

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR**

**ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET**

**INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES**



**Mémoire de fin d'études**  
**en vue de l'obtention du diplôme de docteur veterinaire**

**THEME :**

**Etude bibliographique :traitement des mammites  
bovines par les huiles essentielles .**

**Présenté par :**

**Dr.Belabbes Med Reda Toufik**

**Dr.Abbsi Baghdad**

**Encadre par :**

**Dr. Benbelkacem Idir**

**Année universitaire : 2018 – 2019**

## DEDICACES

Louange à notre Dieu le tout puissant qui nous a enseigné et nous a donné l'amour de travail et pour ma réussite dans mes études.

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut .. tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude.

Chère maman, vous m'avez comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours, vous n'avez cessé de me soutenir et de m'encourager , vous avez toujours été présente à mes cotés pour me consoler quand il fallait , puisse le puissant vous donner ta santé , bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

Cher papa, vous avez su m'inculque le sens de la responsabilité , de la confiance en soi face aux difficultés de la vie , vos conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite.

Je vous remercie énormément que Dieu vous bénisse et vous garde pour moi .

Je dédie aussi ce mémoire à mon collègue de travail « Absi Baghdad » et à ses parents.

un énorme remerciement pour ton encouragement et ton soutien et d'être toujours a mes cotés par ta présence, je prie Dieu le tout puissant pour qu'il te donne le bonheur et prospérité.

A toutes les personnes qui m'ont aidé et m'encouragé durant tout mon parcours d'études.

*Dr.Belabbes med reda toufik*

## DEDICACES

Louange à notre Dieu le tout puissant qui nous a enseigné et nous a donné l'amour de travail et pour ma réussite dans mes études.

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut .. tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude.

Chère maman, vous m'avez comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours, vous n'avez cessé de me soutenir et de m'encourager , vous avez toujours été présente à mes cotés pour me consoler quand il fallait , puisse le puissant vous donner ta santé , bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

Cher papa vous avez su m'inculque le sens de la responsabilité , de la confiance en soi face aux difficultés de la vie , vos conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite.

Je vous remercie énormément que Dieu vous bénisse et vous garde pour moi .

Je dédie aussi ce mémoire à mon collègue de travail «Belabbes Med reda Toufik » et à ses parents.

A toutes les personnes qui m'ont aidé et m'encouragé durant tout mon parcours d'études.

*Dr. Absi Baghdad*

## REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

La première personne que nous tenons à remercier est notre encadrant **Dr.Benbelkacem** Idir pour l'orientation, la confiance, la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port,

Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

Au directeur des affaires administratives et financières au sein de l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret **dr.zidene khaled** et à notre aimable Enseignant : **Dr. Boumezrag Assia et Dr.ouldali A**

Qui par leur compréhension et leur aide, on a pu accomplir notre travail de recherche.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

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

**Dr.Belabbes med reda toufik**

**Dr.Abbsi baghdad**



## Sommaire

<b>Introduction</b> .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>1. Définition</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Critères déterminants la qualité des huiles essentielles</b> .....	<b>8</b>
2.1. Localisation et rôles des huiles essentielles chez les végétaux .....	9
2.2. Caractérisation des huiles essentielles.....	9
<b>3. Mode d'application des HE</b> .....	<b>10</b>
3.1. Par voie cutanée.....	10
3.2. Par voie olfactive.....	10
<b>4. Mode d'extraction</b> .....	<b>11</b>
4.1. Techniques d'extraction des huiles essentielles .....	11
<b>Entraînement à la vapeur d'eau</b> .....	<b>11</b>
<b>I.3.2 Hydrodistillation et ses variantes</b> .....	<b>13</b>
<b>I.3.4 Distillation « sèche »</b> .....	<b>15</b>
<b>I.3.5 L'extraction par solvants La technique d'extraction par solvant</b> .....	<b>15</b>
<b>I.4 L'extraction assistée par chauffage micro-ondes</b> .....	<b>16</b>
<b>I.4.1 Introduction L'extraction par micro-ondes regroupe différents procédés parmi lesquels :</b> .....	<b>16</b>
<b>I.4.2 Les micro-ondes Les micro-ondes ou hyperfréquences</b> .....	<b>17</b>
<b>I.4.3 Technologie du four à micro-ondes Un four à micro-ondes est constitué de trois éléments principaux</b> .....	<b>18</b>
<b>I.4.4 Le chauffage micro-ondes Le transfert de chaleur sous chauffage micro-ondes</b> .....	<b>20</b>
<b>I.4.5 L'extraction sans solvant assistée par chauffage microondes</b> .....	<b>22</b>
<b>I.4.6 L'hydrodistillation assistée par chauffage micro-onde L'hydrodistillation assistée par micro-ondes sous pression réduite</b> .....	<b>26</b>
<b>I.5 Performances de l'extraction assistée par chauffage micro-ondes</b> .....	<b>28</b>
<b>-Mammite bovine :</b> .....	<b>29</b>
<b>Etiologie :</b> .....	<b>29</b>
<b>Pathogénie :</b> .....	<b>30</b>
<b>Clinique :</b> .....	<b>32</b>
<b>Diagnostic :</b> .....	<b>33</b>
<b>Diagnostic individuel :</b> .....	<b>33</b>
<b>Diagnostic expérimental :</b> .....	<b>34</b>

. Le diagnostic étiologique L'examen bactériologique :	35
. Diagnostic collectif :	35
Traitement des mammites par l'aromathérapie :	35
. MECANISMES D'ACTION SUPPOSES DES HUILES ESSENTIELLES :	35
1. PRESENTATION DES MOLECULES AYANT UNE ACTION ANTI-INFECTIEUSE	35
2. EVALUATION DE L'EFFICACITE : AROMATOGRAMME ET CMI :	36
3. MECANISMES D'ACTION SUPPOSES DES HUILES ESSENTIELLES :	39
A. Contexte et attente des éleveurs :	44
1. CONTEXTE PLAN ECOANTIBIO 2012-2017 ET DEVELOPPEMENT DE	
L'AGRICULTURE BIOLOGIQUE :	44
2. PLAN ECOANTIBIO 2 2017-2021 : VERS UNE DYNAMIQUE POUR LES	
TRAITEMENTS « ALTERNATIFS » ET POUR LA PREVENTION DES MALADIES :	45
3. ATTENTE DES ELEVEURS :	46
4. PLACE DU VETERINAIRE TRAITANT :	47
B. Données existantes :	47
1. AROMATOGRAMMES :	47
2. LITTERATURE SCIENTIFIQUE :	51
3. ESSAIS DE TERRAIN :	56
C. Législation, résidus et huiles essentielles :	59
1. LEGISLATION CONCERNANT L'UTILISATION DES HE POUR LES ANIMAUX DE	
PRODUCTIONS :	59
a. DEFINITION DU MEDICAMENT VETERINAIRE :	59
b. INSCRIPTION A LA PHARMACOPEE :	60
c. PUBLICATION D'UN DECRET PROMOUVANT L'UTILISATION DES	
MEDICAMENTS A BASE DE PLANTES :	60
d. CADRE REGLEMENTAIRE DE L'UTILISATION DES HUILES ESSENTIELLES :	61
D. Perspectives pour le futur de l'utilisation des huiles essentielles :	63
Conclusion.....	65

## La liste de figure

<b>Figure 1: Entraînement à la vapeur.....</b>	<b>11</b>
<b>Figure 2 : Hydrdifusion.....</b>	<b>12</b>
<b>Figure 3 : L'hydrodistillation.....</b>	<b>13</b>
<b>Figure 4 : L'extraction on continu.....</b>	<b>14</b>
<b>Figure 5 : Schéma de distilation sèche.....</b>	<b>15</b>
<b>Figure 6 : Les différents types d'extraction par solvants volatils.....</b>	<b>16</b>
<b>Figure 8 : Schéma d'un four micro-ondes monomode (A) et multi mode (B).....</b>	<b>19</b>
<b>Figure 9 : Transferts thermiques sous les deux modes de chauffage.....</b>	<b>20</b>
<b>Figure 10 : Frissonnement des dipôles soumis à une irradiation micro-ondes.....</b>	<b>22</b>
<b>Figure 11 : L'extraction par solvant assistée par micro-ondes.....</b>	<b>22</b>
<b>Figure12 : Extraction sans solvant assistée par micro-ondes.....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 13 : Hydrodistillation classique.....</b>	<b>27</b>

## La liste des tableaux :

Tableau XXIII : Diamètres d'inhibitions en mm permettant la comparaison d'huiles essentielles et de la gentamicine concernant six germes responsables de mammites.....	34
Tableau XXIV : CMI et CMB de la Gentamicine et de 3 composants d'huiles essentielles contre six germes responsables de mammites.....	35
Tableau XXV : Excipients utilisables pour les huiles essentielles (HE) au niveau de la mamelle .....	39
Tableau XXVI : Correspondance nombre de goutte d'huile essentielle-mg-ml .....	39
Tableau XXVI : Correspondance nombre de goutte d'huile essentielle-mg-ml .....	40
Tableau XXVIII : Germes isolés pour la réalisation d'aromatogrammes par l'ADAGE 35.....	44
Tableau XXXI : Diamètres d'inhibition en fonction des germes de l'huile essentielle issue de <i>Thy mus nummularius</i> .....	46
Tableau XXX : Diamètres d'inhibition en fonction des germes et de la provenance de l'huile essentielle .....	45
Tableau XXXI : Diamètres d'inhibition en fonction des germes de l'huile essentielle issue de <i>Thymus nummularius</i> .....	45
Tableau XXXII : Diamètres d'inhibition de différentes huiles essentielles, de leur mélange et de leurs composants majoritaires en fonction des germes .....	47
Tableau XXXIII : Diamètres d'inhibition d'huile essentielle (HE) de Cannelle de Chine en fonction de différents germes .....	48
Tableau XXXV : Concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) de l'huile essentielle (HE) de <i>Minthostachys verticillata</i> et du limonène pour plusieurs so	

## Liste des abreviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AFNOR : Association Française de Normalisation

AINS : Anti-inflammatoire Non Stéroïdien AIS : Anti-inflammatoire Stéroïdien

AGNE : Acides gras non estérifiés

ALEA : Animal Level of Exposure to Antimicrobials (Niveau d'exposition des animaux aux antibiotiques)

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché ANSES : Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

ATP : Adénosine TriPhosphate

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

BHB : Beta-Hydroxy Butyrate

CCSI ou CCS : Comptage Cellulaire Somatique Individuel

CD : Cluster of Determination (Groupe de détermination) CE : Conductivité Electrique

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMT : Californian Mastitis Test

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone

CT : Chémotype

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Dosage immuno-enzymatique)

GH : Growth hormone (Hormone de croissance)

h<sup>2</sup> : Coefficient d'héritabilité

HE : Huile essentielle

HEBBD : Huile Essentielle Botaniquement et Biochimiquement Définie

IFN- $\gamma$  : Interféron gamma

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine (1, 6 ou 8)

LMR : Limite maximale de résidus

LPS : LipoPolySaccharide

NETs : Neutrophil extracellular traps (pièges extracellulaire créés par les neutrophiles )

NF $\kappa$ B: Nuclear Factor Kappa B (Facteur nucléaire Kappa B)

NO : Monoxyde d'Azote

PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne par polymérase)

PNN : Polynucléaires Neutrophiles

QTL : Quantitative Trait Locus (Locus à caractères quantitatifs)

SCN : Staphylocoques à Coagulase Négative

SCP : Staphylocoques à Coagulase Positive

SNC : Substances Naturelles Complexes

TLR : Toll Like Receptor (Récepteurs Toll Like)

TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor alpha (Facteur de nécrose tumoral alpha) UFC : Unité Formant Colonie

les plantes qui sont plus adaptées pour lutter contre les maladies ; en effet source de médicament et de produit de sante qui nous défendres les agressions et restaurer notre organisme depuis plusieurs années.

En médecine vétérinaire l'aromathérapie est plus importante dans le soin des animaux mais depuis une cinquantaine année les médicaments d'origine chimique ont pris un place très important dans le traitement thérapeutique en médecine veterinaire.

Dans notre étude des différentes plantes et huiles essentielles indiquées pour les animaux de compagnes (chat ; chien ; cheval) qui en un but curatif et préventif.

ce travail présente les plantes et huiles essentielles, leurs modalités d utilisation ainsi que leurs effets indésirable et contre indications éventuels en médecine vétérinaire.

L'aromathérapie aux spécialités vétérinaires contenant des plantes et des huiles essentielles disponible en officine qui s'intéresse a leurs indications leurs effets thérapeutiques ;leurs posologies et leurs modes d' administration ; leur effets secondaires ; par ce qu'elles **Aucune entrée de table d'illustration n'a été trouvée.**recouvrent les pathologies vétérinaires les plus fréquentes .

Aujourd'hui due a les effets secondaires et les dégâts qui sont causé par les traitement chimique, on a trouvé que l'aromathérapie est l'alternative le plus fiable que leur effets secondaires sont moins nocif mais l'issus est résidé dans l'utilisation car il n'est y'a pas des informations suffisantes pour cette spécialité.

## **1. Définition**

la surface de l'Algérie et la spécificité du climat favorisent la diversité des ressources végétale.

Les HE sont des extraits volatiles et odorants que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, pressage ou incision des végétaux qui les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous produits du métabolisme secondaire.

Les huiles essentielles sont des composés liquides très complexes. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie qui est Paromathérapie (Benayad, 2008).

LES HE sont des mélanges de nombreux composés qui sont des molécules peu complexes comme les terpènes, les phénols, les méthyl-éthers, les oxydes, les esters, les cétones.... (Isman, 2002).

ils sont produitent par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages (Csesk et Kaufman, 1999).

Actuellement, près de 3000 huiles essentielles sont décrites, parmi lesquelles environ 300 présentent une importance commerciale dans le cadre d'applications pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires, agronomiques ou dans le domaine de la parfumerie (Bakkali et al., 2008 ; Tajkarimi et al., 2010).

## **2. Critères déterminants la qualité des huiles essentielles**

a) La sélection de la plante qui est tributaire du genre et de l'espèce botanique ;

b) Le chémotype (chimiotpe) représentant les différents panels de molécules chimiques que des plantes de la même espèce peuvent produire si elles sont placées dans des conditions de cultures différentes. Le chémotype dépend de l'ensoleillement, de la température, de l'humidité, de la nature du sol, de la pression atmosphérique, de la photopériode.... ;

c) La partie de la plante considérée pour l'extraction est déterminante pour la qualité de l'huile. En effet, les différentes parties d'une plante ne possèdent pas un équipement

enzymatique uniforme, ce qui entraîne une différence de composition dans les constituants produits. Il est donc impératif de préciser la partie considérée lors de l'extraction de l'HE ;

d) la période de récolte : la récolte doit se faire au moment où les principes actifs les plus intéressants produits par la plante sont à leur concentration maximale ;

e) la conservation des huiles essentielles : elle doit se faire dans des flacons en verre opaque hermétique, dans un endroit frais, à l'abri de la lumière et de la chaleur pour éviter leur oxydation et la polymérisation de leurs composants.

### **2.1. Localisation et rôles des huiles essentielles chez les végétaux**

La teneur des plantes en huiles essentielles est généralement faible, de l'ordre de 1 % (Guignard, 1995).

Les huiles essentielles sont largement répandues chez les végétaux supérieurs. Elles peuvent être stockées dans tous les organes, les sommités fleuries, les feuilles, les rhizomes, les fruits, les écorces et les graines.

Les huiles essentielles permettent aux plantes de s'adapter à leur environnement et à assurer leur défense. En effet, étant fixées au sol elles n'ont que les composés chimiques issus du métabolisme secondaire, stockés à l'endroit où ils seront le plus utiles comme arme de défense contre les parasites et les déprédateurs. Les plantes possédant ces composés toxiques, qualifiés de phagodétendants ou d'inappétants, sont moins consommées (Houël, 2011) certains plantes à une stratégie bioinspirée de recherche de composés antifongiques, antibactériens ou bioinsecticides parmi les métabolites secondaires, et en particulier les huiles essentielles ( De Figueiredo et al., 2008).

### **2.2. Caractérisation des huiles essentielles**

De nombreux facteurs peuvent modifier les essences provenant du végétal. Les huiles essentielles sont des composés très altérables car ils renferment des composés oxydables sous l'action de l'air et de la lumière. Ils s'altèrent en se résinifiant, ce qui entraîne une modification de leur parfum, leur saveur et leurs constantes physiques et chimiques en les rendant impropres à l'utilisation. La normalisation des huiles essentielles concerne :

-Les propriétés organoleptique odeur, couleur, aspect, saveur ;

- Les caractéristiques chimiques : indice d'acide et d'ester ;

-Le profil chromatographique et la quantification relative des différents constituants.

Utilisations des huiles essentielles Elles sont utilisées dans certains médicaments, en parfumerie, en phytothérapie ou comme agent de saveur dans l'alimentation. L'utilisation des plantes et des huiles est contrôlée par le code de la santé publique. Depuis plusieurs années les huiles essentielles ont envahi de nombreux produits de la vie courante. On les retrouve de plus en plus en tant qu'arômes alimentaires comme exhausteur de goûts (cafés, thés, tabacs, vins, yaourts, plats cuisiné , Certaines huiles sont dermocaustiques (agressive pour la peau), comme l'origan, d'autres photosensibilisantes comme les agrumes. Par conséquent, il faut agir avec grande précaution .

### **3. Mode d'application des HE**

#### **3.1. Par voie cutanée**

La peau est un vecteur naturel efficace des HE ; la perméabilité existe au niveau de la couche cornée ( le sébum facilite le passage des HE) et du derme et hypoderme (capillaires sanguins et lymphatiques facilitent le transport des HE).

