

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun-Tiaret
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Infectiologie

Présenté Par :

M^{lle} HAOUARIT Khadidja Fatima Zohra

M^{lle} KHATTOU Nacera

M^{lle} KOUADRIA Hanane

« Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et *Cinnamomum zeylanicum* sur les souches de *Staphylococcus aureus* productrices de biofilms isolées à partir des cas de mammite bovine »

Soutenu publiquement le 28/09/2020

Jury:

Grade :

Présidente : Dr. BOUMEZRAG Assia

MCB

Encadreur : Dr. BENBELKACEM Idir

MCB

Examineur : Dr. LOUACINI Brahim

MCA

Année universitaire 2019/2020.

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la patience pour réaliser ce travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadrant Dr. BENBELKACEM Idir de conférences. Nos vifs remerciements vont également à la présidente jury Dr. BOUMEZRAG Assia et Dr. LOUACINI Brahim pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à nos parents et nos frères et sœurs, pour leur contribution, leur soutien et leur patience.

Nos remerciements à notre chef de spécialiste Pr DOUKANI Koula pour sa bienveillance, sa disponibilité et son travail exemplaire.

Nos remerciements s'étendent également à tous les professeurs qui nous ont enseigné durant les années des études et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Nous souhaitant adresser également nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide «Inspecteur vétérinaire de la wilaya de Tiaret. KOUADRIA Mehdi,

Dr. BENAÏSSA Toufik, Dr. KOUADRIA Mostapha, Pr. TAÏBI Khaled, Dr. ACHIR Mohamed, Dr. ISMAIL Larbi, Msc. KOUADRIA Tahar, Msc. KADOUM Abdelkader».

Nous adressons aussi nos plus sincères remerciements à nos familles et nos amis, qui nous ont toujours encouragées au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous et à toutes.

Nous remercions s'adresse aussi à nos collègues de promo Master 2 infectiologies.

Enfin, on remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Mlle KOUADRIA & Mlle KHATTOU & Mlle HAOUARIT

Merci 

Dédicace

Je dédie ce modeste travail *qui est le fruit récolté après tant d'années d'efforts:*
A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et
mon bonheur ;MAMAN

Aucune dédicace ne serait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour
tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon
enfance et même à l'âge adulte. Tu as toujours été le père et la mère, rien au monde ne
vaut les efforts fournis jours et nuit pour mon éducation et mon bien être, toute cette
abnégation dont tu as fait preuve afin que je devienne ce que je suis, je t'en serai
éternellement reconnaissante. Que Dieu, tout puissant, te préserve et t'accorde la
bonne santé, longue vie et bonheur

A mon cher PAPA pour ses précieux conseils et encouragements, aucune
dédicace ne saura exprimer l'amour et le respect que j'ai pour toi. Que dieu leur procure
bonne santé et longue vie.

A mes charmantes sœur ASMAA, AMINA, AICHA et SOUAD, mes nièces TASNIM et
JOUMANA Qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de
générosité.

A toute ma famille, Mes oncles surtout mon oncle Mehdi, Mes tantes surtout ma tante
BAKHTA), cousins et cousines ; pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire

Sans oublier surtout Monsieur BENAÏSSA TOUFIK et Madame DOUKANI KOULA.

A mes collègues NACERA, KHADIDJA et les deux familles KHATTOU et HAOUARIT.

Un merci particulier à mes amis SOUAD, HOUARIA, NARIMEN, SANAA et Surtout à mes
chers frères TAHAR et KADER qui sont toujours là
dans le meilleur et le pire.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible.
Je vous dis merci.

Hanane

Dedication

Thank GOD for the guidance, strength, power of mind, protection and skills and for giving me a healthy life to achieve this goal.

I dedicate the fruit of my study to my beloved parents, who have been the reason of my existence, the source of inspiration and the leaders who continually provide their moral, spiritual, emotional and financial support.

To my sisters Saida, Wahida and Ritedj,

To my mima, tati khaldia, abedia, Wahida, tata habiba, elhadja, rabia, farida, all so my cousins; khouloud, bent elhakem, rahil, aya and fadila and my special uncle AMINE and Madjid who shared their words of advice and encouragement to finish this study.

To my little angels FATIHA, LINA and SAIF.

To my second lovely family KHATTOU.

A very special dedication to all my best and dear friends girls and boys especially who shared me this long journey with its good and bad and gave me strength when i thought of giving up.

To my partners, my sun and moon: Nacera and Hanane.

To all the professors who have grown our knowledge, nourished us from their intellectual assets and made us raise, all appreciation and respect, especially M. BENAÏSSA.

To khaled and mma meriem who were the source of energy during all this years.

And lastly i dedicate this work to every single person was the reason of my happiness one day and to the present and next future promotion i say:

«Don't believe in luck believe in hard work ».

Khadidja

Dedication

TO GOD, for the strength he gives me, and that he gives to the people who have helped and supported me.

I would like to take this opportunity to dedicate the first-fruit of my life to

Mother & Father,

Whose affection, love, encouragement and prays of day and night make me able to get such success and honor.

*To my brothers **Khaled, Nouredine, Mohamed, Karim and Hichem** my soul mate, and their wives **Sarah, Leyla, Nacera and Fatiha***

*To my nephews **Ayham, Aymen, Nouredine, Younes, Takieallah** and my nieces **Lilya and Dounia.***

*And special dedication for my second lovely family **Haouarit** « I am proud of being a part from you ».*

To all my friends and especially the best one's thanks for sharing me this long journey with its big and small detail, thanks for the laughs for the support and for every effort you have done to me.

*Thanks to all professors who shared us their knowledge and for the special one **Mr. BENAÏSSA TOUFIK** for his support, encouragement and love « I am so proud of you ».*

*To **mma meriem** and **khaled** who were the source of energy during all this years.*

*To my partners: **Khadija** and **Hanane.***

For the secret of my happiness, my twin, confident and my whole life « love you my everything, khadouj ».

For the future promotions

« Believe in your dreams and your effort so that you can achieve your goals ».

Nacera

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des abréviations.....	i
Liste des tableaux.....	ii
Liste de figures.....	iii
Introduction générale	

Partie bibliographique

Chapitre I

Généralités sur les mammites bovines

I.1 Définition	3
I.2 Classification des mammites.....	3
I.2.1 Mammite subclinique	3
I.2.2 Mammite clinique	3
I.3 Causes des infections mammaires	4
I.4 Mammite à <i>Staphylococcus aureus</i>	5
I.4.1 Caractères bactériologiques de <i>Staphylococcus aureus</i>	5
I.4.2 Classification et taxonomie de <i>Staphylococcus aureus</i>	5
I.4.3 Pouvoir pathogène et importance des <i>Staphylococcus aureus</i> dans les mammites bovines.....	6
I.4.4 Implication de la production du biofilm sur les mammites bovines.....	6

Chapitre II

Plantes et huiles essentielles

II.1 <i>Syzygium aromaticum</i>	9
II.1.1 Historique.....	9
II.1.2 Description de la plante.....	9
II.1.3 Répartition géographique	11
II.1.4 Classification	11
II.1.5 Huile essentielle du <i>Syzygium aromaticum</i>	11
II.1.5.1 Composition chimique.....	12
II.1.5.2 Propriétés pharmacologiques.....	12
II.2 <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	13
II.2.1 Historique.....	13
II.2.2 Description de la plante.....	13
II.2.3 Répartition géographique	14
II.2.4 Classification.....	15
II.2.5 Huile essentielle du <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	16

II.2.5.1	Composition chimique	16
II.2.5.2	Caractères et constantes physico-chimiques	16
II.2.5.3	Activités biologiques.....	17
II.2.5.4	Pouvoir antioxydant.....	17
II.2.5.5	Effets toxiques et allergisants.....	18
II.3	Les huiles essentielles	19
II.3.1	Définition.....	19
II.3.2	Mode d'extraction des huiles essentielles	19
II.3.3	Localisation des huiles essentielles.....	19
II.3.4	Rôle des huiles essentielles.....	19
II.3.5	Propriétés physiques et chimiques.....	20
II.3.6	Activités des huiles essentielles.....	20
II.3.6.1	Activité antibactérienne.....	20
II.3.6.2	Activité antifongique.....	21
II.3.6.3	Activité antioxydante	21
II.3.7	Toxicité des huiles essentielles.....	21

Chapitre III

Traitement alternatif des mammites bovines

III.1	Différents traitements alternatifs pour les mammites bovines.....	23
III.1.1	Homéopathie.....	23
III.1.2	Isothérapie	23
III.1.3	Phytothérapie	23
III.1.4	Aromathérapie.....	23
III.2	Voies d'administration.....	24
III.3	Essais sur terrain.....	24

Partie expérimentale

IV.1	Matériel et méthodes.....	29
IV.1.1	Objectif de travail	29
IV.1.2	Matériel et produits.....	29
IV.1.2.1	Matériel	29
IV.1.2.2	Matériel de laboratoire.....	30
IV.1.3	Protocole expérimental.....	31
IV.1.4	Prélèvements du lait mammitique.....	32
IV.1.5	Identification des souches bactériennes.....	33
IV.1.6	PCR pour détecter les gènes liés à la production du biofilm	34
IV.1.7	Caractérisation phénotypique des souches productrices de biofilm.....	35
IV.1.8	Extraction des huiles essentielles et analyse chimique par CG-SM.....	35

IV.1.9	Concentration minimale inhibitrice (CMI)	37
IV.1.10	Production de biofilm par <i>Staphylococcus aureus</i>	38
IV.1.10.1	Production de biofilm par <i>Staphylococcus aureus</i> en présence et absence des huiles essentielles.....	38
IV.1.10.2	Formation du biofilm sur l'acier inoxydable.....	38
IV.2	Résultats et discussion.....	40
IV.2.1	Analyse génotypique de la présence d'icaA, d'icaD et de bap.....	40
IV.2.2	Caractérisation chimique des huiles essentielles par CG-SM.....	40
IV.2.3	CMI des huiles essentielles et de leurs composants majeurs.....	41
IV.2.4	Effet des huiles essentielles et des principaux composants sur la formation de biofilm sur les coupons de polystyrène et d'acier inoxydable.....	42
	Conclusion et perspectives	45
	Références bibliographiques	47
	Annexes	
	Résumé	

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNase	Désoxyribonucléase
AFNOR	Association Française de Normalisation
ATCC	American type culture collection
<i>Bap</i>	Biofilm associated protein
BHIB	Brain Heart Infusion Broth
CCSI	Comptage cellulaire somatique individuel
CLSI	Institut des normes cliniques et de laboratoire
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CMT	California Mastitis Test
EDTA	Ethylene diamine tetra acetique
FID	détecteur à ionisation de flamme
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HE	Huiles essentielles
HECZ	Huiles essentielles de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>
HESA	Huiles essentielles de <i>Syzygium aromaticum</i>
<i>Ica</i>	Intercellular adhesion protein A
M	Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme (g).
M'	Masse de l'huile essentielle obtenue en gramme (g)
mg	Milligramme
ml	Millilitre
nm	Nanomètre
nuc	Nucléase
Pb	Paire de base
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Réaction de polymérisation en chaine
Pmol	Pic mole
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
CG SM	Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse
Av. J.C	Avant Jésus-Christ
Apr. J.C	Après Jésus-Christ

QS	Quorum sensing
RCA	Rouge Congo Agar
Rd	Rendement
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SCN	Staphylocoques à coagulase négative
SCP	Staphylocoques à coagulase positive
SOD	Super oxyde dismutase
Taq	Thermus aquaticus
TTC	chlorure de 2, 3,5-triphényltétrazolium
U	Unité de rack
UFC	Unité Formant Colonie
UHT	Ultra Haute Température
µg	Microgramme
µL	Microlitre
µm	Micromètre

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°01 : Classification de l'espèce <i>Staphylococcus aureus</i>	5
Tableau N°02 : Classification botanique de <i>Syzygium aromaticum</i>	11
Tableau N°03 : Différents constituants de l'huile essentielle du <i>Syzygium aromaticum</i>	12
Tableau N°04 : Classification botanique de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	15
Tableau N°05 : Différents constituants de l'huile essentielle du <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	16
Tableau N°06: Matériel de laboratoire.....	30
Tableau N°07: Oligonucléotides utilisés dans la détection des gènes du biofilm et la confirmation de l'identification des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées à partir de lait de vaches atteintes de mammite subclinique.....	34
Tableau N°08: Analyses physicochimiques et valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI90%) des isolats de <i>Staphylococcus aureus</i> d'huile essentielle de clou de girofle, d'huile essentielle de cannelle et de leurs principaux composés	42
Tableau N° 09: Formation de biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> sur polystyrène et acier inoxydable en présence d'huile essentielle de clou de girofle (HESA), d'huile essentielle de cannelle (HECC) et de ses principaux composants.....	43

LISTE DES FIGURES

Figure N°01: Allure d'un giroflier.....	9
Figure N°02: Feuilles jeunes de couleur rose et feuilles matures de couleur verte du giroflier.....	10
Figure N°03: Fleurs de giroflier.....	10
Figure N°04: <i>Syzygium aromaticum</i> Pousse florifère et dessous bouton floral. A droite: fruit surmonté des restes du calice.....	10
Figure N°05: Clous de girofle.....	11
Figure N°06: L'arbre <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	13
Figure N°07: Feuilles, fleurs et fruits du cannellier.....	14
Figure N°08: <i>Cinnamomum zeylanicum</i> et <i>Cinnamomum cassia</i>	14
Figure N°09: Situation géographique du Sri Lanka (Ceylan).....	15
Figure N°10: Bâtons et poudre d'écorce de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	18
Figure N°11: Protocole expérimental.....	31
Figure N°12: Schéma représentatif du principe d'extraction par distillation à valeur d'eau...36	

Introduction générale

Introduction générale

Depuis la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928, l'usage des antibiotiques n'a cessé d'augmenter. Or déjà à cette époque, le phénomène d'antibiorésistance avait été observé. La lutte contre ce dernier est donc un défi majeur du XXIème siècle. En agriculture biologique, l'usage d'antibiotiques n'est ni normalement autorisé, ni désirable. Il existe par contre un grand nombre de mesures préventives, curative et des traitements alternatifs disponibles aux producteurs pour faire face au problème (**Ministère de l'agriculture, 2012**).

En outre, l'un des aliments les plus essentiels pour l'homme étant le lait de part son omniprésence comme étant une denrée vitale. Cependant, l'état sanitaire de la vache, essentiellement celui de la glande mammaire, a un impact primordial sur le lait et sa qualité, d'où l'importance de la mammite bovine qui influence négativement sur le rendement du lait, la reproduction ainsi que la santé humaine et l'économie.

La mammite bovine est essentiellement due aux bactéries pathogènes. Les principaux agents pathogènes de l'infection mammaire sont *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* et *Escherichia coli* (**Boutet et al., 2005**). Ainsi qu'il peut y'avoir des infections fongiques dues aux agents mycosiques tel que : *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus albidus*, *Geotrichum capitatus* et *Saccharomyces cerevisiae* (**Benbelkacem et al., 2019**).

