

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun –Tiaret–
Faculté Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Science de la nature et de la vie

Filière : Science Biologique

Spécialité : Infectiologie

Présenté par :

Belabbes Wafaa

Bensaid Hanane

Bouguerroudj Chaimaa

Thème

Traitement des mammites par des extraits de plantes médicinales
(*Salvia Officinalis et Lupinus albus*)

Soutenu publiquement le

Jury:

Grade

Président : M^r AYAD Mohamed Amine

M.C.A

Université de TIARET

Encadrent : M^r AGGAD Hebib

Pr

Université de TIARET

Co-Encadrent : M^{me} BOUTELDJA Rachida

M.C.B

Université de TIARET

Examineur : M^r SAIM Mohamed Said

M.C.A

Université de TIARET

Année universitaire 2023-2024

Remerciement

الحمد لله الذي أعاننا على إنهاء هذا العمل وسخر لنا القوة لإتمامه فكل التوفيق منه وحده

Tout d'abord, nous tenons à remercier ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la volonté, le courage, la force et la patience pour réaliser ce travail de fin d'étude et arriver à ce stade-là.

Ce mémoire est le fruit des efforts fournis et des sacrifices consentis par plusieurs personnes que nous pourrions oublier de les remercier.

*C'est avec un grand plaisir que nous adressons nos sincères remerciements à notre professeur et promoteur monsieur **AGGAD Hebib** pour l'honneur qu'il nous a fait de nous encadrer, pour ses bons conseils, pour cela on tient à lui exprimer toutes nos gratitude.*

*Nous exprimons également nos chaleureux remerciements à notre Copromoteur docteur **BOUTELDJA Rachida** pour son soutien et sa patience durant notre travail, son exigence, sa disponibilité et pour nous avoir communiqué sa passion pour la recherche, et pour ses précieux conseils.*

*Nous s'incères également aux membres des jurys monsieur **AYAD Mohamed Amine** et monsieur **SAIM Mohamed Saïd** d'avoir accepté d'examiner et juger ce modeste travail.*

Nous tenons à remercier toutes l'équipe de laboratoire d'hygiène et pathologies animales d'institut vétérinaire université Ibn Khaldoun, TIARET.

*Et surtout un grand et sincère remerciement à madame **BENHAMOUDA Leïla Soher** et monsieur **DOUCENE Radhouane** et madame **Abdelmalek Ilhem** pour son effort et leurs aides, et leurs conseils et leurs ouvertures d'esprit, et pour eu avoir la patience et la gentillesse de répondre à nos innombrables requêtes.*

*Nous exprimons également nos chaleureux remerciements à Libraire Ibn Khaldoun (**Djaber et Ahmed**)*

Dédicace

Je dédie ce travail comme un témoignage d'affection, de respect et d'admiration.

À mon père, Djelloule je vous dois une profonde gratitude pour ton soutien illimité et pour l'ambition que tu vois en moi.

Et à mon cœur battant, ma mère, Nebia source de tendresse, merci d'avoir été la motivation derrière chaque progrès que j'ai accompli.

À ma sœur unique, Zahra.

À mes frères, Mohamed et M'hamed

Et à mes Petites fleurs de famille, yasmine et sara et soumia.

Aux compagnes du cheminement de parcours universitaire Mes Belles Binômes: Wafaa, Chaimaa, je vous remercie pour votre soutien.

Et tout la famille Bensaid et Boularesse

Je conclus ainsi cette dédicace, en suppliant le Très-Haut de continuer à me guider et à me diriger dans ce qui m'attend.



Dédicace

Je dédie ce travail comme un témoignage d'affection, de respect et d'admiration.

À mon père, Noureldinne je vous dois une profonde gratitude pour ton soutien illimité et pour l'ambition que tu vois en moi.

Et à mon cœur battant, ma mère, Aicha source de tendresse, merci d'avoir été la motivation derrière chaque progrès que j'ai accompli.

À mes belles sœurs, Fatima et Nadia.

À mes frères, Miloude et Mohamed Akram

Aux compagnes du chemin de parcours universitaire,

Mes Belles Binômes : Hanane, Chaimaa, je vous remercie pour votre soutien.

Mes grandes Mères : Elkhadem et Oum el Bakhte

Et toutes la famille Bensaid et Belabbes

Je conclus ainsi cette dédicace, en suppliant le Très-Haut de continuer à me guider et à me diriger dans ce qui m'attend.



Dédicace

Je dédie ce travail comme un témoignage d'affection, de respect et d'admiration.

À mon père, Zoubir je vous dois une profonde gratitude pour ton soutien illimité et pour l'ambition que tu vois en moi.

Et à mon cœur battant, ma mère, Kheira source de tendresse, merci d'avoir été la motivation derrière chaque progrès que j'ai accompli.

À mes belle sœurs, Djamila et son marie Djamaa Aek et ses fils Mohamed et Merouane, Rouia et Soudjoud l'enfant à naitre et ma petite sœur Aroua.

et mon ami bouteldja ghania

À mon frère, Mohamed Miloud

Aux compagnes du cheminent de parcours universitaire,

Mes Belles Binômes : Hanane, Wafaa, je vous remercie pour votre soutien.

Et toutes la famille Bougerroudj et Mousaoui et Djamaa elhelli et Ammar et Razag

Je conclus ainsi cette dédicace, en suppliant le Très-Haut de continuer à me guider et à me diriger dans ce qui m'attend.



Table des Matières :

Remerciement.....	
Dédicace	
Résumé	
Liste des Figures.....	
Listes des Tableaux	
Listes des Abréviations.....	
<i>Introduction</i>	1

Recherche bibliographique

I. Mammites	3
1. Définition	3
2. Types de mammites en fonction des agents causals	3
a. Infection bactérienne	3
b. Mammite environnementale.....	4
3. Mécanisme de la mammite	4
II. Pharmacopée traditionnelle.....	5
1. Description des plantes étudiées	5
1.1. <i>Salvia officinalis</i> L.....	5
1.2. <i>Lupinus albus</i> L.	6
1.3. Plantes médicinales et mammites.....	7

II. Matériels et méthodes

1. Objectifs de travail	10
2. Lieu et la durée de travail.....	10
3. Matériels et produits utilisés	11
4. Protocole Expérimentale:.....	12
5. Préparation des plantes	13

6. Préparation des extraits	13
7. Partie microbiologique.....	13
7.1. Prélèvement et Echantillonnage	13
7.2. Préparation des dilutions et l'ensemencement.....	14
7.3. Recherche et dénombrement des bactéries.....	14
7.4. Caractérisation des souches	15
8. Activité antibactérienne	18
9. Analyse statistique	20

Résultats et Discussion

I. Identification des bactéries recherchées.....	22
II. Evaluation de l'activité Antibactérienne	25
Conclusion.....	30
Références	33
<i>Annexes</i>	42

Résumé

La mammite, est une inflammation de la glande mammaire chez les vaches laitières, est une préoccupation majeure pour les exploitations laitières du monde entier en raison de ses effets dévastateurs sur la production et la qualité du lait.

Outre les méthodes thérapeutiques avancées, nous avons cherché dans cette étude des solutions naturelles alternatives basées sur l'utilisation d'extraits de plantes médicinales pour traiter la mammite bovine causée par les bactéries *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

10 vaches ont reçu des injections quotidiennes pendant 5 jours, réparties en 3 groupes, en étudiant l'évolution du nombre et de la qualité des bactéries présentes dans le lait et en prélevant des échantillons au début de l'expérience T0 et au cinquième jour Tf.

Les principales bactéries étudiées sont *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Les résultats de cette étude ont montré l'efficacité antimicrobienne de l'extrait éthanolique de *S.Officinalis L.* contre *S.aureus* et *E.coli* avec des zones d'inhibition (25.51 ± 05.34 et 16.5 ± 2.26) à la concentration de 125 mg/ml et (25.66 ± 3.78 et 16.03 ± 01.66) à la concentration de 62.5 mg/ml, respectivement.

D'autre part, l'extrait éthanolique de *L.albus L.* a montré une zone d'inhibition (13.69 ± 3.6 et 10.5 ± 1.65) contre *E.coli* et (11.9 ± 1.029 et 11.47 ± 02.83) contre *S.aureus* à une concentration de 125 mg/ml et 62.5 mg/ml, respectivement.

Les résultats de l'injection intra mammaire de *L.albus L* ont montré une faible inhibition contre *E.coli* et *S.aureus*.

المخلص:

يعد التهاب الضرع، وهو التهاب الغدة الثديية في الأبقار الحلوب، مصدر قلق كبير لمزارع الألبان في جميع أنحاء العالم بسبب آثاره المدمرة على إنتاج الحليب وجودته. بالإضافة إلى الطرق العلاجية المتقدمة، بحثنا في هذه الدراسة عن حلول طبيعية بديلة تعتمد على استخدام مستخلصات نباتية طبية لعلاج التهاب الضرع البقري الناجم عن بكتيريا *S.aureus* و *E.coli*.

تم حقن 10 أبقار يوميًا لمدة 5 أيام مقسمة إلى 3 مجموعات، ودراسة التغيرات في عدد ونوعية البكتيريا الموجودة في الحليب وأخذ عينات في بداية التجربة T0 وفي اليوم الخامس Tf . كانت البكتيريا الرئيسية التي تمت دراستها هي *S.aureus* و *E.coli*.

أظهرت نتائج هذه الدراسة الفعالية المضادة للميكروبات للمستخلص الإيثانولي لبكتيريا *S.officinalis L* ضد بكتيريا *S. aureus* و *E. coli* بمناطق تثبيط 25.51 ± 05.34 و 2.26 ± 16.5 عند تركيز 125 مجم/مل و (3.78 ± 25.66) و (01.66 ± 16.03) عند تركيز 62.5 مجم/مل على التوالي . من ناحية أخرى، أظهر المستخلص الإيثانولي لبكتيريا *L.albus L* منطقة تثبيط (3.6 ± 13.69) و (1.65 ± 10.5) ضد *E.coli* و (1.029 ± 11.9) و (02.83 ± 11.47) ضد بكتيريا *S.aureus* بتركيز 125 مجم/مل و 62.5 مجم/مل على التوالي .

أظهرت نتائج الحقن داخل الثدي من *L.albus L* تثبيطاً ضعيفاً ضد الإشريكية القولونية والبكتيريا العنقودية الذهبية.

Abstract

Mastitis, an inflammation of the mammary gland in dairy cows, is a major concern for dairy farms worldwide due to its devastating effects on milk production and quality.

In addition to advanced therapeutic methods, in this study we looked for alternative natural solutions based on the use of medicinal plant extracts to treat bovine mastitis caused by the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of ethanolic extracts (80%) of *S.officinalis L* and *L.albus L*.

10 cows received daily injections for 5 days, divided into 3 groups, studying the evolution of the number and quality of bacteria present in the milk and taking samples at the start of the experiment T0 and on day 5 Tf.

The main bacteria studied were *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

The results of this study showed the antimicrobial efficacy of the ethanolic extract of *S.Officinalis L*. against *S.aureus* and *E.coli*, with zones of inhibition (25.51 ± 05.34 and 16.5 ± 2.26) at a concentration of 125 mg/mL and (25.66 ± 3.78 and 16.03 ± 01.66) at a concentration of 62.5 mg/mL, respectively.

On the other hand, ethanolic extract of *L.albus L*. showed a zone of inhibition (13.69 ± 3.6 and 10.5 ± 1.65) against *E.coli* and (11.9 ± 1.029 and 11.47 ± 02.83) against *S.aureus* at a concentration of 125 mg/ml and 62.5 mg/ml, respectively.

The results of intra-breast injection of *L.albus L* showed weak inhibition against *E.coli* and *S.aureus*.