#### **3.2. Par voie olfactive**

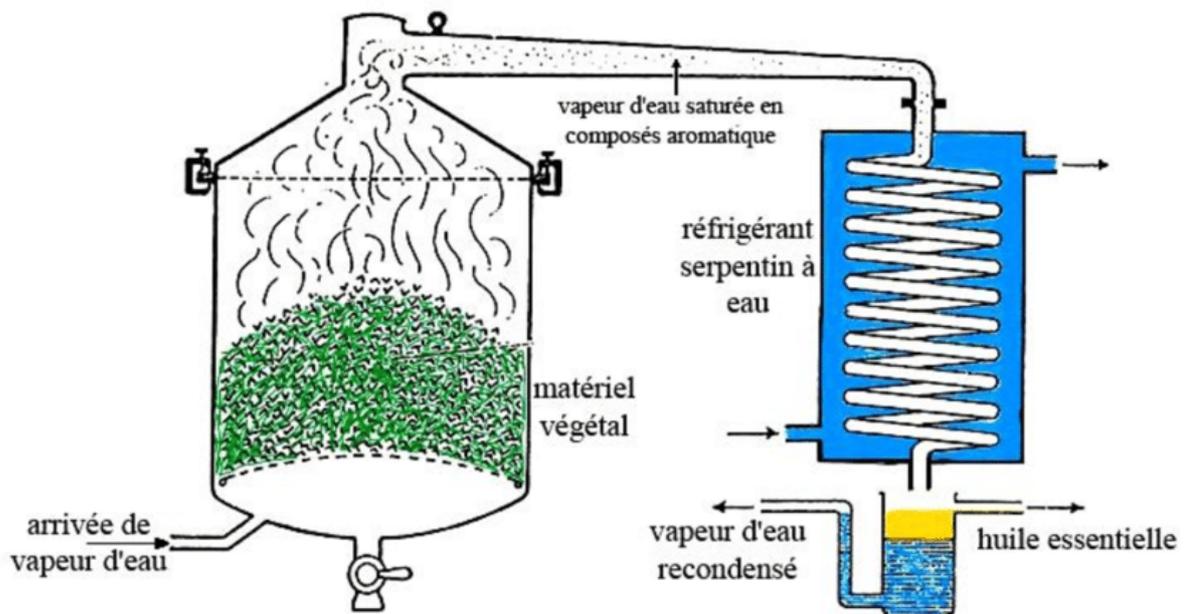
Inhalation 4 ou 5 gouttes d'HE dans un bol d'eau non bouillante (exemple Eucalyptus radiata en cas de rhume ou de rhino-pharyngite) – inhalation sèche \* pour soulager une crise d'asthme : sentir pendant 5 minutes environ de l'HE d'Eucayptus globulus \* transports, inhaler régulièrement de l'HE de menthe poivrée.

## 4. Mode d'extraction

### 4.1. Techniques d'extraction des huiles essentielles

#### Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter.

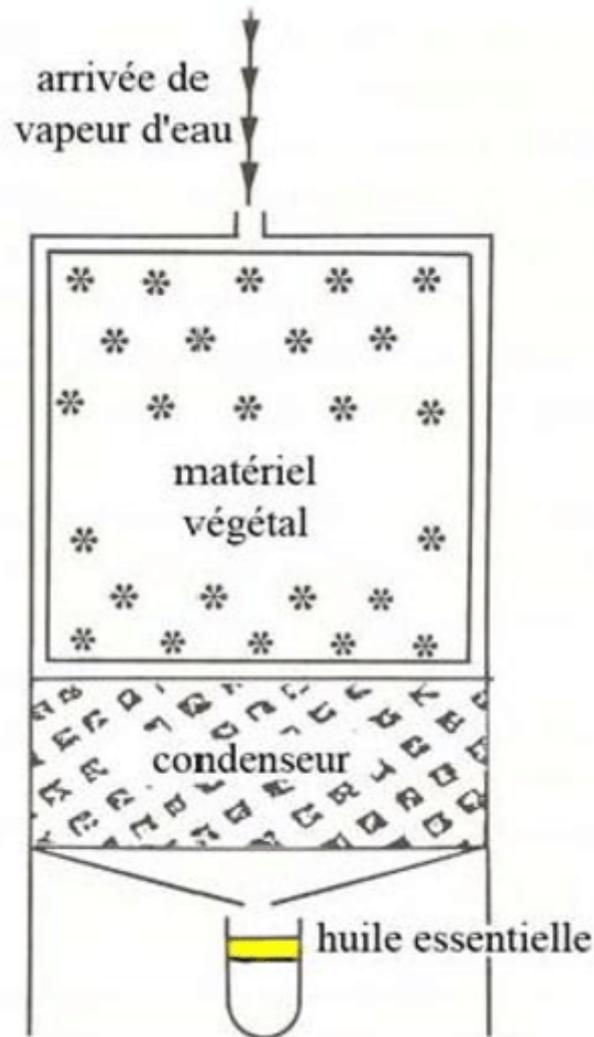


**Figure 1: Entraînement à la vapeur.**

Figure I.1 : Entraînement à la vapeur d'eau.

De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un

mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique. L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur (Figure I.2).



**Figure 2 : Hydrodiffusion**

Dans le cas de l'hydrodiffusion, le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant. Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodiffusion présente l'avantage de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie

d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur.

### I.3.2 Hydrodistillation et ses variantes

L'hydrodistillation proprement dite, est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de qualité. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique (Figure I.3). La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. - La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage (cohobage) de la phase aqueuse obtenue lors de la décantation. - La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. - Afin de traiter des matières premières pour lesquelles il est difficile d'extraire l'huile essentielle ou pour les essences difficilement entraînaibles, l'hydrodistillation à pression réduite représente une bonne alternative. Cette technique est en outre utilisée pour le santal, le girofle ou les rhizomes de vétyver, de gingembre et d'iris.

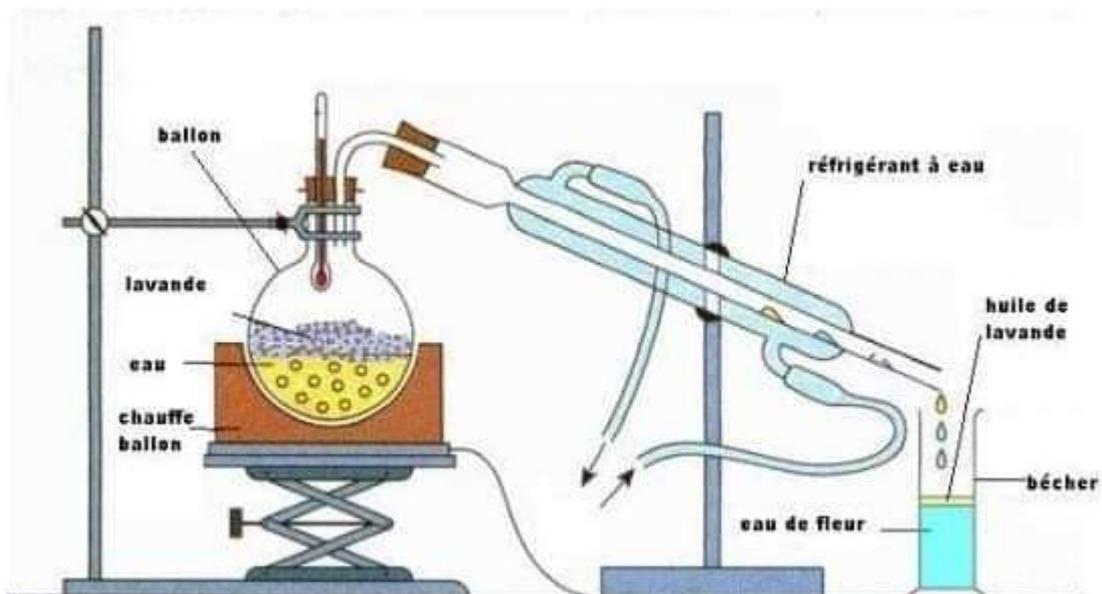


Figure 3 : L'hydrodistillation

- La turbodistillation est un procédé d'hydrodistillation accélérée en discontinue. Cette technique est prédestinée aux matières premières végétales difficiles à traiter (les racines, les ligneux ou les graines, exemple : badiane de Chine ou les graines de céleri). Elle représente une alternative à des hydrodistillations de longue durée. Le réacteur contenant la matière végétale est équipé d'une turbine qui permet d'une part, la dilacération des matières végétales, d'autre part, une agitation turbulente, d'où un meilleur coefficient de transfert thermique et une augmentation de la surface de vaporisation.

### I.3.3 Expression à froid

Les huiles essentielles de fruits d'hespéridés ou encore d'agrumes ont une très grande importance dans l'industrie des parfums et des cosmétiques. Cependant ce sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes et aldéhydes. C'est pourquoi, spécifiquement pour cette catégorie de matière première, est utilisé un procédé totalement différent d'une distillation classique, qui est l'expression à froid. Le principe de cette technique est basé sur la rupture ou la dilacération des parois des sacs oléifères contenues dans l'écorce des fruits et sur la pression du contenu de ces sacs sur les parois.

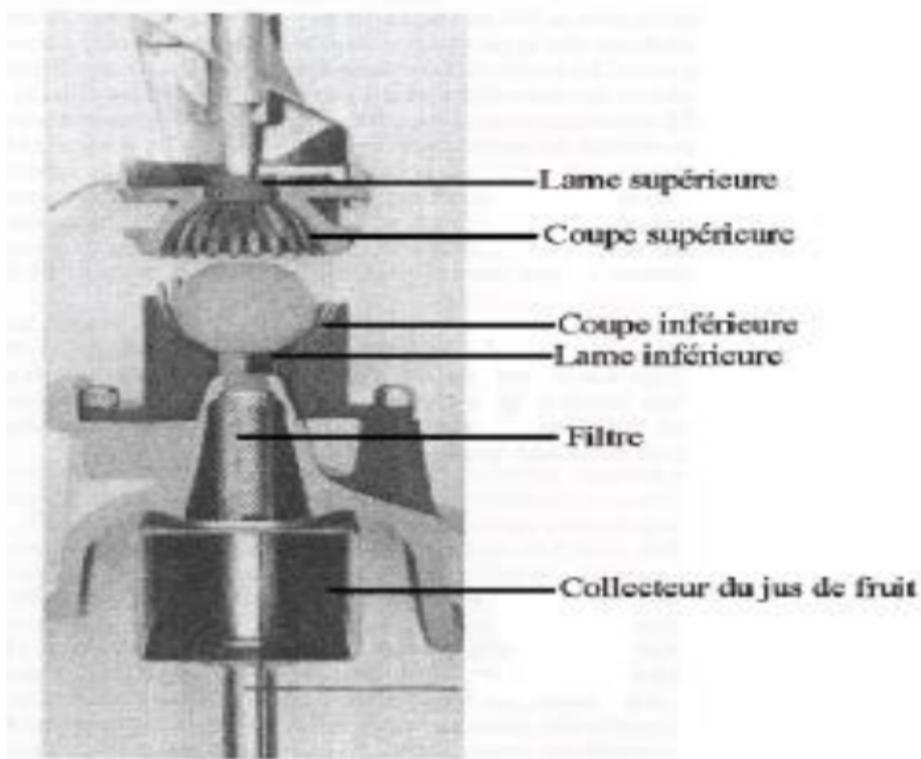
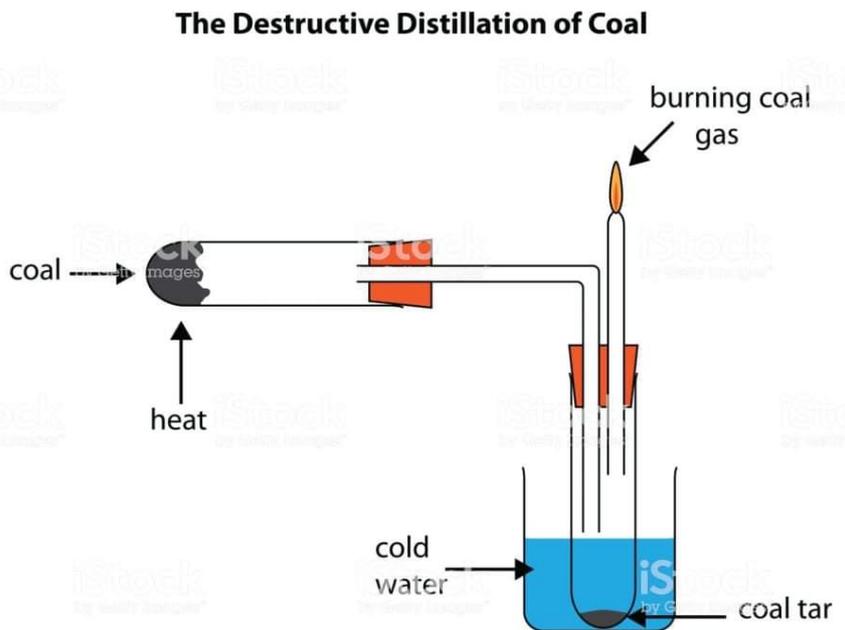


Figure 4 : L'extraction on continu

### I.3.4 Distillation « sèche »

, aussi appelée distillation destructive, est utilisée pour la séparation des produits chimiques liquides contenus dans des matériaux solides. On peut ainsi obtenir, à partir du bois, par calcination, de la créosote (mélange de phénols), de l'alcool méthylique et de nombreux autres produits.



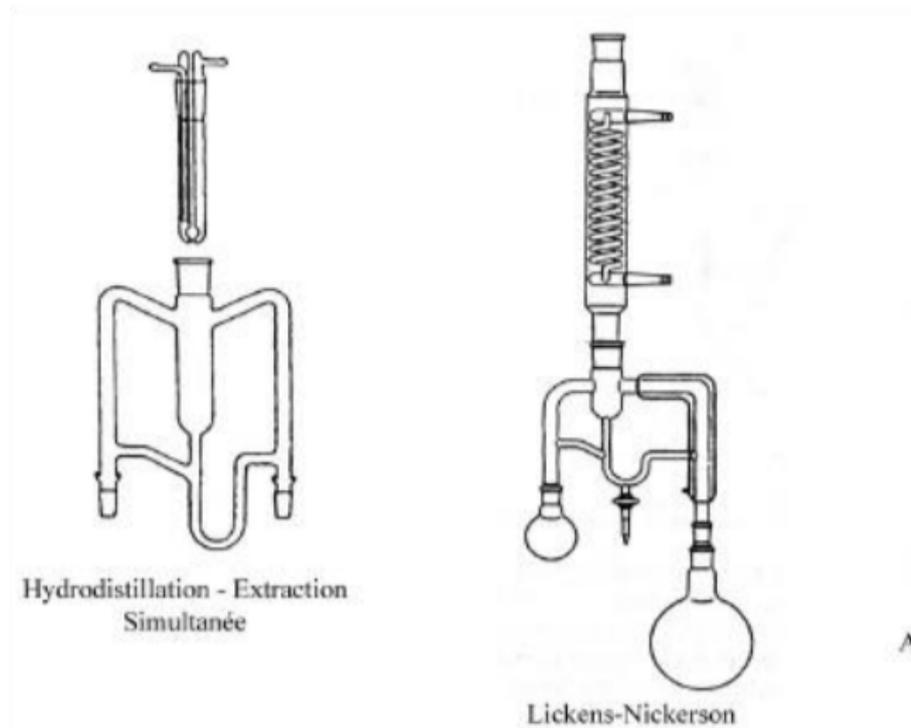
**Figure 5 : Schéma de distillation sèche**

Un avantage certain au niveau de la qualité, Les rendements extrêmement faibles.

### I.3.5 L'extraction par solvants La technique d'extraction par solvant

, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. Le produit ainsi obtenu est appelé « concrète ». Cette concrète pourra être par la suite brassée avec de l'alcool absolu, filtrée et glacée pour en extraire les cires végétales. Après une dernière concentration, on obtient une « absolue ». - Les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation. - L'intervention de solvants organiques qui peut entraîner des risques d'artéfacts et des possibilités de contamination de l'échantillon par des impuretés parfois difficile à éliminer.

- Le choix du solvant : le méthanol, l'éthanol, l'éther de pétrole ou encore le dichlorométhane. - Cette technique d'extraction a été récemment combinée aux micro-ondes et aux ultra-sons.



**Figure 6 : Les différents types d'extraction par solvants volatils**

L'extraction par solvant organique volatil reste très pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, cyclohexane, l'éthanol moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone.

#### **I.4 L'extraction assistée par chauffage micro-ondes**

**I.4.1 Introduction** L'extraction par micro-ondes regroupe différents procédés parmi lesquels :

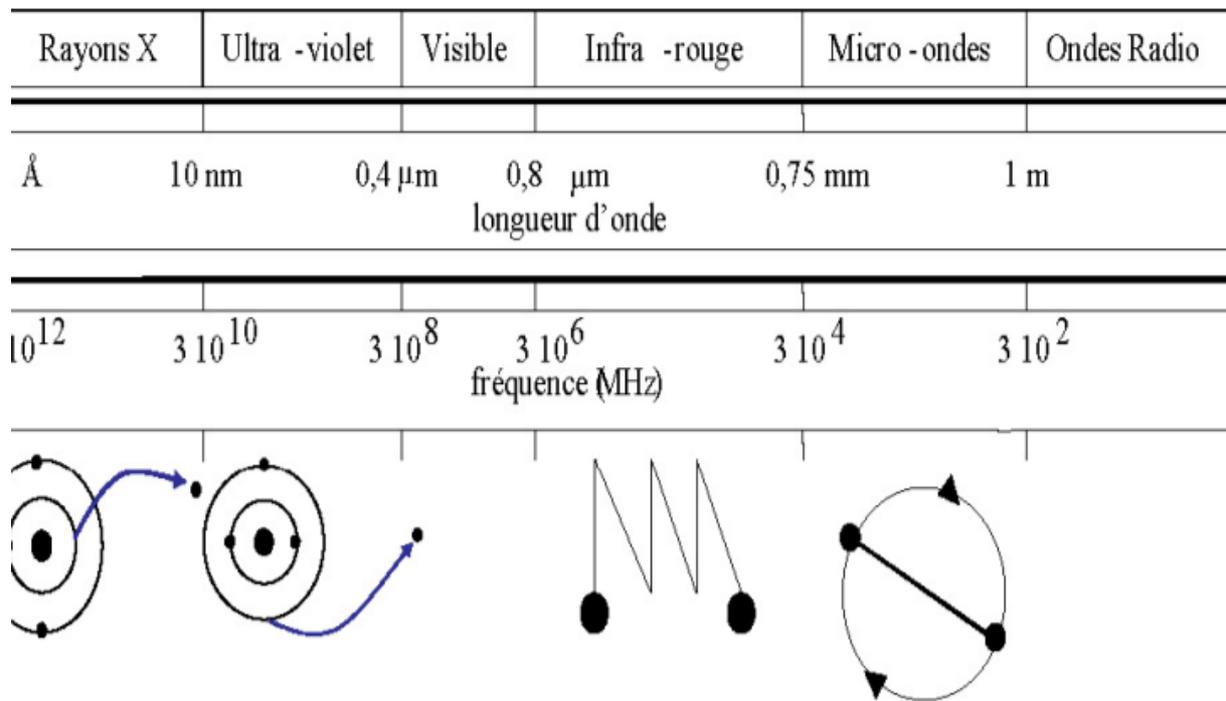
- L'extraction par solvant assistée par chauffage micro-ondes. - Hydrodistillation assistée par chauffage micro-ondes sous vide. - Extraction sans solvant assistée par chauffage micro-ondes (extraction des plantes fraîches) .