Vu l'impact économique qu'a cette infection qui place l'Algérie au troisième rang mondial en matière d'importation de lait et de produits laitiers, ainsi que celui sur la santé humaine, la recherche de techniques curatives ne cesse depuis son apparition. En effet, en 2006 plus de 500 millions de dollars ont été dépensés pour l'importation de lait en poudre (**Mouffok, 2007 ; Rahal et al., 2009**).

Actuellement, les moyens de traitement et de prophylaxie de la mammite bovine consistent surtout à l'usage d'antibiotiques, que ce soit d'une façon générale ou ciblée ; mais leur utilisation peut entraîner une antibiorésistance. D'où l'éventuelle idée des huiles essentielles comme alternative aux traitements conventionnels à base des antibiotiques, ou la synergie entre les deux. Cela pourrait aboutir à l'élaboration de molécules antibactériennes innovantes plus efficaces, capables d'agir par de nouveaux modes d'action (**Guinoiseau, 2011**).

L'objectif principal de la présente étude est d'évaluer l'effet antibactérien des HEs, extraites à partir de *Syzygium aromaticum* et *Cinnamomum zeylanicum*, sur des souches B *Staphylococcus aureus* productrices de biofilm, que l'on a isolé à partir de vaches atteintes

Introduction générale

de mammites tout en visant à en valoriser l'effet en adoptant des procédés scientifiques actualisés.

Au vue de la situation sanitaire liée à la pandémie de la COVID 19, nous avons procédé à une analyse de quelques travaux antérieurs en relation avec notre problématique.

Dans cette perspective, nous avons jugé utile d'articuler la présente recherche en trois volets :

1. Extraction et caractérisation chimique des huiles essentielles (*Syzygium aromaticum* et *Cinnamomum zeylanicum*).
2. Isolement et identification des souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*) productrices de biofilms à partir de lait de vaches atteintes de mammites subcliniques.
3. Evaluation de l'effet antibiofilm des huiles essentielles et de leurs composants majeurs.

Partie
Bibliographique

Chapitre I

Généralités sur les mammites bovines

I.1 Définition

Une glande mammaire qui représente une inflammation qu'elle qu'en soit l'origine traumatique, chimique, physique ou biologique est définie comme une mammite entraînant une perte de fonction ou de la production laitière (**Poutrel, 1985**). Elle représente l'une des maladies endémique majeure des bovins laitiers les plus importantes dans l'industrie laitière mais elle peut également toucher tous les autres mammifères en lactation (**Kevine, 2020**).

Si elle n'est pas traitée, elle peut conduire à la détérioration du bien-être et de la santé de la vache, de la production laitière et de la qualité du lait et aboutir à la mise à la réforme des vaches affectées, voire à leur mort (**Remy, 2010**).

I.2 Classification des mammites

I.2.1 Mammite subclinique

Elle ne représente pas les signes cliniques, elle se définit par l'absence de modifications visibles du lait et la diminution de la production laitière. la présence d'un agent infectieux dans un quartier provoque une élévation des numérations cellulaires du lait de ce quartier, avec prédominance des globules blancs polynucléaires neutrophiles (**Rattez, 2017 ; Hanzen, 2016**). Il est absolument impossible par la seule observation du lait ou de la mamelle de détecter si l'animal est infecté ou non (**Remy, 2010**). Seul le comptage cellulaire somatique individuel de chaque vache (CCSI) ou le CMT permet d'identifier la présence de cette infection (**Bourachot, 2017**).

Il est important de noter qu'une mammite subclinique peut devenir clinique si l'immunité de la vache ne parvient plus à assurer une stase bactérienne (**Remy, 2010**).

I.2.2 Mammite clinique

L'infection se caractérise par l'apparition de signes visibles au niveau du quartier de la mamelle ou même de l'animal. On peut observer une modification de l'aspect du lait par la présence de cailles et de grumeaux, ou même des quartiers rouges, gonflés, chauds, durs ou douloureux et dans les cas les plus sévères, une atteinte de l'état général de l'animal (la fièvre, la déshydratation, la faiblesse et une baisse d'appétit) (**Durel et al., 2003**). Il existe deux types de mammites cliniques : les mammites aiguës et les mammites suraiguës.

Les mammites aiguës se caractérisent les douze premières heures de l'infection par une douleur et une chaleur associée au quartier, puis Vingt-quatre heures après l'entrée des germes, apparaît l'altération du lait et du tissu mammaire : un œdème interstitiel dû aux toxines. On note par ailleurs une hyperthermie modérée autour de 39-39,5°C (**Institut de l'élevage, 2008 ; Remy, 2010**).

Les mammites suraiguës sont rares mais généralement mortelles. Elles apparaissent sans syndrome, et correspondent à une intoxication extrêmement grave suivi d'une nécrose du tissu mammaire. La mamelle est dans un premier temps très rouge, brillante et chaude pour devenir en quelques heures très sombre et froide. On observe à ce moment-là, un tarissement de la sécrétion lactée qui se transforme en pus. On note, par ailleurs, une altération intense et rapide de l'état général avec abattement, perte d'appétit, difficultés motrices, impossibilité de se lever, hyperthermie puis très vite une hypothermie (37,5°C). Le diagnostic devient très réservé, et la mort est possible en 24 à 72 h (**Watrenez, 2014**).

I.3 Causes des infections mammaires

90% des infections mammaires sont Généralement d'origine bactérienne, rarement causées par des champignons, des parasites ou des agents chimiques. Les bactéries des infections mammaires pénètrent obligatoirement par le sphincter du trayon (**Institut de l'élevage, 2008**).

On peut classer les pathogènes bactériens en deux catégories; les pathogènes majeurs comme *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* cette dernière peut provoquer des mammites cliniques aiguës, et les pathogènes mineurs comme *Corynebacterium bovis* et les *staphylococcus* à coagulase négative (SCN) (**Bourachot, 2017**).

Les mammites peuvent être subdivisées en deux grandes catégories: mammites dites «contagieuses» et mammites « environnementales » selon la source de l'infection;

- La principale source de mammite environnementale est le milieu dans lequel vivent les vaches : l'infection mammaire se produit entre les traites à partir des bactéries du sol ou de la litière, pendant que le canal du trayon est encore ouvert.
- La principale source de mammite contagieuse ou mammite dite de « réservoir mammaire » provient des quartiers infectés des vaches présentant déjà une infection mammaire : la transmission se produit pendant la traite, de vache à vache, par l'intermédiaire de l'équipement de traite contaminé ou des mains souillées de l'éleveur

ou du personnel au contact des vaches, ou par l'intermédiaire d'un veau allaitant (Bourachot, 2017 ; Rattez, 2017).

I.4 Mammites à *Staphylococcus aureus*

I.4.1 Caractères bactériologiques de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus ou staphylocoque doré est une coque à Gram positif, anaérobie facultatif, catalase positive, oxydase négative, immobile, associée par groupes en amas (grappe de raisin) ou en chaînes. D'environ 1 µm de diamètre, thermosensible (requiert des températures de croissance comprises entre 6 et 46°C, optimum à 37°C). C'est une bactérie neutrophile (Croissance entre PH 4 et 9,8). Elle possède une coagulase (une enzyme provoquant une coagulation du plasma) (Garry, 2006 ; Yves et Michel, 2010).

Cette souche est capable de produire de nombreuses toxines. Son équipement enzymatique performant assure sa pénétration profonde et son internalisation dans le tissu mammaire (Remy, 2010).

I.4.2 Classification et taxonomie de *Staphylococcus aureus*

Tableau N°01 : Classification de l'espèce *Staphylococcus aureus*
(Delarras et al., 2010)

Domaine	<i>Eubacteria</i>
Phylum	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Staphylococcaceae</i>
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

Généralement ; les espèces du genre *Staphylococcus* sont classées en deux groupes selon leur capacité à produire une coagulase libre : les staphylocoques à coagulase positive (SCP), sont les plus pathogènes en générale et les staphylocoques à coagulase négative (SCN) (Hennekinne, 2009).

I.4.3 Pouvoir pathogène et importance des *Staphylococcus aureus* dans les mammites bovines

Staphylococcus aureus est un agent courant des mammites qui a une capacité de rendre les mammites subcliniques chroniques et persistes durant longues période. La pathogénie des infections mammaires causé par ce pathogène comprend notamment l'intervention de nombreux facteurs de virulence dans la phase d'attachement tels que des toxines, des protéines ou des polysaccharides de surface et certains composants des biofilms, ces derniers contribuent également à l'évasion du système immunitaire, conduisant à l'apparition d'infection persistante car ils permettraient aux germes de résister aux traitements antibiotiques (Wallemacq et al., 2010). Chez les vaches laitières, les mammites à *S. aureus* s'expriment le plus souvent par une élévation du taux de cellules somatiques dans le lait, principalement liée à un afflux des neutrophiles (Van et al., 2001).

Ces mammites ont plusieurs formes, aigue et gangréneuse caractérisées par une anorexie, déshydratation, léthargie, fièvre et signes de toxémie menant parfois à la mort de l'animal. Ainsi que la forme chronique le plus souvent associé par des sécrétions contiennent régulièrement des caillots, des flocons ou des amas de fibrine (Rahmeto et al., 2016).

I.4.4 Implication de la production du biofilm sur les mammites bovines

Les souches de *S. aureus* sont capables de former du biofilms, ces derniers sont des amas structurés de cellules bactériennes enrobés d'une matrice polymérique et attachés à une surface vivante ou inerte. Ils offrent une résistance à la phagocytose par les macrophages, et même une résistance aux antibiotiques qui ont du mal à diffuser et à atteindre leurs cibles (Yannick et al., 2014 ; Ibrahim, 2014).

Le biofilm protège les bactéries et leurs permet de survivre dans des conditions hostiles, il peut se former très rapidement, en quelques heures, cinq phases généralement sont distinguées:

- L'attachement et le transport des cellules vers un substrat, ainsi que la création d'un film de conditionnement.
- L'adhésion réversible puis irréversible des microorganismes à la surface.
- Croissance et division des microorganismes avec le développement de micro-colonies.
- La maturation du biofilm.
- Détachement et dispersion de cellules de biofilm (Goetz et al., 2016 ; Medeiros, 2016).

En outre le biofilm a un rôle très important car il représente un facteur de virulence clé dans la persistance de *Staphylococcus aureus* pendant la mammite par la formation des micro abcès qui provoquent une mammite subclinique et par l'augmentation de la résistance des bactéries contre les antibiotiques grâce à la matrice extracellulaire qui recouvre et protège la communauté(Yannick et al., 2014 ; Goetz et al., 2016).

Chapitre II

Plantes et huiles essentielles

II.1 *Syzygium aromaticum*

II.1.1 Historique

Depuis longtemps, le *Clou de girofle* est utilisé en médecine dentaire pour sa propriété d'anesthésique local (Kozam, 1977; Ohkubo et Shibata, 1997).

Dans les années 206 av. J-C – 220 apr. J-C, les chinois avaient utilisé les clous de girofle pour ses vertus médicinales et culinaires, aussi pour avoir une meilleure haleine (Botnieau, 2010).

II.1.2 Description de la plante

C'est un grand arbre de la famille myrtacées (Bois, 1999).

Un grand arbre fruitier, élancé, de forme conique ou pyramidale avec une hauteur moyenne de 10 à 12 mètres jusqu'à 20 mètres, avec un tronc principal de forme oblique grisâtre (Barbelet, 2015)



Figure N° 01: Allure d'un giroflier (Barbelet, 2015)

Il a des feuilles de 8 à 10 cm de long, son, persistantes, coriaces et opposées, avec un limbe simple de 10 cm de long. Elles sont aromatiques avec une odeur de clous de girofle au froissement, elle a une couleur verte sombre vernissé (Barbelet, 2015).



Figure N°02 : Feuilles jeunes de couleur rose et feuilles matures de couleurs vertes du giroflier (Barbelet, 2015)

Les fleurs sont organisées en cymes de 4 – 5 cm en nombre de 25 fleurs. La corolle contient 4 pétales (blanc - rosé) qui font tourner avec les sépales. Les petits boutons sont appelés les clous de girofle.



Figure N°03: Fleurs de giroflier (Alice, 2011)

Les fruits sont appelés aussi antofles dans le domaine du commerce, sont des baies pour pres comestibles. Ils contiennent une ou des fois deux graines à enveloppe.



Figure N° 04: *Syzygium aromaticum*. Pousse florifère et dessous bouton floral.

A droite : fruit surmonté des restes du calice (Boullard, 2001)



Figure N°05: Clous de girofle (Mahdid et Hamichi, 2018)

II.1.3 Répartition géographique

Syzygium aromaticum se localise d'origine en Indonésie en particulier les Iles Moluques. Puis ils ont commencé à planter en Malaisie, en Inde, Madagascar puis les îles d'Afrique de l'Est de la république, Unie de Tanzanie, de Ceylan et l'Amérique de sud (Koba et al., 2011).

II.1.4 Classification

Tableau N°02: Classification botanique de *Syzygium aromaticum* (Goetz et al., 2012)

Règne	<i>Plante</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Magnoliidae</i>
Ordre	<i>Myrtales</i>
Famille	<i>Myrtaceae</i>
Genre	<i>Syzygium</i>
Espèce	<i>Syzygium aromaticum</i>

II.1.5 Huile essentielle du *Syzygium aromaticum*

Chapitre II Plantes et huiles essentielles

Le giroflier est la source de plusieurs types d'huiles essentielles, d'une différente qualité suivant la partie de la plante utilisée : clous, feuilles, des griffes et des tiges. Elles sont caractérisées par l'eugénol, l'acétate d'eugénol et le B-caryophyllène avec des quantités

différentes avec de couleur jaune à jaune pâle, a une odeur épicée, aromatique et puissante (Rozafimamonjison et al., 2016).

II.1.5.1 Composition chimique

Tableau N°03: Différents constituants de l'huile essentielle du *Syzygium aromaticum* (Goetz et al., 2012)

Composant majoritaire	Eugénol (80 à 90%)
D'autres composants	Acétate d'Eugénol (5 à 10%), alpha et béta Caryophyllène (5 à 12 %) Cétones aliphatiques

II.1.5.2 Propriétés pharmacologiques

L'huile essentielle de clou de girofle à plusieurs utilisations parmi lesquelles, on cite les plus importants.

A. Effets antimicrobiens

L'huile de clou de girofle se caractérise par des propriétés très intéressantes en tant qu'un antibactérien grâce à sa composition en eugénol, en acétate d'eugénol qui démontrent une activité sur nombreuses souches bactériennes : *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *S.aureus* et *Lesteria monocytogenes* prévenant également des propriétés bactéricides sur des bactéries à gram positive que des bactéries à gram négative (Lobstein et al., 2017).

B. Effets antioxydants

Possède une activité antioxydant par l'eugénol qui montre une action protectrice sur la cirrhose hépatique en inhibant la prolifération cellulaire aussi diminue le stress oxydatif. Elle se caractérise aussi comme un agent pour prévenir des métastases liées au stress oxydatif (Lobstein et al., 2017).

II.2 *Cinnamomum zeylanicum*

II.2.1 Historique:

Cinnamomum zeylanicum est d'origine du Sri Lanka et du Sud d'Inde. Depuis plus de 5000 ans, la cannelle fait partie des plus anciennes épices utilisées en médecine grâce à ses propriétés médicinales. Le mot cannelle d'origine latine «*Canna* » signifiant roseau ou tuyau. (Stella, 1998).

