2009**). Les symptômes arrivent brutalement. Les agneaux sont tristes et ne tètent pas. La parésie du début

Chapitre I: Diarrhée néonatale de l'agneau

fait rapidement place en quelques heures à une hypotonie flasque généralisée avec impossibilité de se tenir debout. Il peut y avoir ballonnement et réplétion de la caillette (action paralysante des toxines sur le tube digestif). La diarrhée peut être présente (**Poncelet, 2004**). Elle est de couleur jaune claire mais elle n'est pas constante (**Millemann et al., 2003, Mondoly et al .2007 et Le Moine, 2009**). La diarrhée n'est pas exprimée par ralentissement du péristaltisme : l'intestin est plein de diarrhée pâteuse jaunâtre non évacuée (paralyse). Passé le cap des 15 jours, les agneaux qui n'ont pas été touchés, ne le seront plus (**Poncelet, 2004**).

4) Diagnostic :

Les colibacilles sont souvent impliqués dans les diarrhées. Une étiologie colibacillaire peut être suspectée devant une diarrhée contagieuse touchant des agneaux âgés de moins de trois semaines et accompagnée d'une mortalité plus ou moins importante(**Poncelet, 2004**).

Mais le diagnostic ne peut reposer sur la clinique seule (exception faite pour des diarrhées dues à du pica qui est visible par l'éleveur qui voit les agneaux lécher les crèches et consommer de la litière. Ceci sera confirmé par une autopsie) (**Poncelet, 2004**).

Seule une analyse de laboratoire peut révéler l'agent responsable. Un antibiogramme doit être réalisé systématiquement car il y a de nombreuses résistances d'E. Coli aux antibiotiques.

Un typage du colibacille permet éventuellement de prescrire ultérieurement, une vaccination adaptée si cette colibacillose est récurrente dans l'élevage.

Mais les stocks vaccins sont des vaccins bovins dont les valences sont souvent différentes des souches rencontrées en pathologie ovine (**Poncelet, 2004**).

4) Diagnostic différentiel des diarrhées:

Le diagnostic différentiel s'exerce avec les diarrhées virales (les diarrhées à rota et coronavirus sont très rares chez l'agneau). Les diarrhées d'origine bactériennes [Salmonelle, entérobactéries,... (Recours au laboratoire)].

Avec les diarrhées causent par les Clostridioses lors des mortalités brutales avec lésions septicémiques. (NB : chez l'agneau souvent les entérotoxémies sont accompagnées de péricardite avec présence de liquide péricardique abondant) (**Poncelet, 2004**).

Pour le laboratoire : agneaux ou prélèvements d'agneaux non traités. Il s'agit d'une mise en culture (diarrhée ou anse intestinale) qui peut se réaliser en mélange (**Poncelet, 2004**). .

5) Parasitaire : le diagnostic différentiel des diarrhées colibacillaire peut se faire avec :

- **Cryptosporidies :** diarrhée de couleur et consistance mayonnaise, très contagieuse, touchant les agneaux dans leur deuxième semaine. Les agneaux maigrissent, il y a peu de mortalité. Une confirmation par un test rapide au cabinet permet de confirmer la cryptosporidiose en quinze minutes (**Poncelet, 2004**).

- **Coccidies :** diarrhée noirâtre d'agneaux âgés de plus de 3 à 4 semaines. Amaigrissement avec très peu de mortalité si les agneaux sont traités. Le diagnostic est très rapide par mise en évidence des coccidies au microscope par examen direct de la diarrhée entre lame et lamelle (**Poncelet, 2004**).

- **Strongyloïdes :** rarement rencontrée, c'est la seule strongylose qui sévit en bergerie toute l'année (**Poncelet, 2004**).

On observe des lésions parfois importantes de l'intestin grêle (congestion et épaissement par endroits de la muqueuse). Ces lésions ne sont pas univoques. Seul le laboratoire permettra de faire le diagnostic (**Poncelet, 2004**).

Remarque : Il peut y avoir association de colibacilles pathogènes et de cryptosporidies.

6) Alimentaire: il peut se faire avec le pica (carences), l'intolérance au lait maternisé, lors de déséquilibre alimentaire des mères (ex : excès d'azote soluble) avec production d'un lait mal toléré par les agneaux ainsi que les moisissures des aliments consommés par les agneaux. (**Poncelet, 2004**).

7) Traitement :

Le principal traitement de la colibacillose repose sur le maintien de l'état d'hydratation par l'administration de fluides oraux, intraveineux (pour les cas plus lourds qui ont perdu le réflexe de téter) ou sous-cutanés. Si l'état d'hydratation est corrigé et maintenu, l'utilisation d'antibiotiques peut être nécessaire. Votre vétérinaire peut aussi vous prescrire des anti-inflammatoires pour diminuer l'inflammation dans l'intestin et contrôler la douleur, ce qui aidera au retour à l'alimentation normale (**Daignault et al., 2009**).

8) Prophylaxie :

8-1) Sanitaire :

L'hygiène des lieux est le facteur le plus important pour réduire l'impact du E .coli entérotoxigène dans un élevage ovin. Il est aussi recommandé de tondre les brebis en période pré-partum et de laver les trayons après la mise-bas afin de réduire l'ingestion de fumier par les agneaux. Il faut également s'assurer que les petits reçoivent suffisamment de colostrum. La qualité de celui-ci est améliorée lorsque les mères ont une cote de chair variant entre 2,5 et 3,5 au moment de la parturition. Des préparations commerciales d'anticorps pour veaux existent également en pâte orale à donner dans les premières douze heures de vie. Il s'agit d'un complément au colostrum qui peut être donné oralement, surtout lors d'épisode épidémique dans un troupeau ou dans un parc en particulier (**Daignault et al., 2009**)

8-2) Médicale :

Certains auteurs recommandent de vacciner les brebis avec des vaccins commerciaux homologués chez les bovins afin de réduire les impacts de la diarrhée néonatale causée par E. coli. Ce type de vaccin est donné à la mère avant l'accouchement pour améliorer le transfert d'immunité passive via le colostrum (**Daignault et al., 2009**).

Lors de colibacillose néonatale, en l'absence de septicémie, l'immunité systémique n'est pas impliquée dans la protection contre les colibacilloses. Il importerait donc de développer un protocole immunitaire et la production d'anticorps au niveau de la muqueuse intestinale, notamment des IgA en stimulant l'immunité muqueuse. Mais l'infection et la colonisation de l'intestin par les souches ETEC se produisent dans les premières heures de vie. Or toute stimulation efficace du système immunitaire demande un délai d'une semaine pour faire apparaître les anticorps et 2 semaines pour obtenir une réponse complète. Ce délai est trop long (**Le Moine, 2009**).

Ainsi la manière d'apporter in situ des immunoglobulines aussi tôt dans la vie de l'animal est l'administration de colostrum provenant de brebis préalablement vaccinées contre les souches ETEC. (**Mainil J.1995**)

Les vaccins disponibles contre la colibacillose néonatale à souche ETEC sont basés sur les facteurs d'adhésion de type fimbriaire de ces souches et sont destinés à une utilisation par

Chapitre I: Diarrhée néonatale de l'agneau

voie parentérale chez la brebis gestante de telle sorte que l'immunité soit transférée via le colostrum à l'agneau nouveau né. La perception générale concernant l'utilisation de ces vaccins est leur efficacité, essentiellement en ce qui concerne la réduction de la mortalité qui paraît plus spectaculaire que celle de la morbidité . (**Mainil J.1995**)

Plusieurs vaccins contre la colibacillose néonatale ont une AMM ovine dans certains pays. Il s'agit Imocolibov ® (Merial). C'est un vaccin inactivé par le formol, adjuvé par l'hydroxyde d'aluminium composé de :

-corps bactériens d'E.coli09-078-0101 portant le facteur K99 : 6 milliard

-corps bactériens d'E.coli015 portant le facteur d'attachement 31A et E coli0117 portant le facteur FY : 12 milliards

Le second vaccin est Séranamix® (Ceva) qui en plus des valences entérotoxémies contient une valence d'E coliK99.

Les vaccins anti-colibacillaires sont en général relativement efficaces car les colibacilloses à ETEC ont lieu dans les premières semaines de vie, là où les titres en anticorps du colostrum et du lait sont le plus haut (**Harley W.et al 1993**)

Une thèse a étudié l'efficacité de ce vaccin. Les anticorps dirigés contre l'antigène K99 persisteraient 20 jours et les anticorps dirigés contre l'antigène Y et 31A, 90 jours. Étant donné que la protection sur le terrain semble corrélée aux titres en anticorps, il apparaît donc que l'agneau serait protégé vis à vis des diarrhées néonatales à E.coliK99, Y et 31A des cinq premiers jours. De plus grâce à la persistance de ces anticorps (90 jours) dans le sérum des (**Le Moine, 2009**).

chapitre II:

La résistance aux antibiotiques

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. 1).

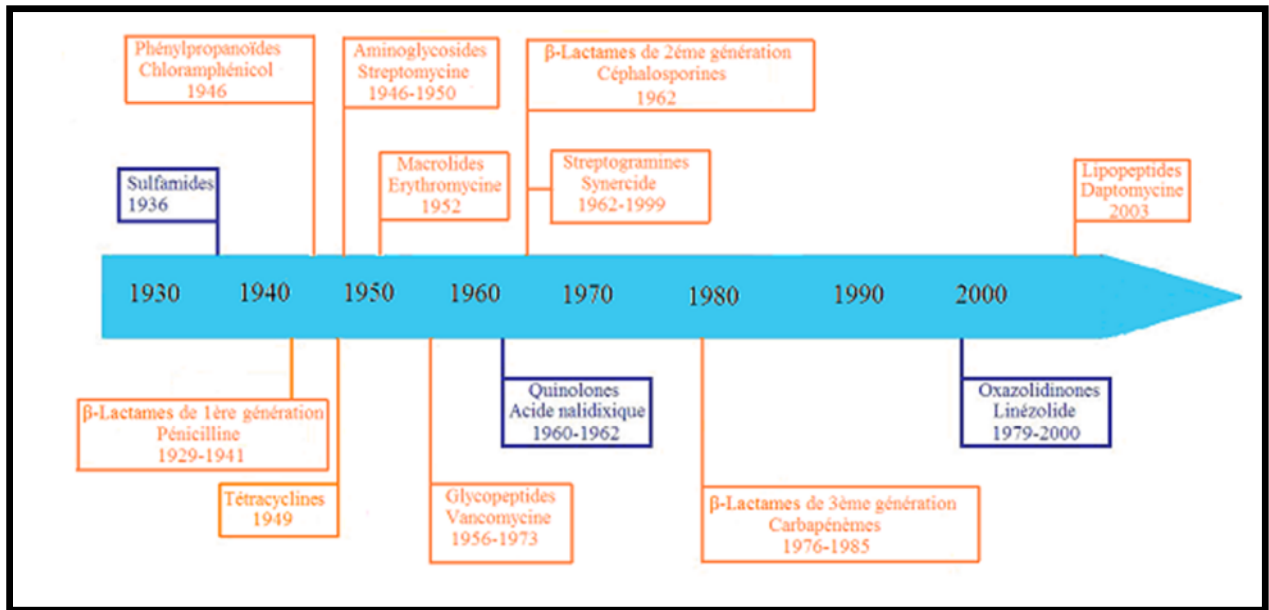


Figure 2 : Découverte et premières utilisations cliniques des principaux antibiotiques d'origine naturelle et d'origine synthétique (d'après Singh et Barrett, 2006).