Il existe divers exemples d'applications de cette technique à l'extraction de certains organes végétaux : épices de *Cuminum cyminum* L. et *Zanthoxylum bungeanum* L. par Wang et col. en 2006, fruits de *Xilopia* par Stashenko et col. en 2004, hysope, sarriette, marjolaine, sauge (*Salvia officinalis*) et thym par Collin en 1991, feuilles de *Lippia sidoïdes* par Craveiro et col. en 1989, menthe poivrée et persil commun par Pare et col. en 1989. L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation (ramenée à quelques minutes) et incrémente le rendement d'extrait. Cependant irradiation d'un volume important pose des problèmes techniques.

#### **I.4.2 Les micro-ondes Les micro-ondes ou hyperfréquences**

sont des ondes électromagnétiques couvrant les gammes des ondes décimétriques UHF, centimétriques SHF et millimétriques EHF (Figure I.6).

Dans le spectre électromagnétique, les micro-ondes occupent une bande de fréquence de trois décades de 300 GHz à 300 MHz. Les longueurs d'ondes associées s'étalent de 1 millimètre à 1 mètre. La fréquence la plus utilisée est de 2450 MHz correspondant à la fréquence de la majorité des magnétrons des fours micro-ondes de cuisine ayant une puissance de 600 à 1000 Watts et une longueur d'onde dans l'air de 12,2 cm.

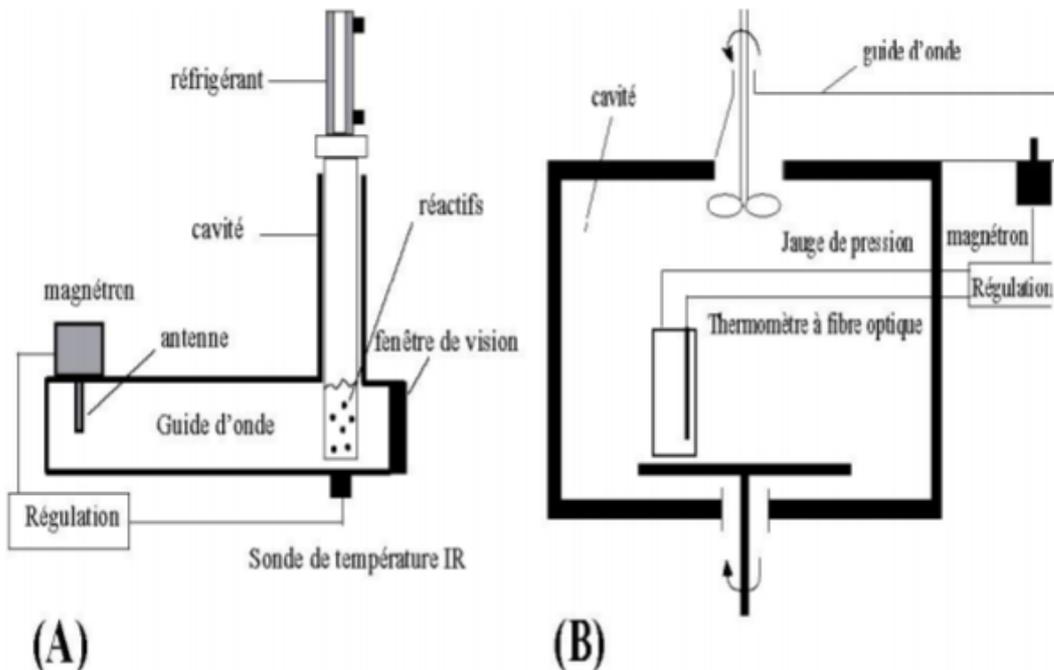


**Figure 7 : Le spectre électromagnétique**

Les applications de ces ondes sont nombreuses et très diverses : - La détection électromagnétique ou radar, - La poursuite des satellites, - La mesure des dimensions d'un objet en cavités résonnantes, - L'évaluation de la température par radiométrie, - La mesure de l'humidité d'un matériau par le biais de ses caractéristiques, - La télévision et les télécommunications par liaisons hertziennes et spatiales.

**I.4.3 Technologie du four à micro-ondes** Un four à micro-ondes est constitué de trois éléments principaux (Figure I.7):

- Le générateur micro-ondes, - Le guide d'onde, - La cavité micro-ondes.



**Figure 8 : Schéma d'un four micro-ondes monomode (A) et multi mode (B).**

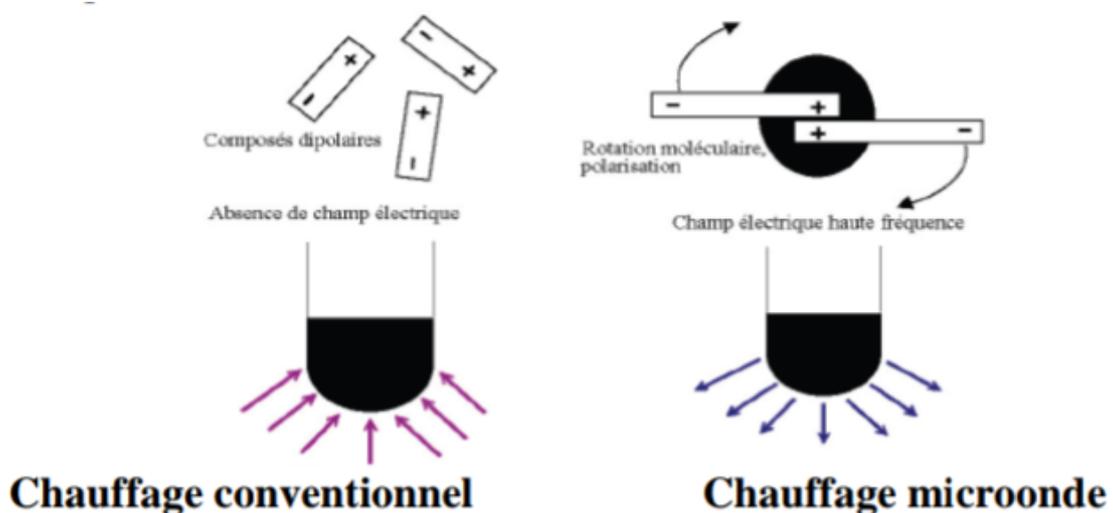
Les micro-ondes de forte puissance sont produites par des tubes à vide dont le plus habituel est le magnétron : il s'agit d'une diode thermoionique composée d'une cathode chauffée qui émet des électrons et d'une anode polarisée positivement par rapport à la cathode pour attirer .

les électrons par le champ électrique continu. Ce champ à haute tension est produit par une alimentation électrique à 50 Hz à partir du secteur redressé. Le guide d'onde permet de convoier et de guider les ondes émises par le magnétron. Le guide est généralement un tube métallique ou un conducteur cylindrique dont la section droite est limitée par un contour fermé pouvant contenir d'autres contours. Sa génératrice sera choisie comme axe de propagation. Deux modes de propagation peuvent exister : le mode TM (transverse magnétique), ou bien, le mode TE (transverse électrique). L'applicateur est une cavité fermée qui doit assurer le transfert au matériau à traiter de l'énergie électromagnétique provenant du magnétron. Deux grandes catégories d'applicateurs existent : - Les applicateurs monomodes - Les applicateurs multimodes. Un applicateur est dit monomode lorsque ses dimensions géométriques sont choisies de telle sorte qu'à la fréquence de travail, il n'existe qu'une configuration de champ. L'énergie électromagnétique emprisonnée se réfléchit sur les parois et donne lieu à des ondes stationnaires. Ce type d'applicateur permet ainsi le contrôle précis

du champ électrique, il est cependant réservé aux matériaux de petit volume. L'applicateur multimode consiste en une cavité suffisamment grande afin qu'il existe plusieurs types de configurations de champ. Le champ électrique n'y est pas stable comme dans une cavité monomode et sa distribution varie. On préfère donc utiliser des applicateurs multimodes pour le traitement des volumes importants, et des matériaux dont les paramètres électriques et magnétiques varient peu.

#### I.4.4 Le chauffage micro-ondes Le transfert de chaleur sous chauffage micro-ondes

complètement inversé par rapport au chauffage conventionnel. Le transfert de chaleur classique se transmet de l'extérieur vers l'intérieur du récipient.



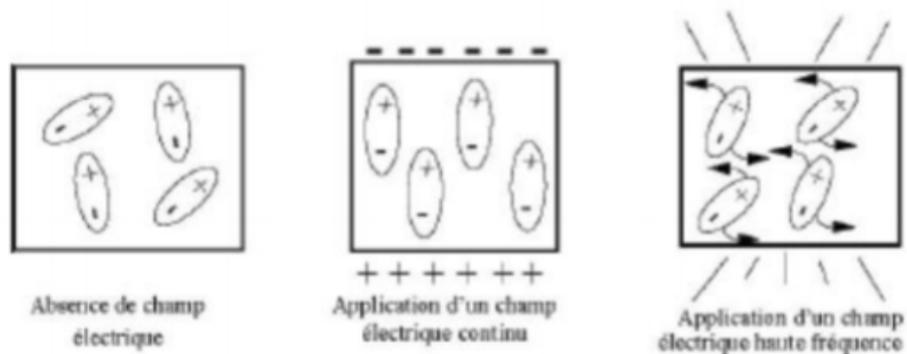
**Figure 9 : Transferts thermiques sous les deux modes de chauffage.**

Sous chauffage micro-ondes, le volume traité devient lui même source de chaleur. On parle de dégagement de la chaleur de l'intérieur vers l'extérieur du récipient. La paroi externe du réacteur est plus froide que le milieu du réacteur dans le cas du chauffage micro-ondes, et inversement pour le cas du chauffage conventionnel par double enveloppe, plaque chauffante et flamme. C'est un mode de chauffage instantané en volume et non en surface. Les phénomènes thermiques de conduction et de convection ne jouent plus qu'un rôle secondaire d'équilibrage de la température. Des surchauffes locales peuvent également se produire.

Le mécanisme du chauffage diélectrique repose sur le fait que les molécules polaires, telles que l'eau, ont des extrémités négatives et positives : ce sont des dipôles. En l'absence de champ électrique, les dipôles d'un milieu diélectrique se trouvent orientés au hasard sous

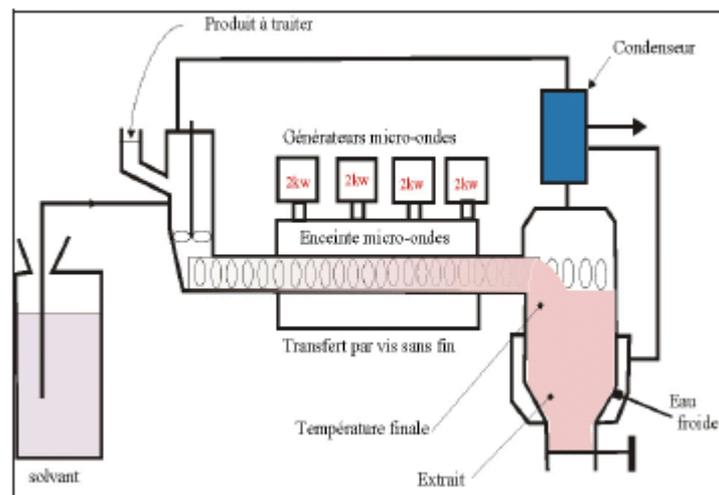
l'effet de l'agitation thermique du milieu. Sous l'effet d'un champ électrique continu, les molécules tendent à s'orienter dans la direction du champ électrique. Plus le champ électrique est intense, moins l'agitation thermique qui tend à désorganiser l'alignement a d'importance. Lorsque toutes les molécules sont orientées, il apparaît un moment dipolaire global induit. Sous l'effet d'un champ électrique alternatif de fréquence  $f$ , les dipôles s'orientent dans la direction du champ sur une demi alternance, se désorientent lorsque le champ s'annule et se réorientent dans l'autre sens pendant la seconde demi alternance : c'est la rotation dipolaire. L'énergie électrique est convertie en énergie cinétique par la rotation des dipôles. L'énergie cinétique est transformée partiellement en chaleur : l'alignement des dipôles par rapport au champ électrique est contrarié par les forces d'interactions entre molécules (les forces de liaison par pont hydrogène et les forces de liaisons de Van der Waals). Ces forces peuvent être assimilées à des forces de frottement internes qui existent dans les contacts solide-solide. Elles s'opposent ainsi à la libre rotation des molécules. De la friction produite, naît le dégagement de chaleur. La dissipation d'énergie par le produit peut être maximale si la fréquence du champ électrique est égale à la fréquence de relaxation. Le phénomène de relaxation correspond à l'apparition d'un déphasage entre l'oscillation du champ électrique et celui des dipôles. Les fréquences micro-ondes étant imposées, l'échauffement d'un produit avec une efficacité maximale est exceptionnel. Dans ce cas, une grande partie des molécules soumises à l'action du champ micro-ondes ne tourne pas avec le changement alternatif du champ mais frissonne comme le montre la figure I.9.

Outre l'extraction aromatique des composés aromatiques d'origine végétale, il existe actuellement diverses méthodes assistées par microondes : - Extraction de minerais, - Décontamination des sols



**Figure 10 : Frissonnement des dipôles soumis à une irradiation micro-ondes**

Ganzler et coll. en 1986, en Hongrie furent les premiers à présenter une technique d'extraction par solvant assistée par micro-ondes en vue d'une analyse chromatographique. Cette technique se présentait comme beaucoup plus efficace qu'une méthode conventionnelle et permettait de réduire les temps d'extraction et donc les dépenses en énergie. La figure I.10 représente un montage pour l'extraction par solvant assistée par chauffage microonde en continu.



**Figure 11 : L'extraction par solvant assistée par micro-ondes.**

#### I.4.5 L'extraction sans solvant assistée par chauffage microondes

En 1989, Craveiro et coll. proposaient une technique originale d'extraction de l'huile essentielle de *Lippia sidoides* par chauffage microondes sans solvant en utilisant un compresseur à air. L'huile essentielle extraite en 5 minutes sous chauffage micro-ondes était présentée comme qualitativement identique à celle obtenue par entraînement à la vapeur en 90 minutes. Le système proposé est inspiré du procédé l'entraînement à la vapeur classique. Il se compose en fait de trois parties : Un compresseur envoyant de l'air dans le ballon où se trouve la matière végétale placé dans un four microondes (Figure I.11). Ce ballon est soumis aux radiations micro-ondes. La vapeur d'eau saturée en molécules volatiles est ensuite entraînée vers un second ballon de récupération plongé dans de la glace et situé à l'extérieur du four à micro-ondes. L'eau ainsi que les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle sont donc condensées dans ce ballon extérieur. L'extraction de l'huile essentielle se fait à l'aide du dichlorométhane. - La distillation sèche des alchimistes : XII<sup>ème</sup> siècle - L'hydrodistillation de type Clevenger : 1928 - L'extraction par micro-ondes : 1986 Basée sur un principe relativement simple, l'extraction sans solvant assistée par microondes consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajout d'eau ou de solvant organique. Le chauffage de l'eau contenue dans la plante permet la rupture des glandes renfermant l'huile essentielle. Cette étape libère l'huile essentielle qui est ensuite entraînée par la vapeur d'eau produite par la matière végétale. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle, par la suite

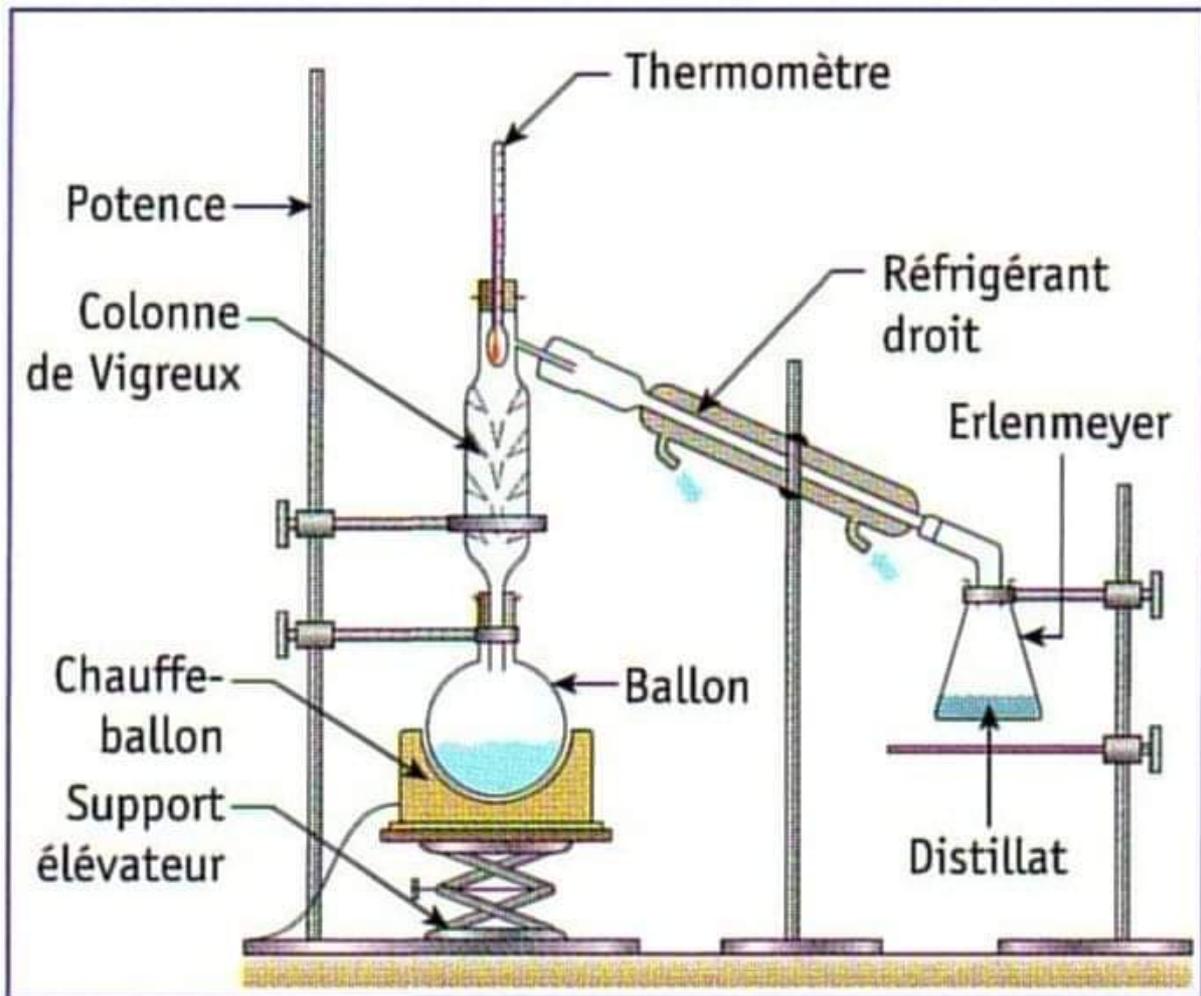
facilement

séparable

par

simple

décantation.