Liste des Figures

Figure N° 01: Changements dans le microbiome à différents stades de la mammite bovine ...	4
Figure N°02 : Mécanisme de la mammite chez les vaches.	5
Figure N° 03 : la partie aérienne de <i>S. officinalis</i> L..	6
Figure N°04 : Mécanisme d'activité antibactérienne des plantes médicinales vis-à-vis les agents responsables du mammites.....	8
Figure N°05 : Matériels et produits utilisés.....	11
Figure N° 06 : Protocol Expérimentale	12
Figure N°07 : (A) Macération de extraits, (B) Résidus secs.....	13
Figure N°08 : (A)Test de conductivité, (B) Le test de la mammite en Californie et (C) Prélèvement du lait.....	14
Figure N°09 : Etapes d'activités antibactérienne	19
Figure N°10 : (A) Colonies sur le milieu EMB, (B) Colonies sur le milieu Chapman.	22
Figure N°11 : (A) Coloration de Gram <i>E. Coli</i> , (B) Coloration de Gram <i>S. aureus</i>	23
Figure N°12 Résultat de l'identification dans la galerie Api 20E.	24
Figure N°13 : Zone d'inhibition éthanoïque sur <i>S.aureus</i> et <i>E.coli</i>	25
Figure N°14 : Activité antibactérien d'extrait éthanolique de <i>S. officinalis</i> L. contre <i>S. aureus</i> et <i>E. coli</i>	26
Figure N°15 : Activité antibactérien d'extrait éthanolique de <i>L. albus</i> L. contre <i>S. aureus</i> et <i>E. coli</i>	27
Figure N°16 : Dénombrement des Germes totaux, <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> dans le lait contaminé.	28

Listes des Tableaux

Tableau N°01 : Résultat de l'identification biochimique.....	24
---	-----------

Listes des Annexes :

Annexe N°01 : Préparation des extraits éthanoliques

Annexe N°02 : Prélèvement de lait

Annexe N°03. : Isolement et identification des souches

Annexe N°04 : Activité anti bactérienne

Annexe N°05 : Composition de milieu

Listes des Abréviations

ADH : Arginine Di hydrolase

CMT : California Mastitis Test

EMB : Eosine Méthylène Blue

E.coli : *Escherichia coli*

H₂S : Thiosulfate

L.albus : *Lupinus albus L*

LDC : Lysine décarboxylase

MH : Muller Hinton

ODC : Ornithine decarboxydase

ONPG : Onitrophéiul B.D.galactopyranoside

S.officinalis : *Salvia Officinalis L*

Saureus : *Staphylococcus Aureus*

TSI : Triple Sugar Agar

VF : Viande fois

Introduction

La mammite est une pathologie majeure qui affecte les exploitations laitières du monde entier. Se manifestant par une inflammation de la glande mammaire, elle entraîne des pertes économiques significatives en raison de la réduction de la production laitière, de la détérioration de la qualité du lait et des coûts de traitement.

Plusieurs micro-organismes peuvent provoquer une inflammation de la mamelle, dont les bactéries constituent la principale menace pour la glande mammaire. Celles-ci sont souvent contagieuses, largement répandues dans l'environnement des animaux laitiers en favorisant les infections intra-mammaire (**Kibebew et al. 2017**).

Selon leurs caractéristiques, on distingue la mammite clinique caractérisée par la présence de flocons, de caillots ou de sécrétions aqueuses dans le lait où les quartiers infectés sont enflés, chauds et douloureux et concernant la mammite subclinique caractérisé par l'absence des signes observables, se manifeste par l'augmentation du nombre de cellules somatiques, la diminution de la production de lait (**Morales-Ubaldo et al. 2023**).

En Algérie, le problème de la mammite subclinique et de la résistance aux antibiotiques est une préoccupation majeure en médecine animale et humaine (**Ghallache et al. 2021**).

Face à cette préoccupation, les chercheurs se sont orientés vers des sources naturelles plus fiables pour le traitement de la mammite, à savoir les plantes médicinales. Parmi les plantes les plus utilisées dans la région de Tiaret dans leur pharmacopée traditionnelle *Salvia officinalis*, connue localement sous le nom de Miramia, et *Lupinus albus* connu sous le nom de Termes.

Dans cette étude, l'activité antibactérienne d'extraits de *S. officinalis* et de *L. albus* contre des souches isolées du lait contaminé a été évaluée, et leur capacité à réduire la contamination chez les vaches souffrant de mammite a été examinée. En conséquence, l'utilisation de ces extraits de plantes médicinales dans le traitement de la mammite bovine sera renforcée et constituera une alternative aux antibiotiques.

*Recherche
bibliographique*

I. Mammites

1. Définition

La mammite bovine est une réaction inflammatoire des tissus de la mamelle dans les troupeaux laitiers provoquée par un choc physique ou une infection microbienne via des bactéries Gram-positives et Gram-négatives, soit contagieuses de type *Staphylococcus aureus*, soit environnementales y compris les excréments et la surface du sol de type *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. (Grodkowsk et al., 2022; Cheng et al., 2020). Pendant la traite, ils se transmettent des pis infectés aux pis propres par l'intermédiaire des mains contaminées du trayeur et des serviettes en tissu utilisées pour laver ou sécher les pis de nombreux animaux, ainsi que par les mouches (Paramasivam et al., 2023). Cette pathologie entraîne des anomalies dans le lait et donc des pertes économiques (Goulart et al., 2022 ; Gérard et al).

2. Types de mammites en fonction des agents causals

En fonction de l'agent causal, on peut distinguer différents types de mammites bovines (Figure N°01):

a. Infection bactérienne

Est considérée comme la cause principale de la mammite bovine. Plusieurs espèces bactériennes ont été identifiées comme étant les agents responsables de la mammite bovine. Elles sont classées en deux types selon leur origine bactérienne : soit contagieuse, qui peut être transmise d'une vache à l'autre lors de la traite, notamment par *Staphylococcus aureus*, qui vit sur la peau de la mamelle et des trayons, colonise le canal du trayon, s'y fixe et se développe (Fesseha et al., 2021).

➤ **La mammite clinique** : se manifeste par des symptômes visibles, tels qu'un gonflement, une rougeur et/ou une douleur de la mamelle, ainsi qu'une fièvre systémique. Cela entraîne des altérations du lait, y compris des changements de couleur et de consistance, la présence de caillots, des modifications sanguines et chimiques, une acidification ainsi qu'une réduction de la teneur en matières grasses (Mohammed. 2021 ; Argaw et al., 2016).

➤ **La mammite subclinique** : est un type de mammite sans symptômes, ce qui la rend difficile à détecter dans une exploitation laitière ou dans le pis (Moschovas et al., 2023;Haxhij et al., 2022).

b. Mammite environnementale

Elle est provoquée notamment par des agents pathogènes qualifiés d'opportunistes, tels qu'*Escherichia coli*, qui ne vivent normalement pas sur la peau ou dans la mamelle, mais qui pénètrent dans le canal du trayon lorsque la vache entre en contact avec un environnement contaminé (Che et al., 2020). Ces agents pathogènes se trouvent généralement dans les bouses, la litière et le fourrage (Kibebew et al., 2017).

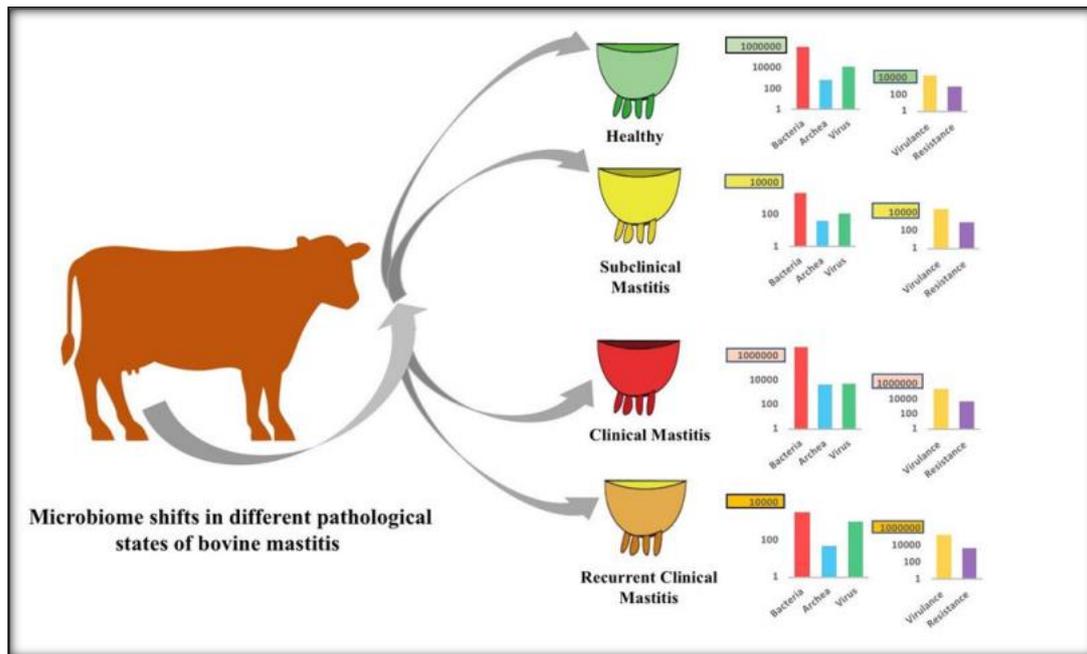


Figure N° 01: Changements dans le microbiome à différents stades de la mammite bovine (Hoque et al., 2021).

3. Mécanisme de la mammite

Lorsque des bactéries pénètrent dans les trayons des vaches, elles activent une réponse immunitaire locale qui implique l'action de sous-produits bactériens tels que le lipopolysaccharide (LPS) ou les vésicules de la membrane externe (OMV). Ces substances sont reconnues par les macrophages grâce à des récepteurs appelés TLR4 ou TLR2, ce qui déclenche une réaction en chaîne impliquant d'autres types de globules blancs, tels que les leucocytes polymorphonucléaires. Cette réaction entraîne la libération de cytokines (IL1, IL6 et TNF) et de chimiokines (interleukine (IL)-8), qui affectent l'ovaire et le corps jaune, perturbant la sécrétion d'hormones essentielles à la reproduction. Cela peut entraîner des problèmes tels qu'un développement folliculaire anormal, un retard de l'œstrus, une augmentation de la mortalité des embryons et une dysplasie embryonnaire (Figure N°02). De plus, la fièvre associée à la mammite peut nuire au développement des ovocytes et des

embryons, ainsi qu'à la nutrition des vaches laitières (Haxhiaj et al., 2022 ; Wang et al., 2021).

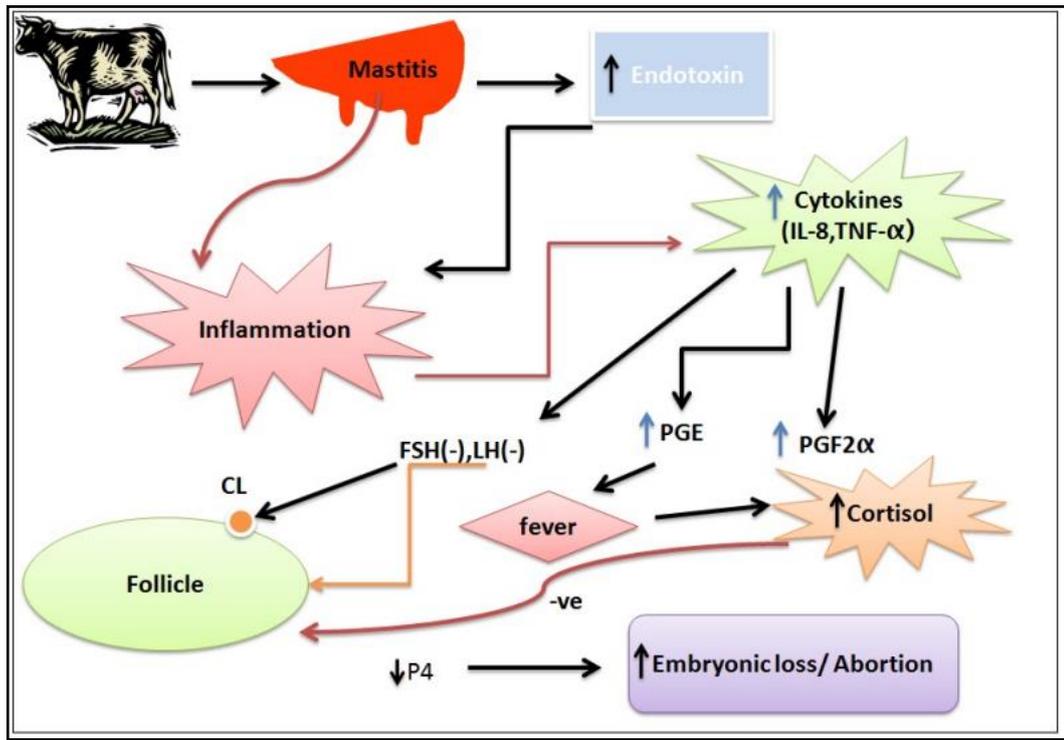


Figure N°02 : Mécanisme de la mammite chez les vaches (Sharma et al., 2017).

II. Pharmacopée traditionnelle

Les plantes médicinales sont des plantes riches en composés bioactifs dans leurs différents organes. Ces composants ont des propriétés thérapeutiques soit directement, soit en entrant dans la fabrication de médicaments (Sofowora et al., 2013). En outre, plusieurs médicaments actuels sont basés sur des plantes médicinales traditionnelles en raison de leurs composés médicinaux (Marrelli. 2021).

I. Description des plantes étudiées

1.1. *Salvia officinalis* L

+ Description

La sauge est sans doute la reine des herbes aromatiques, et l'une des plus anciennes à être cultivée. Elle appartient au genre Lamiaceae, qui comprend plus de 800 espèces de plantes herbacées (annuelles et vivaces) (Vialard. 2013) .

Salvia officinalis L. est une plante à feuilles persistantes, arbustive, atteignant jusqu'à 60 cm de haut, avec des tiges ligneuses et des feuilles poilues, avec des fleurs bleu-violet,

roses ou blanches. Elle pousse généralement dans les zones littorales et les îles le long de la Méditerranée, de l'Adriatique et de la mer Ionienne, ainsi que dans les zones intérieures du sud de la Serbie. Ouest de la Grèce et de la Macédoine (**Jažo et al., 2023**) .