La cannelle est parmi les épices mentionnée dans un des plus anciens documents médicaux comme stimulante digestive et antiseptique : le POPYRUS EBERS datant de 1500 Av J.C. (Norman, 1991). Les Égyptiens s'en servaient pour embaumer les cadavres et confectionner des parfums (Dechambre, 1876).

II.2.2 Description de la plante

L'arbre *Cinnamomum zeylanicum* «Cannelier de Ceylan » nommé aussi « Arbre à Cannelle » et « Cinnamon » par les anglophones est un arbre au tronc droit, long de 10 à 15 mètres. L'écorce du tronc est épaisse et dur, d'une couleur verdâtre au début puis devient grisâtre en dehors et brune rougeâtre au-dedans. (JOY, 1998).

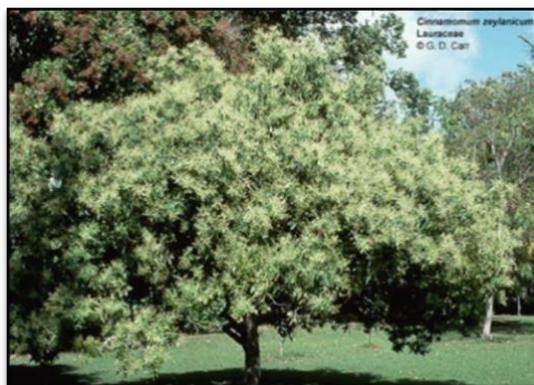


Figure N°06:L'arbre *Cinnamomum zeylanicum* (Fabienne Edet, 2004)

IL possède un feuillage persistant, opposé et coriace, son pétiole strié d'une façon longitudinale mesuré de 1 à 2 cm de long. Le limbe à deux formes est origines de deux sous espèces différentes selon leur provenance: la catégorie où le limbe est ovale, et la catégorie vulgaire ou verum où le limbe est oblongue elliptique. (Evans, 1996).

Les feuilles ont une couleur rouge vermillon à pourpre après devient vert jaune puis verte brillante, lisse et luisante à la maturation complète (Evans, 1996).

La plante a des petites fleurs jaune blanchâtre à jaune pâle de 03 mm, ce sont des fleurs hermaphrodites unisexuées avec une odeur désagréable. Les inflorescences sont en panicules axillaires et terminales (Encyclopédie des plantes Médicinales, 2001).



Figure N°07: Feuilles, fleurs et fruits du cannellier (Garnero, 1984)

II.2.3 Répartition géographique

Loin de ses origines culturelles, cannellier a une source géographique, on retient deux noms (Paris et Moyse, 1967) :

- 1- Cannelle de chine : *Cinnamomum cassia*
- 2- Cannelle de Ceylan : *Cinnamomum zeylanicum*.



Figure N°08: *Cinnamomum zeylanicum* et *Cinnamomum cassia* (Garnero, 1984)

On s'intéresse dans notre étude par la cannelle de Ceylan : *Cinnamomum zeylanicum*. C'est la véritable cannelle vient du Sri Lanka, Accroît dans les régions tropicales de Ceylan, de l'Inde orientale, Madagascar jusqu'à 500 mètres d'altitude. Elle est cultivée de manière intensive ou le maintien à l'état sous-arbrisseau buissonneux de moins de 2 mètres.

(Joy et al., 1998).

On la multiplie par bouturage tous les deux ans, à la saison des pluies, on taille les arbrisseaux au ras du sol (Encyclopédie des Plantes Médicinales, 2001).



Figure N°09: Situation géographique du Sri Lanka (Ceylan) (Garnero, 1984)

II.2.4 Classification

Le nom du Cannelier de Ceylan vient du grec « kinnamômou » qui désigne cette Lauracée aromatique, « Kinein » signifiant enroulé, et « Zeylanicum » désignant son origine de Ceylan.

Tableau N°04: Classification botanique de *Cinnamomum zeylanicum*
(Mascre et Deysson, 1951)

Règne	Plante
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Magnoliidae</i>
Ordre	<i>Lurales</i>
Famille	<i>Lauraceae</i>
Genre	<i>Cinnamomum</i>
Espèce	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>

II.2.5 Huile essentielle du *Cinnamomum zeylanicum*

II.2.5.1 Composition chimique

Tableau N°05: Différents constituants de l'huile essentielle du *Cinnamomum zeylanicum*
(Pharmacopée européenne, 2011)

Composant majoritaire	l'aldéhyde cinnamique (cinnamaldéhyde) (jusqu'à 75 %)
D'autres composants	l'eugénol (jusqu'à 7,5 %) le β -caryophyllène (1 à 4%) L'acétate de cinnamyle (1 à 8 %) Linalol (1 à 6 %) 1,8-cinéole (3 % maximum) Benzoate de benzyle (maximum 1 %) Coumarine et Safrole (maximum 0,5 %)

Dans la *Cinnamomum zeylanicum* (cannelle de Ceylan), les principales substances actives dépendent de la partie de la plante utilisée. Nous trouvons (**Germann et Germann, 2014**):

- Pour l'huile essentielle de feuille de cannelier : les phénols (l'eugénol à 70-85%)
- Pour l'huile essentielle d'écorce de cannelier : les aldéhydes aromatiques (le transcinnamaldéhyde à 45-97%) (**Bruneton, 2009 ; Unlu et al., 2010**).

II.2.5.1 Caractères et constantes physico-chimiques

Selon la Pharmacopée européenne, 2011 L'huile essentielle de cannelle de Ceylan est un liquide mobile, limpide, d'odeur caractéristique rappelant celle de l'aldéhyde cinnamique, entraînable à la vapeur d'eau, de couleur jaune clair fraîchement distillé et prenant une coloration rouge plus ou moins foncée en fonction du vieillissement. L'huile essentielle d'écorce de cannelle de Ceylan présente un taux d'aldéhyde cinnamique compris entre 65-80% et 5 à 10% d'eugénol (**Garnero, 1984**)

Les spécifications de l'huile essentielle de *Cinnamomum zeylanicum* sont: densité à 20°C:
1,000 - 1,030

- Indice de réfraction à 20°C : 1,572 - 1,591
- Pouvoir rotatoire à 20°C : -2° à + 1°

- Indice d'acide (mg/g) : inférieur à 20

- Indice de peroxyde (mEqO₂/Kg): inférieur à 80 (**Pharmacopée européenne, 2011**).

II.2.5.2 Activités biologiques

La cannelle de Ceylan est utilisée depuis longtemps dans la médecine grâce à ses propriétés thérapeutiques. Ces utilisations permettaient aux chercheurs scientifiques de mettre en évidence les propriétés biologiques de la cannelle. Les deux espèces ont des propriétés très semblables, la cannelle de Chine étant considérée comme le succédané de la cannelle de Ceylan (**Fabienne, 2004**).

La recherche sur la cannelle se fait entre 1972 et 1982 fait un bond important avec l'équipe de Harada au Japon qu'ils ont publié 5 articles sur les propriétés pharmacologiques de la cannelle de Chine. Ces propriétés pharmacologiques sont les mêmes que la cannelle de Ceylan, puisque le composant majoritaire de la cannelle de Chine est également présent chez la cannelle de Ceylan c'est l'aldéhyde cinnamique (**Harada et Ozaki, 1972**).

Parmi ces activités: Activités qui agissent sur le système nerveux, le système cardiovasculaire, Activité antispasmodique, Activité anti-infectieuse Activité antifongique, Activité insulinique, Activité antioxydante et Activité anti-tumorale (**Fabienne, 2004**).

Dans notre étude on s'intéresse par activité anti-infectieuse et antioxydante.

- Pouvoir antimicrobien.
- L'effet antimicrobien d'huile essentielle est utilisé depuis l'Antiquité (**Juvan et al., 1994**). Cette action est due principalement l'eugénol et le cinnamaldéhyde. Les huiles essentielles riches de ces molécules ont le plus fort pouvoir antimicrobien. (**Delaquis, 2002**).

II.2.5.3 Pouvoir antioxydant

Dans les années 90, des chercheurs étudient le pouvoir antioxydant de la cannelle de Ceylan. La cannelle de Ceylan a un pouvoir super-oxyde dismutase « like ». Le radical super-oxyde O₂ est pu engendrer des processus d'oxydations pathogènes : l'inflammation, la mutagénicité, la carcinogénicité aussi dans les maladies neuro dégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Pour surmonter ce pouvoir oxydatif, il existe une enzyme, le super-oxyde dismutase (SOD) qui est capable de combattre ce radical libre (**Fabienne, 2004**)

II.2.5.4 Effets toxiques et allergisants

La cannelle, sous forme de poudre, est un produit irritant. En effet, les huiles essentielles contiennent d'aldéhydes et phénols aromatiques, comme celle de Ceylan, sont également connues pour être les plus irritantes. Une expérience réalisée à Ceylan (**Uragoda, 1984**) sur des travailleurs qui sont exposés à la poussière de cannelle, montre que la cannelle provoque une augmentation des crises d'asthme, d'irritations cutanées et de douleurs oculaires dans cette population et peuvent aussi provoquer une réaction d'hypersensibilité. Une étude réalisée en 2009 étudié l'objectif de recenser les cas de dermatite de contact allergique à la cannelle d'origine professionnelle (**Barbier, 2014**). La dermatite de contact des mains, du visage et du cou est la plus courante. Elle s'aggrave au contact de l'air. Ce sont d'allergies liées à la manipulation de bâtons de cannelle utilisés comme épices (**Pecquet, 2007**).



Figure N°10:Bâtons et poudre d'écorce de *Cinnamomum zeylanicum* (**Garnero, 1984**)

II. 3 Les huiles essentielles

II.3.1 Définition

Une huile essentielle « essence » ou « huile volatil ». C'est un produit parfumé et volatil, contient de molécules secrétées par certains arbre et plantes qui donne un parfumes spécifiques (**Chouitah, 2012**). Le terme "volatil" va s'expliquer par le fait que les huiles essentielles se sont évaporées très rapidement, c'est pour cela il est important de les conserver correctement pour garder leurs principes actifs (**Nadia, 2015**). Ce sont des mixtures composés naturels de métabolites secondaires volatils, lipophiles et souvent liquides, extraites à partir de plantes par le mécanisme d'extraction soit à la vapeur ou hydrodistillation et par expression à froid (**Laib, 2011; Guinoiseau et al., 2015**).

II.3.2 Mode d'extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont extraites avec plusieurs méthodes à partir de plusieurs parties de la plante, parmi lesquelles l'hydrodistillation et la distillation à basse ou à haute pression, extraction par solvants, expression à froid, fermentation ou enfleurage, telles que des méthodes qui impliquent l'utilisation de dioxyde de carbone liquide ou des micro-ondes (**Bakkali et al., 2008; Carson et Hammer, 2011 ; Shaaban et al., 2012**). Le choix de la technique d'extraction est en fonction avec la composition chimique d'une huile essentielle (**Masotti et al., 2003 ; Angioni et al, 2006**), et aussi en fonction avec l'utilisation d'huile essentielle (**Bakkali et al., 2008**).

II.3.3 Localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles, elles ne sont pas universellement synthétisées chez toutes les plantes, ne se trouvent que dans les végétaux supérieurs (**Chouitah, 2012**). Elles sont formées dans des cellules glandulaires et couvertes d'une cuticule (**Laib, 2011**).Elles sont réservées dans des cellules secrétaires spécialisées, des cavités, des canaux d'huile et des résines, des cellules épidermiques ou des trichomes glandulaires (**Carson et Hommo, 2011**).

II.3.4 Rôle des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont fréquemment représentées comme des métabolites secondaires des plantes (**Bakhaled et al., 2008**). Nouvellement une avantage aux métabolites secondaires a accédé de montrer que ces composés ont joué un rôle de défense chez les plantes (**Mclaskill et Croteau, 1998 ; Gershenzon et Dudareva, 2007**), permettre aussi de s'échapper

des risques de microorganismes et insectes (**Andrade et al., 2014**), en jouant le rôle d'un antibactérien, antifongique, antiviral (**Bakkali et al., 2008**).

II.3.5 Propriétés physiques et chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles ne sont pas des simples composées ou mixtures de quelques composants (**Carson et Hammer, 2011**), c'est un complexe qui contient plus de 60 composés (**Senatore, 1996; Russo et al., 1998**).

Les huiles essentielles contiennent des composés d'une variété de classes chimiques, spécialement les terpènes, contiennent aussi les phénylpropanoïdes et autres composés différents (**Carson et Hammer, 2011**). Il appartient de groupe des hydrocarbures et leurs dérivés oxygénés, renferment l'azote ou le soufre, avec un faible poids moléculaires et peu soluble dans l'eau (**Weidenhamer et al., 1993 ; Griffin et al., 1992**).

Les huiles essentielles sont volatils, elles sont rarement colorés, elles ont une densité fréquemment inférieure à celle de l'eau, d'une odeur forte et caractéristique (**Burt, 2004; Bakkali et al., 2008**), peu soluble dans l'eau, mais solubles dans les graisses, alcools, solvants organiques et autres substances (**Carson et Hammer, 2011**). Elles ont une forme liquide à température ambiante (**Jean, 2009**).

II.3.6 Activités des huiles essentielle

II.3.6.1. Activité antibactérienne

Les huiles essentielles ont un effet antibactérien sur les deux groupes de bactéries gram-positif et gram-négatif, qui affichent une importante sensibilité *in vitro* (**Carson et Hammer, 2011**). Les techniques exploitées pour estimer cette activité sont communément des techniques de diffusion, dilution ou de bio autographie (**Rios et al., 1988**). La technique de diffusion est souvent celles de puits ou de disques, alors que les méthodes de dilution au milieu liquide ou solide aident à définir les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (**Kalembe et kunicka, 2003; Burt, 2004 ; Lahlou, 2004; Wilkinson, 2006**). Plusieurs expériences montrent le pouvoir antibactérien contre un large spectre de souches bactériennes, telles que *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* (**Hulin et al., 1998**).

II.3.6.2 Activité Antifongique

Les composants des huiles essentielles ont aussi une activité contre les champignons. Un géant éventail de pathogènes fongiques humains, animaux et agricoles ont décrit une importante sensibilité aux huiles essentielles in vitro. Ce qui augmente l'intérêt pour leur utility thérapeutique ou industrielle, les pathogènes les plus visés, les levures du genre candida et les dermatophytes comme Epidermophyton, Microsporum et Trichophyton qui suscitent le plus grand intérêt (**Hammer et al., 1996; Hammer et al., 1999; Yu et al., 2004; Preuss et al., 2005**). Les huiles essentielles contiennent des composants responsables de l'activité antifongique parmi eux : c'est le carvacrol et le thymol qui ont établi une action sur des espèces fongiques responsables de l'altération des aliments telles qu'*Aspergillus Niger* et *Aspergillus parasiticus* (**Razzagi-Abyauche et al., 2002**).

II.3.6.3 Activité antioxydante

L'activité antioxydant est le sujet le plus étudié dans la recherche sur les huiles essentielles, après des dommages engendrés par les réactions d'oxydation sur l'ensemble de substances biologiques, qui provoquent plusieurs maladies, celle-ci: les maladies de foie, cancer, inflammation, diabète, l'athérosclérose et le SIDA (**Shaaban et al., 2012**).