La pénicilline, premier antibiotique à large spectre, isolé des champignons du genre *Penicillium* sp, marque le début de l'ère antibiotique. Elle appartient à la classe des β -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 β -lactames de deuxième génération. Une troisième génération de β -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 (fig. 2).

Chapitre II : la résistance aux antibiotiques

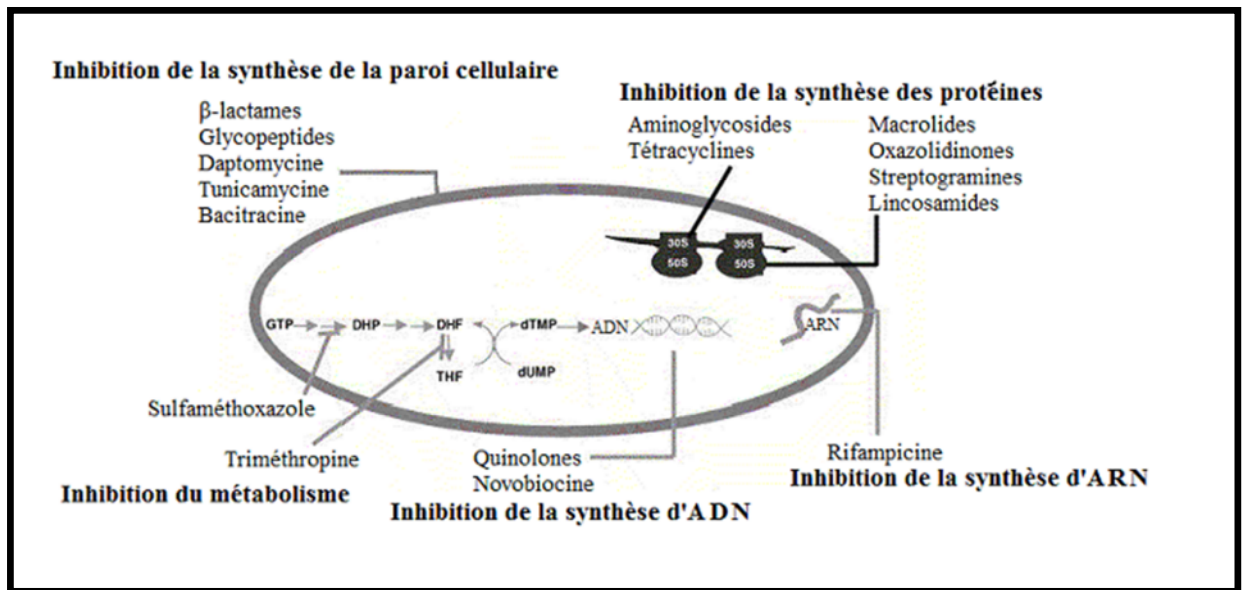


Figure 3 : Mode d'action des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006)

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 : la résistance aux antibiotiques

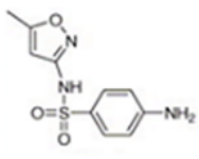
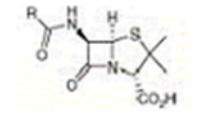
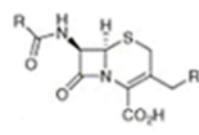
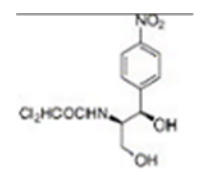
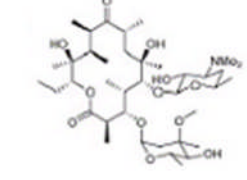
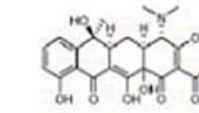
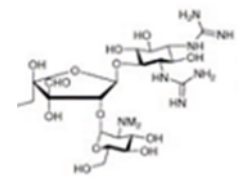
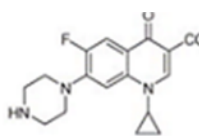
Classe	Origine	Mode d'action	Ex	Structures chimiques
Sulfamides	Synthétique	- Inhibent la synthèse de l'acide folique - Entraînent une diminution de la production de bases azotées par la bactérie	Sulfaméthoxazole	
β -Lactames de 1 ^{ère} génération	Penicillium notatum	Inhibent la synthèse du Peptidoglycane par	pénicilline	
β -Lactames de 2 ^{ème} génération	Cephalosporum	blocage de la transpeptidation	Céphalosporine	
Phénylpropanoïdes	Streptomyces Venezuelae	Se fixent sur l'ARN 23S de la sous-unité 50S du	Choramphénicole	
Macrolides	Streptomyces erythraeus	ribosome empêchant l'élongation du peptide au cours de la traduction	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	

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

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) 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* sp 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 β -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

Chapitre II : la résistance aux antibiotiques

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, 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 *vanA*, réalisé par conjugaison avec *Enterococcus faecalis* (**Noble et al., 1992 ; Alekshun et Levy, 2007**).

chapitre III:

Les huiles essentielles

Chapitre III : l'huile essentielle

1- Historique :

De tout temps, le règne végétal a offert à l'homme des ressources naturelles à son alimentation, à son hygiène et sa santé. Depuis les temps les plus anciens, les parfums de ces mêmes végétaux sont associés à des rites mystiques, artistiques et esthétiques.

Déjà, En Chine, l'Empereur Chen Nong (2800 av. J.-C.), médecin érudit, consigne son savoir relatif aux plantes médicinales dans un livre, le Pen Ts'ao, qui recense plus de 1000 plantes médicinales utiles (**Lardy Et Haberkorn, 2007**).

Il semblerait que ce soit les Egyptiens, dont l'histoire remonte à plus de 4000 ans qui furent les premiers à tirer parti du règne végétal dans un souci esthétique et spirituel.

L'essence de térébenthine était déjà utilisée et tout porte à penser que certains parfums étaient déjà obtenus sous forme d'huile distillée

Plus tard la civilisation Arabe dont Bagdad, Bassora et Damas étaient les principaux centres commerciaux, développa le commerce des épices et des aromates et donna une grande impulsion à l'Art de distillation.

C'est Gerber (721-815) est le premier qui a mentionné de façon écrite la description de la distillation.

L'alambic est incontestablement associé à Avicenne (930-1037), tout comme le GiovanniI- Baptista Della Porta (1540-1615), dans son célèbre ouvrage « De destillatione » parut en 1567, mentionne les connaissances avancées des Arabes dans le domaine de la distillation.

Hermann Boerhave (1668-1738) fut l'un des premiers à décrire les H.Es d'un point de vue chimique (**Lucchesi, 2005**).

L'aromathérapie tomba ensuite dans l'oubli, toutefois il a fallu attendre le XX^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. En 1928 René-Maurice Gatte Fossé chimiste Français publia un ouvrage « aromathérapie » décrivant la relation entre la structure biochimique de l'H.E et son activité antimicrobienne.

En 1929, Sevelinge un pharmacien en France, étudia les H.Es en médecine vétérinaire et confirma le potentiel antimicrobien élevé de ces substances aromatiques.

Chapitre III : l'huile essentielle

En 1975, Franchomme en France, aromatalogue mis en évidence l'importance du chémotype (ou race chimique de l'espèce) (**FOUCHE Et Al., 2000**).

L'ère industrielle a pris peu le pas sur un empirisme et développa ainsi de nouvelles techniques de distillation.

Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums. Mais la tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle a entraîné un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances. Depuis deux décennies des études ont été menées sur le développement de nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des H.Es dans différents domaines (**Zhiri, 2006**).

2- Définition :

Les H.Es sont définies comme étant des extraits volatils et odorants, que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, pressage ou incision des végétaux qu'ils les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous produits du métabolisme secondaire. Les H.Es ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie **Bruneton, (1999)**.

3- Localisation et lieu de synthèse :

Les H.Es n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Environ 1% des espèces élaborent des essences. Certaines familles se caractérisent par un grand nombre d'espèces qu'elles regroupent en particulier dans les familles : Myrtaceae, Lauraceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apeaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae, Piperaceae. (**Mohammedi, 2006**).

La synthèse et l'accumulation des H.Es sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante. Les poils glandulaires épidermiques rencontrés souvent chez les Labiaceae, Geraniaceae, et Rutaceae, ils produisent les essences dites superficielles. Les organes sécréteurs sous-cutanés comprenant les cellules et les poches sécrétrices qui sont généralement disséminées au sein du tissu végétal chez les Myrtaceae, Auranthiaceae, ainsi que les canaux sécréteurs chez les Umbelliferae Apiaceae ou Asteraceae. Les essences dans les plantes peuvent être stockées dans divers organes : fleurs (origan), feuilles (citronnelle, Eucalyptus), écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), rhizomes (acore, gingembre),

Chapitre III : l'huile essentielle

sève (encens, myrte), bourgeons (pin), fruit (badiane) ou graines (carvi). Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une espèce, voire dans un même organe (**Bruneton, 1999**).

Quantitativement, les teneurs en H.Es sont extrêmement faibles. Pour produire 200g d'essence de Thym, il faut 100kg de plantes fraîches, et à titre d'exemple selon **Padrini & Luchroni, (2003)**, pour obtenir 1kg d'H.E il faut :

- 1 tonne de fleur d'oranger.
- 4 tonnes de pétales de Rose.
- 6 à 7 kg de boutons floraux de clous de Girofle.
- 100 kg de sommités fleuries de Lavande.
- 7 tonnes de Mélisse.
- 1tonne de Verveine.