Elle est utilisée pour traiter divers types de troubles, notamment les crises d'épilepsie, les ulcères, la goutte, les rhumatismes, les inflammations, les vertiges, les tremblements, la paralysie, la diarrhée et l'hyperglycémie (**Ghorbani et Esmailizadeh, 2017**).



Figure N° 03 : la partie aérienne de *S. officinalis* L. (**Ghorbani et Esmailizadeh, 2017**).

Classification botanique

La classification scientifique d'espèce *Salvia officinalis* L. (**Mehta.2020**) :

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Subclasse : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Salvia*

Species : *officinalis*

1.2. *Lupinus albus* L.

Description

Le lupin blanc, nom commun *Lupinus albus* L., appartient au genre *Lupinus*, à la famille des Leguminosae ou Fabaceae. Cette variété de lupin est une légumineuse annuelle cultivée qui peut atteindre une hauteur d'environ 120 cm. Elle possède également une forte

tige qui, associée à des racines auxiliaires, peut pénétrer dans le sol jusqu'à une profondeur de 1,5 m (Tounsi-Hammami et al., 2019 ; Petterson. 2004). Ses feuilles sont alternes et comportent de cinq à neuf folioles, presque lisses sur le dessus et poilues sur le dessous (Pereira et al., 2022).

Classification botanique

Règne : Plantae

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Genre : *Lupinus*

Species : *albus*

1.3. Plantes médicinales et mammites

De nombreuses recherches ont récemment été menées sur le développement de traitements alternatifs de la mammite bovine (Abon et Mingala, 2024 ; Mushtaq et al., 2018). Ces traitements sont basés sur les plantes médicinales en raison des propriétés des extraits à éliminer les bactéries pathogènes isolées du lait des vaches atteintes de mammite (Castañeda et al., 2022).

En effet, les plantes médicinales produisent un grand nombre de métabolites secondaires ayant une forte activité antimicrobienne. Ces métabolites peuvent avoir plusieurs effets antimicrobiens, tels que la destruction des parois cellulaires microbiennes, l'induction de la production de radicaux libres, l'inhibition de la formation de biofilms et de la réplication de l'ADN microbien, ainsi que l'inhibition des toxines bactériennes (Liang et al., 2022).

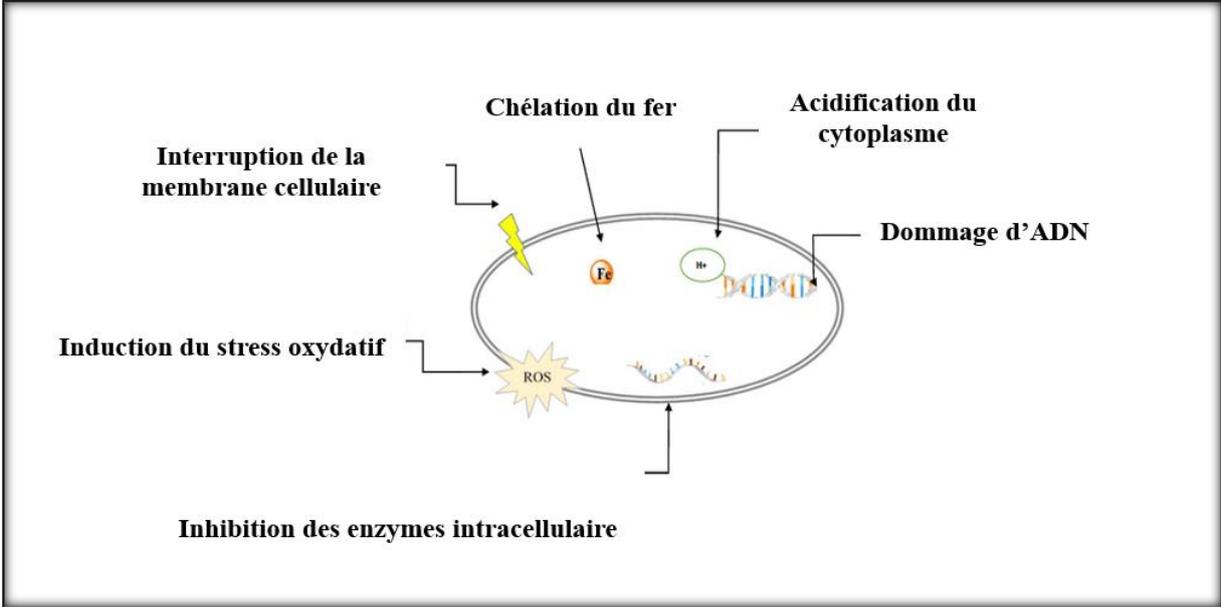


Figure N°04 : Mécanisme d'activité antibactérienne des plantes médicinales vis-à-vis les agents responsables du mammites (Alibi et al., 2021)

Partie

expérimentale

II. Matériels et méthodes

1. Objectifs de travail

L'objectif de notre travail consiste donc à :

- Isoler et identifier certaines souches bactériennes causant des mammites à partir de lait contaminé.
- Evaluation du pouvoir antibactérien d'extraits hydroéthanoliques de *S. officinalis* et *L. albus* contre des souches isolées.
- Élaborer un sous-produit à base de plantes pour le traitement des mammites et le tester in vivo sur les vaches contaminées.

2. Lieu et la durée de travail

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'hygiène et pathologies animales d'institut vétérinaire université Ibn Khaldoun, TIARET. La période de travail était du 11 février au 30 mai 2024.

3. Matériels et produits utilisés

Tout matériel utilisé dans cette étude est représenté dans la figure N°04

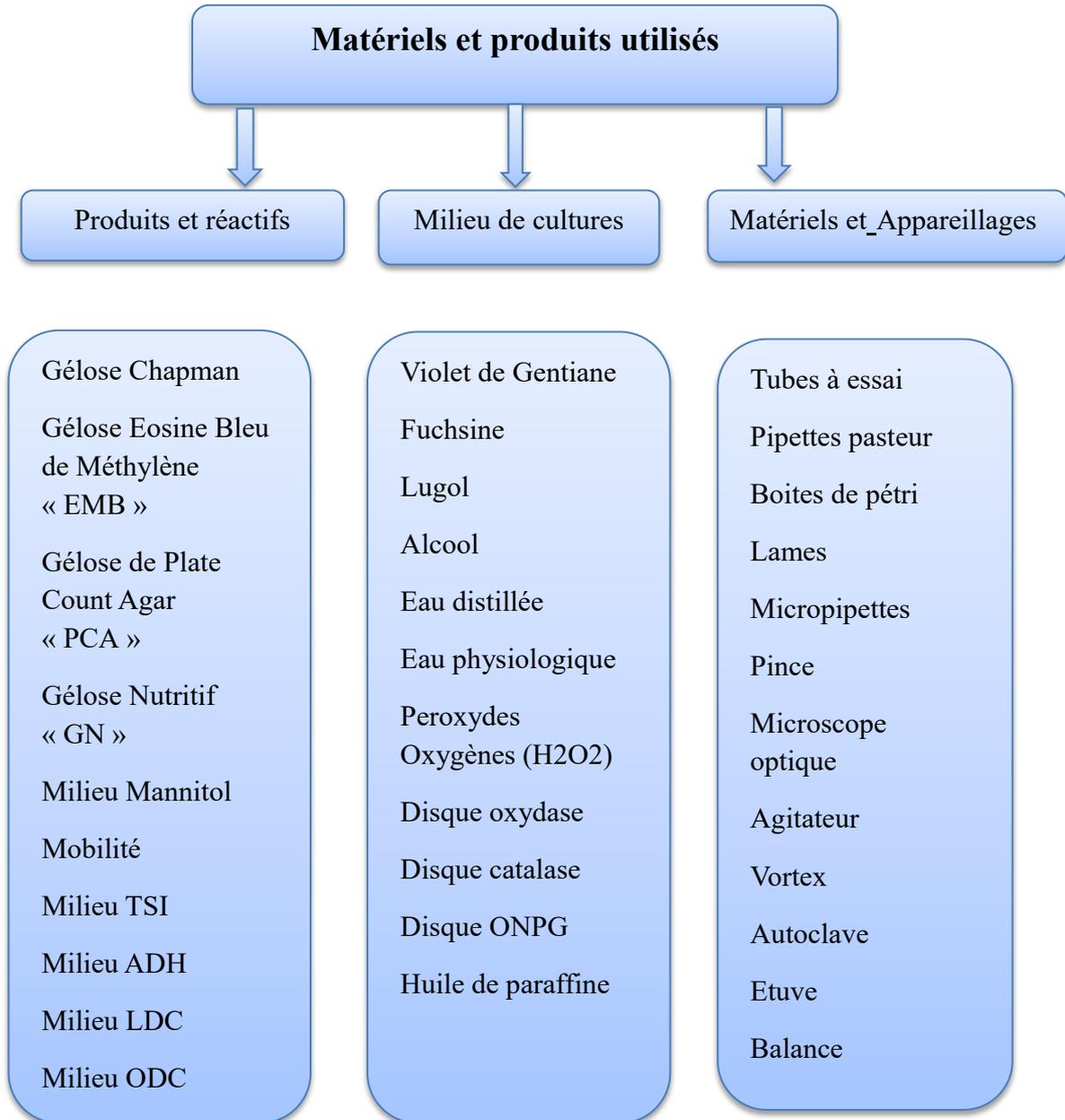


Figure N°05 : Matériels et produits utilisés

4. Protocol Expérimentale:

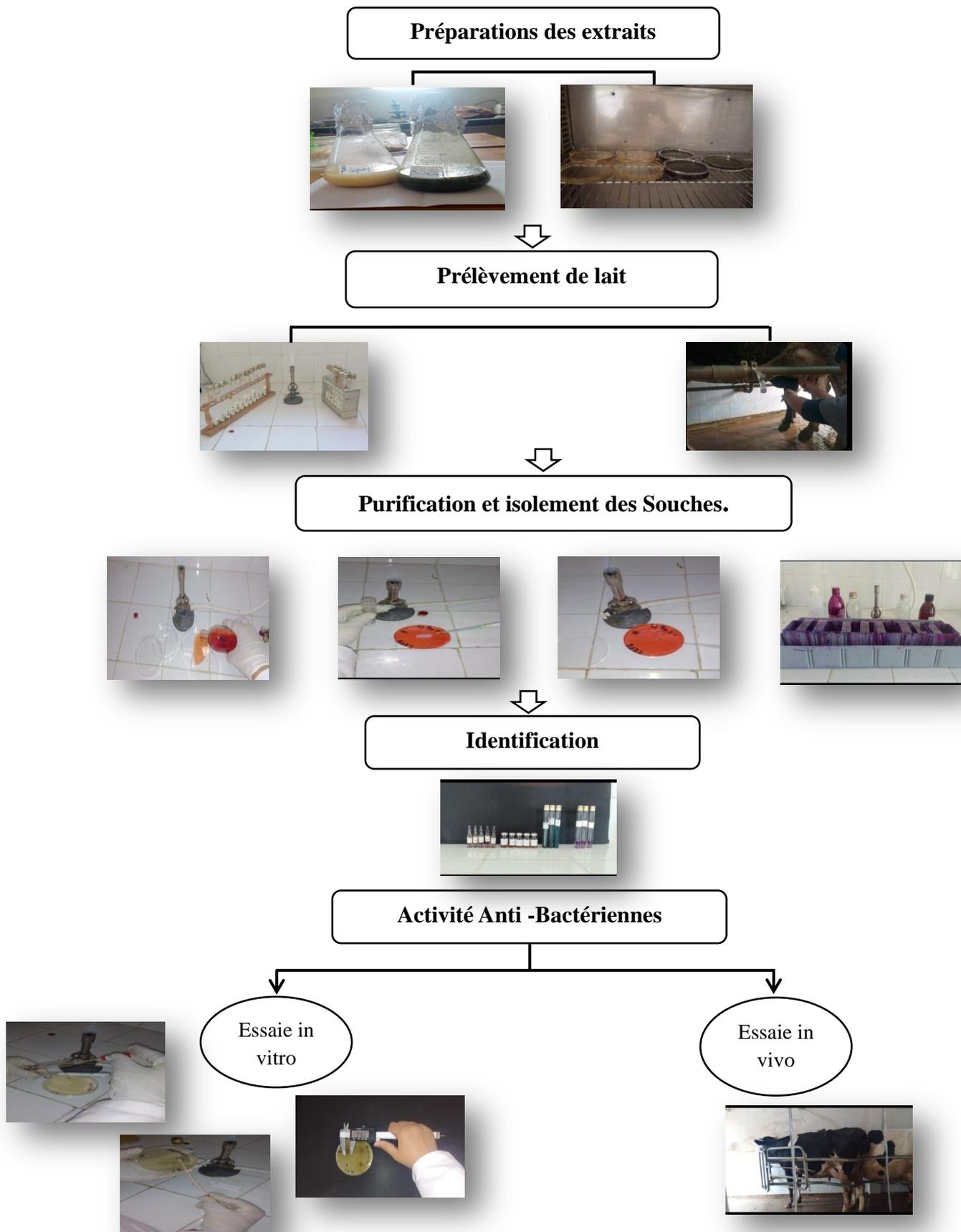


Figure N° 06 : Protocol Expérimentale

5. Préparation des plantes

Les parties aériennes (feuilles et tiges) de *Salvia officinalis* L. (*S. officinalis*) ont été récoltées en janvier 2024 dans la région de Tiaret (Algérie) et les graines de *Lupinus albus* L. (*L. albus*) ont été achetées chez un herboriste de la même région. Ces deux plantes ont été nettoyées, puis séchées dans un endroit sec à température ambiante et à l'abri de la lumière, puis broyées et tamisées en une fine poudre.