Parmi les composants responsable de l'activité antioxydant sont les terpènes et terpénoïdes y compris: α -terpinène, β -terpinène et β -terpinolène, 1;8-cinéole; menthone et isomenthone (**Elmassry et Elgharab, 2006**).

II.3.7 Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont décrites comme produits sans danger, mais les derniers sont des substances puissantes (**Bouguerra, 2012**). A cause de leur composition chimique complexe. Elles sont utilisées avec précautions et prudence, puisque elles causent de grave dégâts de santé lorsqu'une application aléatoire (**Benzeggouta, 2005**)

Les effets nocifs des huiles essentielles changement en fonction de leur nature chimiques (**Traoré, 2006**), quelques-uns sont toxiques par voie cutanée à cause de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol) (**Smith et al., 2000**), photo toxiques (huiles de citrus contenant des Furocoumarines (**Naganuma et al., 1985**), d'autres l'huiles ont un effet neurotoxiques, qui sont riches en cétones comme l'a Thujone (**Franchoume et al., 1990**).

Chapitre III

Traitement alternatif des mammites bovines

III.1 Différents traitements alternatifs pour les mammites bovines

III.1.1 Homéopathie

Le principe de l'homéopathie repose sur les trois grands principes qui sont : similitude, infinitésimalité et globalité. Le principe de similitude repose sur la loi des semblables, contrairement à l'allopathie qui repose sur la loi des contraires. Pour le principe d'infinitésimalité, selon **Hahnemann**, les doses administrées doivent être plus faibles que les doses expérimentales pour obtenir les mêmes effets sans les aggravations. Enfin, le principe de globalité implique la prise en compte du malade dans son ensemble, avec sa constitution, ses diathèses, son environnement et sa capacité réactionnelle (**Maillot, 2013**).

III.1.2 Isothérapie

Un isothérapique est un produit non chimiquement défini (sécrétions, excréctions pathologiques ou non, produits d'origine microbienne) préparé extemporanément à partir d'une souche fournie par la vache elle-même (**Maillot, 2013**).

III.1.3 Phytothérapie

La phytothérapie, du mot grec « *phyton* » plante et « *therapeia* » traitement. Elle correspond à l'utilisation en nature ou sous formes galéniques peu élaborées, de plantes médicinales pour traiter une pathologie (**Christophe, 2014**).

III.1.4 Aromathérapie

C'est l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles extraites des plantes médicinales aromatiques qui mettent les arômes et les bienfaits des plantes au service de la santé et la beauté. Elle est classée comme une branche de la phytothérapie. Le mot aromathérapie vient du grec « *aroma* » arôme et « *therapeia* » soin, cure (**Colette, 2007 ; Labre, 2012**).

Dans la présente étude on s'intéresse à l'aromathérapie, les huiles essentielles et leurs effets sur les mammites bovines ce qui nous amène à chercher leurs voies d'administration et les essais réalisés sur le terrain.

III.2 Voies d'administration

On peut citer plusieurs voies d'administration ; la voie orale, la voie rectale, la voie cutanée, la voie génitale, la voie diathélique (l'injection des huiles essentielles directement dans la mamelle) ou la voie respiratoire (**Franchomme, 2001**).

Chez la vache laitière, les principales voies d'administration des huiles essentielles utilisées sont les voies orale et cutanée. Les huiles essentielles peuvent être incorporées directement dans les blocs à lécher du troupeau, ou diluées dans une huile végétale que l'on disperse ensuite sur la ration.

Pour la voie cutanée, deux types d'applications existent en fonction de l'huile végétale choisie comme véhicule. Si l'action recherchée est une action locale, le mélange d'huiles essentielles sera appliqué directement sur la zone à traiter, en massage. Mais si on vise une action systémique, il est alors intéressant d'appliquer le mélange d'huiles essentielles en pour-on, sur le dos de la vache. Notons que la voie intramammaire est également utilisable, et particulièrement intéressante pour traiter les mammites. Les huiles essentielles diluées dans une huile végétale sont alors administrées dans le canal du trayon grâce à une seringue intramammaire (**Lesot, 2006**).

III.3 Essais sur terrain

Dès les années 2000, plusieurs essais de terrain ont été réalisés concernant l'utilisation des huiles essentielles pour le traitement des mammites.

En 2001, une première thèse a évalué l'efficacité d'un traitement intramammaire à base d'HE de *Thym vulgaire* à linalol. Différents protocoles ont été effectués. Le protocole consistait à réaliser 5 injections intramammaires à 12 heures d'intervalle et la sixième 24 heures plus tard.

Le taux de guérison bactériologique était de 16%. Or la valeur de guérison spontanée présentée dans la bibliographie se situe autour de 25%. Les résultats de cet essai sont donc peu satisfaisants in vivo (**Debert, 2001**).

En 2002, Philippe Labre a présenté les résultats de l'essai « *Aromavet* ». Les formules élaborées avec un mélange de plusieurs HE pour le traitement des mammites aiguës ou chroniques par voie intramammaire ont donné des résultats défavorables (**Labre et Chaduc, 2002**).

Chapitre III Traitement alternatif des mammites bovines

En 2006, une nouvelle thèse a évalué l'efficacité d'un traitement intramammaire à base d'un mélange de 3 huiles essentielles sur les mammites cliniques. La préparation était composée de 1,5% de *Thym satureioides*, 1,5% de Laurier noble et de 1,5% de Romarin officinal à verbénone soit 7 gouttes de chaque dans 10 ml d'huile officinale de tournesol. Deux protocoles ont été proposés : 4 ou 6 injections toutes les 12 heures. Une guérison clinique à 48 heures a été observée dans 35% des cas et une amélioration clinique dans 31 % des cas. Au final, la guérison clinique était de 44%. Selon une enquête réalisée auprès d'éleveurs utilisateurs de traitements d'aromathérapie, 75% d'entre eux sont satisfaits pour le traitement des mammites (**Masson, 2006**).

Suite à ce travail, un nouveau protocole a été établi en 2007. Le mélange était limité à 2 HE, le *Thym vulgaire* et le *Romarin* officinal à verbénone à une concentration de 6% chacune dans de l'huile de tournesol ou dans une solution aqueuse. Ce mélange était administré par voie intramammaire. In vitro, les résultats obtenus sont encourageant. In vivo, la guérison clinique avoisinait les 40% et la guérison bactériologique observée était de 65%. Les résultats étaient toujours peu satisfaisants par rapport à l'étude précédente de 2006 (**Lefevre et al., 2008**).

En 2008, un nouveau mélange a été proposé avec 10% d'HE de *Thym* et 5% d'HE de Romarin incorporé à un nouvel excipient, le solubol à place de l'huile végétale. La guérison clinique était de 33%. Ce résultat n'était pas satisfaisant par rapport aux précédents de l'essai de 2007 (**Lefevre, 2009**).

En 2009, Les HE de Sarriette des montagnes, de Ravinsara, de *Thym* à linalol et d'Arbre à thé concentrées à 10% en solubol ont été testées contre *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* et *S.aureus*. Leur efficacité a été évaluée sur milieu gélosée et sur deux milieux lactés (lait UHT et lait cru). La croissance bactérienne est bien inhibée dans le milieu gélosé mais ne l'est absolument pas dans les deux milieux lactés. Ainsi l'utilisation d'injections intramammaires d'HE pour le traitement des mammites est vouée à l'échec dans l'état des connaissances actuelles. Il est donc préférable de changer de voie d'administration (**Lefevre, 2009**).

Suite à ses travaux sur les aromatogrammes, l'Adage 35 a réalisé des essais de terrain entre 2009 et 2010. Les traitements étaient appliqués par voie externe, c'est-à-dire par massage du quartier. Les guérisons étaient évaluées selon la satisfaction des éleveurs lorsqu'ils considéraient que la mammite était guérie cliniquement. Trois mélanges ont été testés sur une durée de 7 jours. Le mélange A était constitué d'HE de *Bois de rose*, de *Thym satureioides* à

bornéol et de romarin officinal à verbénone. Le mélange A2 était constitué d'HE d'Eucalyptus citronné, de *Thym satureioides* à bornéol et de *romarin officinal* à verbénone. Le mélange B était constitué d'HE de *Laurier noble*, de *Palmarosa* et d'Arbre à thé. La guérison clinique était aux

Chapitre III Traitement alternatif des mammites bovines

alentours de 70% pour le mélange A2. Le mélange B a donné des résultats variables allant de 33 à 83% de guérison clinique. Le mélange A était constitué d'HE de Bois de rose, de Thym satureioïdes à bornéol et de romarin officinal à verbénone. Le mélange A2 était constitué d'HE d'*Eucalyptus citronné*, de *Thym satureioïdes* à bornéol et de *romarin officinal* à verbénone.

Le mélange B était constitué d'HE de *Laurier noble*, de *Palmarosa* et d'Arbre à thé. La guérison clinique était aux alentours de 70% pour le mélange A2. Le mélange B a donné des résultats variables allant de 33 à 83% de guérison clinique. Le mélange A a donné des résultats très variable de 22% à 100% de guérison clinique. Un autre mélange constitué d'HE de *Litsée citronnée*, de *Thym vulgaire* à thymol et de Manuka a été testé. Ce dernier mélange a donné 90% de guérison clinique pour les mammites cliniques.

L'expérience des éleveurs et la vitesse de détection des mammites sont un gage de réussite et de guérison clinique rapide des mammites. Ces résultats ne sont pas validés scientifiquement et 94 statistiquement mais donnent de bonnes bases pour élaborer de nouvelles études (**Mathilde, 2009**). Ces résultats sont interprétables de manière qualitative et donnent une tendance favorable à l'utilisation de traitements aromatiques par voie transcutanée pour les mammites cliniques. D'autres essais seront nécessaires pour valider les résultats statistiquement.

En 2012, une thèse vétérinaire a présenté les résultats d'un essai de traitement transcutané des mammites à l'aide d'une préparation à base d'HE d'*Eucalyptus citronné*, de Menthe poivrée et de thym satureioïdes. Chacune des HE a été incorporée à un volume de 2,5 ml dans 50 grammes d'excipient, le carbopol® 2%. La guérison bactériologique était définie par l'absence à J21 de l'agent pathogène isolé à J0. Les taux de guérison bactériologique tous germes confondus (*Staphylococcus aureus*, SCN, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium bovis*, *Escherichia coli* et *Klebsiella spp.* Principalement) étaient de 30,2% pour les mammites subcliniques et de 37,2% pour les mammites cliniques. Il est à noter que ces taux sont proches de ceux d'une guérison spontanée. Quant au taux de guérison clinique tous cas confondus, ils ont atteint 87,2% à J5. Les résultats sont décevants quant à l'utilisation d'HE par voie intramammaire. Le massage aromatique du quartier atteint est une alternative intéressante et à approfondir. Cliniquement, le taux de guérison est satisfaisant (**Harlet, 2012 ; Leperlier et al., 2013**).

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

IV.1 Matériel et méthodes

IV.1.1 Objectif du travail

L'Objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de l'huiles essentielles de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*; HESA), Cannelier de Ceylan (*Cinnamomum zeylanicum*; HECZ), et leurs principaux composés, à savoir l'eugénol et le cinnamaldéhyde, vis-à-vis de la formation de biofilms, l'acier inoxydable et le polystyrène par des isolats de *Staphylococcus aureus* isolés à partir de le lait des vaches atteintes une mammite subclinique.

IV.1.2 Matériel et produits

IV.1.2.1 Matériel

➤ Matériel végétal

Les plantes utilisées dans ce travail se trouvent sur le marché tout au long de l'année, pour leur importance majeure et leur usage quotidien dans la cuisine. Elles ont été achetées sous forme séchée.

- Le clou de girofle «*Eugenia caryophyllus* = *Syzygium aromaticum*»
- La cannelle « Cannelier de Ceylan » «*Cinnamomum zeylanicum* = *Cinnamomum verum* »

➤ Matériel biologique

✓ Souches cliniques

Les souches utilisées sont des 64 souches appartenant au genre *Staphylococcus aureus*, qui été isolés à partir du lait de vaches atteintes de mammite subclinique comme décrit par **Koneman et al.(2008)**.

✓ Souches ATCC

- La souche ATCC (American Type Culture Collection) de *Staphylococcus aureus* numéro 35983a été utilisée comme contrôle positif (producteur de biofilm).
- La souche ATCC de *Staphylococcus epidermidis* numéro 12228 à été utilisée comme contrôle négatif pour la production de biofilm (**Vasudevan et al. 2003**).

IV.1.2.2 Matériel de laboratoire

Le matériel utilisé dans cette étude est présenté dans le tableau suivant:

Tableau N°06:Matériel de laboratoire.

Appareillage, Verreries et instruments	Produits et réactifs	Milieus de culture
Incubateur Densitomètre Spectre de masse kit Mini spin Boîtes de pétri Micropipette Pipettes de pasteur Ecouvillon Lame Tube hémolyse	HcL H ₂ O ₂ «proxy de hydrogène » Chlorure de magnésium Cristal violet Acide acétique glacial Colorant Résazurine	Gel d'agarose Gélose ADNase Milieu de Chapman Bouillon cœur cervelle

IV.1.3 Protocole expérimental

Le protocole expérimental utilisé dans cette étude est représenté comme suit:

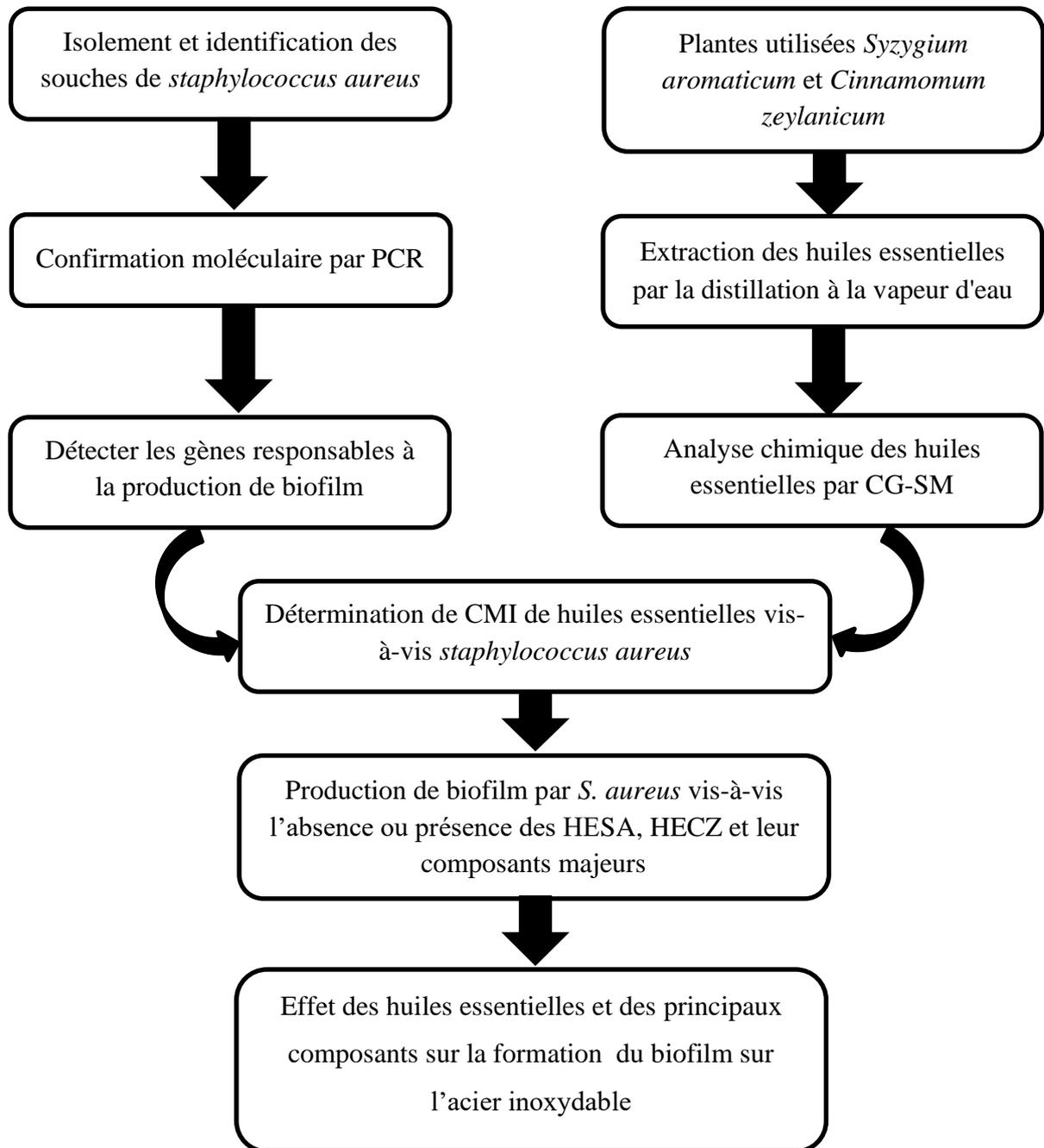


Figure N°11: Protocole expérimentale

IV.1.4 Prélèvements du lait mammitieux

Un échantillon de lait d'environ 5 ml est prélevé à partir de chaque quartier présentant une réaction positive au CMT.