**Figure12 : Extraction sans solvant assistée par micro-ondes**

Ce système proposé par Marie Lucchesi représente l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes avec un système de cohobation assurant un taux d'humidité constant du matériel végétal au cours de l'extraction. Il est signalé aussi que les rendements identiques à ceux obtenus en hydrodistillation classique. L'application de cette méthode a concernée Trois plantes aromatiques ( basilic, thym, menthe). Le protocole expérimental: 250g de feuillage frais sont introduits sans ajout d'eau ni de solvant organique dans un réacteur de type ballon d'une contenance de 2 litres placé dans la cavité multimode du four micro-ondes Milestone

ETHOS1600(FigureIII.1).



Four micro-ondes de laboratoire Milestone Ethos 1600 :

- Cavité multimode, recouverte de PTFE : 35 cm X 35 cm X 35 cm - Fréquence de 2450 MHz
- 2 magnétrons délivrant une puissance maximale de 1000 W par incrément de 10 W -
- Logiciel de contrôle : « easy-Wave » - Température relevée par un thermocouple de type ATC-300 et/ou par une sonde infrarouge interne à la cavité.

La durée de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes de végétaux frais peut être fixée après observation de la quantité d'huile essentielle extraite au cours du temps. Grâce au système de cohobation, le taux d'humidité au sein du ballon est quasiment le même tout au long de l'extraction. L'huile essentielle obtenue est séparée de l'eau par simple décantation. L'huile essentielle est au préalable placée sur desséchant de type sulfate de magnésium (MgSO<sub>4</sub>), afin d'éliminer toute trace éventuelle d'eau, puis est pesée afin de calculer le rendement de l'extraction par rapport à la masse de matériel végétal frais. Les huiles essentielles sont conservées au réfrigérateur à l'abri de la lumière et à une température de 4°C.

Montage d'extraction assistée par micro onde sous vide pulsé.

Basée sur un principe relativement simple, le procédé de sous vide pulsé consiste à mettre en œuvre de vide où sont placés 250 g de plante fraîche dans un ballon de 1 litre. Le vide pulsé permettant de réaliser l'entraînement azéotropique à une température inférieure à 100 °C. Le mélange « eau + huile essentielle » ainsi formé, est véhiculé vers le système de refroidissement qui est muni d'un réfrigérant à double enveloppe. Le mélange « eau + huile essentielle » est dirigé vers le vase florentin. Par simple décantation, l'huile essentielle est collectée puis séchée par le sulfate de sodium.

#### **I.4.6 L'hydrodistillation assistée par chauffage micro-onde L'hydrodistillation assistée par micro-ondes sous pression réduite**

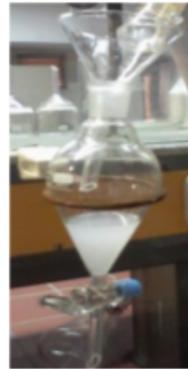
A été élaborée et brevetée par la société Archmiex dans les années 1990. Cette technique d'extraction, dont l'origine est l'hydrodistillation classique, est basée sur l'utilisation conjointe des microondes et d'un vide pulsé. Le matériel végétal à traiter frais ou sec (auquel cas on lui rajoute une quantité d'eau requise) est soumis durant une période un vide pulsé qui permet l'entraînement azéotropique des substances volatiles à une température inférieure à 100°C (Figure I.12). Cette opération peut être répétée plusieurs fois selon le rendement souhaité. Les avantages présentés par cette technique sont nombreux tant au niveau économique qu'au niveau qualitatif. - Hydrodistillation assistée par micro-ondes sous pression réduite serait dix fois plus rapide que l'hydrodistillation pour un rendement équivalent et un extrait de composition identique.

- Les avantages cités sont la rapidité et la similitude de la composition de l'huile par rapport à une hydrodistillation classique.



**Figure 13 : Hydrodistillation classique**

Protocole et procédé d'Hydrodistillation assistée par chauffage microonde - Le réacteur, contenant le matériel végétal solide à extraire, est une enceinte construite sur mesure en verre de type pyrex et adapté aux microondes. Le matériel à extraire est placé sur un support aux micro-ondes. - Un four micro-ondes, dont la température, le temps et la puissance sont contrôlés et automatisés. L'ouverture supérieure du four micro-ondes permet le passage le mélange « eau+ huile essentielle ». Ce mélange « eau + huile essentielle » ainsi formé, est véhiculé vers le système de refroidissement qui est muni d'un réfrigérant double enveloppe. Ce système de condensation permettant un refroidissement rapide et complet.



### Montage de l'hydrodistillation assistée par micro onde

Le mélange « eau + huile essentielle » est dirigé vers le vase florentin. Par simple décantation, l'huile essentielle est collectée puis séchée sur le sulfate de sodium et stockée.

### **I.5 Performances de l'extraction assistée par chauffage micro-ondes**

La rapidité de l'extraction Hydrodistillation, hydrodiffusion, ou entraînement à la vapeur d'eau : l'heure, Extractions assistées par micro-ondes : la seconde ; minute.

Le choix du solvant l'hexane, le toluène, le tétrachlorure de carbone, le dichlorométhane et l'éthanol. Le choix du solvant va définir le type de chauffage.

- La puissance micro-ondes A quelques exceptions, les puissances appliquées sont relativement élevées (supérieure à 500W) par rapport à la quantité de végétal à traiter (inférieure à 100g). Cependant la quantité de puissance appliquée est étroitement liée au temps d'extraction mais reste aussi en étroite relation avec la température de la matrice. Au cours de l'extraction par solvant assistée par micro-ondes, les puissances appliquées sont jusqu'à 45 fois supérieures à la masse de végétal à traiter. Mais les temps d'extraction varient entre 10 secondes et une minute. L'hydrodistillation assistée par micro-ondes sous vide pulsé nécessite des puissances sensiblement plus élevées (1200W) pour des temps d'extraction de 15 minutes en moyenne. La distillation sèche assistée par micro-ondes applique des puissances en rapport direct avec la quantité de matière végétale à traiter d'où la notion plus

appropriée de « densité de puissance ». Cette valeur est généralement de 2 Watts par gramme de matière végétale traitée.

- La composition chimique D'un point de vue quantitatif, l'extraction assistée par chauffage microondes dans son ensemble apporte des résultats extrêmement intéressants par rapport aux méthodes classiques utilisées comme références. D'un point de vue qualitatif, les différences interviennent surtout au niveau des pourcentages de certains composés aromatiques. Le choix du solvant va aussi influencer sur la composition de l'extrait final.

- La dénomination des produits obtenus La législation sur la dénomination des produits obtenus est très stricte. Rappelons qu'une huile essentielle est obtenue par les seules méthodes d'entraînement à la vapeur d'eau, d'hydrodistillation, d'expression à froid et de pyrogénéation ou distillation sèche. Ainsi l'extraction par solvant assistée par micro-ondes produira des extraits microondes. En revanche on pourra conserver le terme « huile essentielle » pour l'hydrodistillation assistée par chauffage microondes

#### **-Mammites bovine :**

Une mammite est l'inflammation d'un ou plusieurs quartiers de la mamelle. C'est la réaction de défense contre une agression locale de la mamelle, la plupart du temps d'origine infectieuse.

#### **Etiologie :**

La grande majorité des mammites sont d'origine infectieuse. Cependant on note l'existence de mammites d'origine traumatique, physique ou chimique. L'infection de la mamelle par voie exogène est de loin la plus fréquente, bien que des infections par voie endogène soient décrites, notamment par des mycoplasmes. Il faut noter aussi l'excrétion possible de micro-organismes dans le lait sans qu'il n'y ait de signes cliniques de mammite associés, par exemple lors de tuberculose, para-tuberculose, salmonellose, listériose et brucellose. La plupart des infections sont d'origine bactérienne. Les mammites mycosiques sont rares. Généralement une seule espèce bactérienne est en cause, plus rarement l'association de deux espèces est possible. On considère d'ailleurs que la présence de plus de deux germes dans un lait de mammite signe une contamination du prélèvement. Traditionnellement on classe les espèces bactériennes responsables de mammites en deux groupes (cf. tableau 1) : - Les espèces pathogènes majeures sont potentiellement responsables de mammites cliniques et regroupent les streptocoques (*Streptococcus uberis*, *Str. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*1, *Str.*

agalactiae), les entérocoques (*Enterococcus faecalis*...), les staphylocoques à coagulase positive (CPS) (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*<sup>2</sup>), ainsi que les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*<sup>3</sup>, *Enterobacter aerogenes*...). Ces trois familles de germes sont responsables de la majorité des mammites cliniques, à hauteur de 80-90 p. cent (ARGENTE et al 2005, FABRE et al 1997). Dans la suite du texte nous désignerons *Str. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* par *Str. dysgalactiae*, l'autre sous espèce n'étant pas agent de mammites. 2 De même *S. aureus* subsp. *aureus* sera désigné par *S. aureus*

Sont plus rarement isolés *Arcanobacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, des mycoplasmes et des bactéries anaérobies. - Les espèces pathogènes mineures sont exceptionnellement responsables de mammites cliniques, mais plutôt de mammites sub-cliniques. Ce sont essentiellement les staphylocoques à coagulase négative (CNS) (*S. xylosus*, *S. chromogenes*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*...).

### **Pathogénie :**

Pénétration des germes dans la mamelle Hormis le cas des mammites d'origine hématogène (mammites brucellique ou tuberculeuse), les germes pathogènes pénètrent dans la glande par le canal du trayon. Le canal du trayon constitue la première barrière contre la pénétration des germes. Le sphincter à sa base maintient le canal fermé entre les traites. Ensuite la muqueuse du canal est tapissée de cellules kératinisées possédant des propriétés bactériostatiques. Ces cellules desquament régulièrement, ce qui contribue à l'élimination des germes dans le lait en début de traite. Ainsi pour que les germes pénètrent, il faut d'abord que le sphincter soit ouvert. L'ouverture du sphincter étant maximale à la fin de la traite, c'est lors de la traite et dans la demi-heure suivant la traite qu'a lieu la majorité des infections. De même le canal du trayon voit son diamètre augmenter au vêlage et au tarissement, d'où une sensibilité accrue des vaches aux infections pendant ces périodes. Le franchissement du canal peut avoir lieu selon trois grandes modalités : - Soit par le phénomène d'impact lors de la traite mécanique : une entrée d'air intempestive au niveau d'un manchon trayeur provoque une baisse du niveau de vide dans la griffe, et le reflux de lait de la griffe vers les autres manchons trayeurs où le niveau de vide est plus élevé. Ce lait va alors déposer des germes au niveau des trayons sains. - Soit par la multiplication de germes présents sur le trayon entre les traites : ces germes profitent de la fermeture différée du sphincter pour pénétrer dans le canal. Toute lésion du trayon (verru, blessure, gerçure) favorise la multiplication des germes et par conséquent la

fréquence des infections. - Soit par l'introduction directe dans le sinus lactifère de germes lors de traitements intra mammaires mal conduits ou de tout sondage du canal du trayon.

Infection de la glande Normalement la traite par son effet de vidange concourt à l'élimination des germes qui ont pu pénétrer dans le sinus lactifère. Les germes qui provoquent l'infection ont donc des propriétés d'adhésion à l'épithélium du sinus lactifère. On a réussi à montrer in vivo que *S. aureus* et *Str. agalactiae* adhèrent aux cellules épithéliales de la glande mammaire. Ensuite les germes se multiplient rapidement et envahissent le tissu mammaire. La prolifération des germes s'accompagne de la production d'enzymes et de toxines qui vont léser le tissu sécrétoire et provoquer une modification qualitative du lait produit. Les bactéries se multiplient d'autant plus facilement que la réaction de défense cellulaire de la glande est longue à se mettre en place. En effet la glande mammaire saine renferme normalement peu de cellules. Les cellules les plus nombreuses alors sont les macrophages, mais leur aptitude à phagocyter les germes pathogènes est diminuées par rapport aux monocytes sanguins, à cause de la phagocytose des débris cellulaires et des globules de gras du lait.

Inflammation de la mamelle et cellules du lait La mamelle saine contient peu de cellules, ce sont principalement des macrophages (66-88%) ainsi que des lymphocytes, des cellules épithéliales desquamées, et quelques polynucléaires :

Lors d'infection, les lésions du tissu sécrétoire provoquent l'afflux massif de polynucléaires neutrophiles sanguins dans la glande par diapédèse (cf. figure 2). Ces derniers deviennent alors le type de cellule majoritaire dans le lait. Ils représentent de 50% des cellules lors d'une infection modérée, à 90% lors de mammite aiguë. La numération de l'ensemble des cellules somatiques du lait constitue une bonne estimation du nombre de polynucléaires neutrophiles et donc de l'état inflammatoire de la glande mammaire. Les polynucléaires, de par leur capacité de phagocytose, constituent la principale défense de la mamelle contre les infections. Cependant comme pour les macrophages leur capacité à phagocyter les germes est réduite par rapport aux polynucléaires sanguins. L'afflux massif de polynucléaires modifie profondément la qualité de la sécrétion : le lait contient des caillots de fibrine et des grumeaux. Il existe aussi d'autres systèmes de défense de la glande comme les lactoferrines, le lysozyme, le système lacto-peroxydase-thiocyanate-peroxydase présent dans le lait.

Evolution Suivant le pouvoir pathogène du micro-organisme et l'efficacité des réactions de défense de la glande, l'évolution se fait :

- Vers la guérison spontanée, lorsque la réponse cellulaire est de bonne qualité.
- Vers l'extension de l'inflammation et de l'infection, lorsque le micro-organisme est très pathogène. On observe alors des manifestations cliniques de mammite.
- Vers la persistance de l'infection dans la glande, on parle de mammite sub-clinique, un équilibre s'installe entre l'infection et la réponse inflammatoire de la glande. Lorsque l'équilibre se rompt l'expression clinique reprend.

### **Clinique :**

Mammite clinique La définition d'une mammite clinique est la présence de symptômes fonctionnels, c'est-à-dire une modification de la sécrétion de la glande. La quantité et l'aspect du lait changent, reflétant une perturbation des fonctions de sécrétion et filtration. En plus de ces symptômes fonctionnels, on peut observer des symptômes locaux classiques de l'inflammation : rougeur, tuméfaction, chaleur et douleur de la mamelle ou du quartier atteint. On parle alors de mammite aiguë. Lors de mammite chronique, le quartier s'atrophie et se sclérose. Enfin parfois on observe des symptômes généraux liés à une intoxication. Ils se traduisent par une altération de l'état général (abattement, anorexie, hyperthermie, arumination, déshydratation, troubles locomoteurs...). On parle alors de mammite suraiguë. Nous allons maintenant évoquer les différents types de mammites cliniques rencontrés.

Mammite suraiguë D'apparition brutale et d'évolution rapide, elle se caractérise par une sécrétion lactée très modifiée (aspect séreux, aqueux, hémorragique, sanieux ou purulent) voire interrompue par la douleur. Les signes locaux sont très violents, la mamelle très congestionnée. L'état général est fortement altéré et l'évolution vers la mort est fréquente en l'absence de traitement précoce. On distingue deux formes caractéristiques : - La mammite paraplégique : la vache est en décubitus, en syndrome fébrile (tachycardie, tachypnée, hyperthermie...), parfois en diarrhée. Les symptômes locaux peuvent être frustrés, il convient alors de faire le diagnostic différentiel avec une fièvre vitulaire en observant la sécrétion qui est rare et séreuse. Des entérobactéries sont le plus souvent associées à ce type de mammite. - La mammite gangreneuse : l'inflammation du quartier atteint est très violente, puis suivie d'une nécrose avec apparition d'un sillon disjoncteur séparant les tissus sains des tissus nécrosés froids, noirâtres à gris plombé. La sécrétion est rare et nauséabonde. L'évolution rapide conduit à la mort en l'absence de traitement. Le germe mis en cause est *S. aureus*, parfois associé à des anaérobies.

**Mammite aiguë** Le quartier est enflammé, la sécrétion est modifiée avec des grumeaux. Les symptômes généraux sont peu marqués. L'évolution est plus lente et ne se solde pas par la mort de l'animal. En l'absence de traitement l'évolution vers la chronicité est fréquente. Tous les germes potentiellement responsables de mammite peuvent être isolés.

**Mammite chronique** Elle est le plus souvent secondaire à une mammite aiguë. Les symptômes locaux sont discrets, lentement le quartier évolue vers l'atrophie du fait de l'installation de zones de fibrose cicatricielle. La mamelle devient noueuse à la palpation. La sécrétion n'est souvent modifiée qu'en début de traite. L'évolution est lente vers le tarissement de la sécrétion au bout de plusieurs mois. Tous les germes donnant des mammites peuvent être isolés.

**Mammite sub-clinique** Elle est par définition asymptomatique : la sécrétion paraît macroscopiquement normale même en début de traite, les signes locaux et généraux sont absents. Seul l'examen du lait au laboratoire permet de mettre en évidence des modifications chimiques (baisse du taux de caséines et de lactose, augmentation du taux de chlorures), bactériologiques (présence de germes) et surtout cellulaire du lait, en l'occurrence augmentation des cellules somatiques du lait (surtout les polynucléaires neutrophiles). Les germes en causes sont essentiellement à Gram positif (staphylocoques et streptocoques). Les mammites sub-cliniques, beaucoup plus fréquentes que les mammites cliniques, sont insidieuses et responsables de pertes économiques importantes par une baisse de la production laitière et une augmentation des comptages cellulaires du troupeau.