6. Préparation des extraits

La préparation des extraits s'est faite par macération. Pour cela, on mélange 10 g de poudre avec 100 ml de solvant éthanol à 80% et on secoue le tout pendant 24 heures à température ambiante. Ensuite, la préparation a été filtrée sur papier filtre et le filtrat récupéré a été placé dans une étuve à 40°C pour le séchage (Ghezelbash et al., 2015).

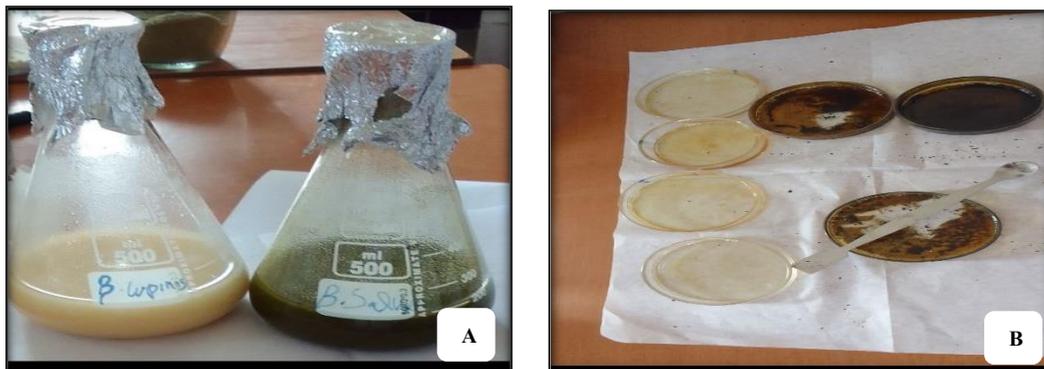


Figure N°07 : (A) Macération de extraits, (B) Résidus secs

7. Partie microbiologique

7.1. Prélèvement et Echantillonnage

La collecte d'échantillons est une étape importante dans la détermination de la qualité du lait. De ce fait, il est essentiel de procéder avec soin et rigueur, en respectant une méthode précise afin d'éviter toute contamination potentielle.

Dans le cadre de cette étude, 56 vaches de la ferme pilote de Bouziane de Boukhtache à Rahouia, Tiaret, et de la ferme pilote de Relizane ont été étudiées. Les vaches comprenaient celles souffrant de mammites subcliniques et chroniques, confirmées par des tests cliniques tels que le California Mastitis Test (CMT) (Figure N°06). Des échantillons de lait ont été prélevés sur le pis dans des tubes stériles après que le premier jets a été nettoyé et jeté. Ces

échantillons ont été identifiés et transportés au laboratoire dans des conditions strictement contrôlées (Boufaïda *et al.*, 2012).



Figure N°08 : (A)Test de conductivité, (B) Le test de la mammite en Californie et (C) Prélèvement du lait.

7.2.Préparation des dilutions et l'ensemencement

Des échantillons de lait de vaches mammites ont été homogénéisés puis dilués à 10^{-3} . La technique de dilution a consisté à prélever 1 ml de chaque échantillon et à les introduire dans des tubes stériles de 9 ml d'eau physiologique stérile (Na Cl).

Afin d'isoler les bactéries, les échantillons ont été étalés à la surface de l'agar sur des boîtes de Pétri contenant des milieux sélectifs stériles. A l'aide d'une micropipette, un volume de 0,1 ml de chaque échantillon a été distribué puis étalé sur toute la surface de la gélose à l'aide du râteau pour les milieux EMB et Chapman. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

7.3. Recherche et dénombrement des bactéries

✓ **Recherche et identification *Escherichia coli* sur milieu Eosine Méthylène Blue « EMB »**

Escherichia coli est une bactérie Gram négatif (-) mobile de la famille des Enterobacteriaceae sous la forme d'un coccobacille aéro-anaérobie facultatif et mobile (Ngyen *et al.*, 2005). Ce germe peut provoquer des mammites subcliniques et cliniques chez les vaches, caractérisées par des changements systémiques, une apparence anormale du lait et une inflammation de la mamelle (Zaatout, 2022 ; Goulart et Mellata, 2022).

L'isolement de cette bactérie a été réalisé par inoculation de surface sur milieu EMB ; chaque échantillon a été placé dans une boîte de Pétri de 0,1 ml puis étalé à l'aide d'un râteau stérile. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures.

✚ **Identification d'*Escherichia coli* par la galerie Api 20 E**

La galerie Api 20 E contient 20 microtubes remplis d'une suspension bactérienne standardisée à l'échelle 0,5 Mc Farland. Des substrats déshydratés sont présents dans ces microtubes pour différents types d'ONPG, ADH, ODC, LDC, citrate de Simmons (CIT), production d'hydrogène sulfuré par réduction du thiosulfate (H₂S), synthèse d'uréase (URE), recherche de tryptophane désaminase (TDA), recherche de puissance indologène (IND), production d'acétone « vogue proskauer » (VP), gélatinase (GEL), recherche d'hydrates de carbone : glucose (GLU), arabinose (ARA), mannose (MAN), inositol (INO), sorbitol (SOR), mannose (RHA), saccharose (SAC), mélioïdose (MEL), amygdaline (AMY) sont indiqués sous chaque microtube. Les réactions peuvent être lues comme des changements de couleur libres ou des ajouts de réactifs.

✓ **Recherche et identification *Staphylococcus aureus* sur milieu chapman**

Staphylococcus aureus est une bactérie à Gram positif, aérobie ou anaérobie facultative, en forme de cocci, et qui a tendance à être disposée en grappes appelées « grappes de raisin ». Ces organismes peuvent se développer sur des milieux contenant jusqu'à 10 % de sel et les colonies sont souvent dorées ou jaunes (Taylor, 2023). Cette bactérie endommage les tissus du trayon et des cellules glandulaires, formant des poches d'infection dans les cellules sécrétrices de lait. Cette infection réduit la production de lait et peut former des tissus cicatriciels et des abcès volumineux dans la glande mammaire (Campos et al., 2022).

Pour l'isolement, chaque échantillon de 0,1 ml est ensemencé en surface sur le milieu de Chapman, puis étalé à l'aide d'un râteau. Ces boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures. L'identification de ces bactéries a été réalisée par des tests culturels, microscopiques et biochimiques.

7.4. Caractérisation des souches

La confirmation des bactéries d'intérêt dans cette étude s'est faite par des caractères morphologiques et biochimiques suivant le manuel de bactériologie systématique de Bergey (Kandler et Weiss, 1986).

✓ **Caractères morphologiques**

Les caractéristiques morphologiques reposent sur deux examens : un examen macroscopique basé sur l'aspect des colonies se développant sur le milieu de culture, et un examen microscopique utilisant la lame d'observation microscopique après coloration de Gram, qui permet d'avoir une idée de la forme et du type de paroi (Gram-positif et Gram-négatif) (Bejot .2021).

✓ **Caractères biochimiques**

a. Test oxydase

✓ **Principe**

Il consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore (Shields et *al*,2016)

✓ **Technique :**

- placer un disque sur une lame à l'aide d'une pince flambée
- Déposer une goutte de réactif sur le Disque
- Déposer une colonie à l'aide de pipette pasteur. (Shields et *al*,2016)

b. Le test catalase :

✓ **Principe :**

Est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène. (Kiener et *al*)

✓ **Technique :**

- Déposer dans une lame une goutte d'eau oxygénée
- Dissocier la colonie prélever dans la goutte. (Kiener et *al*)

c. ONPG :

✓ **Principe :**

Est destiné à la révélation de la B-galactosidase des entéro- bactéries, enzyme nécessaire au métabolisme du lactose (Lowe et *al*; Le minor et *al*; Richarde et *al*).

✓ **Technique :**

- Préparer une suspension bactérienne à partir d'une colonie isolée.
- Placer le disque dans le tube de suspension.
- Incuber dans l'étuve et la lecture après 15 min. (Lowe et *al*; Le minor et *al*; Richarde et *al*).

d. Recherche de l'activité Arginine dihydrolase (ADH), Lysine Décarboxylase (LDC) et Ornithine Décarboxylase (ODC) :

✓ **Principe**

La capacité des bactéries à dégrader un acide aminé (Arginine).

-le métabolisme du glucose se traduit par un virage au jaune si la souche dégrader arginine elle produit va augmenter le ph du milieu (**Hariri et al; El Hachemi et al 2018**).

✓ **Technique**

Ensemencer le milieu additionné d'arginine par une suspension bactérienne puis incubé à 37c°pendant 24h (**Hariri et al; El Hachemi et al 2018**).

e. Triple Sugar Iron (TSI) :

✓ **Principe**

Est utilisée pour la détermination de la fermentation des glucides et de la production de sulfure d'hydrogène dans l'identification des bacilles à gram négatif

(**Tabak et al.,2012**)

✓ **Technique**

On utilise une pipette est ensemencer la colonie dans la gélose inclinée dans le tube puis incubé à 37°c pendant 24 h. (**Tabak et al.,2012**)

f. Mannitol de Mobilité :

✓ **Principe**

-Ce milieu permettant d'étudier deux caractères à savoir la fermentation du mannitol sur le plan biochimique et mobilité de la souche sur le plan morphologique (**Boussena, 2020**).

✓ **Technique**

On utilise une anse de platine pour ensemencer le milieu par pique centrale puis incubé à 37 °c pendant 24h. (**Boussena, 2020**).

g. Urée Indole

✓ **Principe**

Milieu liquide, dénommé aussi milieu de Ferguson, destiné au diagnostic rapide des entérobactéries permettant la recherche de l'uréase, de l'indole (avec le réactif de Kovacs).

✓ **Technique**

- Préparer une suspension bactérienne à partir d'une colonie isolée.
- Ensemencer dans le milieu pour la lecture d'urée.
- Incuber 24heures à 37c°
- Ajouter le réactif de Kovacs pour la lecture d'indole. (**Boussena, 2020**).

h. Viande Foie

✓ **Principe**

Milieu utilisé à la recherche de types respiratoires des bactéries et pour isolements en profondeur pour les anaérobies.

✓ **Technique**

- Ensemencer la colonie isolée à l'aide d'une pipette au fond de tube de milieu
- Incuber à 37°C pendant 24 heures.

i. Citrate de Simmons

✓ **Principe**

Milieu utilisé pour la différenciation des bacilles à gram négatif.

Ce milieu contribue à la mise en évidence des caractères d'identification des Entérobactéries.

(Boussena. 2020)

✓ **Technique**

- Ensemencer la pente du milieu au citrate en stries longitudinales et parallèles à l'aide d'une pipette.
- Incuber à 37°C pendant 24 heures. **(Boussena. 2020)**

8. Activité antibactérienne

✓ **In vitro**

Nous avons évalué l'efficacité antibactérienne des extraits éthanoliques de *S. officinalis* et de *L. albus* contre les souches testées en utilisant la méthode de diffusion par puits. Pour ce faire, des puits de 6 mm de diamètre ont été soigneusement formés dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose Mueller Hinton. Ensuite, une suspension bactérienne de *S. aureus* et *E. coli* standardisée à une échelle de 0,5 McFarland a été inoculée dans les boîtes. Enfin, les extraits éthanoliques de *S. officinalis* et de *L. albus*, à une concentration de 62,5 et 125 mg/ml, ont été ajoutés dans chaque puits.

Après une incubation de 24 heures, les zones d'inhibition ont été mesurées soigneusement en millimètres à l'aide d'un pied à coulisse, conformément aux méthodologies établies par **Wasihun et al., 2023**.