Il faudrait accorder une grande importance au respect des règles d'asepsie et d'antisepsie au cours de la réalisation de ces prélèvements à cause de l'ubiquité des microorganismes pouvant influencer le diagnostic.

En effet, pour limiter au maximum la contamination des prélèvements de lait, une double désinfection du trayon est réalisée avant de procéder au prélèvement des échantillons. Les échantillons de lait sont collectés selon les recommandations de la National Mastitis Council (Hogan et al., 1999) :

1. Elimination des premiers jets dans un bol à fond noir et examen visuel du lait.
2. Lavage de la mamelle avec l'eau et élimination des particules d'excréments.
3. Essuyage avec une éponge propre.
4. Désinfection des trayons en les trempant dans une solution désinfectante à l'aide d'un gobelet Twin-dipper de trempage anti-retour en recouvrant toute la surface du trayon pour une efficacité maximale.
5. Essuyage avec du papier absorbant.
6. Désinfection de l'extrémité du trayon à l'aide d'alcool, puis essuyage avec une compresse stérile.
7. La récolte du lait se fait en orientant le trayon horizontalement. Le flacon est maintenu incliné 45° pour éviter de le contaminer avec les salissures de la mamelle.
8. Marquage et identification du flacon (numéro de la vache, quartier).
9. Les tubes du lait ont été transportés dans une glacière à une température de 4-8°C jusqu'au laboratoire.

IV.1.5 Identification des souches bactériennes

L'identification présomptive a été effectuée par Coloration de Gram « Examen microscopique » et selon **Koneman et al. (2008)**; la confirmation supplémentaire a été faite par les tests biochimiques basés sur la production de catalase, d'ADNase et de coagulase.

- **Test de la catalase**

A partir d'une jeune culture de 18-24h, on prélève une colonie, puis on la place sur une lame stérile. On fait réagir la colonie avec une goutte de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂); (**Garnier et Denis, 2007**). Une réaction positive se traduit par le dégagement de bulles de gaz (oxygène).

- **Test d'ADNase**

À partir d'une jeune culture de 18-24h on passe un écouvillon stérile afin de prélever une quantité importante de bactéries. Puis on ensemence ces dernières sur une gélose ADNase en une seule strie au milieu de la boîte.

Après une incubation de 24h à 37°C, la lecture est faite par l'ajout d'un volume considérable de HcL dilué 1N à la surface de la gélose. On élimine l'excès de la solution, et la lecture se fait 10 à 15 min après le contact entre l'HcL et la surface de la gélose par l'apparition d'une zone claire autour de la strie ce qui se traduit par hydrolyse de l'ADN et son utilisation comme source de carbone et d'énergie pour la croissance bactérienne. Sa mise en évidence permet seule, d'affirmer la présence de *Staphylococcus aureus* (**Kateete, et al., 2010**).

- **Test de la coagulase**

Ce test permet de mettre en évidence le pouvoir des *Staphylococcus sp* à produire ou pas une enzyme appelée la coagulase. Cette enzyme est capable de coaguler le plasma de lapin (**Sperber et al., 1975**).

Pour réaliser ce test, on incube une colonie prélevée à partir du milieu culture Chapman dans 5 ml de milieu de culture cœur cerveau BHIB à 37°C, pendant 24 heures. Dans un tube à hémolyse stérile, 0,5 ml de plasma citraté et 0,5 ml de la culture de BHIB sont mélangés, puis incubés à 37°C. Une lecture doit être effectuée après 4 heures ensuite après 18h. S'il y a formation d'un coagulat, la souche est qualifiée comme étant *Staphylococcus aureus* (**Sperber, et al., 1975**).

La confirmation moléculaire a été effectuée par amplification par PCR du gène de nucléase staphylococcique spécifique à l'espèce (*nuc*) en utilisant des amorces et des conditions de PCR comme indiqué dans le **tableau 7**.

IV.1.6 PCR pour détecter les gènes liés à la production de biofilm

L'extraction de l'ADN a été effectuée à l'aide du kit Mini spin (GE Health care, Little Chafont, Buckinghamshire, Royaume-Uni) selon les instructions du fabricant. Les réactions PCR ont été réalisées avec chaque paire d'amorces dans un volume final de 25 µL contenant 2,5µL de 10×tampon PCR, 2,0 mm de chlorure de magnésium, 200 mm de désoxynucléotides, 1U d'ADN polymérase Taq (Fermentas, St. Leon Rot, Allemagne), 10 pmol de chaque amorce et 3 µL de la matrice d'ADN.

Les amorces utilisées pour la détection d'*icaA*, *icaD* et *bap* et leurs accessoires Les propriétés sont répertoriées dans le tableau 07. Les conditions de PCR étaient ceux décrits dans les références fournies (Tableau 07) avec des réactions effectuées dans un système de PCR Gene AMP 9700 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA).

Les PCR produits ont été détectés en utilisant un gel d'agarose à 1,5% dans Tris- tampon acide borique-EDTA et développé avec Sybr Green (Invitrogen, Grand Island, NY). Positif et négatif les témoins pour *icaA* et *icaD* étaient *S. aureus* ATCC 35983 et *S. epidermidis* ATCC 12.228. Pour *bap*, une souche positive et séquencée a été utilisée.

Tableau N°07: Oligonucléotides utilisés dans la détection des gènes du biofilm et la confirmation de l'identification des souches de *Staphylococcus aureus* isolées à partir de lait de vaches atteintes de mammite subclinique

Gene	Amorce	Séquence	Taille de l'amplicons (Pb)	Température de recuit (°C)	Référence
<i>bap</i>	bap-F bap-R	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTG GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	971	65	Cucarella et al., 2001
<i>icaA</i>	<i>icaA</i> -F <i>icaA</i> -R	CCTAACTAACGAAGGTAG AAGATATAGCGATAAGTGC	1,315	49.5	Vaseduvan et al., 2003
<i>icaD</i>	<i>icaD</i> -F <i>icaD</i> -R	AAACGTAAGAGAGGTGG GGCAATATGATCAAGATAC	381	50	Vaseduvan et al., 2003
<i>nuc</i>	nuc-F nuc-R	CGTAAATGCACTTGCTTCAGG TCAGCAAATGCATCACAAACAG	257	55	AR (Community Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance)

IV.1.7 Caractérisations phénotypique des souches productrices de biofilm

La caractérisation phénotypique de la production de biofilm par production de slime est réalisée par culture des isolats sur un milieu solide additionné du colorant le Rouge Congo.

La méthode RCA (Rouge Congo Agar) permet l'analyse directe et visuelle des colonies et l'identification des souches productrices de slime (qui donnent des colonies noires sur la gélose rouge) et des souches non productrices (qui donnent des colonies de couleur rouge). De ce fait, cette méthode ne permet pas un dosage quantitatif de biofilm puisqu'elle est basée seulement sur un changement de couleur de rouge Congo qui va interagir directement avec certains polysaccharides bactériens formant un slime (**Freeman et al., 1989**).

IV.1.8 Extraction des huiles essentielles et analyse chimique par CG-SM

Les huiles essentielles *Syzygium aromaticum* et *Cinnamomum zeylanicum* ont été extraits de *Syzygium aromaticum* et Cannelier de Ceylan par glissement distillateur à vapeur (modèle MA480, Marconi, Piracicaba, Brésil).

La distillation à la vapeur d'eau est la méthode d'extraction ancestrale des huiles essentielles. C'est également la meilleure méthode pour obtenir une huile essentielle de qualité. En effet, c'est la seule méthode préconisée par la pharmacopée française, car elle minimise les altérations hydrolytiques. Dans le cas du clou de girofle et la Cannelier de Ceylan, l'extraction est solide-liquide. C'est à dire que la matière végétale sous forme solide est mise en contact avec de la vapeur d'eau. La technique la plus répandue, est l'entraînement à la vapeur d'eau, réalisée sous basse pression, appelée hydrodistillation ou distillation à la vapeur d'eau.

Elle consiste à faire traverser par de la vapeur d'eau, une cuve (**Figure N°12**) remplie de plantes aromatiques (*Syzygium aromaticum* et *Cinnamomum zeylanicum*). Cette vapeur va se charger au passage en huiles essentielles (insolubles dans l'eau mais solubles dans la vapeur). Ce mélange huile-vapeur d'eau traverse ensuite un serpentín réfrigérant (circuit d'eau froide) puis redevient liquide ; les huiles s'en désolidarisent et sont récupérées par décantation dans l'essencier grâce à la différence de densité des deux liquides (**Lamassiaude-Peyramaure, 2008**).

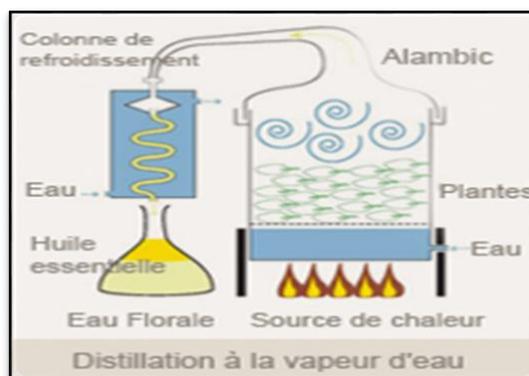


Figure N°12: Schéma représentatif du principe d'extraction par distillation à valeur d'eau (https://fr.wikipedia.org/wiki/Huile_essentielle)

La plante est mise dans un ballon en verre pyrex (50 grammes de matière végétale), additionnées de 600 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition, lors de l'apparition de la première goutte du distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur (30 minutes à 1 heure) l'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par un condensateur, fixé par un support approprié en position horizontale inclinée légèrement pour faciliter l'écoulement du distillat. Le temps de cette extraction est d'environ 2 heures. Le distillat obtenu est récupéré dans une ampoule à décantation. Le mélange est laissé au repos quelques minutes. En fin l'huile essentielle est séparée du distillat par décantation puis récupérée dans un flacon appropriée et pesé pour le calcul du rendement.

Le rendement est calculé selon la norme **AFNOR, (1986)** : le rendement en huile essentielle (Rd), est défini Comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M).

Il est donné par la formule suivante :

$$\mathbf{Rd = M' / M \cdot 100}$$

Rd: Rendement en huile essentielle exprimée en pourcentage (%).

M': Masse de l'huile essentielle obtenue en gramme (g).

M: Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme (g).

Les densités ont été calculées selon **Fonseca et Librand, (2008)**. Les principaux composés du HESA et HECZ, eugénol et cinnamaldéhyde, étaient d'origine commerciale (Sigma-Aldrich, St. Louis. MO). La caractérisation chimique a été déterminée par le gaz chromatographie couplée à CG SM (modèle QP5050A, Shimadzu, Kyoto, Japon) avec l'utilisation d'une CBP-5 colonne capillaire d'un diamètre interne de 0,25 mm et une épaisseur de

film de 0,25 µm. Les conditions ont été fixées en fonction de l'HE analysé. Tous les deux HESA et HECZ ont été identifiés en faisant correspondre leurs spectres de masse aux composés de référence dans le Spectre de masse de l'Institut des normes et de la technologie bibliothèque (Gaithersburg, MD).

L'identification des composants des huiles essentielles est réalisée par chromatographie en phase gazeuse grâce à un chromatographe équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG SM). Les analyses de la composition chimique des deux huiles essentielles effectuées par un laboratoire privé (*Sarl Pyrenessences Analyse, France*).

IV.1.9 Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Selon **CLSI (2009)**. Les tests de sensibilité ont été réalisés en triple pour les huiles essentielles HESA, HECZ et leurs principaux composants en utilisant la méthode de micro dilution en bouillon et les directives. Brièvement, des inoculum de *Staphylococcus aureus* ont été préparés à la densité de 0,5 McFarland en utilisant un densitomètre (Densichek, Bio Mérieux, Durham, NC) dans une solution saline à 0,85%.

Les inoculum ont été ensuite dilués à une concentration approximative de 10^5 ufc / ml et incubés avec des composés d'essai à des concentrations de 0,025, 0,04, 0,06, 0,08, 0,10, 0,20, 0,40, et 0,80%, dans des volumes finaux de 200 µL de bouillon d'infusion cœur cerveau (Oxoid, Basingstoke, UK) complété avec 0,5% de Tween 80. Des contrôles de croissance positive et des contrôles de stérilité ont été inclus.

Les plaques ont été incubées à 35 °C pendant 24 h, après quoi 50 µL de Résazurine à 0,01% ont été ajoutés à chaque puits. La CMI a été enregistrée comme la plus faible concentration d'huiles essentielles ou de composants d'huiles essentielles à laquelle aucune croissance n'a été observée, comme indiqué par un changement de couleur du bleu au rose (**Coban, 2012**).

IV.1.10 Production de biofilm

IV.1.10.1 Production de biofilm par *Staphylococcus aureus* en présence et absence des huiles essentielles

Les isolats sont cultivés dans un bouillon de soja tryptone, à 37 °C pendant 24 h, et dilués à environ 10⁸ cfu / ml. De l'eugénol et du cinnamaldéhyde ont été ajoutés à 200 µL de la dilution de bouillon de soja tryptone séparément jusqu'à une concentration finale de 0,106 mg / ml (concentration subinhibitrice basée sur la détermination de la CMI).