## **Diagnostic :**

### **Diagnostic individuel :**

. **Diagnostic clinique** La détection précoce des mammites passe par la détection des symptômes fonctionnels, avant l'apparition de symptômes locaux. On cherche donc à mettre en évidence la présence de grumeaux dans le lait. Le moyen le plus efficace est l'épreuve du bol de traite : lors de la préparation de la mamelle à la traite, les premiers jets de lait de chaque quartier sont recueillis dans un bol à fond noir et rugueux, avant la mise en place des gobelets trayeurs. Malheureusement de nos jours encore l'épreuve du bol de traite n'est pas réalisée systématiquement sur tous les quartiers dans de nombreux élevages.

## **Diagnostic expérimental :**

Le diagnostic des mammites sub-cliniques nécessite la mise en évidence d'une augmentation du taux cellulaire du lait.

Technique directe de numération cellulaire Ces techniques automatisées sont appliquées mensuellement sur le lait de mélange des quatre quartiers de chaque vache, dans les élevages adhérents au contrôle laitier. L'appareil de mesure le plus répandu dans les laboratoires est le Fossomatic® (méthode fluoro-opto-électronique) et ses dérivés. Le principe consiste à compter les noyaux des cellules du lait rendus fluorescents par coloration au bromure d'éthidium (agent intercalant de l'ADN). Le lait est disposé sur un disque. La fluorescence est émise par les cellules après excitation à une longueur d'onde spécifique du bromure d'éthidium (400-530 nm) (LERAY 1999). Le nombre de cellules est sujet à des variations physiologiques selon le stade de lactation, la race et le rang de lactation (LE PAGE 1999). On prend donc en compte plusieurs comptages par vache pour une lactation (SERIEYS 1985) : - si tous les comptages cellulaires individuels (CCI) sont inférieurs à 300 000 cellules par millilitre, la vache est considérée comme saine.

- si deux CCI sont supérieurs à 800 000 cellules par millilitre, la vache est considérée comme infectée durablement. - dans tous les autres cas, elle est considérée comme douteuse.

Notons que l'on peut aussi mesurer le taux cellulaire du lait de chaque quartier individuellement, ce qui sera réalisé dans notre étude, avec pour but d'estimer la guérison du quartier, ou de détecter les quartiers probablement infectés.

. Technique indirecte de numération cellulaire

Le « Californian mastitis test » (CMT) ou test au Teepol® C'est une méthode semi-quantitative qui peut être appliquée par l'éleveur directement en salle de traite. Pendant la préparation de la mamelle à la traite, après lavage, essuyage du trayon et élimination des premiers jets, 2 mL de lait de chaque quartier sont tirés dans une coupelle correspondant à chaque quartier, puis mélangés avec 2 mL de Teepol® (alkyl-aryl-sulfonate de Na) à 10%, un détergent qui va provoquer la lyse des cellules du lait. On agite doucement pour mélanger pendant quelques secondes avant d'observer la consistance du mélange. En lysant les membranes cellulaires, le détergent libère l'ADN des cellules qui forme alors un gel dont la viscosité est proportionnelle au nombre de cellules dans le lait.

## **. Le diagnostic étiologique L'examen bactériologique :**

Est lourd, coûteux, il n'est utilisé que lors d'échec thérapeutique ou d'épizootie dans un élevage. Nous détaillerons sa mise en œuvre dans la partie « analyses de laboratoire » de ce travail .

## **. Diagnostic collectif :**

réalisé plusieurs fois par mois par la laiterie ou le contrôle laitier sur le lait du tank, par mesure du taux cellulaire de tank (TCT) par le même genre d'appareil que pour la mesure du CCI de chaque vache. La mesure du TCT donne le niveau d'infection du troupeau et est important pour détecter un problème de mammites sub-cliniques dans le troupeau.

## **Traitement des mammites par l'aromathérapie :**

### **. MECANISMES D'ACTION SUPPOSES DES HUILES ESSENTIELLES :**

Utilisation des huiles essentielles comme anti-infectieux

#### **1. PRESENTATION DES MOLECULES AYANT UNE ACTION ANTI-INFECTIEUSE :**

Les propriétés anti-infectieuses et antibactériennes des HE sont connues depuis longtemps et ont fait l'objet de nombreux travaux depuis ces trente dernières années. Ces résultats ont été confirmés par la standardisation de la technique des aromatogrammes et par les milliers de résultats obtenus. Parmi les familles de molécules citées précédemment et ayant des propriétés antibactériennes, on retrouve principalement par ordre décroissant : Phénols > Monoterpénols > Aldéhydes > Cétones > Ethers > Oxydes > Phtalides

Les phénols et les alcools monoterpéniques présentent le pouvoir antibactérien le plus important. Parmi les phénols on peut citer par ordre décroissant de coefficient antibactérien le plus élevé : Carvacrol > Thymol > Eugénol

Des essais ont été effectués in vivo sur l'homme et l'animal, ainsi qu'in vitro. Les composés hydroxyliques sont bactériostatiques et bactéricides. Ils sont actifs sur les bactéries Gram + et Gram -. Les aldéhydes arrivent en seconde position avec principalement l'aldéhyde cinnamique. Il faut aussi retenir l'action du citronnellal issu de l'HE d'Eucalyptus citriodora sur *S. aureus*.

On peut aussi retenir la famille des cétones avec une activité antibactérienne très spécifique et limitée, les éthers obéissant à la loi du tout ou rien, et la famille des oxydes avec le 1,8-cinéole qui possède une activité non négligeable sur *S. aureus* (84). Dans la littérature scientifique, les composants majeurs issus d'huile essentielle et testés pour leur action anti-infectieuse sont nombreux. On peut citer le linalol, l'eucalyptol, le pulegone, le menthol, le carvone, le carvacrol, le thymol,  $\gamma$ -terpinène, le bornéol ou l'eugénol (08,10,15,16).

## **2. EVALUATION DE L'EFFICACITE : AROMATOGRAMME ET CMI :**

L'aromatogramme, à l'image de l'antibiogramme, est une méthode par diffusion en milieu gélosé permettant d'étudier la sensibilité des micro-organismes aux HE et de mesurer leur pouvoir antibactérien de manière fiable et reproductible. Cette technique permet le criblage des HE afin de choisir l'HE ayant le meilleur effet bactériostatique ou bactéricide sur le germe isolé (06 ;16). Il existe également une autre technique permettant de vérifier l'action antibactérienne des mélanges d'HE, le Phytogramme® qui est dérivé de l'aromatogramme. Dans ce cas, les huiles essentielles sont déposées au fond de puits présents dans la gélose. Les HE sont testées pures et après dilution à 50%. Un diamètre de 6 mm correspond au diamètre initial du puits et donc à l'absence d'inhibition et un diamètre supérieur à 30 mm correspond à une forte inhibition. Le coût est d'environ 40 €(18).

Afin de réaliser l'aromatogramme, une suspension bactérienne ou fongique est préparée à partir du germe prélevé sur l'animal malade puisensemencée sur un milieu gélifié dans une boîte de Pétri. Ensuite, des disques de papier filtre sont déposés puis imprégnés d'un volume d'HE donné et défini, en général 5  $\mu$ L minimum. Ainsi, autour de chaque disque, l'HE diffuse et crée un gradient de concentration diminuant du centre vers la périphérie. Les résultats sont disponibles après 24 heures en étuve à 37°C (06). Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés en millimètres. En général, les expériences sont réalisées en triplicats. La moyenne des diamètres d'inhibition est calculée afin de réaliser l'interprétation. Par exemple, en médecine humaine, pour la bactérie *Str. pyogenes*, si le diamètre est inférieur à 8 mm le germe est considéré comme « non sensible », entre 8 et 14 mm « modérément sensible », entre 14 et 20 mm « sensible » et si le diamètre est supérieur à 20 mm le germe est considéré comme « très sensible » (20). Il est également possible de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) avec la méthode de dilution en milieu liquide. La CMI est déterminée comme la plus faible concentration d'HE inhibant visiblement la pousse bactérienne. A partir de cette méthode, il est aussi possible d'évaluer la concentration

minimale bactéricide (CMB). La détermination de l'effet antibactérien est donnée par le rapport CMB/CMI. S'il est inférieur à 4, l'HE est considérée comme bactéricide et s'il est supérieur à 4, elle est considérée comme bactériostatique (14,20).

L'étude menée par l'ADAGE 35 et l'ISAE 35 sur l'évaluation de l'efficacité antibactérienne in vitro par la méthode de Kirky-Bauer (Aromatogramme) a présenté les résultats pour 42 HE contre les germes isolés de mammites bovines. Le volume d'HE utilisé était de 1µL permettant l'obtention de résultats répétables et reproductibles. Les HE montrant un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne étaient notamment composées de thymol, de terpinènes et pinènes, de phénols monoterpéniques et d'aldéhydes terpéniques (21).

Parmi quelques publications de la littérature, des données concernant les HE, leurs molécules et leur effet antibactérien sont répertoriées dans les tableaux suivants :

Tableau XXIII : Diamètres d'inhibitions en mm permettant la comparaison d'huiles essentielles et de la gentamicine concernant six germes responsables de mammites

Agents pathogènes	ZAOULI et al. (92)			FADLI et al. (109)	
	Gentamicine (30µg)	R. officinal typicus 4 (10µL)	R. officinal troglodytorum 6 (10µL)	Gentamicine(15µg)	T. riatarum (10µL)
E. coli	18±0	17±0,5	16±1	25,7±0,6	12,3±0,6
P. aeruginosa	12±0	7,5±0,5	0	20±1	8±0
K.pneumoniae	17±0	12,5±1,5	16±1	0	12±0
S. aureus	21±0,5	9,5±0,5	13,5±1,5	31±1	11±1
B. cereus	20±0	15±0	12,5±0,5	42,7±0,6	17,7±0,6
B. subtilis	18±0,5	13,5±0,5	10,5±0,5	40±0	22±1 22±1

Tableau XXIV : CMI et CMB de la Gentamicine et de 3 composants d'huiles essentielles contre six germes responsables de mammites

Agents pathogènes	Carvacrol composant majoritaire ml/L ANANDA BASKARAN et al. (112)		1,8-cinéole composant majoritaire ml/L ZAOULI et al. (92)		Bornéol composant majoritaire ml/L FADLI et al. (109)		Gentamicine (mg/L) FADLI et al. (109) CMI	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
S. aureus	5	12	1.25à5	ND		7.5	8	15
Str. Faecalis	ND	ND	10	ND	ND	ND	ND	ND
E. coli	8	12	1.25à2.5	5	7.5	7.5	31	31
Str. Uberis	4	12	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Str. Agalactiae	8	8	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Str. Dysgalactiae	8	8	ND	ND	ND	ND	ND	ND

D'après les données présentées dans les tableaux XXIII et XXIV, les HE ont un diamètre d'inhibition inférieur à celui de l'antibiotique de la famille des aminosides : la gentamicine. Mais ce n'est pour autant que les huiles essentielles n'ont aucun effet. D'après une thèse vétérinaire, un germe est dit sensible à une huile essentielle si le diamètre d'inhibition est supérieur à 10 mm (19). Ainsi pour les huiles essentielles testées ci-dessus, la majorité des bactéries sont dites sensibles.

En ce qui concerne les CMI et les CMB, il est difficile de comparer une molécule telle que la gentamicine avec une concentration précise en mg/L, à des huiles essentielles composées de plusieurs molécules avec une concentration en mL/L.

### 3. MECANISMES D'ACTION SUPPOSES DES HUILES ESSENTIELLES :

Les effets biologiques des HE sont dus à leur cytotoxicité. Etant composées d'un grand nombre de constituants, les HE ne semblent pas avoir de cibles cellulaires spécifiques. Comme ce sont des molécules lipophiles, elles passent à travers la membrane cytoplasmique,

cassent la structure des différentes couches de polysaccharides, d'acides gras et de phospholipides et rendent la membrane cytoplasmique perméable (Figure 27). La cytotoxicité est donc issue de dommages membranaires. Pour la bactérie, la perméabilisation de sa membrane est associée à une perte d'ions et à la diminution du potentiel membranaire, à l'effondrement des pompes à protons et à la déplétion du stock d'ATP. Les HE peuvent également coaguler le cytoplasme et endommager les lipides et les protéines (Figure 28). Ces phénomènes mènent à la fuite des macromolécules et à la lyse des bactéries (Figures 27 et 28) (05,06,16,22).

Un autre mécanisme probable est l'appariement des composants des HE aux enzymes bactériennes (16).

Chez les cellules eucaryotes, les HE peuvent provoquer la dépolarisation des membranes mitochondriales par diminution du potentiel membranaire, affecter le cycle du calcium ionisé et les autres chaînes ioniques, réduire le gradient de pH et affecter les pompes à protons et le stock d'ATP. Elles modifient la fluidité des membranes, qui deviennent anormalement perméables. Ceci provoque une fuite des radicaux libres, du cytochrome C, des ions calcium et des protéines, comme dans le cas du stress oxydatif. La perméabilisation des membranes mitochondriales externe et interne mène à la mort cellulaire par apoptose et nécrose (05,16,22).

Il faut garder en tête que les HE sont des mélanges complexes de molécules. On peut se demander si les effets biologiques sont dus à la synergie de ces molécules ou sont uniquement le reflet de l'action des molécules présentes en plus grande proportion (05).

Figure 28 : Photographies au microscope électronique à transmission de *S. aureus* et d'*E. coli* isolés de mammites (12).

A. Contrôle : *S. aureus* non traité D. Contrôle *E. coli* non traité B. *S. aureus* traité avec de l'HE de Cannelle de Chine E. *E. coli* traité avec de l'HE de Cannelle de Chine C. *S. aureus* traité avec de l'HE de Cannelle de Chine F. *E. coli* traité avec de l'HE de Cannelle de Chine

Le temps de contact est de 3h et l'HE était à la concentration minimale inhibitrice.

### **G. Galénique des préparations à base d'huiles essentielles :**

La galénique correspond aux techniques pharmaceutiques de fabrication et de préparation des médicaments. Les HE étant lipophiles, il faut privilégier les matières grasses comme excipient

pour les administrer. Certaines permettent de supprimer ou d'atténuer l'agressivité des HE irritantes comme les HE phénoliques. L'eau ne convient en aucun cas car les HE n'y sont pas miscibles. Il existe des émulsifiants permettant d'assurer une émulsion plus ou moins stable ce qui peut être très utile si la préparation allie phytothérapie et aromathérapie (04).

Les voies d'administration sont nombreuses. On peut citer la voie orale, la voie rectale, la voie cutanée, la voie génitale, la voie diathélique ou la voie respiratoire. La galénique est donc à adapter selon la voie d'administration (04,06). Par voie orale, on peut utiliser les huiles végétales alimentaires comme les huiles de colza, tournesol, olive, arachide, etc... On peut éventuellement utiliser de l'huile de paraffine qui n'est pas résorbée au niveau intestinal ou encore de l'huile de foie de morue apportant en plus des vitamines (04). Par les voies cutanées ou muqueuses, les huiles de tournesol, d'amande douce, de sésame ou de chanvre sont couramment utilisées pour leur pouvoir de résorption rapide et intense. Elles seront donc utiles lors d'affections au niveau de la mamelle, des articulations, d'abcès... Les huiles de ricin et d'olive ont quant à elles une bonne pénétration mais moindre par rapport aux huiles citées précédemment. Les huiles de ricin, de sésame et d'amande douce ont des propriétés intéressantes en cas d'irritation et d'inflammation (04). Les autres corps gras comme la vaseline, la graisse à traire ou la cire d'abeille ont une pénétration cutanée quasi nulle et auront donc une action de surface et de protection sur les plaies, les irritations... (Tableau XXV)(04).

Excipients utilisables Action sur un organe sous-jacent par passage transcutané : Application aux Mammites et à l'œdème mammaire HE pure En massage sur l'organe, seulement si mélange HE non irritant Eau + HE JAMAIS Emulsionnants pour HE Transcutol® si mélange HE irritant Huiles végétales peu pénétrantes Ne pas utiliser : Arachide, Olive et Ricin Huiles végétales pénétrantes Tournesol, Noisette, Amande douce Huile de paraffine Ne convient pas Huile de foie de poisson Ne convient pas Vaseline, Graisse à traire et Cire d'abeille Ne convient pas Lanoline, Saindoux Insuffisant

Tableau XXV : Excipients utilisables pour les huiles essentielles (HE) au niveau de la mamelle (04).

Excipients utilisables	Action sur un organe sous-jacent par passage transcutané : Application aux Mammites et à l'œdème mammaire
------------------------	---

HE pure	En massage sur l'organe, seulement si mélange HE non irritant
Eau + HE	JAMAIS
Emulsionnants pour HE	Transcutol® si mélange HE irritant
Huiles végétales peu pénétrantes	Ne pas utiliser : Arachide, Olive et Ricin
Huiles végétales pénétrantes	Tournesol, Noisette, Amande douce
Huile de paraffine	Ne convient pas
Huile de foie de poisson	Ne convient pas
Vaseline, Graisse à traire et Cire d'abeille	Ne convient pas
Lanoline, Saindoux	Insuffisant

L'incorporation des HE dans une solution huileuse peut aller de 1 à 50 % d'une ou plusieurs HE dans une huile végétale grasse (olive, amande douce, noisette, sésame, carthame, soja, tournesol, germe de blé ...) vierge, de première pression à froid. Sur la peau, la dilution est de 5% maximum pour les HE phénoliques en massage locaux (06).

Voici quelques petits repères utiles pour fabriquer des préparations à base d'HE et éviter des erreurs dans la posologie (Tableau XXVI) :

Tableau XXVI : Correspondance nombre de goutte d'huile essentielle-mg-ml (04)

1 goutte d'HE	25 mg environ
1 ml d'HE	30-35 gouttes
1 g d'HE	40 gouttes environ

Les huiles essentielles et leurs constituants passent la peau par différents mécanismes. Elles entraînent la rupture de la structure lipidique intercellulaire très organisée entre les cornéocytes de la couche cornée, la rendant perméable. Elles interagissent avec les domaines de protéines intracellulaires, ce qui induit un changement de conformation et rend la couche cornée plus perméable. Et elles peuvent agir sur les desmosomes entre les cornéocytes ou

altérer l'activité métabolique à travers la peau. Les molécules permettant ces actions sont principalement les terpènes et les terpénoïdes. Elles permettent l'augmentation de la perméabilité de la peau et ainsi les autres molécules comme les phénols, les aldéhydes peuvent atteindre l'organe sous-jacent et la circulation générale (27).