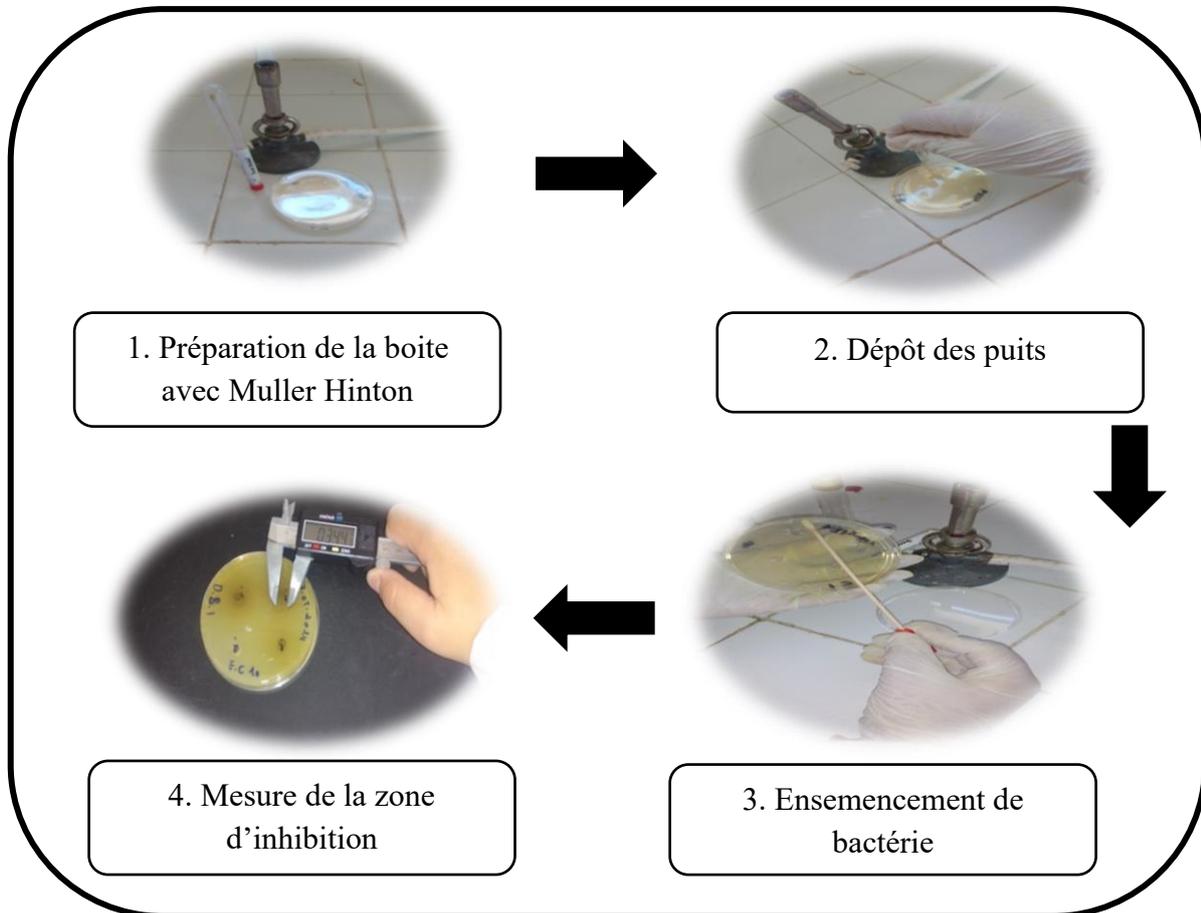


Figure N°09 : Etapes d'activités antibactérienne

✓ **In vivo**

L'activité antibactérienne in vivo a été expérimentée sur 10 vaches à raison d'une injection intra mammaire par jour pendant 5 jours. Elles ont été divisées en 03 lots :

➤ **Lot de test 1b** : 2 vaches injectées avec de l'extrait de *S. officinalis* à 125 mg/ml (EES2).

➤ **Lot d'essai 2a** : 2 vaches contaminées auxquelles on a injecté de l'extrait de *L.albus* à 62,5 mg/ml (GEEL1).

➤ **Lot d'essai 2b** : 2 vaches auxquelles on a injecté de l'extrait de *L.albus* à 125 mg/ml (GEEL2).

Pour évaluer l'effet anti-antibactérien des extraits de plantes sur les vaches, nous avons étudié certaines des bactéries impliquées dans la mammite. Cette recherche était basée sur l'isolement, l'identification et le dénombrement des germes dans le lait. Le lait a été échantillonné au début de l'expérience (T0) et au cinquième jour (Tf). Les principales bactéries retrouvées dans le lait sont : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

9. Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard. On a utilisé le logiciel STATISTICA (version 6.1, Stat,Tulsa.OK) pour l'analyse statistique des données. L'analyse statistique des données a été réalisée par le logiciel STATISTICA (version 6.1). Des comparaisons entre les cinq groupes expérimentaux ont été effectuées au moyen d'une ANOVA à sens unique, complétée par le test LSD. Une valeur p de $<0,05$ a été utilisée comme niveau de signification.

Résultats
et
Discussion

I. Identification des bactéries recherchées

Les résultats de l'identification fondés sur les observations macroscopiques, microscopiques et biochimiques sont présentés dans le tableau N°01. Des colonies bleu-noir avec des reflets verts métallique, dues à la fermentation des hydrates de carbone, apparaissent lors de l'examen macroscopique sur le milieu EMB. Le développement des bactéries sur milieu Chapman donne des colonies jaunes traduisant la fermentation du mannitol et le virage au rouge de phénol.

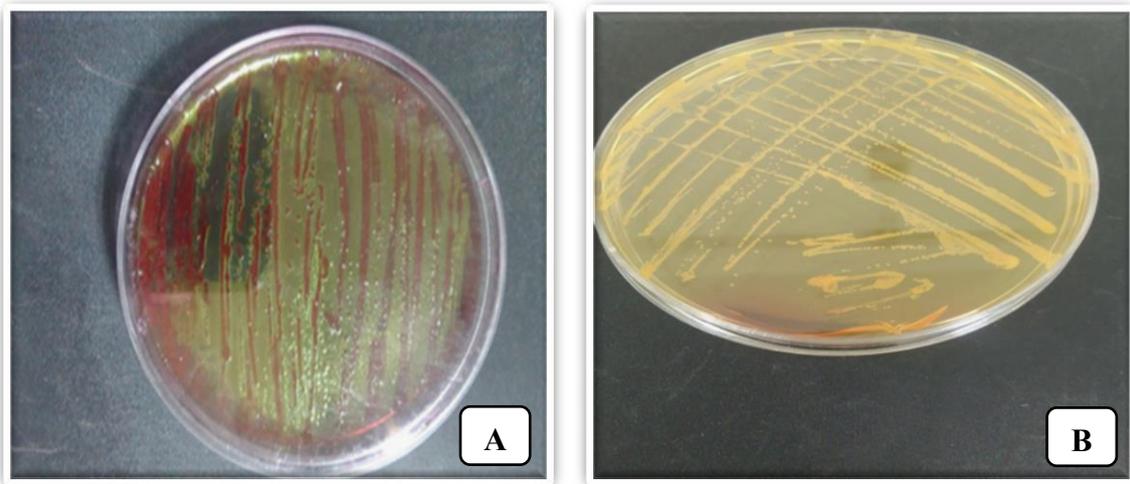


Figure N°10 : (A) Colonies sur le milieu EMB, (B) Colonies sur le milieu Chapman.

En revanche, l'examen microscopique par coloration de Gram montre que les bactéries apparaissant en milieu EMB sont des coccobacilles à Gram négatif. Ceci est confirmé par les travaux de **Megersa et al.** en **2019**, montrent que les isolats d'*E.coli* se caractérisent par un reflet bleu-vert métallique sur la plaque de gélose EMB dans laquelle des coccobacilles à Gram négatif ont été observés individuellement, par paires ou en courtes chaînes.

De plus, les bactéries cultivées dans Chapman sont des cocci Gram-positifs. Notre observation est en accord avec d'autres études qui rapportent que l'observation microscopique de *S. aureus* après coloration de Gram révèle la présence de cocci sous la forme d'un amas à Gram positif (**Jahan et al., 2015**).

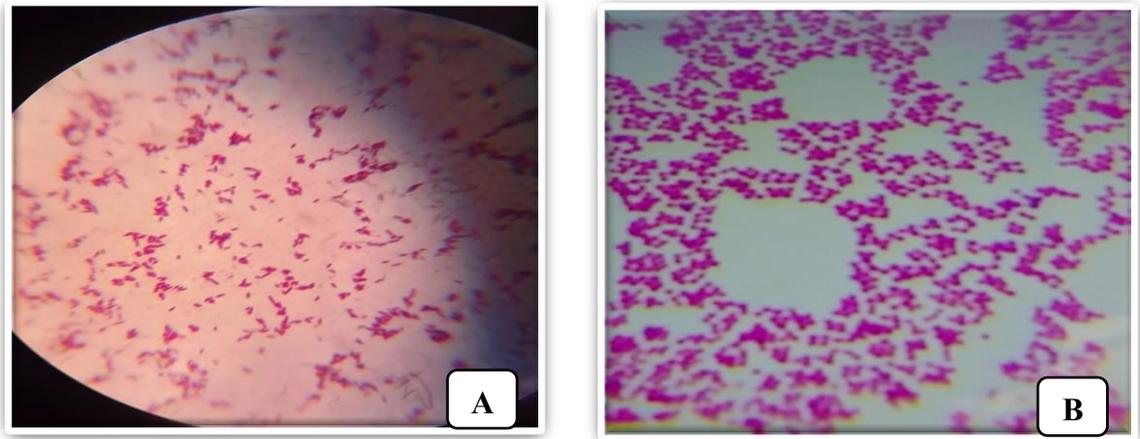


Figure N°11 : (A) Coloration de Gram *E. Coli*, (B) Coloration de Gram *S. aureus*.

On a soumis les bactéries apparaissant sur les milieux de culture à des tests biochimiques réalisés soit par des tests conventionnels (catalase, oxydase, ONPG, TSI, urée-indole, mobilité du mannitol, citrate de Simmons, VP, ADH, LDC, ODC et V.F), soit en utilisant la galerie Api 20E (pour les *E. coli*).

Les résultats obtenus sur milieu **EMB** nous indiquent que la bactérie isolée possède les enzymes β -galactosidase (ONPG), et les décarboxylases LDC, ODC, Indole, et manque de H₂S, Urease (URE), et TDA, et n'utilise pas le citrate comme unique source de carbone.

Le métabolisme de cette espèce porte sur tous les sucres à l'exception de l'inositol et de l'amygdaline. Ces résultats confirment que les colonies obtenues sont des colonies d'*E.coli*.

Des recherches ont également confirmé que les milieux de culture EMB couramment utilisés pour la détection des pathogènes de la mammite à Gram négatif fermentent le lactose et possèdent l'indole et la β galactosidase (ONPG) correspondant au germe d'*E. coli* (Triadi et al., 2022).

Tableau N°01 : Résultat de l'identification biochimique

Les souches		S. Aureus	E. Coli
Les testes			
Oxydase		-	-
Catalase		+	+
ONPG		(-)	+
ODC/ LDC / ADH		+ / + / -	+ / + / -
TSI	Lactose -	+	+
	Saccharose		
	D-Glucose	+	+
	Gaz	-	+
H2S2		(+)	-
Mannitol de Mobilité		+	+
Indole		-	+
Urée		(+)	-
Citrate de Simmons		+	-
Viande fois		Aéro-anarobié	Aéro-anorobié

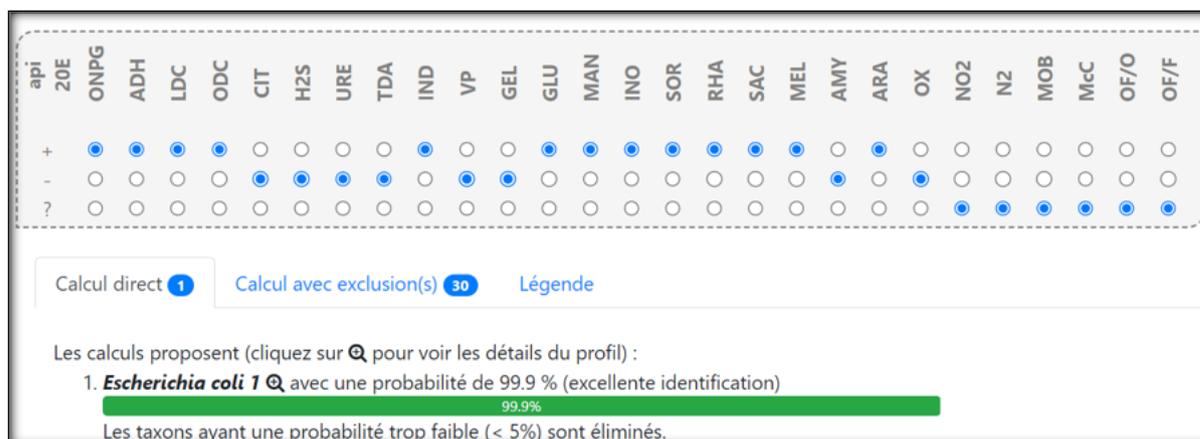


Figure N°12 Résultat de l'identification dans la galerie Api 20E.

Les résultats obtenus ont été analysés à l'aide de logiciel d'identification « **apiweb** ».

Les germes isolés sur milieu Chapman n'ont pas d'activité enzymatique β -galactosidase (ONPG) ou ADH, mais présentent une activité LDC et ODC décarboxylase. Elle est mobile, capable de dégrader le mannitol, produit du H₂S et de l'uréase (URE). Par ailleurs, elle utilise

le citrate comme seule source de carbone. Ces résultats ont permis d'identifier l'espèce *S. aureus* (Karmakar et al., 2016; Gandara et al., 2006.