4- Propriétés physiques :

Les H.Es sont en général liquides à température ambiante, volatiles, d'odeur très forte, incolores, jaunes pâles ou quelques fois bleues. Leur densité est <1 sauf pour les H.Es de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*), Cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*) et Sassafras (*Sassafras albidum*). Elles sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants, les huiles et la vaseline; très altérables, elles s'oxydent au contact de l'air et de la lumière (**Charpentier Et Al., 2008**).

Le terme huile s'explique par la propriété de solubilité dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus au moins forte dégagée par la plante (**Teusher Et Al., 2005**).

5- Rôle physiologique :

Beaucoup de plantes produisent les H.Es en tant que métabolites secondaires. Leur rôle exact dans le processus de la vie de la plante reste encore mal connu. Selon **Bakkali (2008)**, les H.Es peuvent avoir plusieurs effets « utiles » pour la plante : repousser ou au contraire attirer les insectes pour favoriser la pollinisation, comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, permettant de conserver l'humidité des plantes désertiques, réduction de la compétition des autres espèces de plante par inhibition chimique de la germination des graines, par protection contre la flore microbienne infectieuse, action répulsive sur les prédateurs par goût et effets défavorables.

Chapitre III : l'huile essentielle

6- Composition chimique :

Sur le plan chimique, les H.Es sont des mélanges de structure extrêmement complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces substances sont des molécules très volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes comme les monoterpènes (myrcène, β -pinène, γ -terpinène) et les sesquiterpènes (β -caryophyllène, α -humulène, β -bisabolène etc.) (Croteau Et al., 2000).

6-1- Les terpènes :

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C₅H₈). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en monoterpènes formés de deux isoprènes (C₁₀H₁₆), les sesquiterpènes, formés de trois isoprènes (C₁₅H₂₄), les diterpènes, formés de quatre isoprènes (C₂₀H₃₂). Les tétraterpènes huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes. Les polyterpènes (C₅H₈) n ou n peut-être de 9 à 30 (Hernandez-Ochoa, 2005).

Les terpénoïdes sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhydes, cétones, acide, etc.). Les monoterpènes sont volatils entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des H.Es, parfois plus de 90%. Ils peuvent être acycliques (myrcène, ocymène), monocyclique (terpinène, p-cimène) ou bicyclique (pinène, sabinène). A ces terpènes se rattachent un certain nombre de substances à fonction chimique : alcools (géraniol, menthol), aldéhydes (géraniol, citronellal,

sinensal), cétones (carvone, menthone, β -vétinone), et des esters (acétate de géranyle, acétate de linalyle, acétate de cédryle, acétate α -terpinyle) (figure : 1).

Les sesquiterpènes il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Elle contient plus de 3000 molécules comme par exemple : β -caryophyllène, β -bisabolène, α -humulène, α -bisabolol, farnesol (Bruneton, 1999 ; Hernandez-Ochoa, 2005).

6-2- Les composés aromatiques :

Les dérivés du phénylpropane sont moins abondants que les terpénoïdes. Cette classe comprend des composés odorants comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils sont plus fréquents dans les H.Es d'Apiaceae (anis, fenouil, cannelle, basilic).

Chapitre III : l'huile essentielle

6-3- Les composés d'origine diverses :

Il existe un nombre non négligeable de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles issues soit de la dégradation des terpènes non volatils qui proviennent de l'auto-oxydation par exemple des carotènes ou des acides gras comme les acides linoléique et α -linoléique en (3-cis hexanol, decanal, β -ionone) (**Piochon, 2008**).

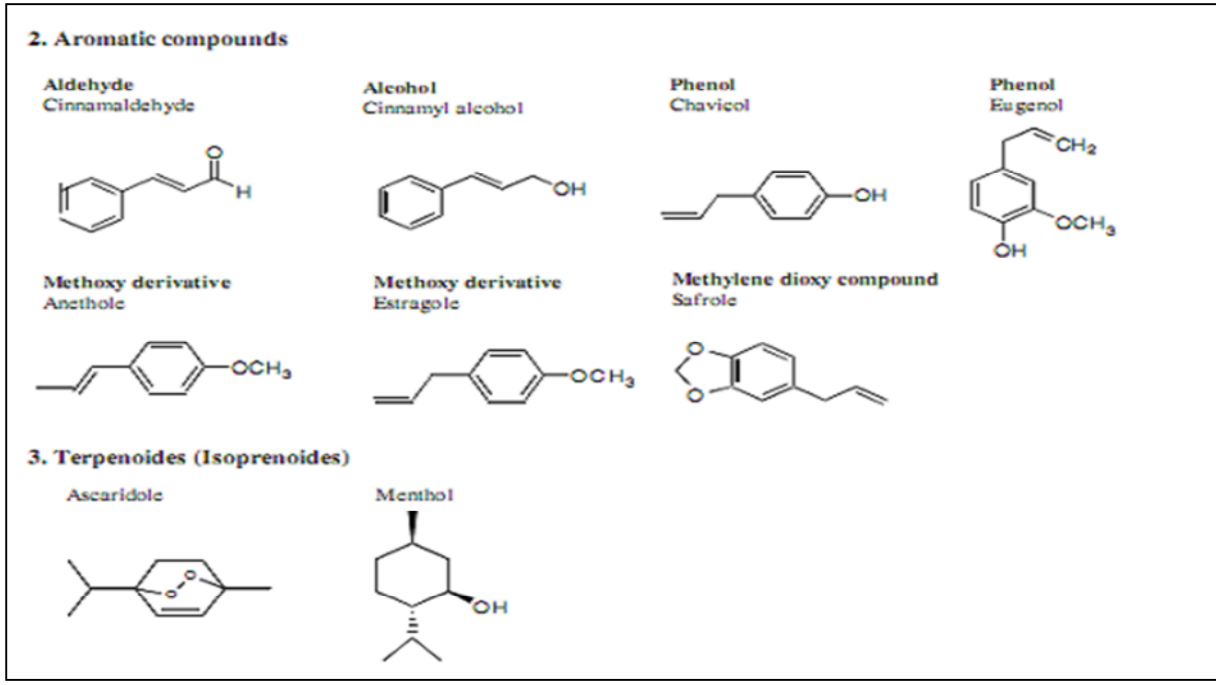
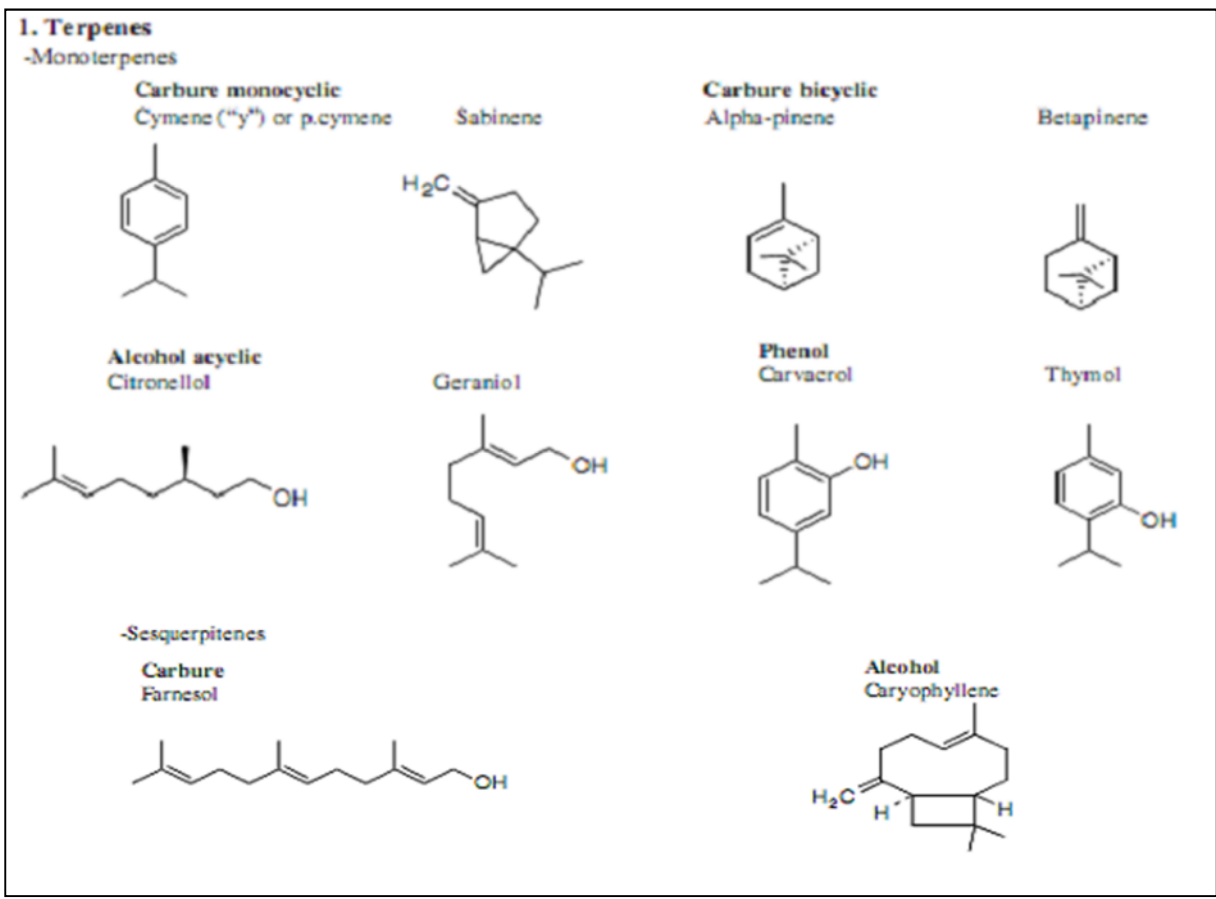
6-4- Notion de chémotype :

Le chémotype d'une H.E est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif, présent dans l'H.E. C'est l'élément qui permet de distinguer des H.Es extraites d'une même variété botanique mais, d'une composition biochimique différente. Cette classification permet de sélectionner les H.Es pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace. Ce polymorphisme chimique existe chez certaines espèces : *Thymus vulgaris*, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare*. Il est important de noter que les H.Es à chemotypes différents présentent non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables (**Pibiri, 2005**).

7- Facteurs influençant la composition chimique :

Il existe beaucoup de facteurs externes pouvant influencer la composition chimique de l'H.E : la température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol, la partie de la plante utilisée, le cycle végétatif de la plante, la méthode utilisée pour l'extraction ; sont d'autant de facteurs susceptibles d'exercer les modifications chimiques. Outre la composition, ces facteurs peuvent également avoir un impact sur la teneur en H.E, par exemple : les citrus ont une teneur importante en H.E lorsque la température est élevée. Les fleurs de *Chrysanthemum carinarum* sont riches en H.E sous l'effet de fertilisants (**Bruneton, 1999**).