Pour conclure, deux possibilités s'offrent à nous pour l'administration des huiles essentielles lors du traitement de mammites. La voie diathélique est possible mais plusieurs problèmes se posent, en particulier la stérilité de la préparation, ainsi que l'irritation induite par l'injection des huiles essentielles directement dans la mamelle. La voie transcutanée par massage du quartier atteint reste donc la voie d'administration à privilégier.

#### **H. Huiles essentielles utiles lors d'infection de la mamelle :**

D'après des travaux précédemment effectués et des sondages auprès des éleveurs, les HE sont assez couramment utilisées lors de mammites (Tableau XXVII). Philippe Labre a décrit deux types de traitements possibles. Le premier est l'injection intramammaire avec les HE suivantes : palmarosa, tea tree, lavandin et laurier. Mais le problème majeur est la stérilité de la préparation injectée. C'est pourquoi, il recommande le traitement topique avec un massage aromatique. Les HE recommandées en association sont le thym thymol, l'origan, le tea tree, le cyprès, l'eucalyptus citronné et la menthe poivrée (04).

Tableau XXVI : Correspondance nombre de goutte d'huile essentielle-mg-ml (04)

L'essai AROMAVET datant de 2000 a décrit deux protocoles utilisant des HE contre les mammites aiguës et les mammites chroniques. L'appréciation des résultats est essentiellement défavorable (24). Quelques thèses ont décrit des essais de terrains effectués il y a une dizaine d'années. Deux ont étudiées l'utilisation d'un traitement intramammaire. Un était constitué d'une seule HE : le thym vulgaire à linalol (25) et l'autre était constitué d'un mélange d'HE : laurier noble, romarin officinal à verbénone et thym satureioïdes (19). Une autre thèse a décrit un traitement en massage aromatique constitué d'eucalyptus citronné, de menthe poivrée et de thym satureioïdes (03). Une dernière thèse a décrit les résultats d'un sondage auprès d'éleveurs sur leurs pratiques en phytothérapie et en aromathérapie. Les éleveurs utilisent majoritairement les HE suivantes en massage par rapport à l'injection intramammaire : le tea tree, le ravensara, l'eucalyptus citronné, la menthe poivrée et le laurier noble (26). Dans la littérature, les essais in vitro d'HE sur des bactéries responsables de mammites utilisent soit des HE soit des extraits des constituants majoritaires d'HE. Les résultats donnés

correspondent aux diamètres d'inhibition obtenu par aromatoigramme et/ou des CMI et CMB avec une concentration en mL/L d'huile essentielle (13,17,23,28,29).

Huiles essentielles utilisées précédemment dans le traitement ou les essais in vitro sur les germes responsables de mammites	
Bergamote	Origan vulgaire
Cannelle de Ceylan	Palmarosa
Cyprès	Ravensara
Eucalyptus citronné	Romarin officinal verbénone
Eucalyptus globulus	Sarriette des montagnes

Laurier noble	Thym vulgaire linalol
Marjolaine à coquilles	Thym vulgaire thymo
Menthe poivrée	Thym saturoioides
Fenouil doux	Tea tree
Lavandin	Thym vulgaire carvacrol

les HE utilisées allient des propriétés anti-infectieuses, anti-inflammatoires, antalgiques et immunomodulatrices.

II. Etat des lieux et perspectives : traitement des mammites par aromathérapie

#### **A. Contexte et attente des éleveurs :**

#### **1. CONTEXTE PLAN ECOANTIBIO 2012-2017 ET DEVELOPPEMENT DE L'AGRICULTURE BIOLOGIQUE :**

En 2012, le premier plan Ecoantibio envisageait de réduire de 25% en 5 ans l'exposition des animaux aux antibiotiques avec une attention particulière à l'utilisation des antibiotiques dits « critiques ». Depuis 1928, avec la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming, l'usage des antibiotiques n'a cessé d'augmenter. Or déjà à cette époque, le phénomène d'antibiorésistance avait été observé. Alexander Fleming avait d'ailleurs déjà insisté sur les bonnes pratiques d'utilisation des antibiotiques. La lutte contre l'antibiorésistance est donc un défi majeur du XXIème siècle. Si aucun effort n'est effectué pour lutter contre ce phénomène,

il est estimé que le nombre de décès humains liés à l'antibiorésistance sera 14 fois plus important en 2050 qu'en 2015. Pour objectiver les résultats de ce plan, l'indice ALEA (Animal Level of Exposure to Antimicrobials = Niveau d'exposition des animaux aux antibiotiques) est calculé chaque année depuis 1999. Il est calculé en divisant le poids vif traité par la biomasse de la population animale potentiellement consommatrice d'antibiotiques. De 2012 à 2015, la consommation en France a diminué de 20% selon l'indice ALEA (6,120). Cette diminution s'accompagne de la réduction de l'indice ALEA de -21,1% pour les céphalosporines de dernières générations et de -23,6% pour les fluoroquinolones chez les bovins sur les deux dernières années. En ce qui concerne les traitements antibiotiques intramammaires, une diminution de 12% du nombre traitements par vache laitière est à noter. En 1999, 1,68 traitement intramammaire par vache laitière a été vendu alors qu'en 2014-2015 ce chiffre est de 1,47 traitement en moyenne. Ainsi en 2014-2015, les estimations des traitements intramammaires sont de 89,8 traitements pour 100 vaches en lactation et 57,3% des vaches tarées ont reçu un traitement intramammaire à base d'antibiotiques (01). Par ailleurs, l'agriculture biologique se développe considérablement ces dernières années. En 2002, les exploitations biologiques représentaient 1,71% de l'ensemble des exploitations françaises. Or en 2015, elles représentaient 6,5% des exploitations françaises. En 2015, les filières les plus dynamiques au développement de l'agriculture biologique sont les élevages bovins avec une augmentation de 23% et les élevages ovins avec une augmentation de 13% par rapport à 2014 (33). Les médecines complémentaires ont donc leur place dans l'arsenal thérapeutique vétérinaire.

## **2. PLAN ECOANTIBIO 2 2017-2021 : VERS UNE DYNAMIQUE POUR LES TRAITEMENTS « ALTERNATIFS » ET POUR LA PREVENTION DES MALADIES :**

Le second plan Ecoantibio dévoilé fin Avril 2017, s'inscrit dans le prolongement du premier plan Ecoantibio. Il est question de poursuivre la dynamique du plan 2012-2017, en consolidant les acquis et en poursuivant les actions précédemment engagées comme la diminution de l'exposition des animaux aux antibiotiques. L'axe 1 de ce second plan promeut le développement de mesures de prévention des maladies infectieuses et de faciliter le recours aux traitements alternatifs. L'action 2 de l'axe 1, « Acquérir des références sur les traitements alternatifs permettant de limiter la prescription d'antibiotiques », donne aux médecines complémentaires une réelle légitimité. Ainsi, les recherches dans le domaine des traitements alternatifs aux antibiotiques (l'aromathérapie, la phytothérapie, la phagothérapie...) seront

soutenues. De plus, des guides de bonnes pratiques pour ces traitements seront élaborés et diffusés. Enfin, une meilleure connaissance des conditions techniques et réglementaires seront nécessaires pour pouvoir les utiliser dans les bonnes conditions et connaître leur rapport bénéfice/risque. Les autres mesures font appel au bon sens zootechnique et médical. Sont ainsi concernées la promotion des mesures de prévention sanitaire et zootechnique, l'utilisation des vaccins, la notion de biosécurité et la formation continue de tous les acteurs concernés (éleveurs, vétérinaires...). L'approche « One health », une seule santé, est essentielle à la lutte contre l'antibiorésistance à la fois en médecine humaine et en médecine vétérinaire. Les efforts doivent être faits conjointement avec les médecins, les vétérinaires, les patients et les éleveurs pour préserver ce bien public mondial que sont les antibiotiques. De ces efforts dépendent la santé humaine et animale et la sécurité alimentaire (31).

### **3. ATTENTE DES ELEVEURS :**

La conversion en agriculture biologique et le respect du cahier des charges ont motivé de nombreux éleveurs à participer à des formations ou à des stages concernant les médecines complémentaires et ont donc contribué à leur développement. Le contexte du plan Ecoantibio, a également renforcé ces démarches. Le contexte de crise incite plus les éleveurs à avoir recours à ce type de soin, pensant que cela est moins coûteux. Or l'utilisation de l'aromathérapie ou de la phytothérapie nécessite tout de même l'expertise du vétérinaire et n'est pas moins coûteuse que les traitements conventionnels. Toutes les maladies selon leur gravité ne sont pas éligibles à ce type de traitement. Les éleveurs peuvent avoir des demandes diverses quant aux médecines complémentaires. Les éleveurs déçus par une efficacité peu satisfaisante des traitements conventionnels dans leurs élevages, pensent que les médecines complémentaires seront plus efficaces. Or le problème ne réside pas dans l'efficacité des traitements mais dans la maîtrise des maladies de l'élevage par l'amélioration de la zootechnie. Une autre attente est celle de la prévention des maladies dans les élevages où la gestion des différentes affections est bien maîtrisée. D'autres éleveurs estiment que, grâce à ces substances, ils peuvent gérer seuls leurs animaux malades sans qu'aucun diagnostic n'ait été établi préalablement. D'après HIVIN, les éleveurs sont demandeurs et souhaitent être plus informés sur les médecines complémentaires. Ainsi 56% des éleveurs, quelles que soient leurs connaissances sur le sujet, montrent un intérêt pour le développement et l'information sur ces médecines complémentaires. Deux tiers des éleveurs en agriculture biologique utilisent des traitements de phyto-aromathérapie. Et  $\frac{3}{4}$  des éleveurs sont satisfaits de leur utilisation car ils trouvent ces traitements efficaces et conformes aux cahiers des charges de

l'agriculture biologique. Les éleveurs insatisfaits par ces traitements, le sont par leur inefficacité.

#### **4. PLACE DU VÉTÉRINAIRE TRAITANT :**

Le vétérinaire traitant est le garant du bien-être animal et de la sécurité sanitaire. Le concept « One health » prend toute son importance ici, en particulier dans la lutte contre l'antibiorésistance (33). Le vétérinaire reste l'intermédiaire privilégié dans le traitement des affections. Les éleveurs attendent de leur vétérinaire un conseil éclairé sur toutes les thérapeutiques disponibles et envisageables pour soigner leurs animaux. Le vétérinaire doit donc être capable d'informer ses clients quant à ce type de soin et de réaliser une prescription adaptée à la maladie concernée en respectant la législation en vigueur.

#### **B. Données existantes :**

##### **1. AROMATOGRAMMES :**

L'aromatogramme a été mis au point en 1950 par Schroeder et Massing. Il a permis de classifier les HE et de définir leurs propriétés antibactériennes (19). Depuis 1950, de nombreuses études ont été menées pour déterminer les propriétés anti-infectieuses des HE. Une étude menée sur 6 années par l'ADAGE 35 et l'ISAE 35 a permis de déterminer l'activité antimicrobienne in vitro de nombreuses HE. Les germes étaient isolés de mammites dans les élevages adhérents de l'ADAGE 35. L'ISAE 35 a ainsi mis au point en 2010 une méthode d'aromatogramme. Il s'agit d'une méthode de diffusion en milieu gélosé reprenant le principe de l'antibiogramme. Cette technique s'applique aux bactéries à croissance rapide donnant une culture visible à l'œil nu en 24 heures à 37°C. Une gélose de Mueller-Hinton estensemencée d'une culture bactérienne calibrée pure (107 UFC/ml) et des disques en papier buvard imprégné d'une HE sont déposés. Un volume d'1µL d'HE est utilisé sur les disques. Ce volume fournit les résultats les plus répétables et reproductibles. Les HE diffusent au sein de la gélose en créant un gradient de concentration décroissant au fur et à mesure de l'éloignement du disque. Après 18 à 24 heures d'incubation à 37 +/- 2°C, la lecture peut être effectuée. Le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne est lu autour du disque à l'aide d'un pied à coulisse et est exprimée en mm.

Les germes isolés dans les élevages adhérents étaient les suivants :

Bactéries Nombre % Streptococcus uberis 26 46 Staphylococcus aureus 15 27 Escherichia coli 2 4 Staphylocoques à coagulase négative 2 4 Streptococcus dysgalactiae 2 4 Trueperella pyogenes 2 4 Corynebacterium bovis 2 4 Klebsiella oxytoca 2 4 Streptococcus agalactiae 1 2 Enterococcus faecalis 1 2 Enterococcus faecium 1 2

Tableau XXVIII : Germes isolés pour la réalisation d'aromatogrammes par l'ADAGE 35 (123)

Bactéries	Nombre	%
Streptococcus uberis	26	46
Staphylococcus aureus	15	27
Escherichia coli	2	4
Staphylocoques à coagulase négative	2	4
Streptococcus dysgalactiae	2	4
Trueperella pyogenes	2	4
Corynebacterium bovis	2	4
Klebsiella oxytoca	2	2
Streptococcus agalactiae	1	2
Enterococcus faecalis	1	2
Enterococcus faecium	1	2

42 HE ont été testées sur les germes isolés cités ci-dessus (Tableau XXVIII). Les HE testées sont sélectionnées selon 3 critères : les HE devaient posséder une indication contre les mammites, devaient avoir fait preuve d'une efficacité contre les mammites et devaient posséder des propriétés antimicrobiennes connues (32). Les résultats sont satisfaisants puisque les diamètres d'inhibition (Tableau XXIX) sont majoritairement supérieurs à 10 mm.

Ces HE sont composées de molécules ayant un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. On retrouve le thymol, les terpinènes et pinènes, les phénols monoterpéniques ou les aldéhydes terpéniques. Cette étape permet de cibler les HE possédant une activité antibactérienne. La catégorisation des souches bactériennes comme sensibles ou résistantes

face aux HE ne peut être effectuée. Actuellement, il est juste possible de connaître l'existence d'un effet inhibiteur ou non (21,32).

DIAMETRE D'INHIBITION MOYENNE (MM) MIN (MM) MAX (MM) ECART-TYPE (MM)

HE	DIAMETRE D'INHIBITION			
	MOYENNE (MM)	MIN (MM)	MAX (MM)	ECART-TYPE (MM)
AJOWAN (Trachyspermum ammi)	20.40	8	48	8.01
ORIGAN D'ESPAGNE (Corydothymus capitatus)	20.36	6	33	6.59
SARIETTE DES MONTAGNES (Satureja montana)	19.89	9	40	7.37
CANNELLE DE CEYLAN (Cinnamomum zeylanicum)	17.77	6	40	6.86
Thymus vulgaire à thymol	17.57	8	36	6.15
MANUKA (Leptospermum scoparium)	17.55	6		6.59
LITSEE	15.45	6	40	8.81

CITRONNEE (Litsea citrata)				
-------------------------------	--	--	--	--

Ces HE sont composées de molécules ayant un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. On retrouve le thymol, les terpinènes et pinènes, les phénols monoterpéniques ou les aldéhydes terpéniques. Cette étape permet de cibler les HE possédant une activité antibactérienne. La catégorisation des souches bactériennes comme sensibles ou résistantes face aux HE ne peut être effectuée. Actuellement, il est juste possible de connaître l'existence d'un effet inhibiteur ou non (21)

Bactérie	Diamètre d'inhibition en mm $\pm$ écart-type		
	HE romarin officinal var. typicus en climat sub-humide 2	HE romarin officinal var. typicus en climat semi-aride4	HE romarin officinal var. troglodytorum en climat très aride 6
E. coli	16,5 $\pm$ 1	17 $\pm$ 0,5	16+1
K. pneumoniae	13 $\pm$ 1	12,5 $\pm$ ,5	16+1
S. aureus	10,5 $\pm$ 1,5	9,5 $\pm$ 0,5	13,5 $\pm$ 1,5
B. cereus	13 $\pm$ 1	15 $\pm$ 0	12,5 $\pm$ 0,5
Str. Faecalis	9 $\pm$ 1	7,5 $\pm$ 0,5	10,5 $\pm$ 0,5

Tableau XXXI : Diamètres d'inhibition en fonction des germes de l'huile essentielle issue de *Thymus nummularius*.

Bactérie ou levure	Diamètre de la zone d'inhibition en mm $\pm$ écart type
E. coli	30.0 $\pm$ 0.5
P. aeruginosa	27.0 $\pm$ 0.3
S. aureus	25.0 $\pm$ 0.2
S. pyogenes	24.0 $\pm$ 0.4
C. albicans	23.0 $\pm$ 0.3

L'efficacité d'une HE est donc variable. Pour une même plante cultivée dans des conditions différentes, la composition de leur HE respective sera différente. Pour une même espèce de plante, mais une variété différente, la composition de l'HE sera différente. Ainsi la notion de chémotype prend tout son sens. Enfin d'une plante à une autre, la composition de leur HE est différente et leur action sur un même germe n'aura pas la même efficacité (Tableaux XXXI et XXXI).

En conclusion, grâce aux aromatogrammes, il a été observé que certaines HE possèdent une activité bactérienne *in vitro*. Ce test permet de faire un screening des HE potentiellement utilisables *in vivo*.

Tableau XXX : Diamètres d'inhibition en fonction des germes et de la provenance de l'huile essentielle (11)

Tableau XXXI : Diamètres d'inhibition en fonction des germes de l'huile essentielle issue de *Thymus nummularius* (08).

## **2. LITTERATURE SCIENTIFIQUE :**

Dans la littérature scientifique, de nombreuses publications traitent du sujet de l'action des HE en tant qu'agents antibactériens contre les germes responsables de mammites. L'intérêt de pour ce sujet est mondial, en passant des USA à l'Argentine et au Brésil, de l'Italie à la Thaïlande, l'Inde ou la Chine. Ces essais *in vitro* démontrent largement l'action antibactérienne de nombreuses HE par la mesure des diamètres d'inhibition, de la CMI ou de la CMB. La majorité de ces publications conclut à l'intérêt de mener d'autres études sur l'application *in vivo* pour le traitement des mammites et sur la contribution de ce type de traitement à la diminution de l'emploi d'antibiotiques. La méthode de Kirby-Bauer (aromatogramme) est la plus utilisée. Les valeurs sont obtenues après trois mesures. Les diamètres d'inhibition sont mesurés en millimètres (mm). En Italie, un essai a décrit l'action d'HE telles que la sarriette des montagnes, le thym vulgaire à thymol ou l'origan vulgaire en mélanges, ou l'action de mélanges des composants majoritaires de ces HE (p-cymène, carvacrol et thymol) sur des bactéries isolées d'épisodes cliniques ou subcliniques de mammites chez des brebis ou des chèvres (*S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. warneri*, *S. xylosus*, *S. sciuri* et *E. coli*) (Tableau XXXII). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les HE de sarriette des montagnes, de thym vulgaire à thymol et d'origan vulgaire. Ceci s'explique par le fait qu'elles contiennent une forte proportion de composés phénoliques tels que le thymol et

le carvacrol. Le mélange de sarriette des montagnes et de thym vulgaire à thymol donne de meilleurs résultats que les HE seules. Le mélange de leurs composants majoritaires purs donne de moins bons résultats. Ainsi, la synergie des composants d'une HE est donc un facteur essentiel à leur action antibactérienne (28).