II. Evaluation de l'activité Antibactérienne

✓ In vitro

Nous avons évalué l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique (80%) de *S.officinalis* et de *L. albus* contre les deux souches isolées, *E. coli* à Gram négatif et une à Gram positif *S. aureus*. Le pouvoir antibactérien a été estimé par le diamètre de la zone d'inhibition (Figure N°13). Un contrôle négatif a été effectué avec le solvant "éthanol 80%" qui n'a pas montré d'effet antibactérien sur les souches testées.



Figure N°13 : Zone d'inhibition éthanolique sur *S.aureus* et *E.coli*.

Le pouvoir antibactérien de l'extrait éthanolique de *S. officinalis* est de (16.5 ± 02.26 et 25.51 ± 05.34 mm) à une concentration de 125 mg/ml et pour 62.5 mg/ml de 25.66 ± 03.78 et 16.03 ± 01.66 mm) contre *S. aureus* et *E. coli*.

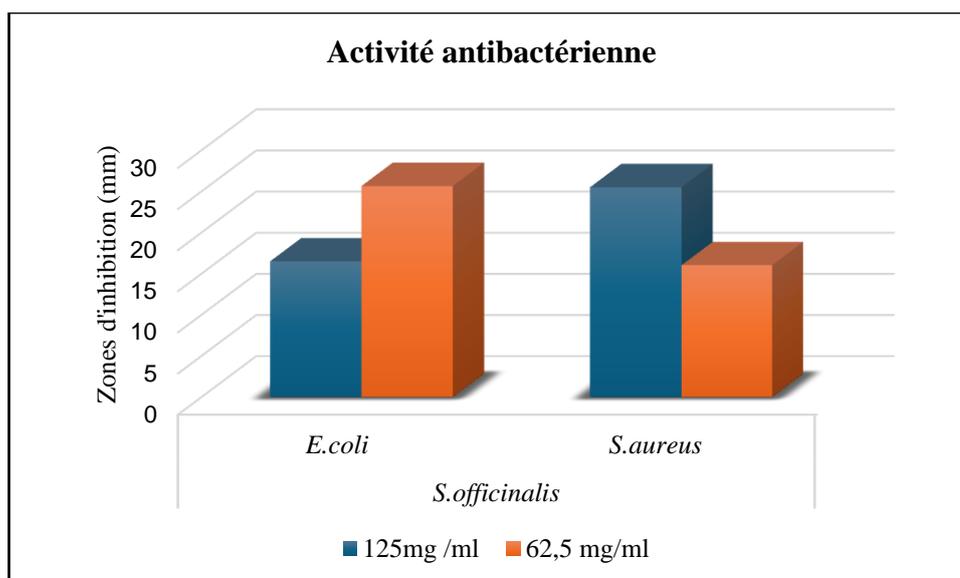


Figure N°14 : Activité antibactérien d'extrait éthanologique de *S. officinalis* L. contre *S. aureus* et *E. coli*.

Ces résultats corroborent ceux obtenus par **Al-Qaysi et Al-Tulaibawi, 2022**, montrant que l'extrait éthanologique de *S. officinalis* exerce un effet antibactérien contre les deux souches isolées avec une zone d'inhibition de 30,66 mm pour *S. aureus* et 29,50 mm pour *E. coli* à la concentration de 62,5 mg/ml et de 34,5 et 31,33 mm contre *S. aureus* et *E. coli* à la concentration de 125 mg/ml. En parallèle, d'autres études révèlent le pouvoir antibactérienne des extraits de *S. officinalis* contre *S. aureus* et *E.coli* (**Gezelbesh et al., 2015 ; Mosafa et al., 2004**).

En effet, La concentration de l'extrait éthanol de *S. officinalis* de 5 mg/ml a montré une activité antibactérienne plus forte vis-à-vis de la bactérie *S. aureus* (9 mm) (**Haziri et al., 2018**).

L'extrait éthanologique (70%) de *S. officinalis* exerce une meilleure activité antibactérienne pour *S. aureus* et *E. coli* (**Hemeg et al., 2020**). Dans le même sens, **Bouteldja et al, 2021**, ont révélé l'efficacité antibactérienne les extraits méthanolique, éthanologique et aqueux de *S. officinalis* envers les souches bactériennes à Gram positif et à Gram négatif, y compris *S. aureus* et *E. coli*.

Par ailleurs, une étude réalisée sur l'huile essentielle et l'extrait éthanologique de *S. officinalis* L. a démontré un effet inhibiteur notable sur la croissance d'*E. coli* (**Ghorbani et al., 2017, Benkherara et al., 2015**).

En ce qui concerne l'extrait éthanolique de *L. albus*, l'activité antibactérienne a atteint ($10,5 \pm 01,65$ et $13,69 \pm 03,6$ mm) contre *E. coli* et ($11,47 \pm 02,83$ et $11,9 \pm 01,02$ mm) vis-à-vis *S. aureus* pour 125 et 62,5 mg/ml.

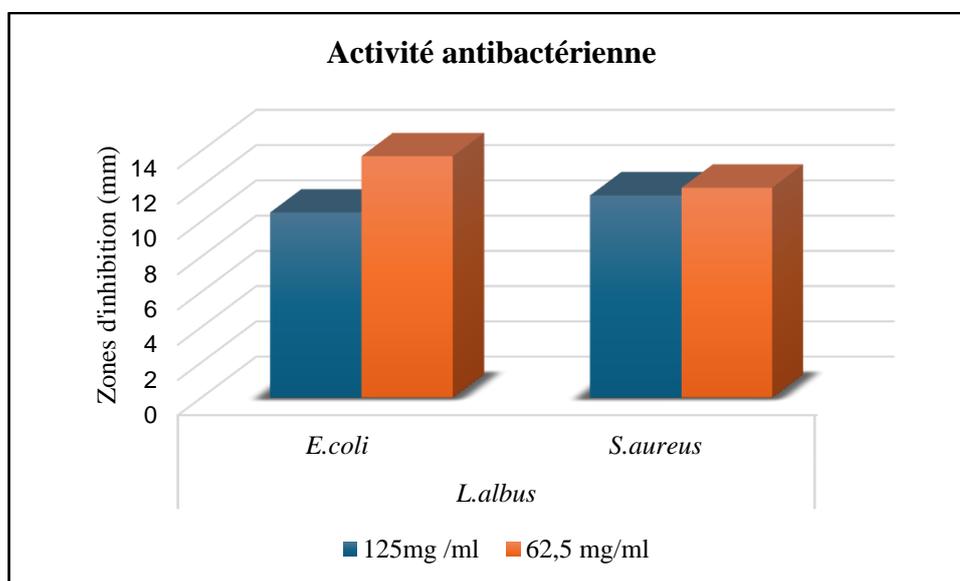


Figure N°15 : Activité antibactérien d'extrait éthanolique de *L. albus* L. contre *S. aureus* et *E. coli*.

Nos résultats sont en désaccord avec les travaux d'**Andor et al., 2016**, qui montrent dans leurs recherches que l'extrait de *L. albus* L. n'a pas d'effet inhibiteur vis-à-vis de *S. aureus* et d'*E. coli*. En outre, les huiles essentielles de *L. albus* ayant un effet inhibiteur contre *S. aureus* (**Al Amrousi et al., 2022**). Les recherches menées sur les extraits éthanoliques et méthanoliques de *L. albus* révèlent un effet inhibiteur sur la croissance de *S. aureus* et *E. coli*, avec des zones d'inhibition variant de 08 à 12 mm (**Rabai et al., 2020**).

En 2020, **Addisu et Sisay**, ont démontré, lors de leur étude sur la capacité antibactérienne des extraits de graines de lupin torréfiées et non torréfiées envers les bactéries Gram-positives (*S. aureus*) et Gram-négatives (*E. coli*), que les extraits de graines non torréfiées avaient un fort pouvoir antibactérien contre *E. coli* et *S. aureus*.

L'activité antibactérienne de *L. albus* et *S. officinalis* dû à la présence des composés bioactif. Ceci peut être essentiel pour inhiber les bactéries pathogènes (**Bouteldja et al., 2021, Karmać et al., 2018**).

Le mécanisme éventuel de l'activité antibactérienne des extraits de plantes médicinales implique une diminution du pH cytoplasmique et une perturbation de la paroi cellulaire (**Álvarez-Martínez et al., 2021, Gonelimali et al., 2018**).

✓ **In vivo**

Les résultats du dénombrement des germes totaux, *E. coli* et *S. aureus* à T0 et Tf sont présentés dans la **figure N°14**. Ces résultats ne montrent pas de différence significative entre les trois groupes expérimentaux à T0.

Par ailleurs, la numération des germes totaux à Tf a montré une réduction hautement significative ($p=0,001$) chez les vaches injectées avec l'extrait de *L. albus* "GEEL2" à 125 mg/ml par rapport au groupe **GEEL1** (62,5mg/ml) ($2,32 \pm 0,22$ UFC/ml vs. $3,25 \pm 0,61$ UFC/ml respectivement).

Parallèlement, une différence significative ($p < 0,05$) a été observée entre le groupe **GEEL1** ($2,32 \pm 0,22$ UFC/ml) et le groupe **GEES2** (2,64 UFC/ml).

On outre le dénombrement d'*E.coli* à Tf signale une réduction significative ($p < 0,05$) chez le groupe GEEL2 par rapport le groupe GEEL1 ($2,24 \pm 0,21$ UFC/ml contre $1,19 \pm 0,85$ UFC/ml respectivement).

En revanche, il n'y avait pas de différence signalé pour *S. aureus* ($2 \pm 0,63$; $2,25 \pm 0,11$ et $2,05$ UFC/ml) pour les groupes GEEL1, GEEL2 et GEES2.

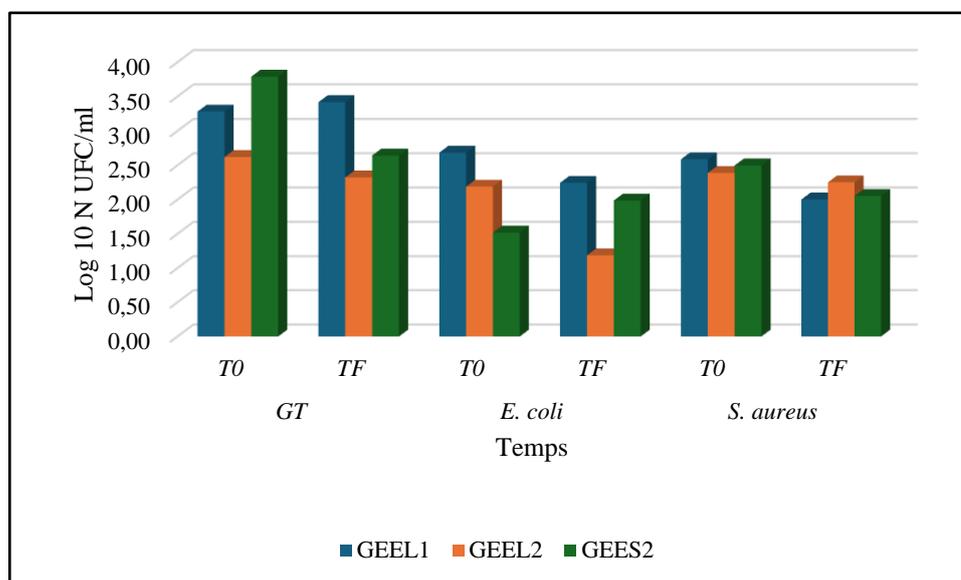


Figure N°16 : Dénombrement des Germes totaux, *E. coli* et *S. aureus* dans le lait contaminé.

Nos résultats sont validés par les travaux d'**Ueda et al, 2021**, montrant des différences très significatives des germes totaux dans les yaourts dopés à la sauge.

En effet, l'utilisation de l'extrait d'hydro-éthanol de *S. officinalis* L. a permis de réduire significativement les croissances microbiennes ($p \leq 0,05$) (**Mehdizadeh et al., 2019**).

En **2023**, une expérience a été menée sur des steaks hachés traités avec des extraits de plantes, qui a montré une réduction du nombre total de bactéries mésophiles, de *S. aureus* et de *E. coli* (**Malek mohammadi et al., 2023**).

Une augmentation du nombre total de bactéries mésophiles a été détectée et considérée comme un signe de mammite associé à une activité enzymatique accrue, qui peut endommager les composants du lait et entraîner des défauts du produit (**Fereja et al., 2023, Yuan et al., 2022, Rodrigues et al., 2017**). Cette augmentation peut être due à la contamination initiale de la surface de la mamelle, à la qualité de l'eau de nettoyage, aux ustensiles de traite, à l'élimination des déchets, au nettoyage des environnements de vente et à l'état de l'hygiène personnelle (**Abera et Angaw, 2015**).

Cette étude illustre la capacité antibactérienne de l'extrait éthanolique (80 %) de *S. officinalis* et de *L. albus*. Il est suggéré que cette capacité antibactérienne est liée à la richesse de ces extraits en composés bioactifs, notamment en polyphénols et flavonoïdes. Ceux-ci ont un effet inhibiteur sur les bactéries Gram-positives et Gram-négatives (**Calvo et al., 2023**).