Chapitre III : l'huile essentielle



8- Activités biologiques :

8-1- Activité antimicrobienne :

De nombreux auteurs ont rapporté que les extraits d'herbes ont des composés chimiques capables d'avoir une activité antimicrobienne (**Dorantes Et Al., 2000 ; Djenane Et Al., 2002 Et 2006 ; Kuda Et Al., 2004, Bousbia, 2004**). Les constituants des H.Es sont actifs contre une large gamme de bactéries, levures et champignons.

➤ **Activité antibactérienne** : Les H.Es les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent aux Labiatae : origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont d'autant de plantes aromatiques à H.Es riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol est le plus actif de tous, reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autres préparations. Le thymol et eugénol sont utilisés dans les produits cosmétiques et, alimentaires. Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries : E. coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Clostridium spp, Helicobacter pylori (**Pauli, 2001**).

Belleti et al.(2004) et Fisher et al. (2007), ont démontré que les H.Es de Citrus sont efficaces contre les bactéries pathogènes, les spores bactériennes, mais également sur certaines bactéries responsables de toxi-infection alimentaire telles que : Mycobacterium jejuni, Listeria monocytogenes, E. coli O157 :H7, Staphylococcus aureus, Salmonella Thyphimurium, et Acrobacter butzleri.

➤ **Activité antifongique** : Le pouvoir antifongique des H.Es des plantes aromatiques a été mis en évidence par de nombreux auteurs contre les moisissures allergisantes (**De Billerbeck Et Al., 2002 ; Koba Et Al., 2004 ; Oussou Et Al., 2004 ; Ouraini Et Al., 2005**) et contre les dermatophytes et les champignons pathogènes et opportunistes tels que Candida albicans (levure), Cryptococcus neoformans et aspergillus fumigatus (**Teixeira-Duarte, 2005**). Des travaux similaires ont été réalisés par **Momammedi, (2006)** sur l'H.E de Cistus ladaniferus contre sept moisissures : Rhizopus, Mucor, Alternaria, Fusarium, Penicillium, Trichoderma et aspergillus; **Omidbeygi et al.(2007)** ont démontré que les H.Es de thym, de la sarriette et du clou de girofle présentent une activité antifongique « in vitro » contre Aspergillus flavus. Les H.Es d'Eucalyptus saligna et d'Eucalyptus camaldulensis ont

Chapitre III : l'huile essentielle

montré un effet fongistatique vis-à-vis de *Phaeoramularia angolensis* (**JASET-DONGMO Et Al., 2008**). PIACENTINI a noté pour la première fois les propriétés antimicrobiennes des H.Es de Citrus en 1949 in (**Fisher & Phillips, 2008**) que les essences de Citrus en solution étaient plus puissantes que les phénols comme désinfectants. Selon les travaux de **Prudent Et Al.(1995)** ; **Sharma-Tripathi, (2006)** ; Et **Viuda-Martos Et Al. (2008)**, les H.Es de Citrus : d'orange douce, de citron, de mandarine et, pamplemousse montrent une activité antifongique contre *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium chrysogenum* et *P. verrucosum*.

Il a été établi d'après **Cox Et Al.(2000)** que généralement les champignons sont plus sensibles que les bactéries.

➤ **Activité antivirale** : Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques des H.Es telles que les monoterpénols et les monoterpénals. De nombreuses pathologies virales sévères traitées avec des H.Es ont montrées des améliorations importantes. L'effet antiviral de l'H.E de *Mentha piperita* a été étudié « in vitro » contre les virus de Herpes Simplex (HSV-1 et HSV-2), une inhibition de 50% est obtenue avec des concentrations entre 0,002% et 0,008% (**Schuhmacher & Reichling, 2003**).

Partie expérimentale

Matériels et méthodes

Matériel et méthodes

Notre étude a été réalisée sur le terrain, en collaboration avec deux fermes privées localisés dans région d'Oued Lili, wilaya de Tiaret.

1) Animaux :

Les prélèvements ont été réalisés durant la période qui s'est étalée de Janvier à décembre 2012, sur des agneaux âgés de moins de 45 jours et manifestants des diarrhées.

2) Méthodes:

2-1) Récolte des échantillons :

Les prélèvements ont été effectués sur des agneaux diarrhéiques âgés de 1 à 45 jours et n'ayant bénéficié d'aucune intervention thérapeutique. Les échantillons ont été récoltés directement au niveau de rectum à l'aide d'un écouvillon stérile. Après nettoyage de la région anale à l'aide d'un papier hygiénique. Immédiatement après prélèvement, les écouvillons ont été étiquetés par un stylo indélébile et acheminés dans une glacière isotherme (à environ 4 °c) au laboratoire de microbiologie de l'institut des sciences vétérinaires- Tiaret-.

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 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⁻¹) est préparée à partir de chaque ensemencement.

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 virage de couleur. Cependant l'identification du genre, voire l'espèce a été réalisé à l'aide d'un logiciel **Api web**.

2-3) 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-Faubleé et Carret, 1999**).

- Application :

Dans des boîtes de 9 cm de diamètre contenant 10^6 à 10^8 cfu de culture bactérienne effectuée à la surface de 10 ml de gélose **Muller Hinton 2 (bioMérieux, lot : 1000487960)**, des disques imprégnés d'antibiotique de dose connues sont appliqués à la surface à des distances déterminés (4 disques/boîte) (tableau 1). 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**).

Matériel et méthodes

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
Tetracycline (Bioanalyse, lot : 101108)	30 mg
Colistine (Bioanalyse, lot :100506)	10 mg

3) Plante : dans notre étude ont a utilisé l'*Eugenia caryophyllata* on vue d'évaluer l'effet de son huile essentielle des clous sur certaines souches bactériennes associées aux diarrhées néonatales de l'agneau. (**Nairouz B. 2005**)

- Classification:

Royaume : Plante

Sous royaume : Trachéophyte = plantes vasculaires

Embranchement : Spermatophytes ou Phanérogames = plantes à graines

Sous embranchement : Angiospermes = plantes à fleurs

Classe : Dicotyledonae

Sous classe : Rosidae

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtaceae

Genre : Eugenia

Espèce : *E. caryophyllata* Thunb

Nom commun : Giroflier

Nom en anglais : Clove

Autres désignations botaniques: *Syzygium aromaticum* (L.) **Merril & Perry**, *Eugenia caryophyllus* **Bull. & Harr.** [15, 62].

4) Extraction de l'huile essentielle :

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

5) Hydrodistillation :

20 g de clou de girofle 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 (Fig.02), l'eau et l'huile se séparent par différence de densité.

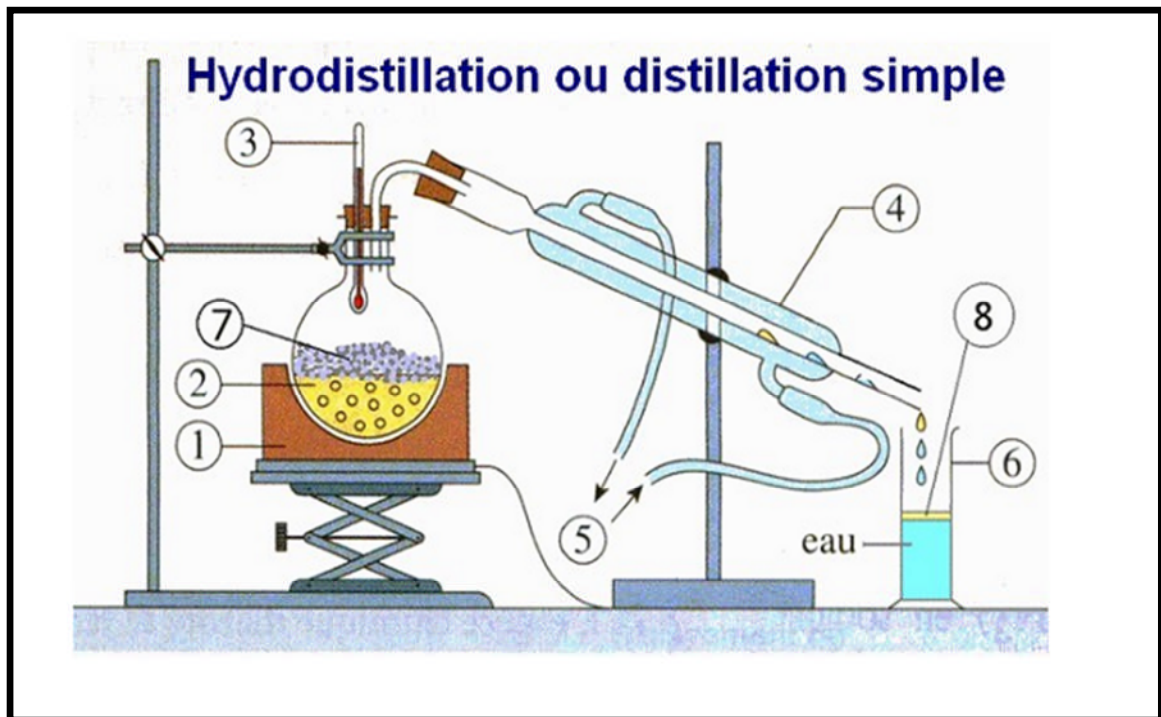


Figure 4: Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (LUCCHESI, 2005).

- | | |
|-------------------|----------------------------------|
| 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 |

6) 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.

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

Matériel et méthodes

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 et de la lumière.

7) Tests microbiologiques :

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

7-1) Microorganismes étudiés :

Quatre bactéries (*Escherichia coli*, *Kluyvera spp*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter braakii*) ont été choisis pour leur fréquence élevée à résisté aux antibiotiques testés (résistance à au moins trois antibiotiques).

7-2) 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^e 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^e, 1/15^e, 1/20^e, 1/25^e, 1/30^e, 1/35^e, 1/40^e, 1/45^e, 1/50^e dans cette solution de Tween 20 diluée.

7-3) 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).

Matériel et méthodes

Dans des tubes à essai contenant chacun 4,5 ml du milieu Muller Hinton préalablement stérilisé 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 les concentrations finales de 1/100^e, 1/150^e, 1/200^e, 1/250^e, 1/300^e, 1/350^e, 1/400^e, 1/450^e, 1/500^e (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 10⁸ UFC.mL⁻¹. Après incubation, on note la présence ou l'absence de culture.