L'expérience a été réalisée en triplicata à l'aide d'une plaque de microtitration à 96 puits. Les témoins négatifs sont préparés de manière similaire, mais les HEs sont remplacés par du bouillon de soja tryptone stérile.

Les plaques sont incubées à 35°C pendant 48h dans un incubateur statique, rincées 3 fois avec du PBS (solution saline dans tampon phosphate) (pH=7,4), séchées à température ambiante et colorées avec 1% de violet de gentiane. Après un autre lavage avec de l'eau distillée, l'absorbance à 570 nm est mesurée en utilisant un lecteur de plaque.

IV.1.10.2 Formation du biofilm sur l'acier inoxydable

Des coupons stériles en acier inoxydable d'un diamètre de 1cm sont déposés au fond d'une plaque à 24 puits et les cultures jeunes de *Staphylococcus aureus* sont diluées à 10⁸ UFC/ml; des aliquotes de 300 µL sont ensuite ajoutées à des puits contenant les coupons et incubées à 35°C pendant 48h en l'absence et en présence de chaque une des HEs. Les coupons sont ensuite transférés sur une nouvelle plaque, rincés 3 fois avec PBS (pH=7,4) et colorés avec 1% de cristal violet pendant 15 minutes et rincés encore 3 fois.

Le biofilm est remis en suspension dans 300 µL d'acide acétique glacial pendant 15 min et 200 µL sont transférés sur une microplaque pour la lecture de l'absorbance à 570 nm.

Résultats et Discussion

IV.2 Résultats et discussion

IV.2.1 Analyse génotypique de la présence d'icaA, d'icaD et de bap

Sur 64 isolats de *Staphylococcus aureus*, 26 (40,6%) étaient positifs pour les 3 gènes de biofilm étudiés (icaA, icaD et bap). Le gène icaA seul a été détecté dans 85,9% des cas et l'icaD dans 84,3% des isolats. Les amplicons représentatifs de la PCR bap, icaA et icaD ont été partiellement séquencés et confirmés dans GenBank (numéros d'accès GenBank AY220730.1, CP006838.1 et JN226155.1, respectivement).

L'analyse génotypique montre que 40,6 % des isolat ont les 3 gènes (icaA, icaD et bap) responsables de la production de biofilm de ce fait on déduit que la production de ces derniers est en relation avec l'infection des mammites par *S. aureus* vu qu'elle secrètent des enzymes dans le milieu afin de bien s'approprier sur les mammites et par conséquent les biofilms sont produits selon **Tramblay et al en 2014** pour permettre aux bactéries de survivre dans des conditions environnementales hostiles ou les bactéries du biofilm peuvent résister à la réponse immunitaire de l'hôte et sont beaucoup plus résistantes aux antibiotiques et aux désinfectants que les cellules bactériennes planctoniques , dans l'analyse de notre article on remarque qu'il y'a une réduction de production de biofilm en présence des HES traitant ainsi l'hypothèse que les HES inhibent le gène responsable de leur production et par conséquent l'inhibition de la souche *S. aureus* comme montré dans la recherche de **Bouyahya et al en 2017** que les HES peuvent avoir de multiple modes d'action y compris sur les protéines moléculaires ce qui montre le pouvoir antibactérien des HES de *Syzygium aromaticum* et *Cinnamomum zeylanicum* vis-à-vis les *S. aureus* .

IV.2.2Caractérisationchimique des huiles essentielles par CG-SM

Les détails des caractéristiques physico-chimiques de HESA, HECZ sont présentés dans le tableau 08 (**Budri et al., 2016**).

Les principaux composants d'HESA sont l'eugénol (90,21%), acétate d'eugénol (6,5%) et β -caryophyllène (1,3%). Selon **Adli et al., (2017)** les mêmes résultats ont été détectés avec eugénol (80,83%), acétate d'eugénol (10,48%) et β -caryophyllène (7,21%). L'huile essentielle de *Cinnamomum zeylanicum* était composée principalement de cinnamaldéhyde (86,5%), benzaldéhyde (4,2%). **Arzuhan et Mehmet, (2020)** ; **Behrooz et al., (2020)** déterminent cinnamaldéhyde (81,39%) et cinnamyl acétate (4,20%) comme composants majeurs et l'eugénol (4,60%) contrairement à la présente étude avec l'eugénol (0,1%).

Résultats et discussion

La variation de la composition chimique de l'huile essentielle selon **Jean et al., (2020)** est due aux modifications du profil chimique qui sont associées à des nombreux facteurs biotiques comprennent les organismes du sol et les microorganismes, abiotiques comme l'hydrologie du sol, le pH et le climat, les méthodes d'extraction et les conditions de conservation.

Tableau N°08: Analyses physicochimiques et valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI90%) des isolats de *Staphylococcus aureus* d'huile essentielle de clou de girofle, d'huile essentielle de cannelle et de leurs principaux composants

Espèce ou composant	Densité (mg/ml)	CMI 90% 1 (mg/ml)	Composition (%)
<i>Syzygium aromaticum</i>	1,060	0.392 (0.187)	Eugénol (90,2%), acétate d'eugénol (6,5%), β -caryophyllène (1,3%), autres (1,9%) (0,187)
Eugénol	1,050	0.237 (0.211)	Eugénol (100%)
Cannelier de Ceylan	1,075	0.243 (0.211)	Cinnamaldéhyde (86,5%), benzaldéhyde (4,2%), cinéole (1,7%), acide cinnamique (1,5%), eugénol (0,1%), autres (5,42%)
Cinnamaldéhyde	1,080	0.199 (0.106)	Cinnamaldéhyde (100%)

Les valeurs CMI indiquées sont la moyenne trouvée pour 26 isolats de *Staphylococcus aureus*.

IV.2.3 CMI des huiles essentielles et leurs composants majeurs

Les résultats expérimentaux les valeurs de Concentration minimale inhibitrice de l'HE de *Syzygium aromaticum*, l'HE de Cannelier de Ceylan, l'eugénol et le cinnamaldéhyde était de 0.392, 0.243, 0.237 et 0.199 mg/ml, respectivement.

Heath dit en 2004 que le métabolisme lipidique chez les bactéries constitue une voie prometteuse pour développer de nouvelles molécules antimicrobiennes. Les HE, grâce à leur caractéristique hydrophobe, constituent de véritables candidats qui pourraient affecter la biosynthèse des lipides, y compris les acides gras insaturés, et modifier ainsi la structure de la membrane cellulaire confirment **Burt et Reinders en 2003**. En effet, la présence des HE dans la cellule bactérienne, même à des concentrations inférieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI), diminue le taux des acides gras insaturés qui sont généralement responsables de la fluidité membranaire. Cela cause légèrement des perturbations au niveau de l'enveloppe

externe de la cellule, traduisant ainsi des modifications structurales de la membrane. Par exemple l'eugénol qui l'un des deux composants majeurs dont l'étude et l'analyse de l'article fait objet ce qui confirment l'efficacité de nos huiles sachant que les substances testées sont classées comme bactéricides en vue des résultats de la CMI.

IV.2.4 Effet des huiles essentielles et des principaux composants sur la formation de biofilm sur les coupons de polystyrène et d'acier inoxydable

Dans une étude réalisée par **Budri et al., (2016)**, l'effet antibactérien de deux huiles essentielles et de leurs composants majeurs a été mis en évidence.

Le tableau 9 résume l'effet de ces huiles essentielles et de leurs composants majeurs sur la formation du biofilm sur les surfaces en polystyrène et en acier inoxydable des *Staphylococcus aureus*, où les valeurs de densité optique (à 570 nm) obtenues en présence de composés naturels sont indiquées en plus du pourcentage restant après exposition aux composés naturels. Ainsi les valeurs obtenues en l'absence des huiles essentielles ou de leurs composants majeurs étaient de 0,415 (100%) pour le polystyrène et de 1,07 (100%) pour l'acier inoxydable (**Budri et al., 2016**).

Tableau N° 09: Formation de biofilm de *Staphylococcus aureus* sur polystyrène et acier inoxydable en présence d'huile essentielle de clou de girofle (HESA), d'huile essentielle de cannelle (HECC) et de ses principaux composants

Composants	Polystyrène OD ₅₇₀ ¹ (% de réduction)	Acier inoxydable OD ₅₇₀ (% de réduction)	Valeur p	
			Polystyrène	Acier inoxydable
Contrôle	0.415 ± 0.075 (0) ^a	1.07 ± 0.222 (0) ^{ab}	-	-
HESA	0.127 ± 0.047 (69.4) ^b	0.390 ± 0.080 (63.5) ^c	<0.01	<0.01
Eugénol	0.196 ± 0.067 (52.8) ^c	0.860 ± 0.220 (19.2) ^b	<0.01	>0.05
HECC	0.105 ± 0.040 (74.7) ^b	0.585 ± 0.158 (45.3) ^c	<0.01	<0.01
Cinnamaldéhyde	0.126 ± 0.078 (69.4) ^b	0.589 ± 0.100 (44.9) ^c	<0.01	<0.01

^{a-c} Les valeurs suivies de la même lettre dans la colonne ne diffèrent pas.

¹Densité optique à 570 nm.

On a noté des différences significatives dans la production de biofilms entre les isolats cultivés en l'absence et en la présence d'HE ou de composants majeurs, où on a remarqué une réduction de la formation de biofilm en présence d'HESA et d'HECZ ($P < 0,01$) sur le polystyrène comme sur l'acier inoxydable (**Budri et al., 2016**).

Le cinnamaldéhyde et l'eugénol ont entraîné une réduction statistiquement significative de la formation de biofilm sur le polystyrène ($< 0,001$), ainsi qu'une réduction significative du biofilm a été observée pour le cinnamaldéhyde ($P < 0,01$) et non l'eugénol sur l'acier inoxydable. En comparant l'activité antibiofilm de chaque HE à son composant principal, une activité antibiofilm similaire a été trouvée pour HECZ et son principal composant "le cinnamaldéhyde", sur les deux surfaces d'essai. Cependant, l'HESA a été plus efficace pour réduire le biofilm sur le polystyrène et l'acier inoxydable que l'eugénol. Ce qui laisse place à deux hypothèses:

1. Premièrement, **Xu GM X, (2016)** a affirmé que la désactivation du quorum sensing (QS), qui est l'ensemble des molécules qu'utilisent les bactéries pour coordonner et assurer la communication entre elles. Cette communication assure un certain nombre de fonctions cellulaires telles que l'expression des facteurs de virulence, et la formation de biofilms. Entraîne la répression des gènes et, par conséquent, la population bactérienne est incapable d'exprimer ces auto-inducteurs car l'expression de ces molécules n'aura lieu que lorsqu'une population bactérienne atteint un seuil de densité cellulaire significative, entraînant ainsi l'activation des gènes, et vu que les HEs désactiveront ces derniers il ne peut y'avoir de QS et pas de formation de biofilms.
2. La deuxième hypothèse stipule que le cinnamaldéhyde agit sur les protéines moléculaires de *Staphylococcus aureus* et peut affecter la division cellulaire. De ce fait, il est capable d'inhiber la séparation des cellules. L'action de ce dernier sur la division cellulaire réside dans l'inhibition de l'assemblage du complexe FtsZ avec les anneaux-Z localisés sur les sites de division cellulaire. Le cinnamaldéhyde peut encore perturber la morphologie des anneaux-Z et inhiber la polymérisation des FtsZ GTP-dépendante.

Conclusion et perspectives

Actuellement, la préoccupation on premiers lieux de la plupart des scientifiques et les chercheurs se sont basées surtout sur la recherche de nouvelles substances antimicrobiennes purement naturelles. Ces dernières années de nombreux travaux se sont intéressés aux effets antibactériens des extraits des plantes médicinales aromatiques et leur composition. Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments; Considérées comme une source de matières premières essentielles pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futur médicaments.

Ce travail a permis de mettre en évidence les propriétés antibactériennes des huiles essentielles de clous de girofle (*Syzygium aromaticum*) et de cannelle de Ceylan (*Cinnamomum zeylanicum*) et leur composants eugénol et cinnamaldéhyde sur la production de biofilm chez les *Staphylococcus aureus* isolées de lait de vaches atteintes de mammite.

Les résultats obtenus par l'analyse de notre article, révèlent la présence des activités inhibitrice significative de la production de biofilm par l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* (HESA) sur les surfaces en polystyrène (69,4%) et en acier inoxydable (63,6%). Cependant, son composant principal, l'eugénol, était moins efficace sur le polystyrène (52,8%) et l'acier inoxydable (19,6%). L'huile essentielle de *Cinnamomum zeylanicum*(HECZ) et son composant principal, le cinnamaldéhyde, ont réduit de manière significative la formation de biofilm sur le polystyrène (74,7 et 69,6%, respectivement) et sur les surfaces en acier inoxydable (45,3 et 44,9%, respectivement). À la lumière de cette dernières, le travail ouvre la voie à des perspectives. Dans le but d'entrevoir la valorisation des huiles essentielles de point de vue production et commercialisation en vue d'utilisations diverses dont notamment comme alternative dans la lutte contre les maladies bactériennes et un spray désinfectant alternatif pour le nettoyage de surface dans l'industrie agro-alimentaire. Il serait intéressant de compléter le travail plus particulièrement par:

- Valorisation de *Syzygium aromaticum* et de *Cinnamomum zeylanicum* origines de nos HEs.
- Élargir les recherches sur d'autres types de maladies infectieuses.
- Étudier d'autres propriétés biologiques de ces plantes, à savoir les propriétés anti-inflammatoires, antivirales, antiparasitaires et antifongiques.
- Comprendre le mécanisme d'action des HEs sur la production de biofilm chez les *Staphylococcus aureus*.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- **Adli D.E.H., Kahloula K., Slimani M., Brahmi M. et Benrguieg M. (2017).** Effets prophylactiques de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* chez les rats wistar en développement Co exposés au plomb et au manganese. Thèse de doctorat. Département de biologie, faculté de science, université de Dr. Moulay Taher, saida.
- **AFNOR, (1986).** Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », Ed. AFNOR, Paris, 57.P

- **Alice D. (2011).** Faisabilité de la mise en place d'une Indication Géographique Sur le Clou de girofle à Madagascar. Thèse de doctorat. Ecole supérieure d'Agro-Développement International ISTOM .65 -72p.

- **Andrade B. F. M. T., Barbosa L. N., Probst I. S.et Júnior A.F. (2014).** Antimicrobial activity of essential oils. J. Essent. Oil Res., 26 (1), 34-40.

- **Angioni A., Barra A., Coroneo V., Dessi S.et Cabras P. (2006).** Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas L. ssp. stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. J. Agric. Food Chem., 54, 4364-4370.

- **Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D.et Idaomar M. (2008).** Biological effects of essential oils: a review. Food Chem. Toxicol., 46, 446-475.

- **Barbelet S. (2015).** Le giroflier : historique, description et utilisations de la plante et de son huile essentielle. Thèse de doctorat. UNIVERSITE DE LORRAINE, France.

- **Barbier C. (2014).** L'huile essentielle de cannelle de Ceylan (*Cinnamomum zeylanicum*). Thèse de doctorat. UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE UFR DE PHARMACIE.52p.