En outre, les polyphénols sont capables d'inhiber la croissance bactérienne en générant de l' H_2O_2 , ce qui entraîne l'induction d'un stress oxydatif chez les bactéries (**Taleb et al., 2016**).

Les composés bioactifs ont démontré une activité antibactérienne significative par le biais d'une grande variété de mécanismes, ciblant la paroi cellulaire, la membrane lipidique, les récepteurs membranaires et les canaux ioniques, ainsi que les métabolites bactériens (**Álvarez-Martínez et al., 2020 ; Magdalena et al., 2020**).

Conclusion

La mammite bovine est une infection bactérienne qui affecte les vaches laitières et représente un problème économique majeur pour l'industrie laitière. Au-delà d'être la maladie la plus coûteuse du secteur, elle altère la qualité du lait, en le rendant impropre à la consommation et en menaçant la santé des consommateurs.

Il est connu que les composés bioactifs exercent divers effets biologiques y compris la capacité d'inhiber les souches bactériennes responsable de mammite par plusieurs mécanismes.

Dans cet axe que notre travail s'intéresse à l'évaluation de l'effet des extraits des plantes médicinales sur les souches responsable d'induction de la mammite. De ce fait, des études in-vitro et in-vivo ont été réalisés sur des vaches contaminés traité par des doses journalières « 62,5mg et 125mg/ml » pour voir les altérations qualitatives et quantitatives.

L'isolement et l'identification des bactéries dans le lait des vaches infectées par la mammite ont montré la présence de différentes souches, dont les germes totaux, *E. Coli* et *S. aureus*.

Le pouvoir antibactérien de l'extrait éthanolique de *S. officinalis* est de (16.5 ± 02.26 et 25.51 ± 05.34 mm) et de (25.66 ± 03.78 et 16.03 ± 01.66 mm) à une concentration de 125 mg/ml et pour 62.5 mg/ml vis-à-vis *S. aureus* et *E. coli* respectivement. Pour l'extrait éthanolique de *L. albus*, l'activité antibactérienne a atteint ($10,5 \pm 01,65$ et $13,69 \pm 03,6$ mm) et ($11,47 \pm 02,83$ et $11,9 \pm 01,02$ mm) pour *E. coli* et *S. aureus* pour 125 et 62,5 mg/ml respectivement.

Pour le dénombrement des germes totaux à Tf a montré une diminution chez les vaches injectées avec l'extrait de *S. officinalis* "GEES2" à 125 mg/ml de 30,35% et évaluée à 11,45% chez le groupe des vaches injectées avec l'extrait de *L. albus* à 125mg/ml (GEEL2). Parallèlement, le dénombrement d'*E.coli* à Tf signale une réduction de 45,66, 30,92 et 16,16 % chez le groupe GEEL2, GEES2 et de GEEL1 respectivement. En outre, *S. aureus* une diminution de 22,77% (GEEL1) ; 5,85% (GEEL2) et 8% (GEES2).

En conclusion, tous ces résultats obtenus dans ce travail démontrent la possibilité d'utiliser l'extrait éthanolique des plantes *S. officinalis* et *L. albus* comme traitement naturel de la mammite via l'inhibition des bactéries causales grâce à leur richesse en polyphénols, flavonoïdes et antioxydants.

Afin de consolider ces résultats, et dans la continuité de ce travail, plusieurs perspectives peuvent être envisagées. Il serait très intéressant de :

- ✓ Poursuivre l'étude de l'influence des extraits éthanoliques de *S. officinalis* et de *L. albus* sur les bactéries responsables des mammites.
- ✓ Réaliser une autre étude in vivo avec un grand nombre de vaches contaminées pour confirmer l'efficacité des extraits de *S. officinalis* et de *L. albus* sur les mammites.

Références

A

Abera Yohannis, Angaw Mesfin. 2015. Handling Practice and Microbial Quality of Raw Cow's Milk Produced and Marketed In Adigrat Town, North Eastern Tigray. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 5(15): 160-169.

Addisu Tamir and Sisay Awoke. 2020.PHYTOCHEMICAL SCREENING AND STUDY OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ROASTED AND UNROASTED SOAKED WHITE LUPINUS ALBUS SEED GROWS IN AWI ZONE, ETHIOPIA *Int. J. of Adv. Res.* **8** (Sep). 292-300.

Alibi Sana, Crespo Dámaso, Navas Jesus. 2021. Plant-Derivatives Small Molecules with Antibacterial Activity. *Antibiotics*, 10 (231): 1-20. 10.3390/antibiotics10030231.

Al-Qaysi, D.B.A., Al-Tulaibawi, N.A.J. (2022). Antibacterial efficacy of *Salvia officinalis* extract against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *International Journal of Design & Nature and Ecodynamics*, 17 (5): 789-794. <https://doi.org/10.18280/ijdne.170518>

Álvarez-Martínez F. Barrajión-Catalán J., E., Herranz-López M., Micol V. 2021. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine*, 90, 153626: 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153626>.

Argaw Amare. 2016. Review on Epidemiology of Clinical and Subclinical Mastitis on Dairy Cows. *Food Science and Quality Management*, 52: (56-65).

B

Bejot J., « GRAM DE COLORATION », Encyclopædia Universalis, site en ligne, **2021.**

Boussena S., « Manuel des Travaux Pratiques de Bactériologie », 2020, Institut des Sciences Vétérinaires, Département de Productions Animales, université Biskra.

C

Calvo Lorena G., Aly Castillo Rosa-Antía Villarino, José Luis R. Rama, Ana G. Abril, and Trinidad de Miguel. 2023. "Study of the Antibacterial Activity of Rich Polyphenolic Extracts Obtained from *Cytisus scoparius* against Foodborne Pathogens" *Antibiotics* 12 (11): 1645. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111645>.

Campos Bruno, Pickering Amy C., Rocha Lis Souza, Aguilar Ananda Pereira, Fabres-Klein Mary Hellen, Mendes Tiago Antônio de Oliveira, Fitzgerald J. Ross, Andrea de Ribon Oliveira Barros. 2022. Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: current understanding and future perspectives. *BMC Vet Res.* 24;18(1):115. doi: 10.1186/s12917-022-03197-5.

Cheng WN, Han SG. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2020 Nov;33(11):1699-1713. doi: 10.5713/ajas.20.0156. Epub 2020 May 12. PMID: 32777908; PMCID: PMC7649072.

D

DELARRAS Camille. Pratique en microbiologie de laboratoire ? Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Lavoisier, 2014 - 772 pages.

E

Ema FA, Shanta RN, Rahman MZ, Islam MA, Khatun MM. 2022. Isolation, identification, and antibiogram studies of *Escherichia coli* from ready-to-eat foods in Mymensingh, Bangladesh. *Vet World,* 15(6):1497-1505. doi: 10.14202/vetworld.2022.1497-1505.

F

Fereja Abebe Bereda, Aboretugn Nigussu Fekade, Bulti Nigatu Qiltu. 2023. Determination of Microbial Hygiene Indicators of Raw Cow Milk in Assosa District, Ethiopia. *Journal of Food Quality,* 6769108, 1- 6 . <https://doi.org/10.1155/2023/6769108>

Fesseha Haben, Mathewos Mesfin, Aliye Saliman, Wolde Amanuel. 2021. Study on Prevalence of Bovine Mastitis and Associated Risk Factors in Dairy Farms of Modjo Town and Suburbs, Central Oromia, Ethiopia. *Veterinary Medicine: Research and Reports,* 12:271-283 <https://doi.org/10.2147/VMRR.S323460>.

Francisco Javier Álvarez-Martínez, Enrique Barrajon-Catalán, José Antonio Encinar, Juan Carlos Rodríguez-Díaz, Vicente Micol. 2019. Antimicrobial Capacity of Plant Polyphenols against Gram-positive Bacteria: A Comprehensive Review. *Current Medicinal Chemistry,* 26 : 1-29.

G

Gandara A, Mota LC, Flores C, Perez HR, Green CF, Gibbs SG. 2006. Isolation of *Staphylococcus aureus* and antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* from residential indoor bioaerosols. *Environ Health Perspect*, 114(12):1859-64. doi: 10.1289/ehp.9585.

Gérard et al, (2010), les mammites, France, Agricole, P 6.

Ghallache Loubna, Abdellah Mohamed-Cherif, China Bernard, Mebkhout Faiza, Boilattabi Nesrine, Bouchemal Alaoua, Rebia Ahmed, Ayachi Ammar, Khelef Djemel, Miroud Kamel, Khatima Ait-Oudhia. 2021. Isolated from Bovine Subclinical Mastitis of Dairy Farms in Algeria from 2017 to 2019. *World's Veterinary*, 11(3): 402-415.

Ghorbani Ahmad, Esmailizadeh Mahdi.2017. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J Tradit Complement Med*, 13;7(4):433-440. doi: 10.1016/j.jtcme.2016.12.014. PMID: 29034191; PMCID: PMC5634728.

Gonelimali Faraja D., Lin Jiheng, Miao Wenhua, Xuan Jinghu, Charles Fedrick, Chen Meiling, Hatab Shaimaa R. 2018. Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms. *Front Microbiol*, 24(9):1639. doi: 10.3389/fmicb.2018.01639.

Goulart DB, Mellata M. Escherichia coli Mastitis in Dairy Cattle: Etiology, Diagnosis, and Treatment Challenges. Front Microbiol. 2022 Jul 7(13):928346. doi: 10.3389/fmicb.2022.928346 . PMID: 35875575; PMCID: PMC9301288.

Goulart Débora Brito, Mellata Melha. 2022. Escherichia coli Mastitis in Dairy Cattle: Etiology, Diagnosis, and Treatment Challenges. Front Microbiol. Jul 7;13:928346. doi: 10.3389/fmicb.2022.928346.

Grzegorz Grodkowski, Tomasz Szwaczkowski, Krzysztof Koszela, Wojciech Mueller, Kamila Tomaszuk, Ton Baars & Tomasz Sakowski. 2022. Early detection of mastitis in cows using the system based on 3D motions detectors. *Scientific Reports*, 12, 21215. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25275-2>.

H

Hariri A., Ouis N., Sahnouni F., Djilali B., Rev. Microbiol. Ind. San et Environ, 2009, 37-55.

Haxhiaj Klevis, David S. Wishart, and Burim N. Ametaj. 2022. "Mastitis: What It Is, Current Diagnostics, and the Potential of Metabolomics to Identify New Predictive Biomarkers" *Dairy* 3, no. 4: 722-746. <https://doi.org/10.3390/dairy3040050>

Hemeg Hassan A., Moussa Ihab M., Ibrahim Sherin, Dawoud Turki M., Alhaji Jwahr H., Mubarak Ayman, Kabli Saleh A., Alsubki Roua A., Tawfik Azza M. , Marouf Sherif A..2022. Antimicrobial effect of different herbal plant extracts against different microbial population. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12):3221-3227. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.08. 015.

Hoque M. Nazmul, Sultana Munawar, Hossain M. Anwar. 2021. Dynamic Changes in Microbiome Composition and Genomic Functional Potentials in Bovine Mastitis. *Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics*, 12 (1):1000232.

J

Jahan Mueena, Rahman Marzia, Parvej Shafiullah, Chowdhury Shah Ziqrul Haq, Haque Enamul, Talukder Abdul Khaleque, Ahmed Sultan. 2015. Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* from raw cow milk in Bangladesh. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 2(1): 49-55. DOI: 10.5455/javar.2015.b47.

Jažo Zvonimir, Glumac Mateo, Paštar Vlatka, Bektić Sanida, Radan Mila, Carev Ivana. 2023. Chemical Composition and Biological Activity of *Salvia officinalis* L. Essential Oil. *Plants (Basel)*, 27;12(9):1794. doi:10.3390/plants12091794.

K

Karmakar Amit, Dua Parimal, Ghosh Chandradipa. 2016. Biochemical and Molecular Analysis of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates from Hospitalized Patients *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2016 (7): 1-7. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9041636>

Kibebew Kinfe. 2017. Bovine Mastitis: A Review of Causes and Epidemiological Point of

L

le MINOR L. et Ben Hamida E., Avantages de la recherche de la B-galactosidase sur celle de la fermentation du lactose en milieu complexe dans le diagnostic bacteriologique en particulier de enterobacteries *Ann. Inst Pasteur* 1962.Vol 102p. 267-277.

M

Magdalena Efenberger-Szmechtyk, Agnieszka Nowak, Agata Czyzowska. 2020. Plant extracts rich in polyphenols: antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI: 10.1080/10408398.2020.1722060

Malekmohammadi Maedeh, Babak Ghanbarzadeh, Shahram Hanifian, Hossein Samadi Kafil, Mehdi Gharekhani, and Pasquale M. Falcone. 2023. "The Gelatin-Coated Nanostructured Lipid Carrier (NLC) Containing *Salvia officinalis* Extract: Optimization by Combined D-Optimal Design and Its Application to Improve the Quality Parameters of Beef Burger" *Foods* 12, no. 20: 3737. <https://doi.org/10.3390/foods12203737>

Marrelli Mariangela. 2021. Medicinal Plants. *Plants (Basel)*, 2;10(7):1355. doi: 10.3390/plants10071355.