7-4) Détermination de l'effet antibactérienne des huiles essentielles :

Dans le but de déterminer l'effet bactéricide ou bactériostatique de l'huile essentielle de clou de girofle. 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

Résultat

Une recherche microbiologique a été effectuée sur 37 prélèvements d'agneaux diarrhéiques, provenant de deux exploitations appartenant aux propriétaires privées 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 des agneaux dans ces deux fermes.

1-Répartition des cas diarrhéiques selon sexe :

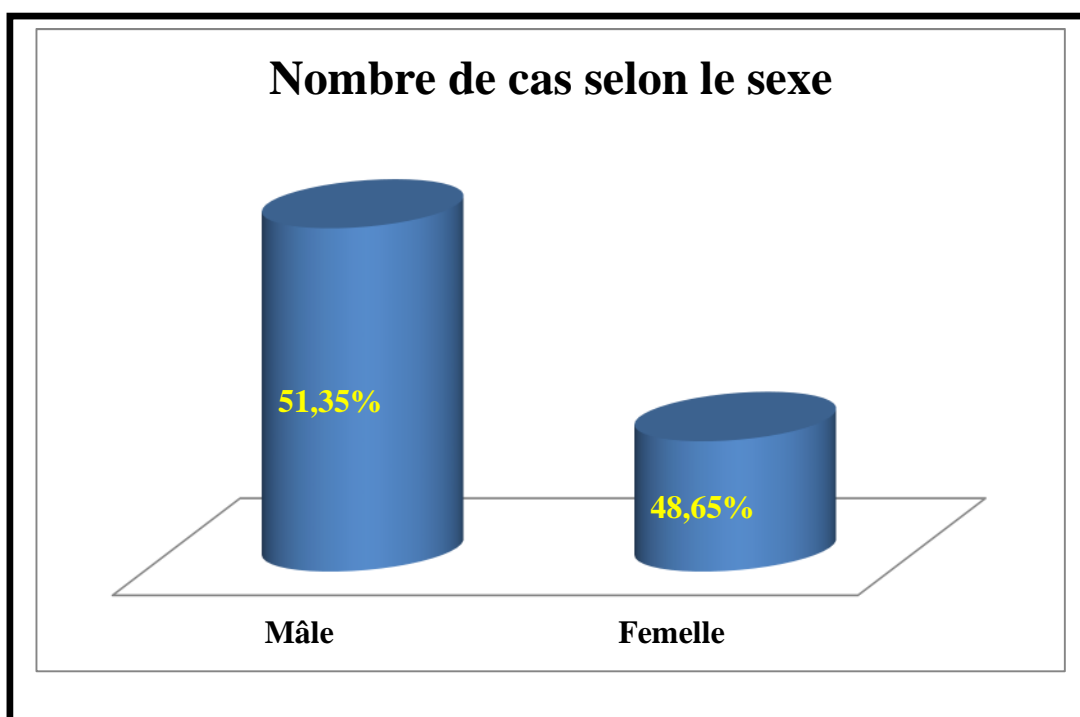


Figure 5 : Répartition des cas diarrhéiques selon sexe.

Cette figure montre clairement que le nombre de cas de diarrhée chez les mâles est supérieur à celui des femelles.

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

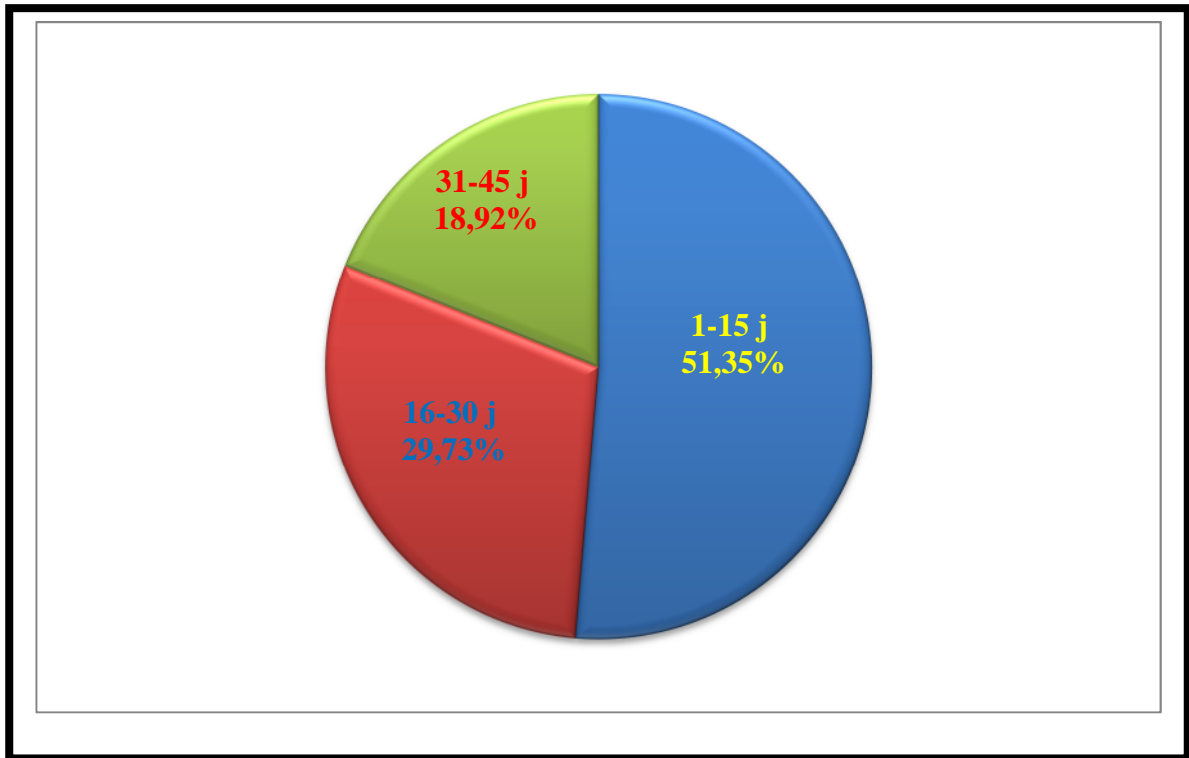


Figure 6 : Répartition des cas diarrhéique en fonction d'âge.

Cette figure montre que la première tranche d'âge affiche le taux le plus élevée des cas diarrhéique avec un pourcentage de 51.35% suivie par la deuxième tranche d'âge avec un taux de 29.73%. Cependant, la dernière tranche d'âge montre le taux le moins élevé 18.92%.

3- Prévalences globales de différentes bactéries isolées :

Tableau 03 : Prévalences des agents entéro-pathogènes détectés chez les agneaux diarrhéiques

Bactéries isolées	Agneaux (n = 37)	
	Nombre	%
<i>Echerichia coli</i>	31	83,78%
<i>Kluyvera spp</i>	3	8,11%
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	2,7%
<i>Klebseilla spp</i>	1	2,7%
<i>Citrobacter braakii</i>	1	2,7%

Il en ressort de ce tableau que *Echerichia coli* est la bactérie la plus isolée avec un pourcentage de 83.78%. Cependant *Kluyvera sp* a été détectée chez 8.1 %. Cependant *Enterobacter cloacae*, *Klebseilla sp*, *Citrobacter braakii* ont affichées un taux d'isolement de 2,7%.

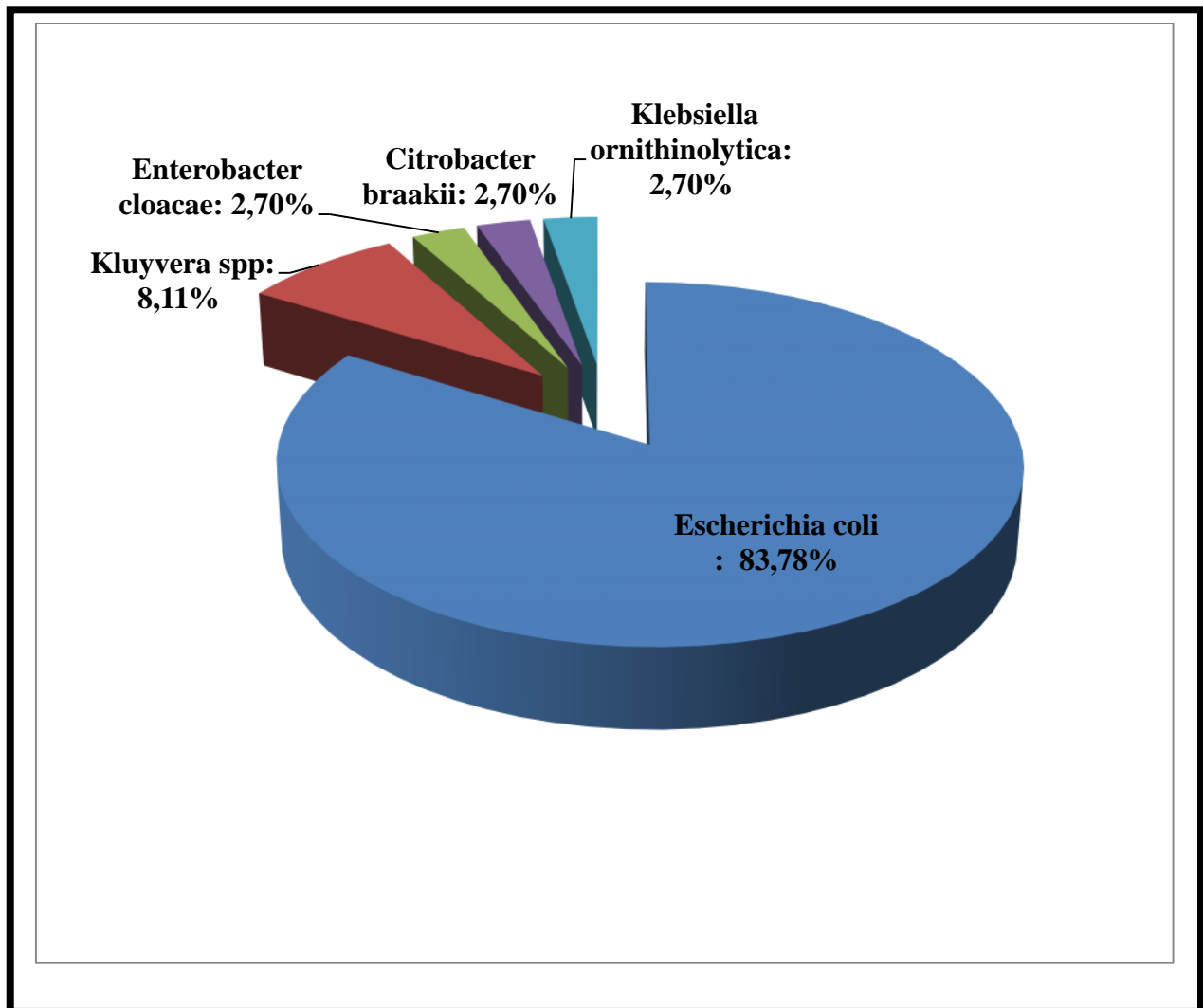


Figure 7 : Prévalence des bactéries isolées des cas diarrhéiques.