HE Diamètre d'inhibition en mm S. aureus S. chromogenes S. warneri S. xylosus S. sciuri E. coli Sarriette des montagnes 21.7 11.3 12.0 12.7 11.7 13.3 Thym vulgaire à carvacrol 13.7 8.79 0.0 7.0 0.0 0.0 Thym vulgaire à thymol 13.3 12.3 14.7 12.0 10.5 0.0 Origan vulgaire 11.0 9.3 10.0 9.7 10.0 0.0 Mélange Sarriette et thym thymol 27.7 23.7 20.0 18.0 16.3 18.0 Mélange sarriette et origan 17.3 12.3 9.3 8.6 12.3 13.3 Mélange thymol, carvacrol 14.0 18.3 11.0 9.70 8.0 13.3 Mélange p-cymène, carvacrol et thymol 29.3 21.6 23.6 20.0 31.3 21.6

Tableau XXXII : Diamètres d'inhibition de différentes huiles essentielles, de leur mélange et de leurs composants majoritaires en fonction des germes (28).

HS	Diamètre d'inhibition en mm					
	S. aureus	S. chromogenes	S.warneri	S.xylosus	S. sciuri	E. cols
Sarriette des montagnes	21.7	11.3	12.0	12.7	11.7	13.3
Thym vulgaire à carvacrol	13.7	8.79	00	7.0	0.0	0.0
Thym vulgaire à thymol	13.2	12.3	14.7	12	10.0	0.0
Origan vulgaire	11.0	9.3	10.0	9.7	10.0	0.0
Mélange	27.7	23.7	20.0	18.0	16.3	18.0

Sarriette et thym thymol						
Mélange sarriette et origan	17.3	12.3	9.3	8.6	12.3	13.3
Mélange thymol, carvacrol	14.0	18.3	11.0	9.70	8.0	13.3
Mélange p-cymène, carvacrol et thymol 29	29.3	21.6	23.6	20.0	31.3	21.6

Le tableau XXXIII montre les résultats obtenus avec l'huile essentielle de Cannelle de Chine à une dilution à 2 %. Les bactéries ont été isolées de mammites bovines cliniques et subcliniques

Tableau XXXIII : Diamètres d'inhibition d'huile essentielle (HE) de Cannelle de Chine en fonction de différents germes (12).

Bactéries	Diamètre d'inhibition en mm $\pm$ écarttype		
	5 $\mu$ L d'HE par disque	10 $\mu$ L d'HE par disque	20 $\mu$ l d'HE par disque
S. aureus	15.0 $\pm$ 0.3	20.0 $\pm$ 0.6	29.6 $\pm$ 0.1
S. epidermidis	7.2 $\pm$ 0.0	9.1 $\pm$ 0.0	19.1 $\pm$ 0.0
S. hyicus	7.2 $\pm$ 0.0	12.5 $\pm$ 0.1	27.0 $\pm$ 0.0
S. xylosus	10.1 $\pm$ 0.6	17.5 $\pm$ 0.8	33.3 $\pm$ 1.8
E. coli	14.2 $\pm$ 0.3	21.7 $\pm$ 0.4	30.7 $\pm$ 0.8

Si l'on garde comme norme 10 mm de diamètre d'inhibition, pour définir l'efficacité de l'huile essentielle testée, alors l'HE de cannelle de Chine a une action inhibitrice satisfaisante sur toutes les bactéries testées lorsque le disque est imprégné de 20 µL d'HE. Dans cette étude, plus la quantité d'HE imprégnée sur le disque est importante plus les diamètres d'inhibition augmentent (12).

Certains essais évaluent directement l'action des composants majoritaires de certaines HE. Le trans-cinnamaldéhyde, l'eugénol, le carvacrol et le thymol ont ainsi été testés sur des souches de *S. aureus*, *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis* et *E. coli* isolées de mammites bovines. Le trans-cinnamaldéhyde semble avoir l'action antibactérienne la plus importante avec une CMI variant de 0,05 à 0,1 % et une CMB variant de 0,4 à 0,45%. Pour les trois autres molécules, la CMI est comprise entre 0,4 à 0,8% et la CMB entre 0,8 et 1,5% (112). Ainsi, en utilisant la molécule de trans-cinnamaldéhyde à une concentration correspondant à la CMB, les UFC ont été réduites substantiellement de 4 à 5 log<sub>10</sub> UFC /ml et sont devenues indétectables dans les 24 heures (p<0,001).

L'HE de thym vulgaire (absence de connaissance du chémotype) a une action antibactérienne sur des souches de *S. aureus*, *S. chromogenes* et *Str. uberis* issues de mammites cliniques de bovins. A partir d'une concentration de 2%, il y a absence de croissance bactérienne (94).

L'HE de Lemongrass et ses composants majoritaires (citral, géraniol, myrcène) ont été testés contre des souches de *S. aureus*, *Str. agalactiae*, *Bacillus cereus*, *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa* isolées de mammites cliniques et subcliniques de bovins. La CMI et la CMB de l'HE de Lemongrass variaient de 0,13 à 1,09 µl/ml. Pour les composants utilisés seuls tels que le citral, le géraniol ou le myrcène, ces valeurs variaient de 0,15 à plus de 17,5 µl/ml. Les résultats de l'HE seule sont meilleurs que ses composants seuls. Une fois encore, la synergie entre les différents composants d'une HE est un élément majeur de leur action et de leur efficacité antibactérienne (22).

## Bactéries

Diamètre d'inhibition en mm ± écarttype	5 µL d'HE par disque	10 µL d'HE par disque	20 µL d'HE par disque
<i>S. aureus</i>	15.0±0.3	20.0±0.6	29.6±0.1
<i>S. epidermidis</i>	7.2±0.0	9.1±0.0	19.1±0.0
<i>S. hyicus</i>	7.2±0.0	12.5±0.1	27.0±0.0
<i>S. xylosus</i>	10.1±0.6	17.5±0.8	33.3±1.8
<i>E. coli</i>	14.2±0.3	21.7±0.4	30.7±0.8

Tableau XXXIII : Diamètres d'inhibition d'huile essentielle (HE) de Cannelle de Chine en fonction de différents germes (12).

Deux publications présentent les résultats des propriétés antibactériennes de plantes médicinales, dont *Allium sativum* et *Coccinia grandis*, utilisées au Pakistan et en Inde contre des germes isolés de mammites cliniques comme *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* et *Str. agalactiae*. Les CMI et diamètre d'inhibition ont été mesurés. Les diamètres d'inhibition s'étendaient de 0 à 21 mm (29) et de 9,7 à 21,3 mm (17). Les CMI variaient de 0 à 250 mg/ml (119) et de 12,5 à 50 mg/ml (17). Pour cette dernière étude, la CMB a aussi été déterminée était au minimum inférieure ou égale à 50 mg/ml (17). Pour conclure, l'efficacité d'une huile essentielle est variable d'une bactérie à une autre, et d'une huile essentielle à une autre. Ces résultats sont cohérents avec les données présentées et décrites précédemment.

Une proportion non négligeable de publications traite uniquement de l'action des HE contre des souches de *S. aureus* issues de mammites bovines et responsables de la formation de biofilms.

Les HE de Clou de Girofle et de Cannelle de Ceylan (Tableau XXXIV), ainsi que leurs composants majoritaires, qui sont respectivement l'eugénol et le cinnamaldéhyde, ont été testés contre 26 souches de *S. aureus* isolées de mammites subcliniques bovines . Les CMI obtenues pour les huiles essentielles sont plus élevées que les CMI des composants majoritaires comme l'eugénol et le cinnamaldéhyde. Ainsi les molécules testées ont à elles seules une action antibactérienne intéressante. Pour les huiles essentielles les CMI sont environ 1,4 fois plus élevées car la concentration par exemple en eugénol est plus faible (autres molécules présentes dans l'huile essentielle)

Tableau XXXIV : Concentration minimale inhibitrice (CMI) d'huile essentielle (HE) de Cannelle de Ceylan, de Clou de girofle et de leurs composants majoritaires en fonction des germes .

HE ou composants testés	CMI 90% (mg/ml)
HE de Clou de Girofle	0.392
Eugénol	0.237
HE de Cannelle de Chine	0.243
Cinnamaldéhyde	0.199

L'utilisation d'une HE d'orange contre *S. aureus* a permis d'évaluer la CMI, qui est égale à une concentration de 0,025% de l'huile essentielle (34). Une étude sur l'efficacité des HE d'Origan vulgaire et de Manuka sur 14 souches de *S. aureus* ont permis d'obtenir les CMI suivantes : 0,240 à 0,480 mg/ml pour l'HE d'origan vulgaire et 0,513 mg/ml pour l'HE de Manuka (34).

Une seule étude s'est intéressée à 15 souches de *Str. uberis* isolées de mammites bovines. L'HE de *Minthostachys verticillata* et le limonène ont été testés (Tableau XXXV) (35)

Tableau XXXV : Concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) de l'huile essentielle (HE) de *Minthostachys verticillata* et du limonène pour plusieurs souches de *Str. uberis* (35).

Substance testée	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)
HE de <i>Minthostachys verticillata</i>	14.3 à 114.5	114.5 à 229
Limonène	3.3 à 52.5	210

Pour conclure, en synthétisant les résultats de toutes les publications précédentes, les valeurs de CMI et CMB sont comprises entre 0 à 250 mg/mL. Pour les CMI et CMB désignées par une concentration d'huile essentielle, elle varie de 0,025 à 2%. Ces chiffres sont seulement indicatifs, car la composition des huiles essentielles est très différente selon plusieurs critères (espèces différentes, variations pédo-climatiques).

### 3. ESSAIS DE TERRAIN :

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

En 2001, une première thèse a évalué l'efficacité d'un traitement intramammaire à base d'HE de Thym vulgaire à linalol (10 à 15 gouttes) dans 10 ml d'eau ppi et du cétiol (agent tensioactif). Différents protocoles ont été effectués. Le protocole de départ consistait à 5 injections intramammaire à 12 heures d'intervalle et la sixième 24 heures plus tard. Or plusieurs éleveurs ont modifié le protocole. Certains ont effectué les injections jusqu'à la guérison clinique ou alors ont stoppé le traitement aromatique pour avoir recours à un traitement antibiotique. 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* (25).

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 (24).

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 satureioïdes, 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%. Les résultats bactériologiques à J5 ont permis d'obtenir 34% de prélèvement stériles.

Tableau XXXV : Concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) de l'huile essentielle (HE) de *Minthostachys verticillata* et du limonène pour plusieurs souches de *Str. uberis* (35).

L'efficacité des HE directement par voie diathélique est probablement diminuée par la présence des globules de gras présents dans le lait (19). Selon une enquête réalisée auprès d'éleveurs utilisateurs de traitements d'aromathérapie (26), 75% d'entre eux sont satisfaits pour le traitement des mammites.

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. La CMI variait de 0,09375% à 0,1875% pour les bactéries suivantes : *E. coli*, *S. aureus*, *Str. uberis*, *Str. agalactiae* et *Str. dysgalactiae*. *In vivo*, La guérison clinique avoisinait les 40% et la guérison bactériologique observée était de 65% sur les échantillons interprétables pour la solution en suspension aqueuse et de 37,5% pour celle en solution huileuse. Les résultats étaient toujours peu satisfaisants par rapport à l'étude précédente de 2006 (36,37,38).

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 (38,39).

En 2009, la question de l'efficacité des HE dans le lait a été soulevée. 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 *Str. uberis*, *Str. 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 (38,39,40).

Suite à ses travaux sur les aromagrammes, 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 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 variables 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 statistiquement mais donnent de bonnes bases pour élaborer de nouvelles études (32). 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 (*S.aureus*, *SCN*, *Str. uberis*, *C. bovis*, *E. 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 (03,41).

L'ensemble de ces essais de terrain ont démontré la difficulté de récolte des données et de leur exploitation statistique. 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. Des études complémentaires sur les taux de guérison bactériologique et cellulaire sont nécessaires à la validation de ce type de traitement. Un nombre suffisamment conséquent de données doit être récolté. De plus, la question des résidus est souvent peu abordée et aucune quantification n'a été envisagée après le traitement par chromatographie et/ou spectrométrie de masse.

### **C. Législation, résidus et huiles essentielles :**

#### **1. LEGISLATION CONCERNANT L'UTILISATION DES HE POUR LES ANIMAUX DE PRODUCTIONS :**

##### **a. DEFINITION DU MEDICAMENT VETERINAIRE :**

La définition juridique du médicament vétérinaire, selon la directive européenne 2001/82/CE modifiée transposée à l'article L. 5111-1 du code de la santé publique combiné à l'article L. 51411 prévoit qu'un médicament est :

« a) toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies animales ; ou

b) toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'animal ou pouvant lui être administrée en vue soit de restaurer, de corriger ou de modifier des fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique, soit d'établir un diagnostic médical. » (07).

L'utilisation de produits à base de plantes dans le cadre des médecines complémentaires, et notamment dans le contexte de réduction de l'usage de certaines catégories de médicaments

comme les antibiotiques entraîne la classification des huiles essentielles en tant que médicament vétérinaire.

« La classification d'un produit en tant que médicament vétérinaire implique pour l'agence (Anses ANMV) :

- Une évaluation par rapport aux critères posés par les différentes catégories de produits réglementés afin de déterminer au plus juste la réglementation opposable, même si la classification médicament peut être privilégiée ;

- Au plan administratif de l'intégrer dans un processus d'évaluation (AMM, enregistrement de médicament homéopathique, autorisation d'importation ou ATU autorisation temporaire d'utilisation),

- De s'assurer que le circuit de production, distribution en gros et au détail respecte les exigences du Code de la santé publique : établissements pharmaceutiques et ayants droit (pharmaciens, vétérinaires ou groupements d'éleveurs agréés à cet effet). L'administration à un animal dans le cadre de thérapies alternatives nécessite le recours soit à des médicaments vétérinaires disposant d'une autorisation administrative délivrée par l'ANMV (AMM, enregistrement de médicament homéopathique, autorisation d'importation ou ATU autorisation temporaire d'utilisation) soit à des préparations magistrales sur prescription vétérinaire par l'usage de substances végétales ayant la qualité de matières premières d'usage pharmaceutique au sens de la pharmacopée française. Elles ne peuvent en aucun cas être utilisées directement par les détenteurs d'animaux dans le cadre d'automédication. En cas d'infraction persistante, l'Anses-ANMV peut être amenée à mettre en œuvre les pouvoirs de police sanitaire (interdiction de production, de distribution, de publicité) ou des sanctions financières ou encore la transmission d'un dossier aux tribunaux judiciaires. » (07).

#### **b. INSCRIPTION A LA PHARMACOPEE :**

La Pharmacopée française contient une liste très complète de plantes médicinales, comprenant des plantes à usage culinaire ou aromatique, et des monographies de produits à base de plantes (extraits, teintures ou huiles essentielles) et des monographies de teintures mères homéopathiques d'origine végétale (07).

#### **c. PUBLICATION D'UN DECRET PROMOUVANT L'UTILISATION DES MEDICAMENTS A BASE DE PLANTES :**

Le 16 août 2013, un décret (n°2013-752) permettant la possibilité de fournir un dossier allégé pour les demandes d'autorisation de mise sur le marché (AMM) de médicaments vétérinaires à base de plantes d'usage bien établi est paru. Grâce à cela, le dossier de demande peut faire référence à de la littérature publiée et reconnue dans la tradition de la médecine vétérinaire en phytothérapie pratiquée en France ou dans l'Union Européenne. Or la directive 2001/82/CE établissant un code communautaire pour les médicaments vétérinaires ne prévoit pas de procédure allégée spécifique aux médicaments à base de plantes. La parution de ce décret intervient dans le contexte du plan Ecoantibio 2012-2017. Il a pour objectif d'inciter les entreprises du médicament vétérinaire à déposer des demandes d'AMM pour des médicaments à base de plantes avec un dossier allégé et des redevances également minorées pour ce type de dossier. Cependant en médecine humaine, il existe une possibilité d'enregistrement simplifié des médicaments à base de plantes. Cette directive définit deux régimes pour leur mise sur le marché : - Un enregistrement si la substance végétale ou la préparation à base de plantes justifie d'un usage traditionnel trentenaire dont au moins 15 ans dans la Communauté européenne prouvant son innocuité et rendant plausible son efficacité - Une AMM si la substance végétale ou la préparation à base de plantes justifie d'un usage bien établi de 10 ans dans la Communauté européenne .

#### **d. CADRE REGLEMENTAIRE DE L'UTILISATION DES HUILES ESSENTIELLES :**

Le traitement d'un animal par aromathérapie, classe directement les huiles essentielles utilisées comme médicament. Soit une AMM est disponible, soit elles sont préparées sous forme de préparation extemporanée. Or aucune AMM n'est actuellement déposée pour cet usage. Ainsi seule la voie de la préparation extemporanée est possible. Les huiles essentielles utilisables sont listées dans le tableau 1 du règlement 37/2010 de la commission européenne. Aucune LMR n'est requise pour ces substances. Malgré le fait qu'aucune LMR ne soit requise, les délais d'attente à appliquer sont ceux correspondant à l'utilisation d'une préparation magistrale. Ainsi le temps d'attente lait forfaitaire est de 7 jours en agriculture conventionnelle et est donc doublé en agriculture biologique soit 14 jours. Le temps d'attente viande forfaitaire est de 28 jours en agriculture conventionnelle et en agriculture biologique de 56 jours. Le rapport de l'Anses de février 2016, propose d'appliquer un délai nul lorsque la LMR est non requise mais ceci n'est pas décrit par le texte réglementaire actuel. Actuellement, l'utilisation des HE est en infraction avec la législation en vigueur (02,41).