- **Benzeggouta N. (2005).** Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments. Mémoire de magister, Université de Constantine, Algérie, 110p.

Références bibliographiques

- **Bois D. (1999).** Les plantes alimentaires chez tous les peuples et à travers les âges : histoire utilisation, culture. Vol 3 : plantes à épices, à aromates, à condiments. Ed. CME. Paris. 1-11p.

- **Botnieau M. (2010).** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Éd Tec&Doc. Paris. 483-486p.

- **Bouguerra A. (2012).** Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill. En vue de son utilisation comme conservateur alimentaire. Mémoire de magister. Université Mentouri Constantine, Algérie. 126p.

- **Bourachot M. (2017).** Traitement des mammites chez la vache laitière : l'aromathérapie, état des lieux et perspectives, université Claud-Bernard LYON.

- **Bouyahya et al. (2017).** Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries, Phytothérapie, Vol

- **Bouziane E. (2019).** Etude expérimentale de l'effet thérapeutique de l'huile de *pélargonium gravelens* contre les infections mammaires bovines par *Staphylococcus aureus*, Département des Sciences Alimentaires, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem (2019).

- **Bradley A.J. (2002).** Bovine mastitis: an evolving disease. The Veterinary Journal, 164(2), pp. 116-128.

- **Bruneton. J. (2009).** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales, 4eme éd. Techet Doc Paris, 1269 p.

- **Budri P.E., Silva N.C., Bonsaglia E.C., Fernandes Júnior A., Araújo Júnior P., Doyama J.T., Gonçalves J.L., Santosm V., Fitzgerald-Hughes D.et Rall V.L. (2015).** Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major component son biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis. J. Dairy Sci. 98, pp 5899-5904.

Références bibliographiques

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

- **Burt S.A. et Reinders R.D. (2003).** Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol* 36:162–7.

- **Carson F. A. et Hammer K. (2011).** Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. In: *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents.* (Ed. Thormar H.). John Wiley & Sons. Islande. 336p.

- **Celine R. (2002).** Compréhension Des Mécanismes D'adhésion Des Biofilms En Milieu Marin En Vue De La Conception De Nouveaux Moyens De Prévention (Docteur De L'université Paris 6).

- **Chouitah O. (2012).** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra*. Thèse de doctorat. Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, Algérie. 143p.

- **Christophe A. (2014).** limites et risques de la phytothérapie, université de LIMOGES, 108p, pp10.

- **CLSI. (2009).** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 8th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

- **Coban A.Y. (2012).** Rapid determination of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus* clinical isolates by colorimetric methods. *J. Clin. Microbiol.* 50:2191–2193.

- **Colette C. (2007).** l'aromathérapie et les huiles essentielles, 82 p.

- **Cucarella C., Colano C., Valle J., Amorena B., Lasa I. et Penades P. (2001).** Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 183:2888–2896.

Références bibliographiques

- **Debert A. (2001).** Traitement des mammites cliniques en élevage biologique : essai sur le terrain d'une huile essentielle. Thèse de doctorat vétérinaire. Nantes : Faculté de Médecine, 116 p.

- **Dechambre A. (1876).** La cannelle, dictionnaire encyclopédique des sciences médicales, vol 12, 164-177p.

- **Delaquis P.J., Stanich K. et Girard B. (2002).** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, *cilantro*, *coriander* and *eucalyptus* essential oils, Int J food Microbiol, vol 74, 101-109p.

- **Delarras, C., Trebaol B. et Durand, J. (2010).** Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux: Réglementation-Micro-organismes-Prélèvements-Analyse. 2^{ème} édition. Éditions Tec et Doc. Lavoisier. p 542.

- **Domadia P., Swarup S., Bhunia A., et al. (2007).** Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. Biochem Pharmacol. 74:831–40.

- **Durel L., Faroult B., Lepoutre D., Brouillet P. et Lepage P. (2003).** Mammites des bovins (cliniques et subcliniques) : démarches diagnostiques et thérapeutiques. La dépêche technique, 87, pp. 39.

- **El-Massry K.F. et El-Ghorab A.H. (2006).** Effect of essential oils and non-volatile extracts of some aromatic plants on Cuinduced oxidative modification of human low-density lipoprotein (LDL). J. Essent. Oil Bear. Plants, 3, 292-299.

- **Encyclopédie des plantes médicinales** : Identification, préparations, soins. (2001).

- **Evans C. (1996).** Trease and Evans 'pharmacognosy 14ème edition WbSauders Company Ltd Londres.

- **Fabienne E. (2004).** La cannelle de Ceylan et ses activités biologiques. Thèse de doctorat. Université JOSEPH FOURIER. Faculté de pharmacie de Grenoble.

Références bibliographiques

- **Fekih N. (2015).** Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre PINUS POUSSANT en Algérie. Thèse de Doctorat. Université de TLEMCEM ABOU BEKR BELKAID, Algérie. 6p.

- **Fonseca P. et Librand A.P.L. (2008).** Evaluation of physico-chemical and phytochemical characteristics of different ttiaturesofbarbatimão (Stryphnodendronbarbatimam). Braz. J. Pharm. Sci.44:271–277.

- **Franchomme P., Jollois R. et Penoel D. (2001).** L'aromathérapie exactement. Editions Roger Jollois, 490 p.

- **Franchomme P. et Penoël D. (1990).** L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jollois. Limoges. 510 p.

- **Freeman D J., Falkiner FR., Keane CT. (1989).** Nouvelle méthode pour détecter la production de boues par des staphylocoques à coagulase négative. J Clin Pathol; 42:872-874.

- **Garnero J. (1984).** La cannelle de Ceylan: son huile essentielle et ses produits d'extraction. Phytother. 11, 5-15.

- **Garnero J. (1984).** La cannelle de Ceylan: son huile essentielle et ses propriétés d'extraction, Phytothérapie vol 11, p. 5-15.

- **Garnier F., et Denis F. (2007).** Bactériologie médical: Techniques usuelles: Cocci à Gram positif. 3ème Ed. Elsevier Masson. (France). 29(251): 254-257.

- **Garry P. (2006).** *Staphylococcus aureus* escapes more efficitly. Nature reviews microbiology, p295-304.

- **Germann G. et Germann P. (2014).** Plantes d'aromathérapie. Ed. Del chaux et Niestlé Paris, 208 p.

Références bibliographiques

- **Gershenson J. et Dudareva N. (2007).** The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.*, 3, 408-414.
- **Ghedira K., Goetz P. et Jeune R. (2010).** *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (*Myrtaceae*) Giroflie. *Phytothérapie*, 8(1), 37-43.
- **Goetz C., Dufour S., Archambault M., Malouin F. et Jacques M. (2016).** Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intramammaires chez la vache laitière : une revue bibliographique, *Revue Médical Vétérinaire*, 167, 7-8, pp 215-229.
- **Griffin S.G., Wyllie S.G., Markham J.L. et Leach D.N. (1999).** The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragrance J.*, 14, 322-332.
- **Guinoiseau E., Luciani A., Serra D.D.R., Quilichini Y., Berti L. et Lorenzi V. (2015).** Primary mode of action of *Cistus ladaniferus* L. essential oil active fractions on *Staphylococcus aureus* strain. *Adv. Microbiol.*, 5, 881-890.
- **Hammer K.A., Carson C.F. et Riley T.V. (1996).** Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Am. J. Infect. Control*, 24, 186-189.
- **Hammer K.A., Carson C.F. et Riley T.V. (1999).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.*, 86, 985-990.
- **Hanzen C. (2009).** La pathologie infectieuse de la glande mammaire. Université de Liège. http://www.therioruminant.ulg.ac.be/notes/200809/R20_Glde_mamm_production_2009_PWP.pdf (consulté le 09 juillet 2020).
- **Harada M. et Ozaki Y. (1972).** Pharmacological studies on Chinese cinnamon. I. Central effect of cinnamaldehyde. *Yakugaku Zasshi*. 92: 135-140.

Références bibliographiques

- **Harlet M. (2012).** Mammites de la vache laitière : étude de l'efficacité d'un mélange d'huiles essentielles par application cutanée locale dans 34 élevages bretons. Thèse de doctorat vétérinaire. Lyon : Université Claude Bernard, 144 p.

- **Heath R.J et Rock Co. (2004).** Fatty acid biosynthesis as a target for novel antibacterials. *Curr Opin Invest Drugs* 5:146–53.

- **Hennekinne J.A. (2009).** Nouvelles approches pour la caractérisation des toxi infections alimentaires à staphylocoques à coagulase positive, thèse de doctorat Paris, pp.16 17.

- **Hogan J.S., Gonzalez R., Harmon R.J., Nickerson S.C., Oliver S.P., J.W., Pankey J.W., Smith K.L. (1999).** Laboratory Handbook on Bovine Mastitis, 1st edition, (National Mastitis Council, Inc., Madison, WI).

- https://fr.wikipedia.org/wiki/Huile_essentielle#/media/Fichier:Distillation_%C3%A0_la_vapeur_d'eau.png. (consulté 15Aout 2020 à 17h30)

- **Hulin V., Mathot A.et Mafart P. (1998).** Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *SCI. Aliments*, 18, 563-582.

- **Institut De L'élevage. (2008).** Maladies des bovins. 4ème édition. Editions France Agricole.

- **Issa Ibrahim A. (2014).** Bilan bactériologique des mammites dans les troupeaux Zébu Azawak à la station expérimentale sahélienne de Toukounous (Niger) et épidémiologie moléculaire des *Staphylococcus aureus* isolés entre 2009 et 2012, médecine vétérinaire, université de LIEGE.

- **Jean B. (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. 4ème Ed. Lavoisier. France. 137p.

Références bibliographiques

- **Jean B.H.F., Pierre M.J.D. and Fabrice F.B. (2020).** Essential oil's chemical composition and pharmacological properties. *Essential Oils- Oils of Nature*, Hany A. El-Shemy. 10.5772. 348p.
- **Joy P.P., Thomas J.et Samuel M. (1998).** Cinnamon (*Cinnamomum verum Presl*) for flavour and fragrance *Parfai journal*, (20): 37-42.
- **Juvani B.J., Kanner J., Schved F.et Weisslowisz H. (1994).** Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal application bacteriol*, vol 76, 626-631p.
- **Kadoum .A., Saadeddine K., KADA. R. (2019).** Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne de trois huiles essentielles du *thymus fontanessii*, *Eucalyptus sp.* et *Lavandula sp.* vis à vis de *Staphylococcus aureus* isolés a partir des cas de mammite bovine. Département Sciences de la Nature et de la vie. Université Ibn Khaldoun–Tiaret .2019.
- **Kalemba D. et Kunicka A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.*, 10, 813–829.
- **Kateete D. P., Kimani C. N., Katabazi F. A., Okeng A., Okee, M. S., Nanteza A.et Najjuka F. C.(2010).** Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 9(1): 23-30
- **Kevine O. (2020).** Mastitis in cows, detection and prevention measures, dairy technologist, Egerton university, [En ligne], <http://www.dairytechnologist.com> (consulté le 20 mars 2020).
- **Koba K., Nenonene A. Y., Raynaud C., Chaumont J. P.et Komla S. (2011).** Antibacterial Activities of the Buds Essential Oil of *Syzygium aromaticum* L. Merry. & Perry from Togo. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 1(1), 4p.

Références bibliographiques

- **Koneman E. W., Allen S.D, Janda W.M, Schreckenberger P.C et Winn Jr.W.C. (2008).** Diagnostico Microbiológico Textoe Atlas Colorido.6th ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brazil.
- **Kozam G. (1977).** The effect of eugenol on nerve transmission. Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol; 44: 799-805.
- **Labre P. (2012).** Médecines naturelles en élevage Tome 2: Phytothérapie et aromathérapie chez les ruminants et le cheval. Deuxième édition. Thônes : Editions Femenvet, 352 p.
- **Labre P. et Chaduc L. (2002).** Traitement de pathologies dominantes chez les ruminants par les huiles essentielles : Essai « Aromavet ». Alter Agri, 54, pp. 23-25.
- **Lahlou M. (2004).** Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phytother. Res., 18, 435-448.
- **Laïb I. (2011).** Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs. Mémoire de magister. Université Mentouri Constantine, Algérie. 122p.
- **Lamassiaude-Peyramaure S. (2008).** Nouvelles thérapeutiques à l'officine, actualités pharmaceutiques, volume 47, issue 475, p.27-28
- **Lefevre C. (2009).** Traitement des mammites à partir d'huiles essentielles : *Thymus saturoïdes* et *Rosmarinus officinalis*. Symbiose, 136, pp. 10-11.
- **Lefevre C., Kemmerer M., Le Guenic M., Roussel P., Alby C., Linclau O., Cartaud G., Tainturier D., Larrat M. et Bareille N. (2008).** Le traitement des mammites cliniques de la vache laitière par des huiles essentielles. Innovations Agronomiques, 4, pp. 79-83.
- **Leperlier I., Harlet M., Kluntz G. et Coll. (2013).** Traitement des mammites cliniques et subcliniques par des huiles essentielles en application cutanée. Bulletin des GTV, 68, pp. 77-86.

Références bibliographiques

- **Lesot H. (2006).** Essai thérapeutique d'un mélange de trois huiles essentielles en intramammaire sur les mammites cliniques en élevage agrobiologique. Th.D.Vétérinaire, Nantes.

- **Leyral G. et Vierling É. (2007).** Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. Wolters Kluwer France. p. 287.

- **Lobstein A., Couic-Marinier F. et Barbelet S. (2017).** Huile essentielle de Clou de girofle. Actualités Pharmaceutiques, 56(569) ,59-61.

- **Maillot B. (2013).** L'homéopathie en élevage bovin. Thèse de doctorat Pharmacologie., Lille 2 santé.

- **Mascre M. et Deysson G. (1951).** Classification des plantes vasculaires, tome II, Se des éditions, Paris. 221p.

- **Masotti V., Juteau F., Bessiere J.M. et Viano J. (2003).** Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. J. Agric. Food Chem., 51, 7115-712.

- **Masson H. (2006).** Enquête sur le traitement des mammites cliniques en agriculture biologique en Bretagne, utilisation de l'aromathérapie. Thèse de doctorat vétérinaire. Nantes : Faculté de Médecine, 116 p.

- **Mclaskill D. et Croteau R. (1998).** Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. Trends Biotechnology, 16, 349-355.

- **Medeiros A. (2016).** Etude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées. Mécanique des fluides [physics.class-ph]. Université Grenoble Alpes.

- **Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt.** Le plan Ecoantibio 2012-2016, synthèse et principales réalisations [en ligne]. URL : 110

Références bibliographiques

<http://agriculture.gouv.fr/telecharger/82020?token=0dc468725c6d47906398a7ad4c5faa4a> (consulté le 07 Aout 2020).