Cette distribution montre que *E.coli* est la bactérie le plus répandu avec 83.78%, suivi en deuxième lieu par *Kluyvera sp* qui a affichée 8.11%, et à moindre degré *Klebseilla sp*, *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter braakii* avec un taux égale de 2.70%.

3- Antibiorésistance :

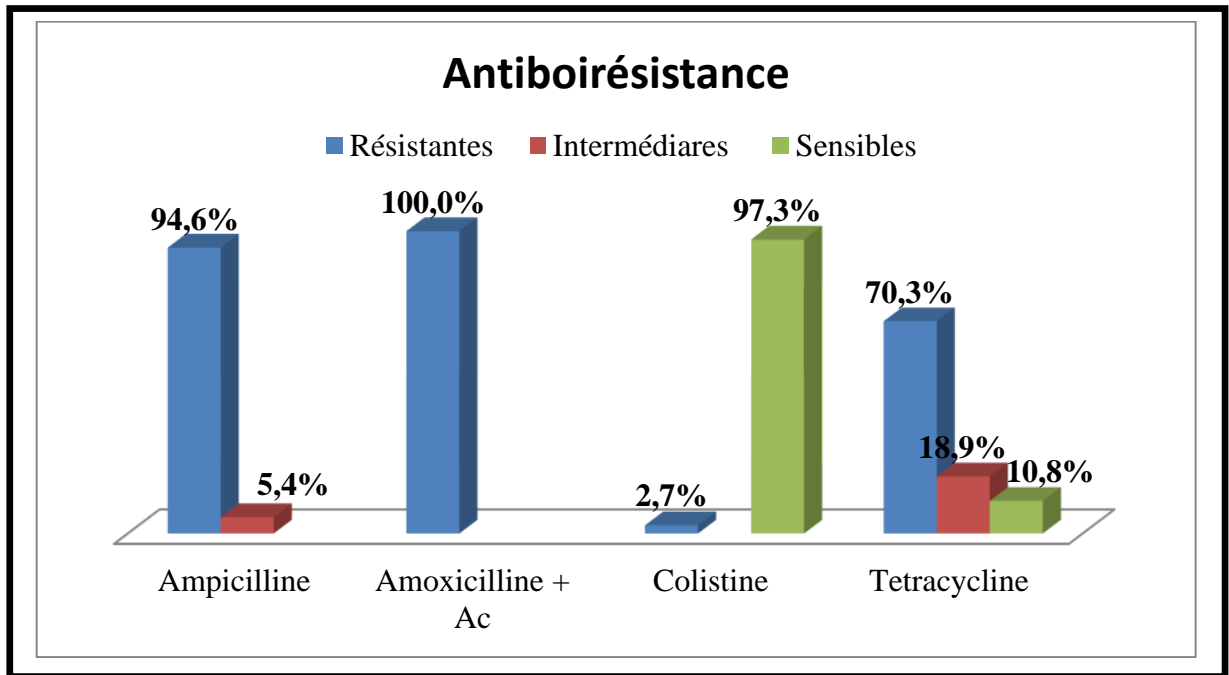


Figure 8 : Anti-bio-résistance des souches bactériennes isolées des cas diarrhéiques

Cette figure montre que les souches bactériennes isolées des cas diarrhéiques chez les agneaux manifestes une résistance de 100% pour l'amoxicilline + AC, de 94.6% pour l'ampicilline et 70.3% en vers la tetracycline. Alors que le taux de résistance pour la colistine n'est que de 2.7%. Cependant ses souches ne sont sensibles qu'à la colistine avec un taux de 97.3%, et à moindre degré à la tetracycline avec un pourcentage de 10.8%.

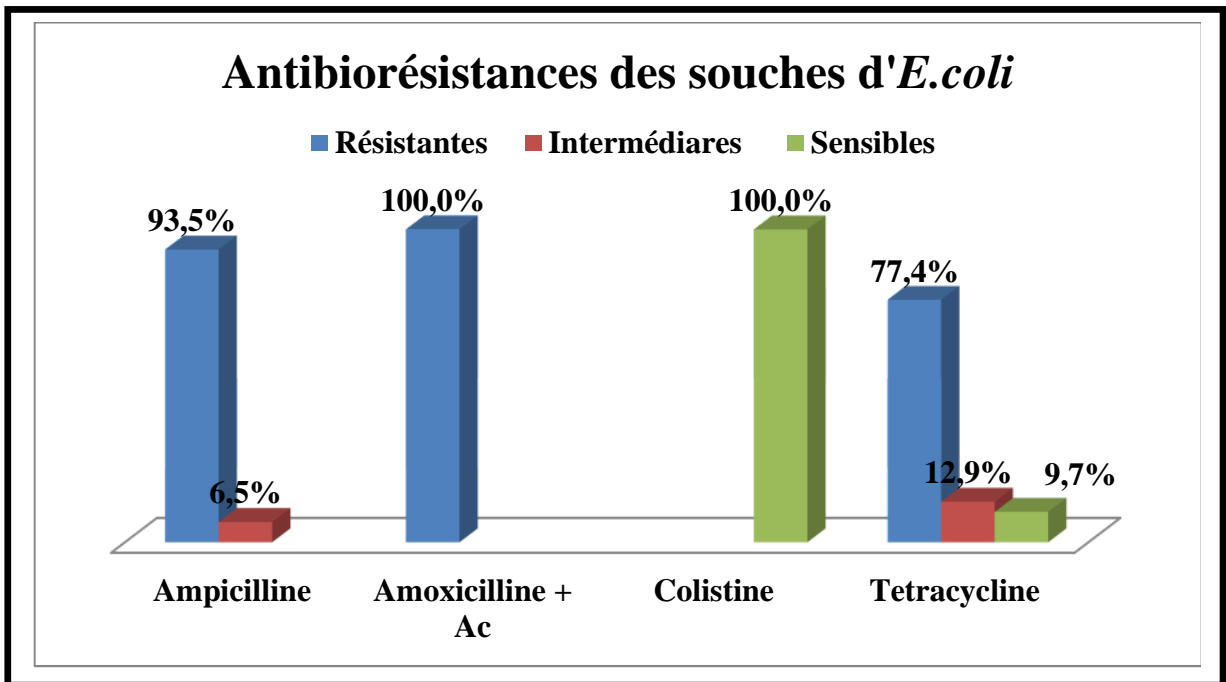


Figure 9 : Anti-bio-résistance des souches *E.coli* isolées des cas diarrhéiques

Cette figure montre clairement que les souches d'*E.coli* manifestes une résistance de plus de 70% en vers trois antibiotiques des quatre utilisés dans cette étude. Cependant ces souches sont sensibles à 100% à la colistine.

4-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.

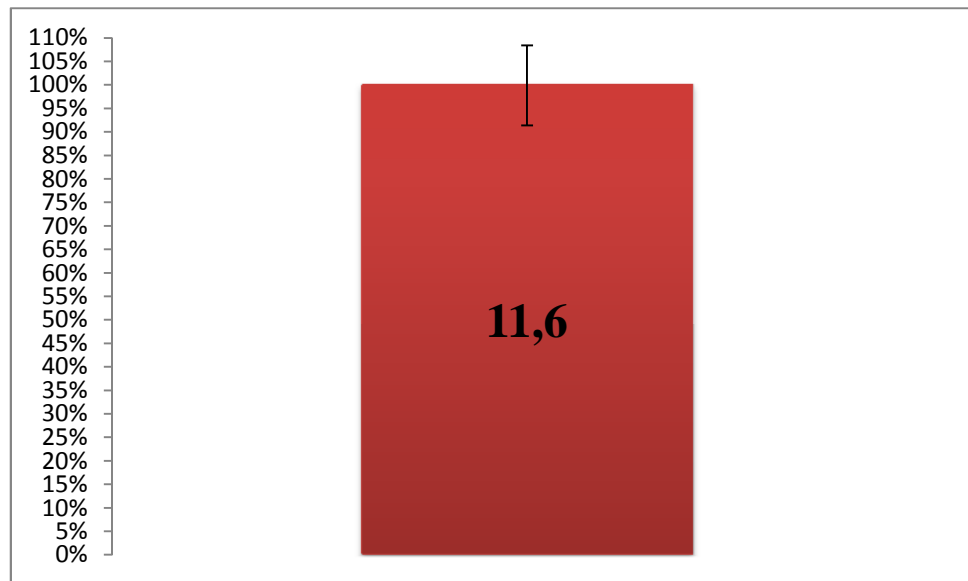


Figure 10: rendement en huile essentielle du clou de girofle

5-Activité antimicrobienne des huiles essentielles:

Le tableau 1 récapitule les résultats de l'activité antibactérienne d'huile essentielle *Syzygium aromaticum*. On note que cette huile exercé une activité antibactérienne. La concentration de 1/200 v/v était suffisante pour inhiber la croissance d'*E. coli*. Alors que *Kluyvera spp*, *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter braakii* étaient plus sensibles avec une concentration d'inhibition de 1/300 v/v.

Tableau 4: Activité antibactérienne d'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*

Bactéries	Dilution v/v							
	1/100	1/150	1/200	1/250	1/300	1/350	1/400	Témoin
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Kluyvera spp</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Citrobacter braakii</i>	-	-	-	-	-	+	+	+

6-Activité bactériostatique / bactéricide:

Le tableau 2 résume les résultats de l'activité bactériostatique / bactéricide d'huile essentielle *Syzygium aromaticum*. On note que cette huile exercé une activité bactéricide envers les quatre souches étudiées d'où son CMI est égal à son CMB.

Tableau 5: Activité bactériostatique / bactéricide d'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*

Bactéries	CMI µl/ml	CMB µl/ml
<i>Escherichia coli</i>	1	1
<i>Kluyvera spp</i>	0.67	0.67
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.67	0.67
<i>Citrobacter braakii</i>	0.67	0.67

Discussion

Répartition des cas diarrhéiques selon sexe :

La présente étude nous a permis de déceler un taux des diarrhées néonatales de 51.35% chez le sexe mâle contre 48.65% chez la femelle. Ces deux taux sont presque égaux. Cela s'explique par le poids du mâle à la naissance qui est un peu élevé par rapport à la femelle, de même le nombre de sujets par portée.