## 2. RESIDUS ET LMR DES HE

Pour pouvoir utiliser les HE sur des animaux de productions, il faut s'interroger sur les résidus qu'elles peuvent engendrer et si cela est préjudiciable à la santé humaine par la consommation de denrées animales. Ainsi « toute substance pharmacologiquement active destinée à être administrée à des animaux dont la chair ou les produits sont destinés à la consommation humaine doit avoir fait l'objet d'une évaluation du risque de résidus dans les denrées alimentaires d'origine animale pour l'espèce de destination du médicament en question par l'EMA. Les substances contenues dans un médicament vétérinaire doivent soit être inscrites au tableau 1 du règlement n°UE 37/2010, soit avoir fait l'objet d'une demande de détermination de LMR avant le dépôt de la demande d'AMM. » Or le tableau 1, dont cinquante substances comprenant des plantes et/ou des extraits de plantes, mentionne la catégorie aucune LMR requise sans restriction d'usage. Comme déjà expliqué précédemment, la mention « aucune LMR requise » n'implique pas l'application d'un temps d'attente de « zéro jour » lors de l'administration d'un médicament vétérinaire contenant la substance inscrite. Un temps d'attente est toujours défini même s'il est de « zéro jour » .

En ce qui concerne les temps d'attente appliqués dans les essais de terrain précédents, ils sont très variables. Dans un essai par administration intramammaire, le temps d'attente a été fixé à 96 heures (25). Dans l'essai suivant, le temps d'attente fixé était nul et une limite de détection a été fixée à 10 ppm. Sur 12 échantillons analysés à 12 heures post-traitement seulement deux dépassaient le seuil de 10 ppm avec comme marqueur présent dans le lait les molécules de thymol et de cinéol. Il n'a pas été possible de conclure du fait de l'hétérogénéité des résultats. Mais la tendance est tout de même à l'observation de taux résiduels faibles après le traitement (19). Pour l'essai avec application transcutanée d'un mélange d'HE, le temps d'attente a été fixé arbitrairement à 4 jours (03). D'autres praticiens conseillent un délai d'attente de 48 heures même

pour une application transcutanée sur la mamelle (18).

Dans la littérature scientifique, les publications concernant les résidus d'HE dans le lait sont peu nombreuses. Lors d'une injection intramammaire, chez 5 chèvres, de la spécialité Phytomast® composée de 4 HE dont le thym vulgaire et la gaulthérie couchée, seul le thymol et le salicylate de méthyl ont un pic plasmatique détectable. Le thymol reste la seule molécule détectable à de très faibles concentrations. Il est donc détecté à la fois dans des échantillons de lait et de plasma. Les résultats sont les suivants : le thymol est détecté 15 min post-traitement

dans le plasma. Le pic plasmatique de thymol est obtenu 30 min post-traitement. A 2 heures post-traitement, le taux plasmatique de thymol est inférieur à la limite de quantification et à 4 heures post-traitement, il est inférieur au taux de détection. Au niveau de la mamelle, le thymol est détectable à 12 heures post traitement dans le lait. Au bout de 24 heures, il n'est plus détectable dans le lait (42).

Une autre publication concernant les résidus de thymol (thym), carvacrol (thym,origan), diallyl disulfure (ail) et cinnamaldéhyde (cannelle) par administration orale chez des bovins donnent les résultats suivants. Deux quantités d'HE sont distribuées aux vaches par voie orale : d'une part 60 mg par jour par vache et d'autre part 10 fois la dose préconisée soit 600 mg par jour par vache. Le lait a été récolté pendant deux jours au cours de la dernière semaine d'expérimentation. Les limites de détection sont de 25 à 50 µg/L et les limites de quantification sont de 50 à 75 µg/L. Aucun des composés aromatiques cités précédemment n'a été retrouvé dans le lait quelle que soit la dose administrée per os (43,44).

#### **D. Perspectives pour le futur de l'utilisation des huiles essentielles :**

L'utilisation des HE pour le traitement des mammites est une pratique devenue assez courante. Les médecines complémentaires dont les HE font partie peuvent être utilisées seules mais aussi comme complément à un traitement allopathique. Quelques publications font part de résultats intéressants à ce sujet.

Une première publication, a testé des antibiotiques de la famille des aminosides sur des souches d'E. coli et de S. aureus multi-résistantes. Lors de l'utilisation des antibiotiques seuls, les souches bactériennes sont classées selon leur CMI, en statut résistantes et intermédiaires. Avec l'ajout d'HE de Romarin officinal, la majorité des souches deviennent sensibles avec une nette diminution de leur CMI. Ainsi in vitro, la présence d'HE modifie la capacité de résistance aux antibiotiques des souches bactériennes testées (45).

Une seconde publication, publiée dix ans plus tôt, avait déjà montré les effets de potentialisation de l'HE de Romarin officinal avec des antibiotiques (Tétracycline, érythromycine et norfloxacine) contre des souches de S. aureus multi-résistantes (46).

Une troisième publication a déterminé le mode d'action de l'HE de Thymus riararum. Elle empêche le bon fonctionnement des pompes à efflux et ainsi permet de rendre perméable la

membrane bactérienne. Cette HE permet d'obtenir un effet synergique avec les antibiotiques comme ici le chloramphénicol dont l'activité est potentialisée sur des souches bactériennes résistantes (21).

La piste de recherche sur l'association d'HE avec les antibiotiques pour pallier les phénomènes d'antibiorésistance n'est pas à négliger.

De plus comme le rappelle ce rapport réalisé par le centre d'étude et de prospectives en 2015, les antibiotiques ont été utilisés comme une solution pérenne et inépuisable pour lutter contre les infections bactériennes. Or leur utilisation a été trop largement banalisée. Les conséquences de cette utilisation non réfléchie a mené à l'augmentation de l'antibiorésistance dont la médecine humaine et vétérinaire font les frais aujourd'hui. L'antibiorésistance est un problème de santé publique majeure. Selon ce rapport, trois voies sont envisageables, dont certaines ont été récemment intégrées au plan Ecoantibio 2. La première piste de réflexion est la recherche de nouvelles molécules antibiotiques. La découverte de nouvelles molécules antibiotiques est une tâche difficile. Les dernières molécules antibiotiques (Céphalosporines de dernières générations et fluoroquinolones) mises sur le marché datent des années 1990.

La seconde piste est la recherche d'alternatives thérapeutiques aux antibiotiques (vaccins, médecines complémentaires telles que l'aromathérapie, la phytothérapie ou bien encore la phagothérapie). La troisième piste est la recherche de solutions techniques plus préventives touchant aux conduites d'élevage (biosécurité, bien-être animal, zootechnie) .

Pour pouvoir utiliser les HE dans le cadre légal, de nombreuses études complémentaires et la constitution de groupes de réflexions sur ce sujet sont nécessaires. Premièrement, il faudrait mettre en place des protocoles plus précis et dont l'efficacité est évaluée par le biais d'études de terrain. Ainsi il serait possible d'obtenir l'équivalent d'une AMM pour les préparations à base d'HE. L'autre sujet à aborder est celui des résidus potentiellement présents dans le lait et les tissus animaux à destination de la consommation humaine. Les HE listées dans le tableau 1 du règlement 37/2010 n'ont pas de LMR requise. Des études sur l'évaluation des résidus sont nécessaires pour pouvoir déterminer des délais d'attente en adéquation avec la réalité, sachant qu'à l'heure actuelle le délai d'attente est forfaitaire avec 7 jours pour le lait et 28 jours pour la viande dans le cas d'un élevage conventionnel.

Le second plan Ecoantibio est une opportunité à saisir pour le développement des médecines complémentaires. Il va permettre un regain d'intérêt pour ces médecines et la possibilité de les appliquer légalement sur le terrain.

### **Conclusion**

Les mammites ont des conséquences économiques importantes dans les élevages laitiers. . Elles sont d'origine multifactorielle ce qui rend leur maîtrise plus difficile. La lutte contre les mammites passe par la mise en place de mesures prophylactiques comme l'hygiène de la traite et du bâtiment. La qualité de la gestion des cas cliniques et de la détection des cas subcliniques font partie intégrante du plan de maîtrise sanitaire des mammites. Ces mesures sont essentielles pour diminuer leur prévalence et donc pour diminuer la consommation d'antibiotiques. De nos jours, la prévention est le mot clé. Le plan Ecoantibio 2 insiste particulièrement sur ce genre de mesures et sur la formation de tous les acteurs de la filière. Dans le cadre du traitement, l'aromathérapie en tant que médecine complémentaire donne de bons résultats in vitro sur des bactéries issues de mammites. En outre, leur pouvoir antibactérien n'est plus à prouver. Les HE contenant des phénols et des alcools sont celles ayant le pouvoir antibactérien le plus important. Mais on peut remarquer que la présence de nombreuses molécules dans une HE a une action synergique sur les bactéries et sur l'animal traité. L'aromathérapie est une alternative qui pourrait permettre la réduction de la consommation d'antibiotiques. Les HE n'agissent pas sélectivement sur les bactéries Il reste à accomplir de nombreux travaux concernant les HE et leur utilisation sur les mammites. De nouveaux essais de terrains avec des protocoles standardisés sont nécessaires pour donner aux éleveurs cette possibilité thérapeutique. L'analyse des résidus dans le lait est une étape essentielle pour déterminer des temps d'attente afin que ne soient plus appliqués les temps d'attente forfaitaires. Ainsi, la législation aura un socle sur lequel se baser afin d'utiliser les HE dans le cadre réglementaire.

## Liste de reference

1. ANSES (2016). Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2015, Rapport annuel Octobre 2016 Edition scientifique. Anses édition,
2. JOUET L. Huiles essentielles et infections mammaires. In : JNGTV (2016). Proceedings Nutrition et pratique vétérinaire du b.a.-ba à l'innovation, 18-20 mai 2016, Nantes. SNGTV, 984 p. 10
3. . 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.
4. . LABRE P. (2012). Médecines naturelles en élevage Tome 2: Phytothérapie et aromathérapie chez les ruminant et le cheval. Deuxième édition. Thônes : Editions Femenvet, 352 p.
5. BAKKALI F. et al. (2008). Biological effects of essentials oils – A review. Food and Chemical Toxicology, 46, pp. 446-475.
6. FRANCHOMME P., JOLLOIS R. et PENOEL D. (2001). L'aromathérapie exactement. Editions Roger Jollois, 490 p. 85
7. ANSES. Note sur le statut juridique du médicament vétérinaire au regard des produits à base de plantes [en ligne]. URL : <https://www.anses.fr/fr/system/files/ANMV-2013-09-25medicaments-et-produits-frontieres.pdf> [consulté le 05 juin 2017] 86. EFEO/IFRA. Directives relatives à l'identification de substances et à la similitude des substances naturelles complexes (SNC) en vertu des règlements REACH et CLP [en ligne]. URL : [https://www.echa.europa.eu/documents/10162/13643/efeo\\_ifra\\_guidelines\\_fr.pdf](https://www.echa.europa.eu/documents/10162/13643/efeo_ifra_guidelines_fr.pdf) [consulté le 07 juin 2017]
8. ALEXOPOULOS A. et al. (2011). Antibacterial activities of essential oils from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of Staphylococcus aureus. Anaerobe, 17(6), pp. 399-402
9. 81. ANSES (2016). Evaluation des demandes d'autorisation de mise sur le marché de médicaments vétérinaires à base de plantes. Avis de l'Anses, rapport d'expertise collective Edition scientifique. Anses édition, 119 p.

10. . NABAVI S.M. et al. (2015). Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food Chemistry*, 173, pp. 339-347.
11. ZAOULI Y., BOUZAINE T. et BOUSSAID M. (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), pp. 3144-3152.
12. ZHU et al. (2016). Bactericidal effects of Cinnamon cassia oil against bovine mastitis bacterial pathogens. *Food Control*, 66, pp. 291-299.
13. MULLEN K.A.E. et al. (2014). Short communication: An in vitro assessment of the antibacterial activity of plant-derived oils. *Journal of Dairy Science*, 97(9), pp. 5587-5591.
14. RIOS J.L., RECIO M.C. et VILLAR A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 23(2), pp. 127-149
15. RIOS J.L., RECIO M.C. et VILLAR A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 23(2), pp. 127-149
16. SHARMA A. et al. (2016). Antibacterial Activities of Medicinal Plants Used in Mexican Traditional Medicine, *Journal of Ethnopharmacology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.045>
17. AMBER R. et al. (2017). Antibacterial activity of selected medicinal plants of northwest Pakistan traditionally used against Mastitis in livestock, *Saudi Journal of Biological Sciences*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.02.008>
18. WILLIAMS L.R. et al. (1998). Essential oils with high antimicrobial activity for therapeutic use. *The International Journal of Aromatherapy*, 8(4), pp. 30-40.
19. MAUVISSEAU T. (2016). Le Phytogramme® : un nouvel outil utilisable en élevage. *Le point vétérinaire*, numéro spécial 47, pp. 76-83.
20. LESOT H. (2006). Essai thérapeutique d'un mélange de trois huiles essentielles en intramammaire sur les mammites cliniques en élevage agrobiologique. Thèse de doctorat vétérinaire. Nantes : Faculté de Médecine, 122 p.
21. DERBRE S., LIZNAR-FAJARDO P. et SFEIR J. (2013). Intérêt des huiles essentielles dans les angines à *Streptococcus pyogenes*. *Actualités Pharmaceutiques*, 52(530), pp. 46-50.

22. LEQUEUX G. et BOUTIN M. Aromatogramme : mise en place d'une méthodologie. Résultats préliminaires sur des souches de mammites bovines. In : JNGTV (2013). Proceedings la prévention, approches opérationnelles, 15-17 mai 2013, Nantes. SNGTV, 995 p.
23. AIEMSAARD J. et al. (2011). The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogen and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4775. *Research in Veterinary Science*, 91, pp. 31-37.
24. ANANDA BASKARAN S. et al. (2009). Antibacterial effects of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. *Journal of Dairy Science*, 92(4), pp. 1423-1429
25. 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
26. 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.
27. 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.
28. HERMAN A. et HERMAN A.P. (2015). Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(4), pp. 473-485.
29. FRATINI F. et al. (2014). Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. *Fitoterapia*, 96, pp. 1-7
30. . Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt. Le plan Ecoantibio 2012-2016, synthèse et principales réalisations [en ligne]. URL : <http://agriculture.gouv.fr/telecharger/82020?token=0dc468725c6d47906398a7ad4c5faa4a> [consulté le 07 juin 2017]
31. MUBARACK H.M. et al. (2011). Activity of some selected medicinal plant extracts against bovine mastitis pathogens. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(6), pp. 738-741.
32. 122. Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt. Ecoantibio2, plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire 2017-2021 [en ligne]. URL :

<http://agriculture.gouv.fr/telecharger/85068?token=ff73b081bc26158a3ef0bb9ad9206521> [consulté le 07 juin 2017]

33. ADAGE 35. Actes du colloque, le 24 mars 2014, Agrocampus Ouest-Rennes, Retour sur 6 années d'expérimentation avec les huiles essentielles sur les bovins [en ligne]. URL : [http://www.adage35.org/wp-content/uploads/2009/11/Colloque-HE-\\_24-03-2014\\_Actes.pdf](http://www.adage35.org/wp-content/uploads/2009/11/Colloque-HE-_24-03-2014_Actes.pdf) [consulté le 07 juin 2017] 124
34. Agence Bio. Chiffres de la bio en France [en ligne]. URL : <http://www.agencebio.org/la-bioen-france> [consulté le 07 juin 2017]
35. FRATINI F. et al. (2017). A novel interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The case *Origanum vulgare* L. and *leptospermum scoparium* J.R. et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiological Research*, 195, pp. 11-17.
36. MONTIRONI I.D., CARIDDI L.N. et REINOSO E.B. (2016). Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. *Revista Argentina de Microbiologia*, 48(3), pp. 210-216
37. Inter Bio Bretagne. Traitement des mammites bovines par l'aromathérapie [en ligne]. URL : <http://www.bio-bretagne-ibb.fr/wp-content/uploads/expe07-Ed2008-L4.pdf> [consulté le 07 juin 2017] 129
38. LEFEVRE C. et al. (2008). Le traitement des mammites cliniques de la vache laitière par des huiles essentielles. *Innovations Agronomiques*, 4, pp. 79-83.
39. Inter Bio Bretagne. Contrôle des mammites par l'aromathérapie [en ligne]. URL : [http://www.bio-bretagne-ibb.fr/wp-content/uploads/expe09ElevBovin\\_Res2009Ed2010\\_2.pdf](http://www.bio-bretagne-ibb.fr/wp-content/uploads/expe09ElevBovin_Res2009Ed2010_2.pdf) [consulté le 07 juin 2017]
40. LEFEVRE C. (2009). Traitement des mammites à partir d'huiles essentielles : *Thymus saturoïdes* et *Rosmarinus officinalis*. *Symbiose*, 136, pp. 10-11.
41. Chambre d'agriculture du Finistère. Phytothérapie et Huiles essentielles : réglementation [en ligne]. URL : [http://www.chambre-agriculturefinistere.fr/ca1/PJ.nsf/TECHPJPARCLEF/28162/\\$File/Liste%20plantes%20\(et%20huiles%20e%20ssentielles\)%20autoris%C3%A9es\\_2.pdf?OpenElement](http://www.chambre-agriculturefinistere.fr/ca1/PJ.nsf/TECHPJPARCLEF/28162/$File/Liste%20plantes%20(et%20huiles%20e%20ssentielles)%20autoris%C3%A9es_2.pdf?OpenElement) [consulté le 07 juin 2017]
42. McPHEE C.S. et al. (2011). Hot topic: Milk and plasma disposition of thymol following intramammary administration of a phytoceutical mastitis treatment. *Journal of Dairy Science*, 94, pp.1738–1743.

43. HALLIER A. et al. (2013). Development of a method to determine essential oil residues in cow milk. *Journal of Dairy Science*, 96, pp.1447–1454.
44. BARRETO H.M. et al. (2014). Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotics therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Industrial Crops and Products*, 59, pp. 290-294
45. . OLUWATUYI M., KAATZ G.W. et GIBBONS S. (2004). Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry*, 65, pp. 3249-3254. 140
46. Ministère de l’agriculture, de l’agroalimentaire et de la forêt. Les antibiorésistances en élevage : vers des solutions intégrées [en ligne]. URL : [http://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/cep\\_analyse82\\_antibioresistances\\_en\\_elevage.pdf](http://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/cep_analyse82_antibioresistances_en_elevage.pdf) [consulté le 21 juin 2017]