Megersa Rundasa, Mathewos Mesfin, Fesseha Haben. 2019. Isolation and Identification of *Escherichia coli* from Dairy Cow Raw Milk in Bishoftu Town, Central Ethiopia. *Archives of Veterinary and Animal Sciences*, 1(1) :1-7.

Mehdizadeh Tooraj, Tajik Hossein, Jafarie Sima, Kaboudari Ata. 2019. Effect of *Salvia officinalis* L. extract on chemical, microbial, sensory and shelf life of rainbow trout fillet. *Food Sci Biotechnol*, 28(5):1499-1506. doi: 10.1007/s10068-019-00575-y.

Mehta Devansh. 2020. Chapter 15. Alzheimer: Possible medicinal plants which can cure this threatening disease. In *Essence of My Research Endeavor*. BlueRose Publishers, page 59-90.

Mohammed Zeravan A. 2021. Association between clinical and subclinical mastitis and reproductive performance of cows at Nottingham dairy centre. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 35 (2) : 343-350. DOI: 10.33899/ijvs.2020.126843.1398.

Morales-Ubaldo AL, Rivero-Perez N, Valladares-Carranza B, Velázquez-Ordoñez V, Delgadillo-Ruiz L, Zaragoza-Bastida A. 2023. Bovine mastitis, a worldwide impact disease: Prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. *Vet Anim Sci.*, 21:100306. doi: 10.1016/j.vas.2023.100306.

Moschovas Marios, Pavlatos Georgios, Basdagianni Zoitsa, Manassis Georgios and Bossis Ioannis. 2023. A Cross-Sectional Study of Risk Factors Affecting Milk Quality in Dairy Cows. *Animals*, 13, 3470. <https://doi.org/10.3390/ani13223470>.

Mushtaq Saleem , Shah Aabid Manzoor , Shah Aiyatullah , Ahmad Lone Sajad, Hussain Ahtesham , Hassan Qazi Parvaiz , Ali Md Niamat. 2018. Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. *Microbial Pathogenesis*, **114**, 357-361. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.024>

P

Pereira Ana, Ramos Fernando, Sanches Silva Ana. 2022. Lupin (*Lupinus albus* L.) Seeds: Balancing the Good and the Bad and Addressing Future Challenges. *Molecules*, **5**;27(23):8557. doi: 10.3390/molecules27238557.

Petterson D.S. 2004. Lupin |overview. *Encyclopedia of Grain Science*, **166-174**. <https://doi.org/10.1016/B0-12-765490-9/00083-5>

R

RABAI M., Bouteldja Rachida, radhouane Doucene , AGGAD Hebib. (2021). *Lupinus albus* seeds extracts: phytochemical screening and antibacterial activity. *LIV*. 91-98.

Richard C., Technique de la recherche dans une utiles au diagnostic des bacteries a Gram négatid – *Ann-Biol-clin*. 1978. Vol. p407- 424.

Rodrigues, M.X., Lima, S.F., Canniatti-Brazaca, S.G. & Bicalho, R.C. 2017 . The microbiome of bulk tank milk: Characterization and associations with somatic cell count and bacterial count. *Journal of Dairy Science*, **100** (4), 2536–2552. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11540>

S

Sen Keya ,Shepherd Vaughn , Berglund Tanner , Quintana Alexa , Puim Shnia ,Tadmori Rama ,Turner Robert J. , Khalil Laura ,1 and Soares Marilia A. . American Crows as en, Keya, Vaughn Shepherd, Tanner Berglund, Alexa Quintana, Shnia Puim, Rama Tadmori, Robert J. Turner, Laura Khalil, and Marilia A. Soares. 2020. "American Crows as Carriers of Extra Intestinal Pathogenic *E. coli* and Avian Pathogenic-Like *E. coli* and Their Potential Impact on a Constructed Wetland. *Microorganisms*,**16**;8(10):1595. doi: 10.3390/microorganisms8101595.

Sharma Neelesh, Batoo Azhar Shuaib, huma Zul I, Kour Sarabpreet, Misri Jyoti and Hussain Kafil. 2017. Impact of Mastitis on Reproductive Performance in Dairy Animals: A Review, *Theriogenology Insight*: 7(1): 41-49. DOI: 10.5958/2277-3371.2017.00015.8

Shields P., Cathcart L., American Society for Microbiology, 2016, 1-9

Sofowora Abayomi, Ogunbodede Eyitope, Onayade Adedeji. 2013 . The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 12;10(5): 210-29. doi:10.4314/ajtcam.v 10i5.2.

T

Tabak S., Bensoltane A., *Nature & technologie*, 2012, 6, 71-79.

Taleb H, Maddocks SE, Morris RK and Kanekanian AD.2016. The Antibacterial Activity of Date Syrup Polyphenols against *S. aureus* and *E. coli*. *Frontiers in Microbiology* , 7:198. doi: 10.3389/fmicb.2016. 00198

Taylor TA, Unakal CG. *Staphylococcus aureus* Infection. [Updated 2023 Jul 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>

Tounsi-Hammami Soumaya, Le Roux Christine, Dhane-Fitouri Sana, De Lajudie Philippe , Duponnois Robin , Ben Jeddi Faysal. 2019. Genetic diversity of rhizobia associated with root nodules of white lupin (*Lupinus albus* L.) in Tunisian calcareous soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 42 (4): 448-456. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.04.002>.

U

Ueda JM, Pedrosa MC, Fernandes FA, Rodrigues P, Melgar B, Dias MI, Pinela J, Calhelha RC, Ivanov M, Soković M, Heleno SA, Carcho M, Ineu RP, Ferreira ICFR, Barros L. 2021. Promising Preserving Agents from Sage and Basil: A Case Study with Yogurts. *Foods*, 10(3):676. doi: 10.3390/foods10030676.

View. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 7(02): 1-14.

V

Vialard, Noémie. Remèdes et recettes à la sauge: Les bonnes plantes de nos grands-mères. N.p.: Rustica Éditions, 2013.

W

Wasihun, Y., Alekaw Habteweld, H. & Dires Ayenew, K. 2023. Antibacterial activity and phytochemical components of leaf extract of *Calpurnia aurea*. *Sci Rep* **13**, 9767. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36837-3>.

Y

Yuan H, Han S, Zhang S, Xue Y, Zhang Y, Lu H, Wang S. 2022. Microbial Properties of Raw Milk throughout the Year and Their Relationships to Quality Parameters. *Foods*, 4(11):3077. doi: 10.3390/foods11193077.

Z

Zaatout Nawel. 2022. An overview on mastitis-associated *Escherichia coli*: Pathogenicity, host immunity and the use of alternative therapies. *Microbiological Research*, 256,126960. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126960>.

Annexes

Annexe 1

Préparation des extraits éthanoliques



Figure N°01 : A) Agitateur Secoueur – B) Balance Analytique

Annexe 2

Prélèvement de lait



Figure N°01 : A) Test de conductivité - B) Test de CMT



Figure N°01 : A) Prélèvement de lait - B) Lieu de Prélèvement - C) Dillutions de lait

Annexe 3

Isolement et identification des souches

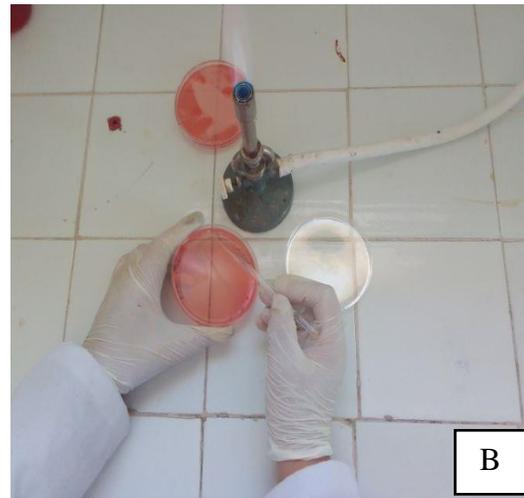
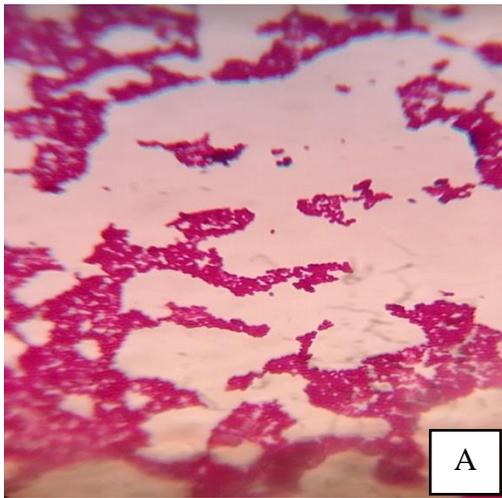


Figure N°01 : A) Aspie Microscopique de S.aureus - B) Repiquage des Souches



Figure N°01 : A) Baine Marie - B) Test de Citrat de Simmons – C) Coloration de Gram

Annexe 4

Activité anti bactérienne

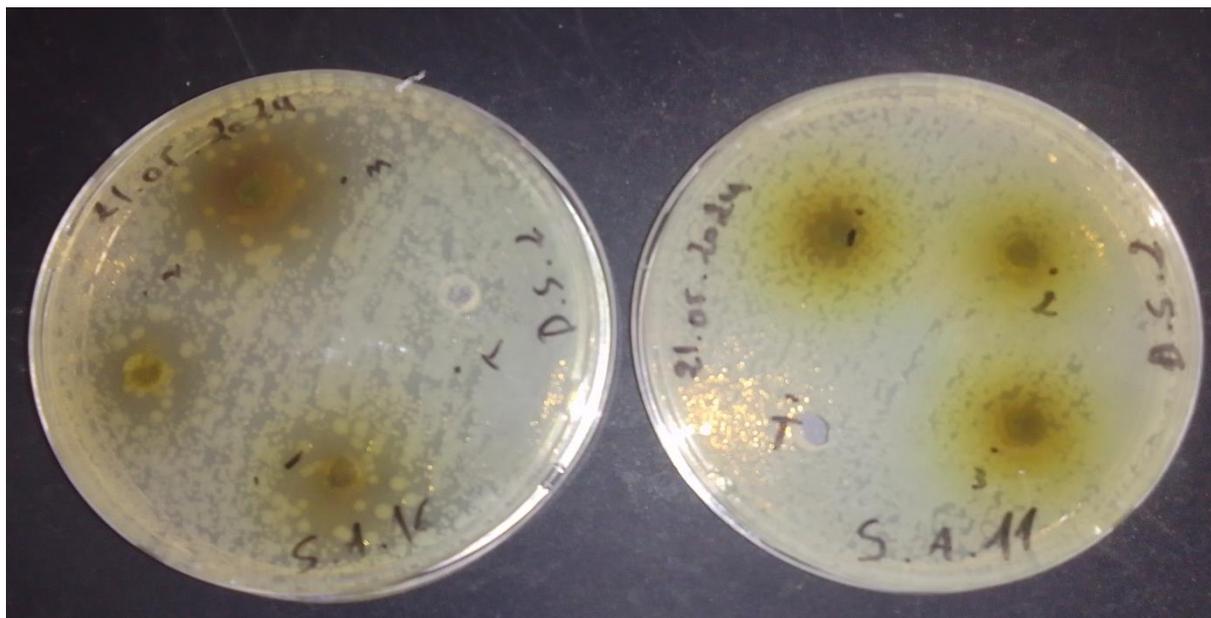


Figure N°01 : A) Résultat de l'activité antimicrobienne d'extrait éthanolique *S. Officinalis* -
B) Pie à coulisse

Annexe 5

Composition des milieux

Milieux de culture solides

Gélose nutritive

Peptone.....	15 g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure.....	02g
Chlorure de sodium.....	05g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

pH= 6,8 ± 0,2 à 25 °C.

Stérilisation à l'autoclave à 121± 1 °C pendant 15 minutes.

Gélose Chapman

Extrait de viande (bovin au porcin).....	1g
Peptone de caséine et de viande (bovin et porcine).....	10g
Chlorure de sodium.....	75g
Mannitol.....	10g
Agar.....	15g
Rouge de phénol.....	0,025g

pH=7,6

Gélose Muller Hinton

Peptone	10g
Extrait de levure	05g
Chlorure de sodium.....	05g
Glucose.....	01g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

pH non précisé ajouté à 7,0.

Stérilisation à l'autoclave à 118 °C pendant 15 minutes.

EMB (Eosine Mythélyne Blue)

Peptone.	10g
Lactose	10g
Hydrogène phosphate dipotassuque	2g

Agar.....	13.5g
Blue de méthylène.....	0.065g
Eosi Jaunatre	0.4g

PH = 7.1

PCA (Plate Count Agar)

Extrait de levure	2.5g
Tryptone	5g
Agar	15g
Glucose	1g

PH = 7.0

Milieus de culture liquides

Bouillon nutritif

Peptone.....	15,0 g
Extrait de leueur.....	3,0 g
Chlorure de sodium.....	6,0 g
D(-) glucose.....	1,0 g
Eau distillée.....	1000 ml