L'augmentation de la taille de la portée entraîne un accroissement des risques de non ingestion du colostrum. Les jeunes des portées multiples ont une vitalité plus faible que ceux des portées simples (**Nowak, 1998**). Cela peut constituer un risque pour l'apparition des diarrhées néonatales.

Répartition des cas diarrhéiques en fonction des tranches d'âge

En ce qui concerne l'âge, la fréquence d'infection est de l'ordre de 51.35% en première tranche d'âge. Cette dernière apparaît comme favorable au développement des agents entéropathogènes, puisque l'infection s'installe après élimination des immunoglobulines colostrales. Un résultat similaire a été rapporté par **Susan (2008)**, qui a mentionnée que l'âge de 2 à 14 jours constitue un âge favorable pour l'apparition des diarrhées néonatales causées par les rotavirus chez les agneaux et les chevreaux.

Cependant, **Kaminjolo et Ademiysum (1994)** ainsi que **Khafagi et al. (2010)** ont montrée que la tranche d'âge allant de la 3^{ème} à la 7^{ème} semaine est la plus favorable à l'apparition des diarrhées néonatales chez les agneaux. Cela s'explique par les programmes de vaccination réalisés.

Fassi-Fehri et al. (1988), ont noté une diminution significative des diarrhées néonatales à partir du 11^e jour au lieu du 21^e jour comme pour le veau, l'insuffisance quantitative et qualitative du colostrum peut être incriminée, d'autant plus que les naissances doubles sont fréquentes chez la brebis.

Prévalences globales de différentes bactéries isolées

La diarrhée néonatale de l'agneau est un syndrome à étiologie complexe. Elle implique de nombreux agents infectieux de nature bactérienne, virale et protozoaire. Parmi les agents bactériennes et virales *Escherichia coli* et le *rotavirus* constituent l'un des causes principales. En général *E. coli* joue un rôle prépondérant lors de la première semaine et le rotavirus est plus important entre 7 et 30 jours d'âge (**Wani et al., 2004**).

Discussion

Plusieurs auteurs ont signalé que *Escherichia coli* est considéré comme la cause la plus importante des diarrhée néonatales chez les agneaux (**Sharif et al, 2005**; **Hodgson, 1994**).

L'*Escherichia coli* a été l'agent pathogène le plus dominant dans notre étude, avec une fréquence d'isolement de 83.78%. Un taux inférieur de 36.84% a été rapporté par **Ahmed et al. (2010)**.

Au contraire d'*E.coli*, les *Kluyvera* spp. Sont beaucoup moins fréquemment détectés, avec un taux de 8.11 %. Cette bactérie n'a pas été mise en évidence dans d'autres travaux. Néanmoins, certains travaux incriminant cette bactérie dans les infections du tractus gastro-intestinal (**Sarria et al 2001**).

Klebseilla spp, *Enterobacter cloacae* ainsi que *Citrobacter braakii* n'ont été détectée que dans un seul cas pour chacune parmi les échantillons fécaux soumis à l'analyse, ce qui a permis de donner une prévalence de 2.7 %. La prévalence de *Klebseilla* ssp est inférieur à celle rapportée par **Ahmed et al., 2010** avec un taux de 13.6%. Cependant, ces mêmes auteurs n'ont pas mis en évidence les autres bactéries isolées dans cette étude. Tandis qu'ils ont isolées *Shigella* spp (7.02%), *Proteus vulgaris* (5.26), *Salmonella* spp (15.79%), *Streptococcus* spp (3.51), *Staphylococcus aureus* (8.77%) et *Arcanobacterium pyogenes* (9.65%)

Au cours de cette étude, nous n'avons pas mis en évidence les *Salmonelles* sur cultures bactériologiques. Ainsi, la coproculture négative ne garantit pas l'absence de portage. A l'opposé, l'isolement d'une salmonelle ne signifie pas obligatoirement une maladie, ni même un portage chronique. Plusieurs coprocultures successives sur le même animal sont nécessaires pour conclure (**Martel et Moulin, 1983**).

Antibiorésistance :

Cette étude a mis en évidence une résistance des souches isolées pour l'ampicilline, l'amoxicilline +acide cluvulanique et la tétracycline à des taux de 94.6%, 100% et 70.3% respectivement. Cependant ces souches montrent une sensibilité élevée à la colistine (97.3%). Egalement, les souches d'*E.coli*, ont manifestées des taux élevés de résistance à l'ampicilline (93.5%), l'amoxicilline +acide cluvulanique (100%) et la tétracycline (77.4%). Tandis qu'ils sont tous sensibles à la colistine avec à un pourcentage de 100%.

Discussion

Des résultats similaires sont rapportés chez le veau par **Akam et al. (2007)**. Cependant, aucun résultat n'a été noté chez les agneaux vu le peu des travaux réalisés dans ce domaine.

Le problème de la résistance aux médicaments n'est pas limité à bactéries pathogènes, il implique également la flore bactérienne commensal, qui peut devenir un important réservoir de souches résistantes (**Erb et al., 2007**).

Rendement de l'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 11,6 % \pm 0,97. **Bruneton (2009)**, note que le clou de girofle contient au minimum 150 ml/kg d'huile essentielle.

Le résultat obtenu dans cette étude par la méthode d'hydrodistillation est proche de celui cité par Guan et al., 2007 avec un rendement de 11.5% pour la même méthode. Toutefois ce rendement est inférieur a celui rapporté par ces mêmes auteurs par la méthode d'extraction par fluide supercritique ainsi que l'extraction au Soxhlet avec un taux de 19.6% et 41.8% respectivement. Alors qu'il est supérieur à celui obtenu par Guan et al., 2007 a l'aide de la méthode de distillation par entrainement à la vapeur d'eau qui est de l'ordre de 10.1%.

Activité antimicrobienne des huiles essentielles:

Dans notre étude, l'huile essentielle de clou de girofle présentait une forte activité contre les souches bactériennes sélectionnées. Elle a affiché un CMI qui a varié de 0,67 à 1 μ l/ml vis à vis des 4 souches d'entéropathogènes étudiés. 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 romarin ont fort et des effets inhibiteurs cohérentes contre divers agents pathogènes.

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 d'agneau âgé de 1 à 45 jours, à savoir *E. coli*, *Kluyvera spp*, *Enterobacter cloacae*, *Klebseilla spp* et *Citrobacter braakii* .

Même si les prévalences sont variables, les *Escherichia. coli* s'affichent en tête de liste des agents diarrhéiques. Ils sont suivis par *Kluyvera spp* *Enterobacter cloacae*, *Klebseilla spp* et *Citrobacter braakii* 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 agneaux nouveau-nés sur le terrain.

Cette étude nous a permis aussi de prouver l'efficacité d'huile essentielle de clou de girofle 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.

Références bibliographiques

Les références bibliographiques

1. **Abruneton J.** (1999). Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Edition Technique et documentation, 3^{ème} Edition Lavoisier, Paris. 1120.
2. **Acres S.D.** (1985). Entérotogénic *Escherichia Coli* infection in new born calves: A review. *J. Dairy. Science.* 68: 229-256.
3. **Ahmed A, GO Egwu, HS Garba and AA Magaji.** (2010). Prevalence of bacterial pathogens and serotyping of *E. coli* isolates from diarrheic lambs in Sokoto state, Nigeria *sokoto journal of veterinary sciences* 8(1):42-45.
4. **Akam A A. Bouyoucef, Kh. Rahal, M. Lafri, R. Kaidi, D. Khelef, F. Chirilă** (2007) FREQUENCE D'ISOLEMENT ET ANTIBIORESISTANCE DES SOUCHES D'*ESCHERICHIA COLI* F5+ ISOLEES CHEZ LES VEAUX DE LA MITIDJA (ALGERIE) *Bulletin USAMV-CN*, 64 (1-2).
5. **Alekshun MN and Levy SB** (2007). Molecular mechanism of antibacterial multidrug resistance. *Cell.* 128: 1037-1050.
6. **Bakkali F., Averbeck S., Averb Eck D., & Idaomar M.** (2008). Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.
7. **Batissou I. and der Vartanian M.** (2000). Extracellular DsbA-insensitive folding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STa in vitro. *J Biol Chem.* 275, 10582-9.
8. **Belletti N., Nidagijimana, M., Sisto C., Guerzoni, M.E., Lanciotti, R. & Gardini F.** (2004). Evaluation of the antimicrobial activity of Citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 52 (23) , 6932-6938.
9. **Bousbia N.** (2004). Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leurs activités antibactériennes. Thèse de Magistère. Option Sciences Alimentaires , INA. Algérie.
10. **Bruneton J.** (2009). Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. ED Lavoisier.
11. **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.
12. **Charpentier B., Hamon-Lorleac'h F., Harlay A., Huard A., Ridoux L., & Chanselle S.** (2008). Guide du préparateur en pharmacie. 3^{ème} édition, Elsevier Masson, 1358.

Les références bibliographiques

13. **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.
14. **Cid, D., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Marin, I., Sanoz, R., Orden, J.A., Amils, R and de La Fuente, R.,** 2001. Association between intimin (eae) and EspB gene subtypes in attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic lambs and goat kids. *Microbiology* 147, 2341–2353.
15. **Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., & Wyllie S.G.** (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 170 – 175.
16. **Croteau R., Kutchan T.M. & Lewis N.G.** (2000). Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN B., GRUISSEM W., JONES R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, 1250-1268.
17. **De Billerbeck V.G., Roques C., Vaniere P. & Marquier P.** (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d’huile essentielle. *Hygiène (Revue officielle de la société française d’hygiène hospitalière)*, 10, 248-251.
18. **De Verdier K, Ann Nyman, Christina Greko and Björn** (2012) *bengtsson* antimicrobial resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from Swedish dairy calves. *Veterinaria Scandinavica*, 54:2.
19. **Djenane D., Meddahi A. & Roncales P.** (2006). Les systèmes antioxydant et antimicrobien pour la conservation de la viande. *Sciences des Aliments*, 26 , 37-73.
20. **Djenane D., Sánchez-Escalante A., Beltrán J.A. & Roncalés P.** (2002). Ability of tocopherol, taurine and rose mary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. *Food Chemistry*, 76, 407-415.
21. **Daignault .A, Bourassa .R And Moreau .J,**(2009). La diarrhée chez l’agneau : un sujet à « éviter », SYMPOSIUM OVIN .CRAAQ.
22. **Dorantes L., Colmenro R., Hernandez H., Mota L., Jaramillo M.E., Fernandez E. & Solano C.** (2000). Inhibition of growth of some food borne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *International Journal Food Microbiology*, 57, 125-128.
23. **Dufrasne V.** (2003). Diarrhée néonatale des veaux et réhydratation par voie orale. Thèse Doctorat Vétérinaire. ENV. Alfort.