- **Naganuma M., Hirose S., Nakayama Y., Nakajima K. et Someya T. (1985).** A study of the photo toxicity of lemon oil. *Arch. Dermatol. Res.*, 278, 31-36.
- **Norman J. (199).** Les épices leur emploi dans la cuisine d'aujourd'hui Hatier, Paris.
- **Ohkubo T. et Shibata M. (1997).** The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *J. Dent. Res.*; 76:848-851.
- **Paris R.P. et Moyses H. (1967).** Matière médicale, tome 2, Masson édition, Paris.
- **Pecquet C. (2007).** Progrès en dermato-allergologie, Libbey édition. Paris.
- **Pharmacopée Européenne version 7.1 (avril 2011).**
- **Poutrel B. (1985).** Généralités sur les mammites de la vache laitière : Processus infectieux, épidémiologie, diagnostic, méthode de contrôle. *Recueil de médecine vétérinaire : Les mammites bovines*, 161, (6-7), pp. 497-511.
- **Prerna et al. (2007).** Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde, *Biochemical pharmacology*, Vol 74, n°6, pp 831–840.
- **Preuss H. G., Echard B., Enig M., Brook I. et Elliott T. B. (2005).** Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria. *Mol. Cell. Biochem*, 272, 29-34.
- **Rahmeto A., Hagere H., Mesele A., Bekele M. et Kassahun A. (2016).** Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of staphylococcus aureus in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia, *BMC Veterinary Research*, p11.

Références bibliographiques

- **Rattez C. (2017).** Les mammites subcliniques en élevage bovin laitier : antibiothérapie et alternatives, université de ROUEN.

- **Razzaghi-Abyaneh M., Shams-Ghahfarokhi M., Rezaee M-B., Jaimand K., Alinezhad S., Saberi R. et Yoshinari T. (2009).** Chemical composition and anti aflatoxigenic activity of *Carum carvi L.*, *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. Food Control, 20, 1018-1024.

- **Remy D. (2010).** Les mammites. Guides France Agricole, 286p, France agricole.

- **Rios J.L., Recio M.C. et Villar A. (1988).** Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: a review of the literature. J. Ethnopharmacol., 23, 127-149.

- **Royster E. et Wagner S. (2015).** Treatment of mastitis in cattle. The Veterinary Clinics Food Animal Practice., 31, pp.17–46.

- **Rozafimamonjison G., Jahiel M., Duclos T., Ramanoelina P., Fawbush F. et Danthu P. (2014).** Bud, leaf and stem essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from Madagascar, Indonesia and Zanzibar, International journal of basic and applied Sciences. 3(3), 224.

- **Russo M., Galletti G.C., Bocchini P. et Carnacini A. (1998).** Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgares sp. Hirtum (Link) Ietswaart*): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis: 1. Inflorescences. J. Agric. Food Chem., 46, 3741-3746.

- **Senatore F. (1996).** Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides L.*) growing wild in Campania (Southern Italy). J. Agric. Food Chem., 44, 1327-1332.

- **Shaaban H. A. E., El-Ghorab A. H. et Shibamotoand T. (2012).** Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. J. Ess. Oil Res., 24(2), 203-212.

Références bibliographiques

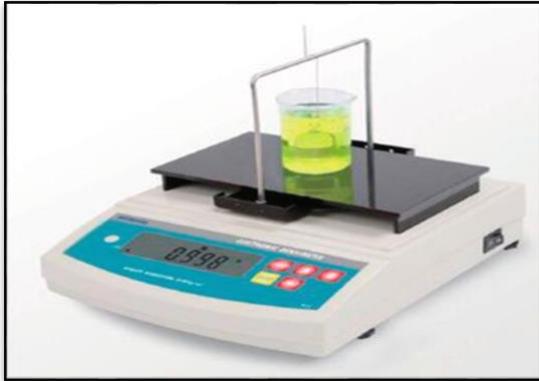
- **Smith C.K., Moore C.A., Alahi E.N., Smart A.T. et Hotchkiss S.A. (2000).** Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 168,189-99.
- **Sperber W. Z. et Tartini S. R. (1975).** Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 29(4): 502-505.
- **Stella A. (1998).** Le livre des épices Flammarion, Paris.
- **Traore M.C. (2006).** Étude de la Phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali. Thèse de doctorat. Université de Bamako, Mali, 175p.
- **Tremblay et al. (2014).** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique, *Canadian journal of veterinary research*, Vol 78, n°2, pp. 110-116.
- **Unlu M., Ergene E., Unlu G., Zeytinoglu H. et Vural N. (2010).** Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food Chem. Toxicol.*, 48(11), pp. 3274-3280.
- **Uragoda C.G. (1984).** Asthma and other symptoms in cinnamon workers. *Br. J Ind Med.* (41), 224-227.
- **Va N Oostveldt K., Vangroenweghe F., Dosogne H. et Burvenich C. (2001).** Apoptosis and necrosis of blood and milk polymorphonuclear leukocytes in early and midlactating healthy cows. *Vet. Res.*, 32, 617-622.
- **Vasudevan P., Nair M.K.M., Annamalai T. et Venkitanarayanan K.S. (2003).** Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. Microbiol.* 92:179–185.

Références bibliographiques

- **Wallemacq H., Girard B., Lekeux P. et Bureau F. (2010).** La vaccination contre les mammites à *Staphylococcus aureus* chez la vache laitière. In Annales de Médecine Vétérinaire. Université de Liège. 154(1): 16-29.
- **Watrenez A. (2014).** Mammite sèche : 9 fois/10 le quartier est condamné. PLM, n°460, 56- 57.
- **Weidenhamer J.D., Macias F.A., Fischer N.H. et Williamson G.B. (1993).** Just how insoluble are monoterpenes?. J. Chem. Ecol., 19, 1799-1807.
- **Wilkinson J.M. (2006).** Methods for testing the antimicrobial activity of extracts, In: Modern Phytomedicine. Turning Medicinal Plants into Drugs (Eds, Ahmad F. A. et Owais M.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 157-171.
- **Xu Gm. (2016).** Relationships between the regulatory systems of quorum sensing and multidrug resistance. Front Microbiol 7:958.
- **Yannick D.N., Tremblay, Skander H. et Mario J. (2014).** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique, The Canadian Journal of Veterinary Research, vol 7, 78, pp 110–116.
- **Yu J., Lei J., Yu H., Cai X. et Zou G. (2004).** Scutellariabarbata. Phytochemistry, 65, 881-884.
- **Yves L. et Michel G. (2010).** *Staphylococcus aureus*, 283 p, ISBN : 27430119555.

Annexes

Annexe 01: Appareillage du laboratoire



Densitomètre Incubateur



Kit Mini spin

Annexe 02: Le milieu de culture Chapman

Le milieu de Chapman est un milieu sélectif, surtout utilisé en microbiologie médicale, permettant la croissance des germes halophiles. Parmi ces germes figurent au premier rang les bactéries du genre *Staphylococcus*, mais aussi les Microcoques, les Entérocoques, les Bacillus, et de rares bactéries à Gram négatif (Bouziane, 2019).

➤ Utilisation

Isolement des *Staphylococcus*

Annexes

➤ Les Composant du milieu Chapman

Tableau n°10: les compositions de milieu Chapman (1L pour 1000)(Bouziane, 2019)

Composant	Quantité
Peptone de viande	10g
Lactose	10g
Clorur de sodium	5g
Serat de sodium	2g
Rouge neutre	0,03g
L'agar	15g

Annexe 03:Le milieu de culture Bouillon cœur cerveau (BHIB)

Le Bouillon Cœur Cervele est un milieu riche utilisé pour la culture des germes exigeants. Son utilisation est recommandée pour le dénombrement de *Staphylococcus aureus* dans les aliments.

➤ Utilisation

Milieu polyvalent riche, utilisé pour la coagulase et l'ADNase des *Staphylococcus*.

➤ Les Composant du milieu Cœur cerveau

Ingrédients en grammes pour un 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Tableau n°11: les compositions de Bouillon Cœur Cervele

Composant	Quantité (en g)
Extrait de cœur	5,00
Extrait de cerveau	12,50
Peptone	10,00
Glucose	2,00

Annexes

Chlorure de sodium	5,00
Phosphate disodique	2,50

Annexe 04:Coloration de Gram

La coloration de Gram, qui permet de différencier les micro-organismes selon la structure de leur paroi, est la première étape d'identification bactérienne (Céline, 2002). Expérimentalement, nous avons utilisé le test de coloration de Gram en plusieurs étapes, selon le protocole suivant : - effectuer un frottis, - le fixer à la chaleur, - recouvrir de Cristal violet (colorant) pendant 1 minute, puis rincer à l'eau distillé, - recouvrir de lugol pendant 1 minute, puis rincer à l'eau distillé, - décolorer à l'aide d'un éthanol pendant 40 secondes puis rincer à l'eau distillé,- contre-colorer à fushine pendant 1 minute , puis rincer à l'eau distillé. Après séchage à l'air, les bactéries sont observées au microscope optique à l'aide d'un objectif à immersion (grossissement X 100).

➤ **Lecture**

Les Staphylocoques se présentent sous forme de cocci Gram+ groupées en grappes.

➤ **Observation microscopique des *S.aureus* (Coloration de gram)**

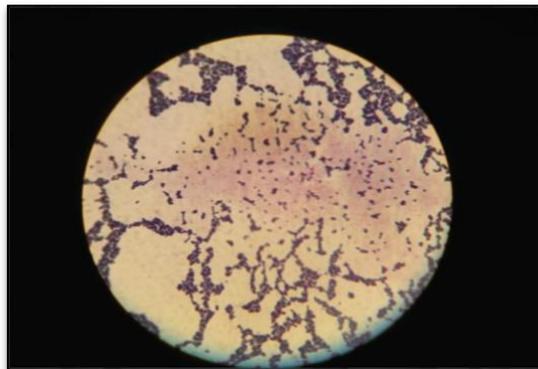


Figure N°13:Observation microscopique des *S.aureus* (Coloration de Gram)

(Kadoum, 2019)

Annexe 05:Description des huiles essentielles obtenues

Tableau n°12: Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles extraites des clous de girofle(HEZA) et cannelle de Ceylan (HECZ)(Garnero, 1984).

	Aspect	Couleur	Odeur
HEZA	Liquide mobile limpide	Jaune clair	Epicée
HECZ	Liquide mobile limpide	Jaune clair	Epicée

Résumé

Résumé

La mammite bovine est une inflammation de la glande mammaire des vaches qui peut entraîner une réduction de l'activité sécrétrice de la glande et des pertes économiques importantes chez les bovins laitiers. Les *Staphylococcus aureus* ce sont des pathogènes fréquemment isolées lors d'infections de la glande mammaire. Les *Staphylococcus aureus* ayant la capacité de former des biofilms, ces derniers facilite l'adhésion des bactéries aux surfaces solides et contribue à la transmission et au maintien de ces bactéries. L'effet des huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* (Clou de girofle; HESA) et de *Cinnamomum zeylanicum* (Cannelle de Ceylan; HECZ) et de leurs principaux composants, eugénol et cinnamaldéhyde, sur la production de biofilm chez les *Staphylococcus aureus* isolées de lait de vaches atteintes de mammite sur différentes surfaces a été étudiée.

Les résultats obtenus par l'analyse de cet article, montre une inhibition significative de la production de biofilm par L'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* HESA sur les surfaces en polystyrène (69,4%) et en acier inoxydable (63,6%). Cependant, son composant principal, l'eugénol, était moins efficace sur le polystyrène (52,8%) et l'acier inoxydable (19,6%). L'huile essentielle de *Cinnamomum zeylanicum*(HECZ) et son composant principal, le cinnamaldéhyde, ont réduit de manière significative la formation de biofilm sur le polystyrène (74,7 et 69,6%, respectivement) et sur les surfaces en acier inoxydable (45,3 et 44,9%, respectivement). Ces résultats suggèrent que l'HESA, l'HECZ et le cinnamaldéhyde peuvent être envisagés pour des applications telles que la désinfection dans l'industrie agro-alimentaire.

Mots clés : Mammite bovine, *Staphylococcus aureus*, *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, Biofilm, l'huile essentielle.

Abstract

Bovine mastitis is inflammation of the mammary glands of cows which can lead to reduction in secretory activity of glands and causes significant economic losses in dairy cattle. *Staphylococcus aureus* are pathogens frequently isolated during infections of the mammary gland. The production of biofilm by *Staphylococcus aureus* facilitates the adhesion of bacteria to solid surfaces and contributes to the transmission and maintenance of these bacteria. The effect of the essential oils of *Syzygium aromaticum* (clove; EOSA) and *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon; EOCZ) and their major components, eugenol and cinnamaldehyde, on *Staphylococcus aureus* biofilm formation on different surfaces was investigated.

The results obtained by the analysis of this article, showed a significant inhibition of biofilm production by essential oil of *Syzygium aromaticum* EOSA on polystyrene (69, 4%) and stainless steel surfaces (63, 6%). However, its major component, eugenol, was less effective on polystyrene (52,8%) and stainless steel (19,6%). The essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* EOCZ and its major component, Cinnamaldehyde, significantly reduced biofilm formation on polystyrene (74.7 and 69.6%, respectively) and on stainless steel surfaces (45.3 and 44.9%, respectively). These results suggest that the essential oil of *Syzygium aromaticum* EOSA, the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* EOCZ, and cinnamaldehyde may be considered for applications such as sanitization in the food industry.

Key words: Bovine mastitis, *Staphylococcus aureus*, *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, biofilm, essential oil.

المخلص

التهاب الضرع البقري هو التهاب في الغدة الثديية للأبقار يمكن أن يؤدي إلى انخفاض النشاط الإفرازي للغدة وخسائر اقتصادية كبيرة في الأبقار الحلوب. المكورات العنقوديات الذهبية هي بكتيريا ممرضة تم عزلها بشكل متكرر من التهابات الغدة الثديية. كما أن هذه الأخيرة لها القدرة على تكوين الأغشية الحيوية التي تسهل التصاق البكتيريا بالأسطح الصلبة وتساهم في نقل هذه البكتيريا والحفاظ عليها. تمت دراسة تأثير الزيوت الأساسية لأعواد القرنفل (*Syzygium aromaticum*) والقرفة (*Cinnamomum zeylanicum*) ومكونيهما الرئيسيين، الأوجينول (eugénol) و السينامالدهيد (cinnamaldéhyde) على التوالي على إنتاج الأغشية الحيوية في المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من لبن الأبقار المصابة بالتهاب الضرع على الأسطح المختلفة.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من خلال تحليل هذه المقالة تثبيطاً كبيراً لإنتاج الأغشية الحيوية (biofilm) بواسطة الزيت الأساسي لأعواد القرنفل على أسطح البوليستيران (polystyrène) (69,4%) و أسطح الفولاذ المقاومة للصدأ (acier inoxydable) (63,6%). ومع ذلك مكونه الرئيسي الأوجينول كان أقل فعالية على أسطح البوليستيران (52,8%) و أسطح الفولاذ المقاومة للصدأ (19,6%). الزيت الأساسي للقرفة و مكونه الرئيسي سينامالدهيد قللوا بشكل ملحوظ تشكل الأغشية الحيوية على أسطح البوليستيران (74,7% ; 69,6% على التوالي) وعلى أسطح الفولاذ المقاومة للصدأ (45,3% ; 44,9% على التوالي). تشير هذه النتائج بأنه يمكن استخدام كل من الزيتين الأساسيين لأعواد القرنفل و القرفة و سينامالدهيد في التطهير و صناعة الأغذية.

الكلمات المفتاحية: التهاب الضرع البقري ، المكورات العنقوديات الذهبية، الأعواد القرنفل، القرفة ، الأغشية الحيوية، الزيوت الأساسية.