Les références bibliographiques

24. **Fairbrother J. M., Nadeau E. and Gyles C. L.** (2005). *Escherichia coli* in post weaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Res Rev* 6, 17-39.
25. **Fassi-Fehri M.M; Johnson D.W; Taoudi A And Berrada J;** (1988). Epidémiologie des diarrhées néonatales à *Escherichia Coli* et à Rotavirus chez le veau et l'agneau au Maroc. *Anim. Rech. Vet.*19: 59-64.
26. **Fisher K. & Phillips C.** (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? A review. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 156-164.
27. **Fisher K., Rowe C. & Phillips C.** (2007). The survival of three strains of *Acrobacter butzleri* in the presence of lemon orange and bergamot essential oils and their components in vitro and food. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 495-499.
28. **Fouche J.G., Marquet A. & Hambuckers A.** (2000). Les plantes Médicinales, de la plante au médicament. *Observatoire du monde des plantes Sart-Tilman*.
29. **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.
30. **Goossens H, Guillemot D, Ferech M, Schlemmer B, Costers M and van Breda M,** 62: 373-379.
31. **Guan Wenqiang, Li Shufen ,*, Yan Ruixiang and Tang Shaokun ,** Quan Can Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chemistry* 101 (2007) 1558–1564.
32. **Harley W. Moon And Thomas O. Bunn.** Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia Coli* Infections In Farm Animals. *Vaccine*. 1993, 11(2), 213-217.
33. **Hernandez-Ochoa L.R.** (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné « Solvant/ Actif ». D'origine végétale. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechniques de Toulouse. France.
34. **Hodgson JC,**(1994). Disease due to *E.coli* in sheep. In: *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, Commonwealth Agriculture Bureau International, UK. 2, 135-150.
35. **Holland R.E.** (1990). Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. A review. *Clinic. Microbial.* 3(4): 348,

Les références bibliographiques

36. **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 Clin Microbiol* 35, 2546-50.
37. **Jaset-Dongmo P.M., Tatsadjieu N. L., Tchinda Sonwa E., Kuate J., Amvam Zollo P.H. & Menut C.** (2008).Antiradical potentiel and antifungal activities of essential oils of the leaves of *Eucalyptus saligna* and *E. camaldulensis* against *Phaeoramularia angolensis*. *African Journal of Biotechnology* , 7, 4045-4050.
38. **Jean-Louis PONCELET**,(2004).LES COLIBACILLOSES sngtv Fiche n° 69.
39. **Kaminjolo et Ademiysum**(1994) rotavirus in calves, piglets, lambs and goat kids in Trinidad britc. *Veterinary J.*, 3:293-299.
40. **Kawano K., Yamada T., Yagi T. and Ito K.** (1998).[Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* from sporadic diarrhea patients]. *Kansenshogaku Zasshi* 72, 1275-82.
41. **Khafagi ,Manal H, M.A.Mahmoud and A.R.Habashi** ,(2010).prevalence of rotavirus infections in small ruminants. *global veterinaria*. 4 (5): 539-543.
42. **Koba K., Sanda K., Raynaud C., Nenonene Y.A., Millet J. & Chaumont J.P.** (2004).Activities antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp. Vis-à-vis des germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 148, 202-206.
43. **Kuda T., Iwai A. & Yano T.** (2004).Effect of red pepper *Capsicum annum* var. conides and garlic *Allium sativum* on plasma lipid levels and cecal mi croflora in mice fed beef tallow. *Food Chemistry Toxicology*, 42, 1695-1700.
44. **Lardy J-M. & Haberkorn V.** (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Revue de Kinésithérapie*, 61, 14-17.
45. **Laub G.R.** (1986). Discovery of the sulfa drugs. *South Med. J.* 79: 782.
46. **Le Moine Constance, Camille, Anne and Marie**, (2009).VACCINS ET VACCINATION CHEZ LES OVINS. ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT.
47. **Lopes L. M., Fabbricotti 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.
48. **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.

Les références bibliographiques

49. **Mainil J.**(1995) La vaccination anticolibacillaire en pathologie digestive In Congrès de la Société Française de Buiatrie : La Vaccination en buiatrie. Paris, 29-30 novembre 1995. Toulouse : SFB, 1995, 60-75.
50. **Matan N, Rimkeeree H, Mawson AJ, Chompreeda P, Haruthaithanasan V and Parker M:** Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *Int J Food Microbiol* (2006), 107:180-185.
51. **Millemann Y, Adjou K, Maillard R, Polack, Chartier C.** Les diarrhées néonatales des agneaux et des chevreaux. *Point Vétérinaire*, (2003), 34(233), 22-29.
52. **Mohammedi Z.** (2006).Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de magister. Option: Produits naturels, activité biologique et synthèse. Faculté des Sciences. Université ABB. Tlemcen. Algérie.
53. **Mondoly.P.** Morts brutales d'origine infectieuse chez les ovins *In Comptes rendus des Journées nationale GTV Nantes* (2007). Paris : SNGTV, 715-721.
54. **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.
55. **Muñoz .M, M. Alvarez , I. Lanza and P. Carmenes .**(1996). Role of enteric pathogens in the etiology of neonatal diarrhea in lambs and goat kids in Spain. *Epidemiol. Infect*, 117, 203-211.
56. **Nairouz B , 2005.** Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues comme aliments, thèse de magister en pharmcochimie ,institu de chimie (Constantine).
57. **Nagy B; Fekete P.Z.** (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine.*Int. J. Medical. Microbio.* 295: 443-454.
58. **Newman DJ, Cragg GM and Snader KM** (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66: 1022-1037.
59. **Nishikawa Y., Zhou Z., Hase A., Ogasawara J., Kitase T., Abe N., Nakamura H., Wada T., Ishii E. and Haruki K.** (2002).Diarrhea genic *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.

Les références bibliographiques

60. **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.
61. **Normak HB and Normak S** (2002).Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.* 252: 91-106.
62. **Nowak,**(1998). Développement de la relation mère-jeune chez les ruminants .*INRA prod.anim.* 11, 115-124.
63. **Omidbeygi M., Barzegar M., Hamidi Z. & Naghdibadi H.** (2007). Antifungal activity of tyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus xavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, 18, 1518-1523.
64. **Ouraini D., Agoumil A., Ismaili-Alaoui M., Alaoui K., Cherrah Y.,Amrani M. & Bellabas M.A.** (2005).Etude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie*, 4 ,147-157.
65. **Oussou K.R., Coffi K., Nathalie G., Seriyolou, Gerard K., Mireille D., Yao T.N., Gilles F. & Jean-Claude C.H.** (2004).Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *Comptes Rendus de Chimie*, 7, 1081-1086.
66. **Padrini F. & Lucchioni N.** (2003).Le grand livre des huiles essentielles: Médecine douce, bien être. Edition de Vecchi S-A. PARIS.
67. **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.
68. **Pauli A.** (2001).Antimicrobial properties of essential oil constituents. *International Journal of Aromatherapy*, 11, 126-133.
69. **Pibiri M.C.** (2005).Assainissement microbiologique de l' air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de Doctorat. Polytechniques Fédérale de Lausanne.
70. **Piochon M.** (2008).Etude des huiles essentielles d' espèces végétales de la flore Laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Mémoire, Université du Quebec à Chicoutimi, Canada.
71. **Prabuseenivasan S, Manickkam Jayakumar and Savarimuthu Ignacimuthu.** *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine* (2006), 6:39.

Les références bibliographiques

72. **Prescott LM, Harley JP and Klein DA** (1995). Microbiologie. De Boeck ed. p 1014.
73. **Prudent D., Perineau F., Bessier E J.M., Michel G.M. & Baccou J.C.**(1995). Analysis of the essential oil of with oregano evaluation of its bacteriostatic and fungi static properties. *Journal of Essential Oil Research*, 7, 165-173.
74. **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 STa enterotoxin from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vaccine*.
75. **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.
76. **Savarino S. J., Fasano A., Robertson D. C. and Levine M. M.** (1991). Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. *J Clin Invest* 87, 1450-5.
77. **Schuhmacher A. & Reichling P.** (2003). Virucidal effect of Peppermint oil on the enveloped viruses Herpes Simplex Virus type 1 and type 2 in vitro. *Phytomedicine* , 10(6-7), 504-510.
78. **Sharif L , Obeidat J and AL Ani F,**(2005). Risk Factors for lamb and Kid mortality in sheep and goat farms in Jordan. *blug. J. Vet .Med.* 8(2):99-108.
79. **Sharma N. & Tripathi A.** (2006). Fungi toxicity of *Citrus sinensis* L. essential oil on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiological and Biotechnology*, 22, 587-593.
80. **Singh SB and Barrett JF.** (2006). Empirical antibacterial drug discovery foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* 71: 1006-1015.
81. **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.
82. **Spangler B. D.** (1992). Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 56, 622-47.
83. **Standardisation de l'antibiogramme en medecine vétérinaire a l'échelle nationale.** selon les recommandations de l' OMS , **ED 4** (2008).
84. **Taillon. C.** (2009), Étude d'un variant de la toxine STb produite par *Escherichia coli* Université de Montréal.
85. **Teixeira-Duarte M.C., Mara Figueira G. & Sartoratto A.** (2005). Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethno pharmacology*, 97, 305-311.

Les références bibliographiques

86. **Teusher E., Anton R. & Lobstein A.** (2005). Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris, 522 .
87. **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
88. **Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J. & Perez-Alvarez J.** (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata*), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.), essential oils. Food Control, 19, 1130-1138
89. **Wani. S.A. , M.A. Bhat, I. Samanta, S.M. Ishaq, M.A. Ashrafi and A.S. Buchh,** (2004). Epidemiology of diarrhea caused by rotavirus and *Escherichia coli* in lambs in Kashmir valley, India. Small Ruminant Research. 52:145–153.
90. **Welch Rodney A.** (2006). The genus *Escherichia*. Prokaryotes. 6:60-71.
91. **Yagupsky P** (2006). Selection of antibiotic-resistant pathogens in the community. Pediatr. Infect. Dis. J. 25: 974-976.
92. **Zhiri A.** (2006). Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. Nutra News. Science, Nutrition, Prévention et santé. Edité par la Fondation pour le libre choix, 12, 8.